

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**  
**Laboratoire Conception et Applications de Molécules Bioactives**  
**Laboratoire Chimie Moléculaire**

# THÈSE

présentée par

**David Sigwalt**

Soutenue le

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline: Chimie

**Conception, synthèse et étude de dérivés de  
C<sub>60</sub> fonctionnalisés: applications biologiques et  
développement méthodologique.**

**THÈSE dirigée par:**

**M. Jean-Serge Remy**

Dr., Université de Strasbourg

**M. Jean-François Nierengarten**

Dr., Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS:**

**M. Jean-Louis Reymond**

Pr., Université de Berne

**M. Pierrick Hudhomme**

Pr., Université d'Angers

---

**MEMBRES DU JURY:**

**M. Jean-Marc Weibel**

Pr., Université de Strasbourg

**M. Robert Deschenaux**

Pr., Université de Neuchâtel



**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**  
**Laboratoire Conception et Applications de Molécules Bioactives**  
**Laboratoire Chimie Moléculaire**

# THÈSE

présentée par

**David Sigwalt**

Soutenue le

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline: Chimie

**Conception, synthèse et étude de dérivés de  
C<sub>60</sub> fonctionnalisés: applications biologiques et  
développement méthodologique.**

**THÈSE dirigée par:**

**M. Jean-Serge Remy**

Dr., Université de Strasbourg

**M. Jean-François Nierengarten**

Dr., Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS:**

**M. Jean-Louis Reymond**

Pr., Université de Berne

**M. Pierrick Hudhomme**

Pr., Université d'Angers

---

**MEMBRES DU JURY:**

**M. Jean-Marc Weibel**

Pr., Université de Strasbourg

**M. Robert Deschenaux**

Pr., Université de Neuchâtel



*« La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber,  
mais de se relever à chaque chute. »*

*Confucius*



## *Remerciements*

Ces trois années et demi de labeur ont été effectuées sous l'œil bien veillant de mes directeurs de thèse, le Dr Jean-Serge Remy et le Dr Jean-François Nierengarten. Je tiens à remercier JS de m'avoir permis de développer une culture interdisciplinaire (microscopie, culture cellulaire, analyses physico-chimiques). Cette ouverture d'esprit et ces outils seront, je pense, un atout certain pour la suite de ma carrière... Merci aussi pour m'avoir fait découvrir l'environnement mac, je crois que tu viens de faire un nouvel adepte!

Merci à JF de m'avoir permis de développer un esprit critique. Sa passion pour la chimie donne souvent lieu à des discussions très enrichissantes qui débouchent sur des projets fructueux. Sa carrière scientifique est un modèle à suivre.

Je remercie énormément le Dr Michel Holler. Son implication dans ma formation remonte à la licence et s'est poursuivie en master et encore aujourd'hui. Son aide au laboratoire et dans l'encadrement de T.P. m'a beaucoup apporté ainsi que son amitié en dehors du labo (apéro-meeting etc...). Et merci aussi pour avoir eu le courage d'être le premier lecteur-correcteur de cette thèse.

Je tiens à remercier les professeurs Piétrick Hudhomme, Jean-louis Reymond, Robert Deschenaux ainsi que le professeur Jean-Marc Weibel pour me faire l'honneur de juger cette thèse. J'adresse toute ma gratitude au professeur Weibel pour m'avoir guidé dans mes premiers pas dans l'enseignement.

Je tiens profondément à remercier tous les partenaires qui ont contribué aux travaux de cette thèse: le professeur Paola Ceroni et son équipe pour les analyses spectroscopiques qui ont été réalisées sur l'auto-assemblage d'un dérivé de  $C_{60}$  amphiphile.

Je remercie l'équipe du professeur Stéphane Vincent, pour m'avoir fourni des dérivés de mannose et avoir réalisé des tests d'hémagglutination sur mes composés, notamment Kevin Buffet.

Je remercie l'équipe du Dr Alain Wagner et du Dr Evelyne Schaeffer pour l'ensemble du projet  $C_{60}$  mannosylés. Grâce à eux un nouveau projet va voir le jour, à partir des résultats obtenus avec les  $C_{60}$  mannosylés.

Je tiens également à remercier: Michel Schmitt et Cyril Antheaume pour les mesures RMN; Christine Ruhlmann pour ma formation en MET; Jean-Marc Strubb pour les mesures

de spectrométrie de masse; Lydia BreLOT et Corinne Bailly pour les analyses RX; Denis Weltin pour les tests MTT.

Je remercie les membres de l'équipe du laboratoire de Chimie des Matériaux Moléculaires: Tchoupi pour m'avoir appris les bases expérimentales de la chimie organique, Vincent avec qui j'ai passé un excellent stage de master tant au labo qu'en dehors. Ces deux amis ont su distiller une bonne ambiance dans le labo permettant de travailler dans des conditions optimales. Meera, qui j'en suis sûr, s'en sortira, même sans l'aide de son gourou. Ruben, actuellement, éminent *assistant-professor* à l'université de Toledo, qui m'a appris les rudiments de la langue espagnole. Luis alias Mr propre et son colocataire de paille Nico. Maïda, Uwe, Iwona, Haifa, ainsi que tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire, notamment Thomas Biellmann.

Je remercie également les membres du laboratoire de Chimie génétique: le Dr Manue Morin-Picardat (alias *supergeek*) qui m'a énormément aidé pour élaborer la mise en page de cette thèse et d'une manière générale dans tous mes problèmes informatiques. Marc qui m'a appris la rigueur de la culture cellulaire. Clément, notre ami de chez Polyplus. Je remercie Phanélie pour le partage de sa bonne humeur. Je remercie également Mitsu, Rkia, Liliane et bien sûr Jérémy.

Je remercie tous mes amis thésards pour l'ensemble de votre soutien (paroles, bières, blagues...etc): Anne-Marie, Seb, Eric, Paco et la team Pale, Jacky, Charlie, Clothilde, Béné, Matthieu et tous ceux que j'oublie.

Je remercie toute ma famille au grand complet (Normandie, Picardie, Alsace). Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours laissé le choix dans mes études et toujours soutenu.

Je remercie tout particulièrement celle qui a dû me supporter pendant la rédaction de cette thèse et qui me supporte encore! Merci Julie.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mes travaux de thèse et qui n'ont pas été citées nommément.

# *Table des matières*



<b>Remerciements .....</b>	<b>7</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>9</b>
<b>Abréviations et Symboles .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction Générale .....</b>	<b>19</b>
<b>I. Généralités .....</b>	<b>21</b>
I. 1. Les fullerènes: une nouvelle famille de molécules.....	21
I. 2. Production des fullerènes .....	22
I. 3. Caractéristiques physico-chimiques du C <sub>60</sub> .....	23
I. 3. 1. Structure .....	23
I. 3. 2. Solubilité.....	24
I. 3. 3. Photophysique .....	25
I. 3. 4. Electrochimie.....	26
<b>II. Réactivité chimique du C<sub>60</sub>.....</b>	<b>26</b>
<b>III. Potentielles applications biologiques des fullerènes.....</b>	<b>31</b>
III. 1. Toxicité du C <sub>60</sub> .....	31
III. 2. Utilisation du C <sub>60</sub> et de ses dérivés comme photo-sensibilisateurs.....	32
III. 2. 1. Applications en PhotoThérapie Dynamique (PTD).....	33
III. 3. Activités antibactériennes et antivirales. ....	35
III. 4. Activité antioxydante.....	36
III. 5. Propriétés immunologiques. ....	38
III. 6. Système de délivrance. ....	38
III. 7. Endométallofullerènes (EMFs).....	39
<b>IV. Objectifs de thèse .....</b>	<b>40</b>
<b>V. Bibliographie .....</b>	<b>41</b>
<b>Chapitre 2 : Délivrance d'ADN plasmidique par des C<sub>60</sub> hexa-adduits polycationiques.....</b>	<b>47</b>
<b>I. Transfection par des vecteurs synthétiques: principes généraux .....</b>	<b>49</b>

II. Synthèse de C <sub>60</sub> polycationiques. ....	51
III. Etudes physico-chimiques et transfection sur des cellules HeLa de C <sub>60</sub> polycationiques. ....	56
IV. Conclusion .....	61
V. Partie expérimentale .....	62
VI. Bibliographie.....	73
<b>Chapitre 3 : Auto-assemblages de dérivés C<sub>60</sub> hexa-adduits .....</b>	<b>75</b>
I. C <sub>60</sub> amphiphiles décrits précédemment .....	77
II. Synthèse d'une série d'hexa-adduits amphiphiles .....	86
III. Auto assemblage d'un composé hexa-adduit avec une unité pyrène.....	94
IV. Conclusion .....	99
V. Partie Expérimentale .....	100
VI. Bibliographie.....	111
<b>Chapitre 4 : Synthèses de dérivés de C<sub>60</sub> multi-mannosylés .....</b>	<b>113</b>
I. Dérivés de C <sub>60</sub> fonctionnalisés par des sucres .....	115
II. C <sub>60</sub> mannosylés auto-assemblables: synthèse, caractérisation et premières évaluations biologiques. ....	121
III. C <sub>60</sub> autour d'un C <sub>60</sub> .....	133
III. 1. Construction d'un composé modèle .....	133
III. 2. Approche dendritique ultra rapide pour incorporer 120 sucres à partir de précurseurs C <sub>60</sub> hexa-adduits. ....	141
IV. Conclusion .....	147
V. Partie expérimentale .....	148
VI. Bibliographie.....	159
<b>Chapitre 5 : Synthèses régio-sélectives de dérivés bis et tris-adduits de C<sub>60</sub> .....</b>	<b>161</b>
I. Introduction .....	163
II. Synthèse de C <sub>60</sub> multi-adduits à partir de dérivés bis-adduits.....	168
III. Synthèse d'un dérivé tris-adduit de C <sub>60</sub> e, e, e. ....	184
IV. Conclusion .....	190
V. Partie Expérimentale .....	191

<b>VI. Bibliographie.....</b>	<b>206</b>
<b>Chapitre 6 : Conclusion générale.....</b>	<b>209</b>



## *Abréviations et Symboles*



Å	Angström
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AgF	Fluorure d'argent
ARN	Acide ribonucléique
BCA	Acide bicinchoninique
BET	Bromure d'éthydiu
BF <sub>3</sub>	Trifluorure de bore
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle
Bodipy	Bore-dipyrométhène
C <sub>60</sub>	Fullerène composé de 60 atomes de carbone
CBr <sub>4</sub>	Tétrabromure de carbone
CCl <sub>4</sub>	Tétrachlorure de carbone
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlorométhane
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CMC	Concentration micellaire critique
CS <sub>2</sub>	Disulfure de carbone
CsF	Fluorure de césium
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7ène
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DDL	Diffusion dynamique de la lumière
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Et <sub>2</sub> O	Ether diéthylique
EtOH	Ethanol
HCl	Chlorure d'hydrogène
HF	Fluorure d'hydrogène
Hz	Hertz
I <sub>2</sub>	Diode
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique
M	Molaire
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight
MeOH	Méthanol
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium
MET	Microscopie électronique à transmission
MTT	Bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NaH	Hydru de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaCl	Chlorure de sodium

nm	Nanomètre
O <sub>2</sub>	Dioxygène
ODCB	<i>Ortho</i> -dichlorobenzène
PEG	Polyéthylèneglycol
PEI	Polyéthylèneimine
pH	Potentiel hydrogène
ppm	Partie par million
RLU	Relative Light Unity / unité relative de lumière
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RX	Rayons X
SOD	Super Oxyde Dismutase
TBAF	Fluorure de tétrabutyle ammonium
TFA	Acide trifluoroacétique
TMS	Triméthylesilyle
THF	Tétrahydrofurane
THP	3,4-dihydro-2-pyrane
TsOH	Acide <i>para</i> -toluène sulfonique
UV	Ultraviolet

*Chapitre 1 :*  
*Introduction Générale*



## I. Généralités

### I. 1. Les fullerènes: une nouvelle famille de molécules.

Tout comme le graphite et le diamant, les fullerènes constituent une famille allotropique du carbone. A l'instar de ces deux matériaux, les fullerènes peuvent être solubles dans des solvants organiques. Ceci a permis aux chimistes de considérablement développer la chimie des fullerènes.

Les fullerènes sont des molécules sphériques constituées de pentagones et d'hexagones. Le fullerène le plus abondant obtenu par les méthodes classiques de production est le  $C_{60}$ , aussi appelé buckminsterfullerène en raison de sa ressemblance avec les dômes géodésiques créés par l'architecte Richard Buckminster Fuller. L'homologue  $C_{70}$  est le second fullerène obtenu en abondance, les autres sont obtenus en faible quantité.

La possibilité de former des cages de carbone est émise à la fin des années 60.<sup>1</sup> En 1970, à la suite de la synthèse du corannulène,<sup>2</sup> *Osawa* propose le premier une structure en icosaèdre tronquée pour le fullerène  $C_{60}$ .<sup>3</sup> En 1984, l'analyse de la vaporisation de graphite par irradiation au laser par spectrométrie de masse montre la formation de *cluster* de carbone avec un nombre de carbone de 30 à 190.<sup>4</sup> Le *cluster*  $C_{60}$  est le plus abondant puis vient ensuite le  $C_{70}$ . Les auteurs n'identifièrent pas la structure des agrégats formés et c'est un an plus tard que *Smalley*, *Curl* et *Kroto* attribuèrent la structure du  $C_{60}$  à celle d'un ballon de football avec 20 hexagones et 12 pentagones, chacun des pentagones étant entouré de 5 hexagones<sup>5</sup> (Figure 1.1).

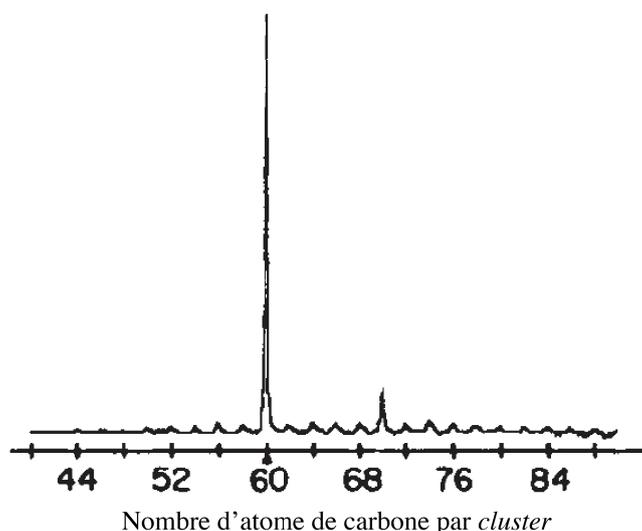


Figure 1.1: Spectre de masse (MALDI-TOF) obtenu par Smalley, Curl et Kroto.<sup>5</sup>

## I. 2. Production des fullerènes

En 1990, *Krättschmer* et *Huffman* inventent la première méthode de production de fullerènes en quantité macroscopique.<sup>6</sup> Deux tiges de graphites en contact par leur pointe, sous atmosphère d'hélium, sont connectées à des électrodes, ce qui produit un arc électrique (Figure 1.2). Les suies produites contiennent des fullerènes de différentes tailles, du carbone amorphe et des nanotubes. Une extraction au toluène permet d'isoler les fullerènes inférieurs à  $C_{100}$ . Puis une séparation chromatographique sur alumine (hexane/toluène, 95:5) permet d'isoler le  $C_{60}$  et le  $C_{70}$ . Les autres fullerènes extraits sont obtenus par plusieurs cycles de CLHP.

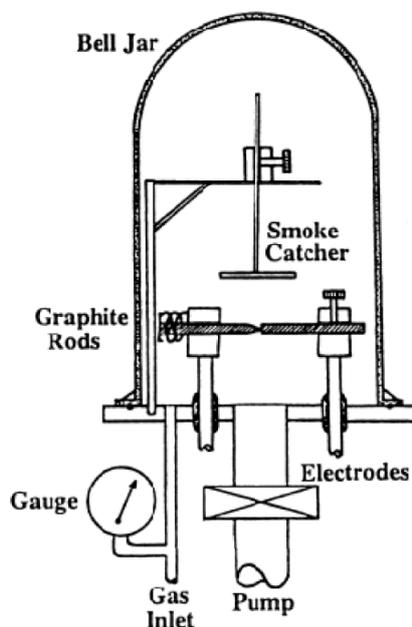


Figure 1.2: Système de production de fullerènes mise en place par *Krättschmer* et *Huffman* (D'après «Fullerenes Chemistry and Reaction» de Andreas Hirsch et Michael Brettreich (Wiley-VCH, 2002))

Une autre possibilité consiste en la combustion d'une flamme laminaire de benzène/oxygène et argon.<sup>7,8</sup> L'utilisation de ce procédé à l'échelle industrielle par la compagnie *Frontier Carbon Corporation* a permis une production de 40 tonnes en 2003. Le développement industriel a diminué les coûts de production et donc le prix final des fullerènes (environ 25\$ le gramme pour du  $C_{60}$ ).

En 2008, la condensation d'un dérivé polyaromatique  $C_{60}H_{30}$  par une catalyse en surface de platine, à 750 Kelvin, a permis d'obtenir quantitativement du  $C_{60}$ <sup>9</sup> (Figure 1.3). Ce procédé semble intéressant pour une production en masse de ce fullerène.

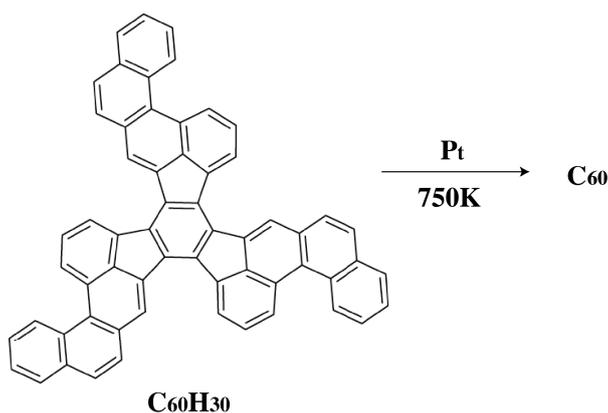


Figure 1.3: Synthèse quantitative de C<sub>60</sub> à partir de C<sub>60</sub>H<sub>30</sub> (obtenu en 2 étapes depuis le truxène).

La suite de ce chapitre sera essentiellement consacrée à l'étude du C<sub>60</sub>, qui a été le matériau de base de tous les produits présentés dans la suite de ce manuscrit et se contentera de résumer ses principales caractéristiques ainsi que sa réactivité. Le lecteur désireux d'avoir une vue détaillée et complète sur les principes et la chimie des fullerènes, notamment celle du C<sub>60</sub>, est invité à consulter deux livres de référence: «Fullerenes Chemistry and Reaction» de Andreas Hirsch et Michael Brettreich (Wiley-VCH, 2002) et «Fullerenes Principles and Applications» édité par Fernando Langa et Jean-François Nierengarten (RSC Publishing, 2011).

### I. 3. Caractéristiques physico-chimiques du C<sub>60</sub>.

#### I. 3. 1. Structure

Le C<sub>60</sub> est une molécule hautement symétrique (icosaèdre tronqué, groupe de symétrie I<sub>h</sub>). Tous les atomes du C<sub>60</sub> sont équivalents et ceci est vérifié par son spectre RMN <sup>13</sup>C qui montre un unique pic à 143,2 ppm<sup>10</sup> (Figure 1.4).

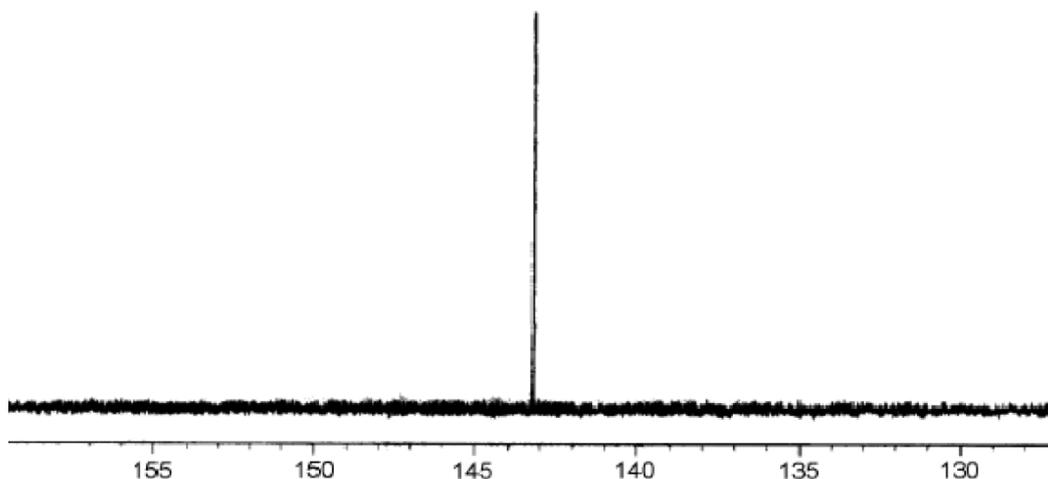


Figure 1.4: Spectre RMN <sup>13</sup>C du C<sub>60</sub> dans du benzène deutéré.<sup>10</sup>

Le  $C_{60}$  est constitué de 20 hexagones et 12 pentagones, chacun des pentagones étant entouré de 5 hexagones. Les jonctions entre un pentagone et un hexagone correspondent à des liaisons [5-6] et les jonctions entre deux hexagones correspondent à des liaisons [6-6] (Figure 1.5). Le diamètre de la molécule est d'environ 10 Å.<sup>11</sup> Différentes méthodes (théoriques,<sup>12-15</sup> RMN,<sup>16</sup> diffraction de neutrons,<sup>17</sup> diffraction d'électrons,<sup>18</sup> rayons X<sup>19</sup>) ont permis de déterminer la taille de ces liaisons. Ainsi, les liaisons [5-6] ont une longueur de 1,45 Å et les liaisons [6-6] ont une longueur de 1,38 Å. Les liaisons [6-6] ont un caractère de liaison double et par conséquent la réactivité de la sphère de carbone est principalement axée sur les jonctions [6-6]. L'hybridation des carbones peut être assimilée  $sp^2$ . Cependant un mauvais recouvrement des orbitales  $\pi$  est constaté à cause de la géométrie sphérique de la molécule.

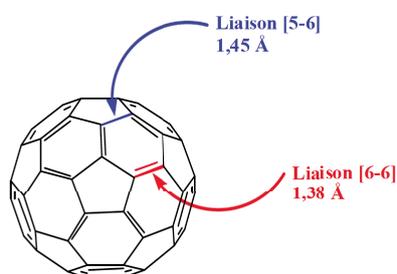


Figure 1.5: Représentation du  $C_{60}$  et de ses deux types de liaisons.

### I. 3. 2. Solubilité

La solubilisation d'un composé organique est souvent essentielle pour effectuer des transformations chimiques. Une étude systématique a permis de mettre en avant les solvants les plus efficaces pour solubiliser le  $C_{60}$ .<sup>20</sup> Une tendance générale se dégage: les solvants aromatiques permettent la meilleure solubilisation. Les dérivés du naphthalène solubilisent le plus le  $C_{60}$ , jusque 51 mg/mL pour le 1-chloronaphtalène. Puis viennent ensuite, le benzène (1,7 mg/mL) et ses dérivés (1,2-dichlorobenzène ou ODCB, 27 mg/mL). Le  $CS_2$  fournit une solubilité de 7,9 mg/mL. Les solvants chlorés ( $CCl_4$ ,  $CHCl_3$ ,  $CH_2Cl_2$ ) ne sont pas de bons solvants pour le  $C_{60}$ , ainsi que les solvants apolaires aliphatiques (*n*-hexane, *n*-pentane) ou cycliques (decaline, cyclohexane). Les solvants polaires (THF, acétone, MeOH...) ne solvatent pas du tout le  $C_{60}$ . Même dans le meilleur des solvants, le  $C_{60}$  est un composé peu soluble.

### I. 3. 3. Photophysique

Le spectre d'absorption du  $C_{60}^{10}$  est caractérisé par plusieurs fortes bandes d'absorptions entre 200 et 410 nm (Figure 1.6) dues à aux transitions  $\pi-\pi^*$ . L'absorption entre 410 et 620 nm est responsable de la couleur magenta du  $C_{60}$  en solution.

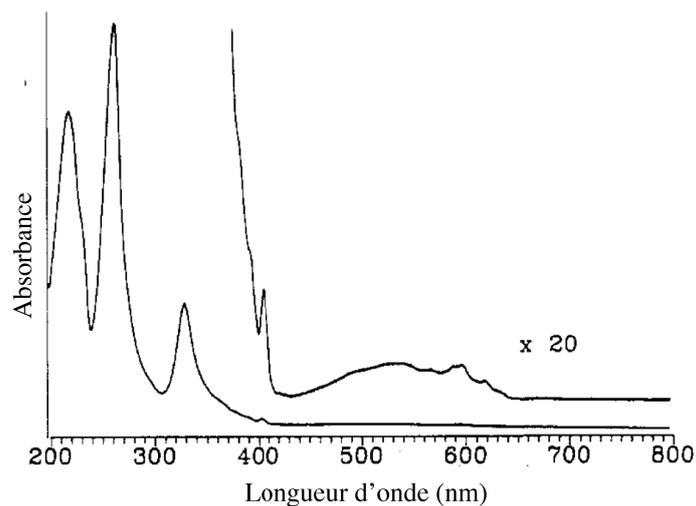


Figure 1.6: Spectre d'absorption du  $C_{60}$  dans du  $n$ -hexane.

Le fullerène  $C_{60}$  est une espèce capable de subir une désexcitation de son état singulet *via* un Croisement Inter Système (CIS) pour atteindre un état triplet, ce processus est quasi-quantitatif<sup>21</sup> (Figure 1.7).

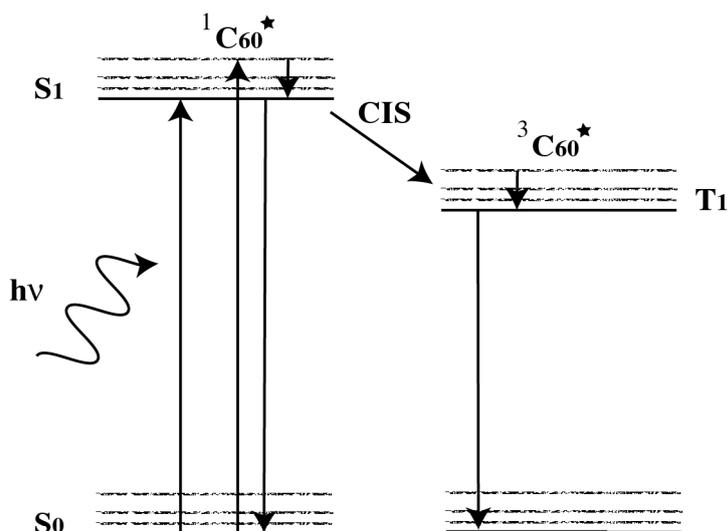


Figure 1.7: Diagramme de Jablonski du  $C_{60}$ .

Cet état triplet peut suivre une variété de processus de désactivation, notamment par un transfert d'énergie à une molécule de O<sub>2</sub> provoquant la production d'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>\*) ou par un transfert d'électron avec un donneur d'électron. Ces deux processus sont particulièrement intéressants pour de potentielles applications en science des matériaux (création de systèmes donneur-accepteur donnant lieu à des processus de transfert d'électron photoinduit, matériaux photovoltaïques) ou en biologie (les applications seront résumées dans la partie III de ce chapitre).

### I. 3. 4. Electrochimie

Le C<sub>60</sub> peut accepter jusqu'à six électrons par une série de mono-réductions successives.<sup>22,23</sup> Si le fullerène peut être facilement réduit, son oxydation est difficile et nécessite des conditions anhydres strictes et l'absence de nucléophile. Ainsi trois mono-oxydations successives ont pu être observées à -60°C en utilisant un électrolyte non-nucléophile (l'hexafluoroarsenate de tétrabutylammonium).<sup>24</sup>

Le C<sub>60</sub> est donc un bon accepteur d'électron, ce qui donne une bonne indication quand à sa réactivité chimique.

## II. Réactivité chimique du C<sub>60</sub>

La réactivité du C<sub>60</sub> est gouvernée par sa géométrie sphérique. Les carbones d'hybridation sp<sup>2</sup> ne sont pas plans. Cette pyramidalisation des carbones induit «une tension» de cycle. Changer l'hybridation sp<sup>2</sup> en sp<sup>3</sup> des carbones permet de relâcher de la tension de cycle. Ainsi, comme les études électrochimiques le montrent, le C<sub>60</sub> est bon accepteur d'électron et de fait un bon électrophile. Sa réactivité peut être assimilée à celle d'une polyoléfine déficiente en électron.

A propos de l'aromaticité du C<sub>60</sub>, encore une fois à cause de la sphéricité de la molécule, le recouvrement des orbitales π est mauvais. Ceci ne permet pas une délocalisation des électrons sur l'ensemble de la sphère, cette molécule n'est donc pas un «superaromatique».

La majorité des réactions sur le C<sub>60</sub> se font sur les liaisons [6-6]. La Figure 1.8 résume les principales réactions réalisées sur le C<sub>60</sub>. En tant que bon électrophile, C<sub>60</sub> réagit facilement avec des espèces nucléophiles variées par addition. L'addition génère un intermédiaire NuC<sub>60</sub><sup>-</sup>, celui-ci réagit ensuite avec un électrophile (H<sup>+</sup>, dans la représentation) préférentiellement en position 1,2, sauf si l'électrophile est encombré.

Le  $C_{60}$  est un bon diénoophile et dipolarophile. En conséquence, il réagit facilement dans toutes sortes de cycloaddition ([4+2], [3+2], [2+2], [2+1]).

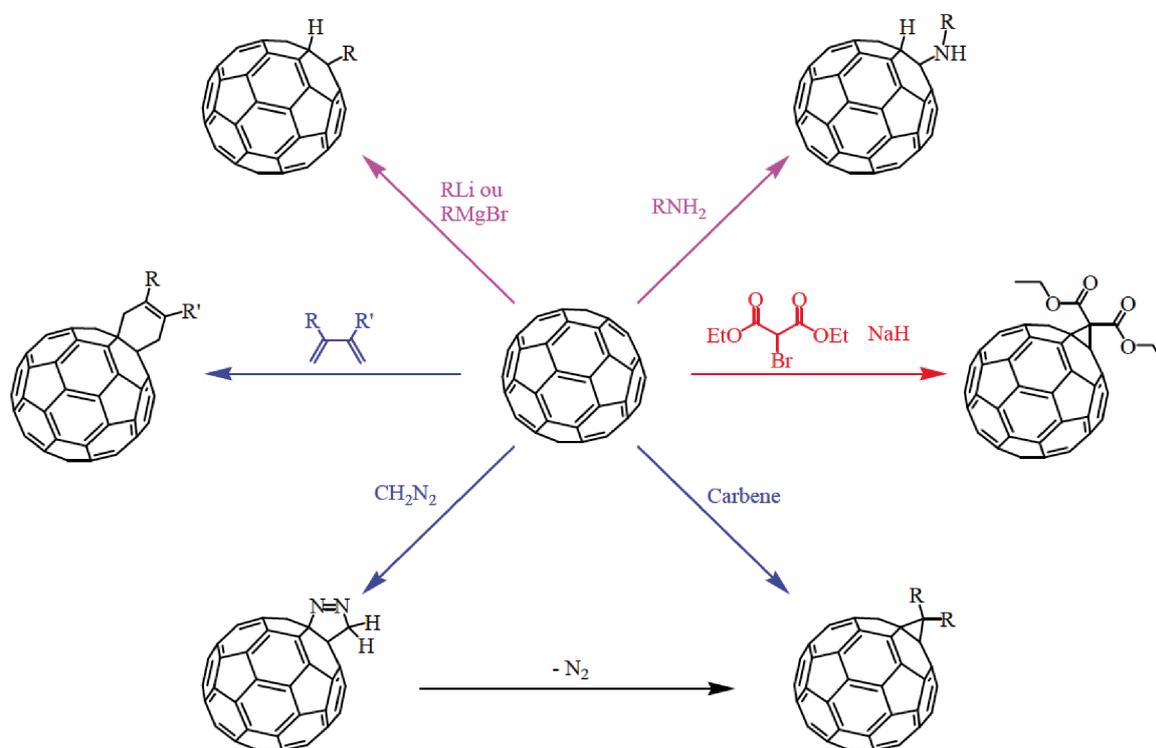


Figure 1.8: Schéma résumant les principales réactions ayant lieu sur le  $C_{60}$ . (D'après Julien Iehl, Thèse de doctorat «La chimie click appliquée à des dérivés de  $C_{60}$ », UDS, 2010).

Les réactions de *Diels-Alder* (cycloaddition [4+2]) peuvent être réversibles. Cette réversibilité a permis de développer une méthodologie efficace pour créer des  $C_{60}$  hexa-adduits de symétrie octaédrique en utilisant du diméthylanthracène comme groupe directeur.<sup>25</sup>

Les réactions [3+2] peuvent, par exemple, être menées par des dérivés diazo. Dans un premier temps, la cycloaddition [3+2] forme un cycle à cinq chaînons puis un réarrangement (extrusion de  $N_2$ ) forme le cyclopropane correspondant. La cycloaddition 1,3-dipolaire<sup>26,27</sup> d'un ylure d'azométhine généré *in situ* par réaction d'un aldéhyde avec de la sarcosine est largement utilisée dans la chimie des fullerènes du fait de sa compatibilité avec différents groupes fonctionnels (Figure 1.9).

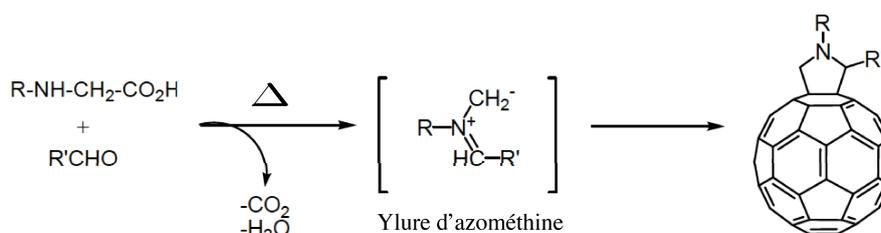


Figure 1.9: Cycladdition 1,3-dipolaire. La formation de fulleropyrrolidines passe par un intermédiaire réactionnel, un ylure d'azométhine.

Les réactions [2+1] sont généralement produites par une réaction entre un carbène ou un nitrène et du  $\text{C}_{60}$ .

Une autre réaction couramment employée (si ce n'est la plus employée) est la réaction de *Bingel*<sup>28</sup> (Figure 1.10). La déprotonation par NaH d'un  $\alpha$ -bromomalonate permet une addition nucléophile sur la sphère de carbone. Puis dans un deuxième temps, l'anion généré sur le  $\text{C}_{60}$  va réaliser une substitution nucléophile intra-moléculaire pour former un cyclopropane et donner un dérivé mono-adduit.

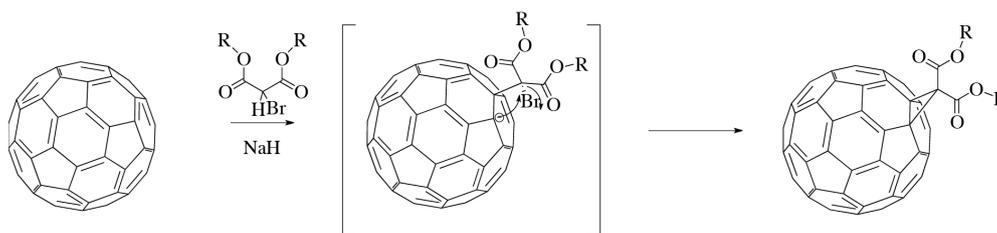


Figure 1.10: Réaction de *Bingel*.

Cette réaction a été optimisée (Figure 1.11). L' $\alpha$ -bromomalonate est généré *in situ* en présence de  $\text{CBr}_4$  et de DBU.<sup>29</sup> Une autre variation de la réaction est la génération *in situ* d'un  $\alpha$ -iodomalonate en présence de  $\text{I}_2$  et de DBU.<sup>30</sup> Cette réaction est facile à mettre en œuvre et fournit de bons rendements.

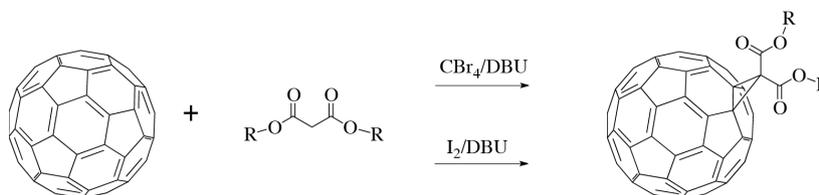


Figure 1.11: Optimisation de la réaction de *Bingel*, par le groupe de *Hirsch* ( $\text{CBr}_4/\text{DBU}$ ) et *Diederich* ( $\text{I}_2/\text{DBU}$ ).

Sous certaines conditions, cette réaction peut mener à des dérivés de  $\text{C}_{60}$  hexa-adduits avec un motif d'addition octaédrique spécifique. En fait, l'ajout de diméthylanthracène

comme groupement directeur permet d'obtenir divers hexa-adduits<sup>25,29</sup>. Là aussi, une autre variante permet d'obtenir le même type de dérivés hexa-adduits, en utilisant un large excès de  $\text{CBr}_4$  (100 équivalents).<sup>31</sup> Dans ces conditions, le  $\text{CBr}_4$  peut générer du  $\text{CBr}_3^-$ , peu nucléophile mais probablement assez pour jouer le même rôle de groupement directeur que le diméthylanthracène (résultats non publiés, voir Julien Iehl, Thèse de doctorat «La chimie click appliquée à des dérivés de  $\text{C}_{60}$ », Chapitre III, p.101, UDS, 2010).

La spécificité de la réaction est due à la possibilité d'additions réversibles du groupement directeur sur les liaisons [6-6] (Figure 1.12). Le système est dynamique et l'équilibre se déplace vers le  $\text{C}_{60}$  hexa-substitué le plus stable. Ce dernier est le dérivé hexa-substitué sur toutes les positions équatoriales, de fait les carbones  $\text{sp}^2$  restants forment huit cycles à six chaînons qui retrouvent un caractère benzénique (Figure 1.13).<sup>25</sup> Ces additions activent alors les liaisons équatoriales, et des additions irréversibles séquentielles à partir du malonate donnent le composé hexa-adduit final. En d'autres termes, la formation des liaisons covalentes étant dynamique, la réaction se fait sous contrôle thermodynamique permettant ainsi d'orienter la régiochimie vers la formation de l'hexa-adduit du  $\text{C}_{60}$  le plus stable.

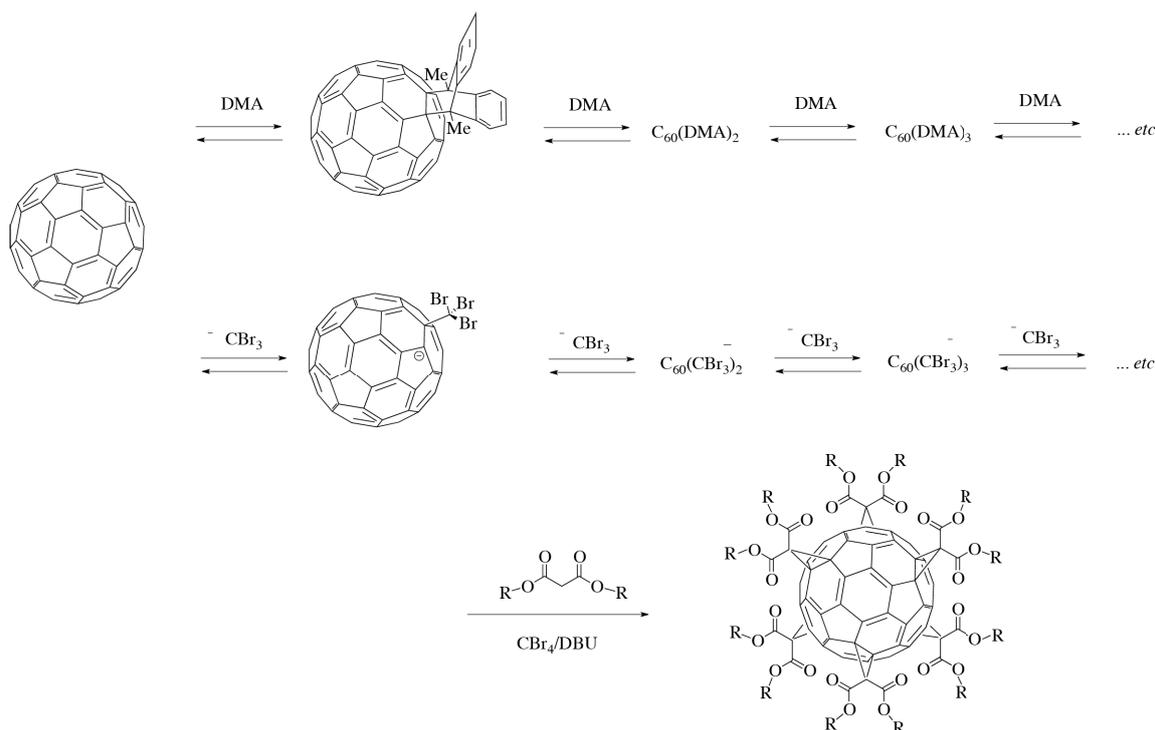


Figure 1.12: L'utilisation de DiMéthylAnthracène (DMA) ou d'un excès de  $\text{CBr}_4$  permet la formation spécifique d'hexa-adduits octaédriques, avec de bons rendements.

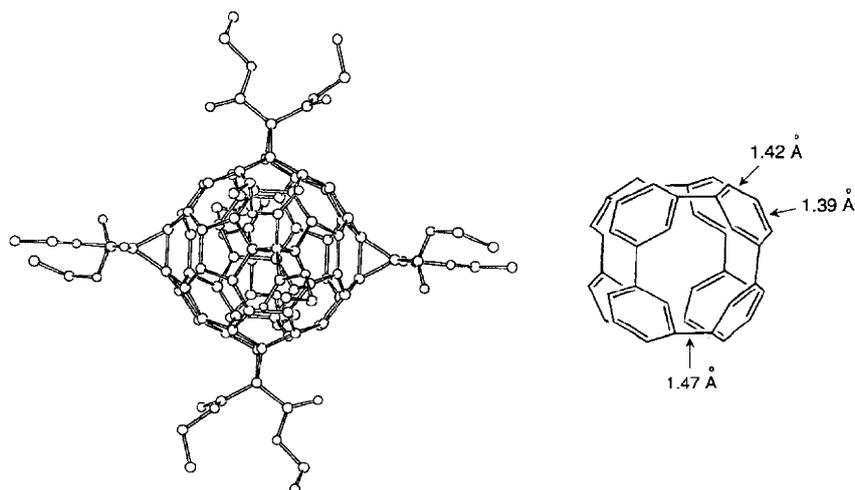


Figure 1.13: Première structure cristallographique d'un  $C_{60}$  hexa-adduit de symétrie octaédrique obtenue par l'équipe de Hirsch<sup>25</sup>. Les huit cycles à six chaînons récupèrent une aromaticité locale.

Cette réaction est efficace pour former une large variété de  $C_{60}$  hexa-adduits. Cependant, lorsque les malonates deviennent trop encombrés l'addition de ceux-ci sur la sphère de carbone se fait avec de faibles rendements ou n'est pas possible. C'est pourquoi notre équipe a développé une méthodologie de post-fonctionnalisation par «click chemistry» pour insérer des malonates encombrés.<sup>32,33</sup> La *click chemistry* est un outil compatible avec un grand nombre de fonctionnalités chimiques. En partant d'un hexa-adduit portant six malonates simples diazotures ou dialcynes, une large variété de dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits inaccessibles par une autre voie de synthèse a été créée.<sup>32-43</sup>

*A propos de la réactivité de la sphère de carbone des  $C_{60}$  hexa-adduits.* La réactivité de la sphère de carbone est drastiquement diminuée comparée à un  $C_{60}$  mono-di-tri-ou encore tetra-substitué. En effet, après chaque addition sur le fullerène, de la tension de cycle est relâchée et les carbones  $sp^2$  restant retrouvent un caractère benzénique, donc une certaine stabilité, donc une réactivité amoindrie. Des études électrochimiques montrent que la réduction des  $C_{60}$  hexa-adduits devient difficile comparée au dérivé mono-substitué.<sup>32,44-46</sup> Ainsi le cœur  $C_{60}$  de ces composés est un moins bon accepteur d'électron.

Récemment, notre équipe en collaboration avec l'équipe de Raymond Ziessel et Anthony Harriman a greffé des fluorophores (Bodipy) sur des  $C_{60}$  hexa-adduits.<sup>36</sup> Les études photo-physiques et électro-chimiques ont démontré que les transferts d'énergie ou d'électrons sur le  $C_{60}$  étaient très faibles mais que des transferts d'énergie avaient lieu quasi-uniquement entre les fluorophores. Ainsi, cette étude confirme que le cœur  $C_{60}$  est une plateforme peu réactive.

La physico-chimie des dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits est donc principalement gouvernée par les groupements greffés en surface.

### III. Potentielles applications biologiques des fullerènes.

Deux livres récents présentent les avancées de ce domaine: «Fullerenes Principles and Applications», chapitre 14, édité par Fernando Langa et Jean-François Nierengarten (RSC Publishing, 2011) et «Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes» édité par Franco Cataldo et Tatiana Da Ros (Springer, 2008).

Un résumé des applications biologiques avec des exemples choisis sera présenté dans cette partie.

#### III. 1. Toxicité du $C_{60}$ .

La toxicité des fullerènes envers les organismes vivants est principalement gouvernée par le degré de fonctionnalisation de la sphère de carbone et les substituants greffés. En effet, la réactivité de la sphère de carbone diminue en fonction du nombre d'adduits présents à sa surface. Le  $C_{60}$  nu et peu fonctionnalisé semble présenter une toxicité liée à la possibilité de former des ROS (*Reactive Oxygen Species*).<sup>47-49</sup> Cependant, le niveau de dangerosité des fullerènes n'est pas encore établi et reste à être défini clairement. En effet, d'autres équipes n'ont pas observé de cyto-toxicité du  $C_{60}$  en milieu biologique, et concluent même que les fullerènes sont des entités non-toxiques.<sup>50,51</sup>

La solubilité du  $C_{60}$  dans l'eau est nulle et c'est sous forme de suspension colloïdale ( $nC_{60}$ ) que la molécule s'organise. Ces agrégats peuvent être obtenus par évaporation successive de solvants organiques pour conduire à une suspension colloïdale. L'origine de la cytotoxicité de ces suspensions est source de discordance.<sup>50</sup> Les solvants organiques utilisés (notamment le THF) pour la préparation des suspensions pourraient être à l'origine de la cytotoxicité de ces suspensions et le  $C_{60}$  n'aurait donc aucune responsabilité.<sup>52</sup>

La toxicité d'un dérivé mono-adduit et d'un composé tris-adduit hydrosolubles a été déterminée sur des lignées cellulaires Jurkat.<sup>53</sup> Une faible toxicité a été observée pour le dendrofullerène, alors qu'aucune toxicité n'a été identifiée pour le tris-adduit. De plus cette toxicité est réversible: quand le milieu de culture est renouvelé sans la présence du dendrofullerène, la croissance des cellules redevient normales.

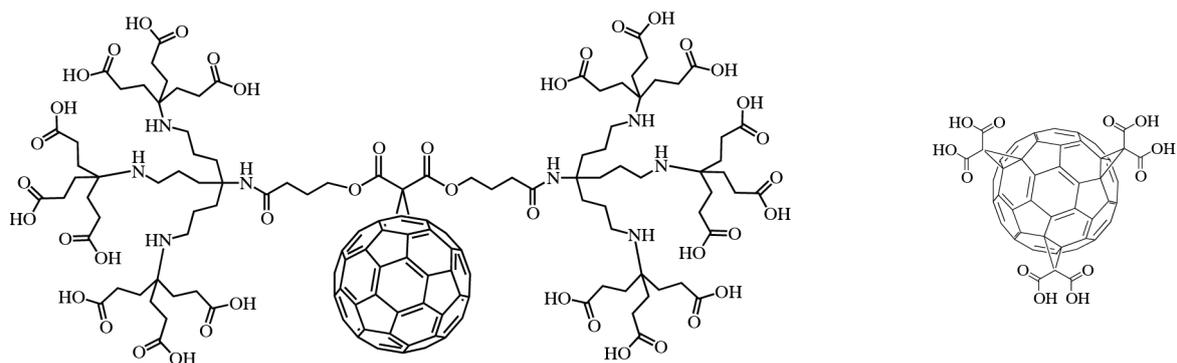


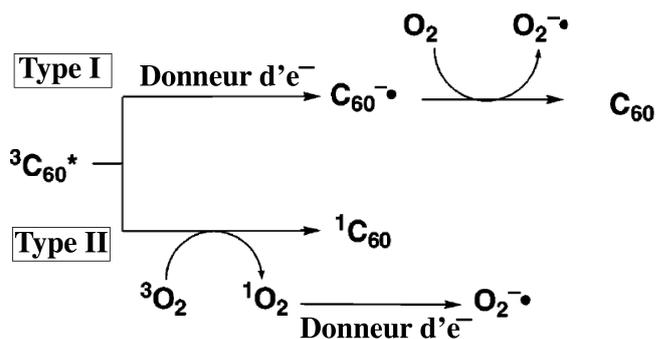
Figure 1.14: Dendrofullerène mono-adduit et fullerène tris-adduit (couramment nommé  $C_3$ ) soluble en milieux aqueux.

A l'heure actuelle, la cytotoxicité ou non des fullerènes n'est pas établie. De plus, leur cytotoxicité est étroitement liée aux groupements fonctionnels greffés. Ainsi, pour des  $C_{60}$  hexa-adduits, la réactivité de la sphère de carbone est faible et le  $C_{60}$  a fonction de support inerte. La toxicité des composés hautement substitués du  $C_{60}$  est donc gouvernée par les substitués greffés plus que par la sphère de carbone en elle-même.

### III. 2. Utilisation du $C_{60}$ et de ses dérivés comme photo-sensibilisateurs.

De part sa structure électronique, le  $C_{60}$  peut être un bon photosensibilisateur. En effet, la possibilité de photo-exciter le  $C_{60}$  permet de créer une entité à l'état triplet (Figure 1.7). En milieux aqueux et biologiques, cet état triplet peut suivre une désexcitation par deux voies principalement<sup>54</sup> (Figure 1.15). La première voie (type I) passe par la réduction du  $C_{60}$  en  $C_{60}^{\cdot-}$ , par un donneur d'électron (par exemple le NADH qui est un réducteur ubiquitaire dans le monde du vivant). Ce radical anion peut ensuite générer des radicaux libres. Le principal radical généré est l'ion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . La seconde voie (type II) passe par un transfert d'énergie à la molécule de  $O_2$  (abondante dans les systèmes vivants). Ce transfert d'énergie permet la conversion d'oxygène triplet en oxygène singulet, un puissant oxydant qui peut directement être toxique pour les cellules ou être converti en ion superoxyde.

$O_2^{\cdot-}$  peut être dégradé en radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) hautement réactif, ou par exemple réagir avec  $NO^{\cdot}$  pour produire l'ion peroxydrite ( $OONO^{\cdot}$ ) très réactif. D'une manière générale, la création de radicaux libres engendre des réactions en chaînes (oxydation des lipides membranaires, oxydation/clivage de l'ADN, oxydation des acides aminés...) létales pour les cellules.

Figure 1.15: Production de radicaux par l'intermédiaire de C<sub>60</sub> à l'état triplet.

### III. 2. 1. Applications en PhotoThérapie Dynamique (PTD).

La PTD repose sur l'utilisation d'un photosensibilisateur, qui une fois irradié, pourra créer des espèces radicalaires qui pourront tuer les cellules *via* la production de radicaux libres.<sup>55</sup> Cette technique s'appuie sur l'utilisation d'un laser qui irradiera spécifiquement la zone à traiter. Ces applications seraient basées sur le traitement des tissus de surface (tumeurs de la peau, des muqueuses, acnés sévères...), car le laser ne peut pas pénétrer les tissus en profondeur.

Le C<sub>60</sub> nu pourrait montrer un pouvoir photosensibilisant. Irradié, il peut produire des espèces radicalaires et détruire des cellules. Le groupe de *Prylutskyy* a montré qu'une préparation colloïdale de C<sub>60</sub>, une fois irradiée, pouvait détruire des cellules du thymus de rat *Winstar*.<sup>56</sup>

En 1997, l'équipe d'*Ikada*, a utilisé du C<sub>60</sub>-PEG (mélange d'isomères, avec en moyenne quatre PEG par C<sub>60</sub>) en injection par intra-veineuse sur des souris ayant une tumeur sub-cutanée.<sup>57</sup> D'après les auteurs, les PEG permettent non seulement de rendre le C<sub>60</sub> hydrosoluble mais aussi d'avoir une accumulation du composé dans la tumeur. Après irradiation laser, les auteurs ont constaté une diminution significative de la masse tumorale. Ainsi, ce dérivé permet après photosensibilisation de détruire des cellules.

Le groupe de *Hamblin* a testé une série de photosensibilisateurs (Figure 1.16) sur trois lignées cellulaires cancéreuses de souris.<sup>58</sup> Les dérivés de C<sub>60</sub> utilisés varient en fonction de leur degré de substitution (un à trois) et des groupes solubilisants utilisés (diols ou sel de pyrrolidinium). Ainsi, les C<sub>60</sub> mono-substitués ont montré une efficacité intéressante pour la destruction des cellules. En comparaison, les dérivés bis- et tris-adduits semblent moins efficaces. La photosensibilisation de type I semble être la voie principale qui permet la production de ROS.

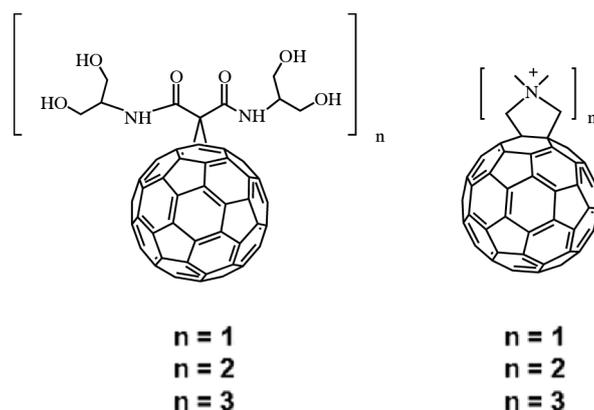


Figure 1.16: Composés testés en tant que photosensibilisateurs.

Ces dérivés ont aussi été testés en tant qu'agent antimicrobien par PTD.<sup>59</sup> Dans ce cas-ci, le dérivé tris-adduit pyrrolidinium a montré la plus forte efficacité, probablement parce que ce composé a l'interaction la plus forte avec les membranes bactériennes (les composés cationiques sont connus pour interagir avec les membranes cellulaires, voir Chapitre 2). Une remarque est à faire: les dérivés bis- et tris-adduits ont été utilisés en tant que mélange d'isomères, ce qui peut avoir un impact sur l'efficacité des composés.

Un mélange d'isomères de  $C_{60}$  *n*-butyl-sulfonés a aussi montré de bonne capacité à détruire des microorganismes.<sup>60</sup> Ces composés s'agrègent en solution, probablement à cause d'une polydispersité de substitution par les groupements sulfones. Les  $C_{60}$  les plus substitués permettent d'avoir une solubilité dans l'eau, alors que les  $C_{60}$  les moins substitués permettent une conversion efficace de l'état singulet à triplet de la sphère de carbone pour produire des radicaux libres.

Une utilisation originale du fullerène en tant que photosensibilisant a été accomplie par le groupe de *Babincova*.<sup>61</sup> Dans leur étude, le  $C_{60}$  est incorporé dans une préparation de liposomes avec un agent photosensibilisant reconnu (dérivé de naphthalocyanine). La préparation liposomale permet de solubiliser le complexe et d'avoir une accumulation dans les tumeurs. Le  $C_{60}$  servirait à faire «exploser» les liposomes pour permettre le relargage des dérivés de naphthalocyanine dans la zone à traiter. Ainsi, après une injection intra-veineuse de la préparation dans des souris avec un mélanome, une irradiation avec un pulse laser nano-seconde à 1064 nm (relargage des cyanines) suivie d'une irradiation à 776 nm (photo-activation des naphthalocyanines) permet de diminuer significativement la taille des tumeurs.

### III. 3. Activités antibactériennes et antivirales.

Quelques dérivés de  $C_{60}$  ont montré une activité antibactérienne. Notamment des dérivés polycationiques.<sup>62,63</sup> Les dérivés polycationiques sont reconnus pour leur cyto-toxicité, notamment par l'étude de la polyéthylèneimine (PEI)<sup>64-66</sup>, un agent de transfert d'ADN. Les auteurs indiquent cependant que la mort cellulaire serait due à l'inhibition de la chaîne respiratoire, par le biais de la réactivité de la sphère de carbone.

Dernièrement, deux dérivés polycationiques mono-adduits de fullerènes (Figure 1.17) ont montré une bonne activité antibactérienne, après irradiation laser. Les auteurs ont défini que cette activité provenait du choix de l'emplacement des charges, qui sont à une distance idéale pour former des interactions électrostatiques fortes avec un motif dipeptidique propre à la membrane bactérienne et aussi l'incorporation d'iode comme contre-ion, qui permettrait théoriquement d'augmenter la production de ROS.<sup>67</sup>

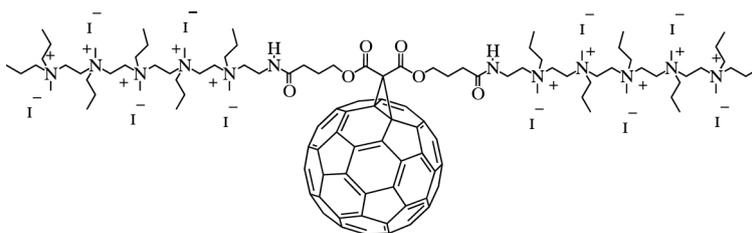


Figure 1.17: Dérivé de  $C_{60}$  aux propriétés antibactériennes. L'analogue  $C_{70}$  a aussi montré une bonne efficacité.

Récemment, notre équipe a développé une large variété de dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits avec douze sucres en périphérie pouvant avoir un potentiel effet bactériostatique. Les potentielles utilisations biologiques de dérivés de  $C_{60}$  comportant des sucres sont résumées dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

Une activité antivirale contre le virus influenza de type A et B a été observée par du  $C_{60}$  nu encapsulé dans de la poly-N-vinylpyrrolidone (PVP). L'activité antivirale a été attribuée au fullerène, car en l'absence de celui-ci le PVP n'a aucun effet<sup>68</sup>. Les auteurs présument que le  $C_{60}$  doit perturber l'assemblage final du virus. Cependant, les auteurs n'ont pas vérifié un potentiel effet synergique du complexe  $C_{60}$ -PVP.

Depuis la modélisation du  $C_{60}$  et de dérivés de  $C_{60}$  dans le site actif de la protéase du VIH<sup>69</sup>, de nombreuses études ont été menées pour développer de nouveaux dérivés efficaces contre ce virus. Le groupe *Prato* a produit une série de bis-fulleropyrrolidine comportant 2 groupements cationiques (Figure 1.18) capables d'inhiber VIH-1 et 2 avec une concentration

efficace médiane (EC 50) inférieure au micromolaire. Ces mêmes dérivés ont montré une efficacité d'inhibition intéressante contre d'autres virus<sup>70</sup>, comme par exemple l'hépatite C<sup>71</sup>.

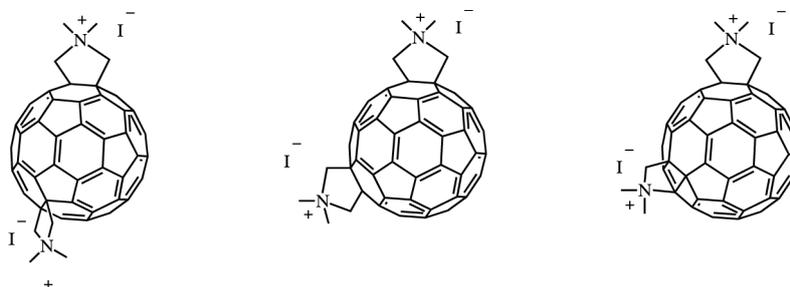


Figure 1.18: Régio-isomères bis-adduits ayant une activité contre VIH.

Le groupe de *Troshin* a développé des dérivés de C<sub>60</sub> penta-adduits hautement solubles dans l'eau grâce à des fonctions carboxyliques périphériques. Ces dérivés ont montré un EC 50 légèrement supérieur au micromolaire.<sup>72</sup> Ces dérivés et ceux présentés en Figure 1.18 sont à l'heure actuelle les dérivés de C<sub>60</sub> les plus efficaces contre le VIH. Leur mode d'action est supposé être en relation avec l'inhibition de la protéase du virus.

### III. 4. Activité antioxydante.

Alors qu'une irradiation du C<sub>60</sub> peut générer un état triplet de la sphère de carbone et provoquer la formation de ROS dans les systèmes biologiques, sans irradiation, le C<sub>60</sub> est un bon accepteur d'électrons et peut avoir des propriétés antioxydantes intéressantes. L'étude de l'impact d'un mono-adduit de C<sub>60</sub> avec deux acides carboxyliques, en culture cellulaire, a montré que le composé pouvait passer la barrière membranaire et s'accumuler près ou dans les mitochondries, site où a lieu la respiration cellulaire et où des ROS sont créés<sup>73</sup>, surtout l'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

L'équipe de *Moussa* a traité des souris intoxiquées au tétrachlorure de carbone (connu pour générer des radicaux) par injection d'une suspension de C<sub>60</sub>.<sup>74</sup> Non seulement les souris traitées sont protégées de l'intoxication d'une manière dose-dépendante mais en plus aucune toxicité liée au C<sub>60</sub> n'a été détectée par les auteurs. Les auteurs concluent que les études mettant en avant une toxicité des suspensions de C<sub>60</sub> en milieux biologiques est certainement due au mode de préparation des suspensions. Notamment la présence de THF dans ces suspensions est reconnue pour provoquer une toxicité accrue dans les organismes vivants.

Un dérivé tris-adduit nommé C<sub>3</sub> (Figure 1.14) a été intensivement étudié comme «éponge à radicaux».<sup>75</sup> Ce dérivé est probablement, le composé référence en matière de

dérivés de  $C_{60}$  à visée antioxydante. L'équipe de *Dugan* a montré que son mode d'action pouvait être assimilé à celui d'un analogue des enzymes *SuperOxyde Dismutase* (SOD).<sup>76</sup> Ces métallo-enzymes sont responsables de la dismutation de l'ion superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. En effet, l'administration de  $C_3$  sur des souris femelles enceintes dépourvues d'une SOD mitochondriale a permis d'augmenter leur durée de vie de 300%. L'activité catalytique de  $C_3$  est cependant 100 fois moins efficace que les enzymes SOD. L'hypothèse catalytique du composé a été modélisée et démontrée par calculs<sup>77</sup>.

Dans l'optique de mieux comprendre la structure-activité des dérivés de  $C_{60}$  en tant qu'antioxydant, l'équipe de *Hirsch* a créé une bibliothèque d'une vingtaine de composés.<sup>78</sup> L'étude montre que les dérivés les plus efficaces sont les  $C_{60}$  mono-adduits avec une bonne hydrosolubilité. Les dérivés mono-adduits sont les composés dans lesquels le système  $\pi$  est le plus «intact» et donc le apte à capter des électrons. Ces composés ont été testés sur un modèle (poisson zèbre) et ont montré une bonne activité de neuroprotection.<sup>79</sup> Finalement, une optimisation de leurs résultats a permis d'obtenir un  $C_{60}$  mono-adduit avec un pouvoir antioxydant et catalytique remarquable, dans le même ordre de grandeur que les meilleurs analogues de SOD.<sup>80</sup>

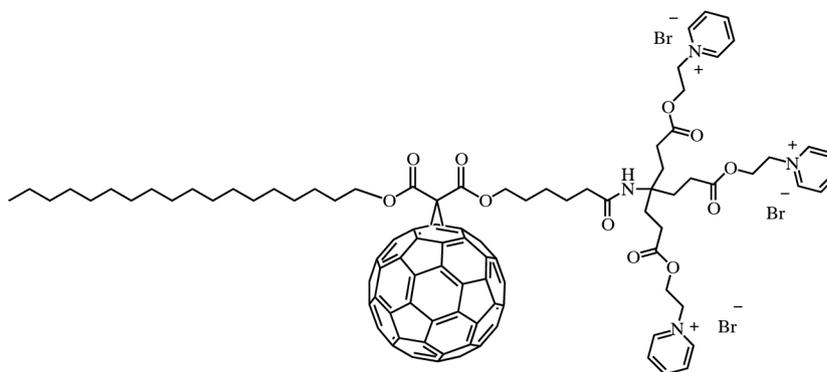


Figure 1.19: Analogue mimétique de SOD synthétisé par l'équipe de Hirsch.<sup>80</sup>

Les études de l'activité antioxydante du  $C_{60}$  et de ses dérivés sont principalement focalisées sur la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$ . Néanmoins d'autres équipes de recherche ont constaté que ces produits pouvaient aussi agir sur d'autres radicaux, en milieux biologiques, comme le  $NO$ .<sup>81-84</sup>

Ainsi le pouvoir antioxydant du  $C_{60}$  promet des perspectives pour des applications biologiques. Malgré tout, la dualité entre les capacités d'inhibition ou d'activation de  $O_2^{\cdot-}$  (par le biais de l'état triplet du  $C_{60}$ ) par  $C_{60}$  n'est pas totalement claire. Notamment, au niveau de la chaîne respiratoire, une meilleure compréhension de l'interaction du  $C_{60}$  avec les

mitochondries doit être effectuée pour voir l'impact positif ou négatif que peuvent apporter ces molécules.

### III. 5. Propriétés immunologiques.

Très peu d'exemples sont présents dans la littérature. La production d'anticorps spécifique du  $C_{60}$  et  $C_{70}$ <sup>85</sup> certifiée par l'obtention de la structure RX de ces anticorps<sup>86</sup> et par la modélisation du site d'interaction du  $C_{60}$ <sup>87</sup>, a permis de formuler l'hypothèse que des fullerènes couplés à des peptides d'intérêts pourraient développer une réponse immunitaire sélective intéressante. Une publication présente la synthèse d'un fullerène couplé à un peptide, qui est connu pour son pouvoir antigénique.<sup>88</sup> Ce motif peptidique est connu pour être impliqué dans la réponse immunitaire de deux maladies auto-immunes (lupus érythémateux systémique et connectivite mixte). Les auteurs ont montré qu'en couplant le  $C_{60}$  au peptide, ce produit était plus actif que le peptide seul envers la reconnaissance des anticorps responsables de la réponse inflammatoire du lupus et de la connectivite mixte.

Une autre publication a montré l'efficacité de  $C_{60}(OH)_n$  (aussi appelés fullerénols) en tant qu'activateur de la réponse immunitaire pour détruire des cellules cancéreuses sur des souris.<sup>89</sup>

### III. 6. Système de délivrance.

Peu d'exemples dans la littérature montre l'utilisation de dérivés de  $C_{60}$  comme système de délivrance. Un dérivé de  $C_{60}$  conjugué à du paclitaxel a été conçu comme une *pro-drug* (Figure 1.20). La liaison fullerène-paclitaxel est dégradée enzymatiquement, ce qui permet un relargage lent du médicament. Ainsi, une formulation liposomale de ce composé a montré une activité anticancéreuse intéressante en culture cellulaire. Les auteurs proposent d'utiliser cette formulation sous forme d'aérosol pour cibler les cancers du poumon.<sup>90</sup>

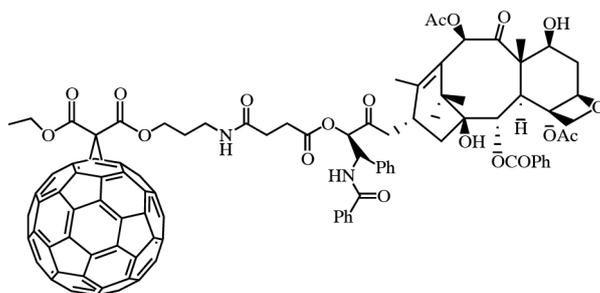


Figure 1.20: Conjugué de  $C_{60}$ -paclitaxel.<sup>90</sup>

Le C<sub>60</sub> a aussi été utilisé comme adsorbant pour créer un matériau poreux liquide capable d'effectuer de la délivrance d'érythropoïétine (EPO).<sup>91</sup> La formulation du C<sub>60</sub> avec un adsorbant permet d'avoir une porosité qui peut contenir de l'EPO. Cette protéine est rapidement dégradée dans l'intestin grêle et est administrée couramment par intraveineuse. Grâce à cette formulation, les auteurs ont réussi à améliorer la biodisponibilité de l'EPO de 5,7% par administration dans l'intestin grêle de rat. Les auteurs envisagent la possibilité future d'administrer de l'EPO par voie orale, par cette technique. Cependant, ils concluent que l'étude ADME-Tox (*Administration Distribution Metabolism Elimination Toxicity*) reste à être effectuée.

Deux dérivés de fullerènes polyhydroxylés ont été conjugués soit à de la doxorubicine par liaison carbamate ou soit à du cis-platine, statistiquement.<sup>92</sup> Ces deux composés ont montré une activité cytotoxique comparable aux produits non-conjugués, en modèle *in vitro* et *in vivo*. L'avantage de la conjugaison aux fullerénols est la possibilité de charger une quantité conséquente d'agent anti-cancéreux, ce qui permet d'augmenter les doses de produits actifs administrables. De plus, la toxicité systémique caractéristique de la doxorubicine seule n'est plus observée *in vivo*. Enfin, les dérivés de fullerènes permettent d'augmenter la solubilité des agents anti-cancéreux en milieux biologiques.

Des dérivés cationiques de fullerènes ont été employés comme agent de transfert d'ADN. Cet aspect sera développé dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

### III. 7. Endométallofullerènes (EMFs).

Les endométallofullerènes (EMFs) correspondent à des fullerènes dont un ou plusieurs (jusque trois) atomes métalliques sont incorporés à l'intérieur de la sphère de carbone. Ces entités sont généralement produites par une variation de la méthode de *Krätshmer* et *Huffman*<sup>6</sup>: les métaux à intégrer à l'intérieur de la sphère de carbone sont présents dans les tiges de graphites qui seront vaporisées pour former les fullerènes.

Les EMFs et leurs dérivés à base de gadolinium pourraient avoir des applications en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) (voir chapitre 8, «Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes» édité par Franco Cataldo et Tatiana Da Ros (Springer, 2008)). En comparaison, aux agents de contraste commerciaux, les gadofullerènes présenteraient un pouvoir de résolution supérieur. De plus le métal étant encapsulé à l'intérieur de la sphère de carbone, celui-ci ne peut pas être relâché dans les organismes, évitant une bioaccumulation de cet atome très toxique.

Plusieurs autres métaux ont été incorporés dans des fullerènes, pouvant aussi avoir des applications en imagerie. Par exemple, l'équipe de *Dorn* a synthétisé des EMFs avec un mix de deux métaux: du gadolinium et du lutétium; l'un étant un bon agent de contraste pour l'IRM (Ga), l'autre permettant une analyse aux rayons X (Lu). Ainsi, les auteurs suggèrent que l'utilisation de ces composés permettrait de coupler plusieurs analyses d'imagerie en même temps.<sup>93</sup>

Du plomb radioactif a aussi été incorporé à l'intérieur du fullerène.<sup>94</sup> Ce métal a des propriétés radioactives intéressantes mais malheureusement, il s'accumule dans le tissu osseux. Les auteurs ont montré que ce phénomène d'accumulation n'avait pas lieu une fois le <sup>212</sup>Pb incorporé dans les fullerènes, sur des souris.

Récemment, une équipe a intégré le concept de théranostique<sup>95</sup> («diagnostique et thérapie à la fois») au développement d'un EMF polyhydroxylé contenant du gadolinium.<sup>96</sup> Des chélateurs contenant du lutétium radioactif ont été greffés à la surface de cet endofullerène. Les auteurs ont observé que l'injection de ce composé dans une tumeur intracrânienne augmentait la survie des souris. Ils ont conclu que l'effet d'agrégation du composé lui permettait de rester dans le cerveau et de ne pas diffuser dans l'organisme, ce qui donnait la capacité au lutétium d'irradier efficacement la zone tumorale. L'intérêt du Ga serait d'avoir un bon suivi par imagerie de l'évolution de la tumeur.

Bien que les EMFs présentent de réelles applications, leur utilisation reste actuellement très limitée à cause de la difficulté d'obtenir des quantités conséquentes de produits purs. De nouveaux procédés de fabrication et de purification pourraient faire sortir les EMFs du domaine purement académique.

## IV. Objectifs de thèse

La brève présentation des applications biologiques des fullerènes et principalement du C<sub>60</sub> montre que l'emploi du C<sub>60</sub> et de ses dérivés dans le domaine de la biologie n'en est qu'à ses balbutiements. En effet, depuis la découverte du fullerène, les premières expériences menées pour entrevoir des applications biologiques datent du milieu des années 90 soit moins de 15 années. La première limite provenait de la production en masse. Cette limite est maintenant dépassée. La seconde provenait du développement de la chimie autour de cette molécule. Des méthodes efficaces permettent maintenant de fonctionnaliser le C<sub>60</sub>. Cependant les principales réactions employées (réaction de *Bingel*, cycloaddition 1,3-dipolaire, polyhydroxylation) ne donnent que des dérivés simples et peu fonctionnalisés qui ne

permettent pas d'exploiter tout le potentiel du  $C_{60}$ . De plus, ces réactions sont utilisées pour créer des dérivés multi-adduits, souvent de manière statistique. Les produits obtenus sont alors des mélanges d'isomères, ce qui n'est pas favorable à une utilisation médicale où l'idéal voudrait qu'un effet corresponde à un produit pur et non à un mélange d'isomères.

Notre équipe a récemment développé une méthode polyvalente permettant de préparer des dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits fonctionnalisés. Cette méthodologie permet d'obtenir des produits aux caractéristiques originales. Le  $C_{60}$  central agit comme un support central peu réactif, autour duquel des fonctionnalités sont réparties dans un espace octaédrique parfaitement défini.

Le chapitre 2 de ce manuscrit présentera l'exploitation de cette méthodologie pour créer des  $C_{60}$  hexa-adduits polycationiques aux propriétés de transfection remarquables. Dans un second temps, les dendrons polyamines synthétisés seront mis à profit pour créer des structures supramoléculaires de  $C_{60}$  hexa-adduits, sous forme micellaire (chapitre 3).

Dans le chapitre 4, l'étude de ces assemblages a orienté nos investigations vers l'élaboration de dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits mannosylés multivalents, par un assemblage supramoléculaire, dont leurs possibles applications biologiques sont actuellement à l'étude. En parallèle une synthèse covalente permettra d'obtenir un «équivalent dendritique» de  $C_{60}$  hexa-adduit multimannosylé.

Partant du constat que notre méthodologie est efficace principalement pour des dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits qui ont une régio-sélectivité particulière, le chapitre 5 a été consacré au développement de nouvelles voies de synthèses qui pourront permettre de créer des dérivés de  $C_{60}$  avec un contrôle régio-sélectif original.

## V. Bibliographie

- (1) Jones, D. E. *New Scientist* **1966**, 35, 245.
- (2) Barth, W. E.; Lawton, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, 88, 380.
- (3) Osawa, E. *Kagaku* **1970**, 25, 854.
- (4) Rohlffing, E. A.; Cox, D. M.; Kaldor, A. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, 81, 3322.
- (5) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* **1985**, 318, 162.
- (6) Kratschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R. *Nature* **1990**, 347, 354.
- (7) Howard, J. B.; McKinnon, J. T.; Makarovskiy, Y.; Lafleur, A. L.; Johnson, M. E. *Nature* **1991**, 352, 139.
- (8) Howard, J. B.; McKinnon, J. T.; Johnson, M. E.; Makarovskiy, Y.; Lafleur, A. L. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, 96, 6657.

- (9) Otero, G.; Biddau, G.; Sanchez-Sanchez, C.; Caillard, R.; Lopez, M. F.; Rogero, C.; Palomares, F. J.; Cabello, N.; Basanta, M. A.; Ortega, J.; Mendez, J.; Echavarren, A. M.; Perez, R.; Gomez-Lor, B.; Martin-Gago, J. A. *Nature* **2008**, *454*, 865.
- (10) Ajie, H.; Alvarez, M. M.; Anz, S. J.; Beck, R. D.; Diederich, F.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R.; Kraetschmer, W.; Rubin, Y.; *et al.* *The Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 8630.
- (11) Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Eklund, P. C. In *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*; Academic Press: San Diego, 1996, p 60.
- (12) Schulman, J. M.; Disch, R. L.; Miller, M. A.; Peck, R. C. *Chemical Physics Letters* **1987**, *141*, 45.
- (13) Lüthi, H. P.; Almlöf, J. *Chemical Physics Letters* **1987**, *135*, 357.
- (14) Scuseria, G. E. *Chemical Physics Letters* **1991**, *176*, 423.
- (15) Häser, M.; Almlöf, J.; Scuseria, G. E. *Chemical Physics Letters* **1991**, *181*, 497.
- (16) Yannoni, C. S.; Bernier, P. P.; Bethune, D. S.; Meijer, G.; Salem, J. R. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 3190.
- (17) David, W. I. F.; Ibberson, R. M.; Matthewman, J. C.; Prassides, K.; Dennis, T. J. S.; Hare, J. P.; Kroto, H. W.; Taylor, R.; Walton, D. R. M. *Nature* **1991**, *353*, 147.
- (18) Hedberg, K.; Hedberg, L.; Bethune, D. S.; Brown, C. A.; Dorn, H. C.; Johnson R. D.; De Vries, M. *Science* **1991**, *254*, 410.
- (19) Liu, S.; Lu, Y.-J.; Kappes, M. M.; Ibers, J. A. *Science* **1991**, *254*, 408.
- (20) Ruoff, R. S.; Tse, D. S.; Malhotra, R.; Lorents, D. C. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 3379.
- (21) Arbogast, J. W.; Darmanyan, A. P.; Foote, C. S.; Diederich, F. N.; Whetten, R. L.; Rubin, Y.; Alvarez, M. M.; Anz, S. J. *The Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 11.
- (22) Xie, Q.; Perez-Cordero, E.; Echegoyen, L. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3978.
- (23) Ohsawa, Y.; Saji, T. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, 781.
- (24) Bruno, C.; Doubitski, I.; Marcaccio, M.; Paolucci, F.; Paolucci, D.; Zaopo, A. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 15738.
- (25) Lamparth, I.; Maichle-Mössmer, C.; Hirsch, A. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34*, 1607.
- (26) Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 9798.
- (27) Prato, M.; Maggini, M. *Accounts of Chemical Research* **1998**, *31*, 519.
- (28) Bingel, C. *Chemische Berichte* **1993**, *126*, 1957.
- (29) Camps, X.; Hirsch, A. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1997**, 1595.
- (30) Nierengarten, J.-F.; Gramlich, V.; Cardullo, F.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 2101.
- (31) Li, H.; Haque, S. A.; Kitaygorodskiy, A.; Meziani, M. J.; Torres-Castillo, M.; Sun, Y.-P. *Organic Letters* **2006**, *8*, 5641.
- (32) Iehl, J.; Pereira de Freitas, R.; Delavaux-Nicot, B.; Nierengarten, J.-F. *Chemical Communications* **2008**, 2450.
- (33) Iehl, J.; Nierengarten, J.-F. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 7306.
- (34) Durka, M.; Buffet, K.; Iehl, J.; Holler, M.; Nierengarten, J.-F.; Vincent, S. P. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 641.
- (35) Sánchez-Navarro, M.; Muñoz, A.; Illescas, B. M.; Rojo, J.; Martín, N. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 766.

- (36) Iehl, J.; Nierengarten, J.-F. o.; Harriman, A.; Bura, T.; Ziessel, R. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *134*, 988.
- (37) Sigwalt, D.; Holler, M.; Iehl, J.; Nierengarten, J.-F.; Nothisen, M.; Morin, E.; Remy, J.-S. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 4640.
- (38) Fortgang, P.; Maisonhaute, E.; Amatore, C.; Delavaux-Nicot, B.; Iehl, J.; Nierengarten, J.-F. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 2364.
- (39) Cecioni, S.; Oerthel, V.; Iehl, J.; Holler, M.; Goyard, D.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Nierengarten, J.-F.; Vidal, S. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 3252.
- (40) Durka, M.; Buffet, K.; Iehl, J.; Holler, M.; Nierengarten, J.-F.; Taganna, J.; Bouckaert, J.; Vincent, S. P. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 1321.
- (41) Iehl, J.; Holler, M.; Nierengarten, J.-F. o.; Yoosaf, K.; Malicka, J. M.; Armaroli, N.; Strub, J.-M.; Van Dorselaer, A.; Delavaux-Nicot, B. a. *Australian Journal of Chemistry* **2011**, *64*, 153.
- (42) Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 5753.
- (43) Nierengarten, J.-F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Munoz, A.; Martin, N.; Rojo, J.; Sanchez-Navarro, M.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Buffet, K.; Durka, M.; Vincent, S. P. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 3860.
- (44) Boudon, C.; Gisselbrecht, J.-P.; Gross, M.; Isaacs, L.; Anderson, H. L.; Faust, R.; Diederich, F. *Helvetica Chimica Acta* **1995**, *78*, 1334.
- (45) Cardullo, F.; Seiler, P.; Isaacs, L.; Nierengarten, J.-F.; Haldimann, R. F.; Diederich, F.; Mordasini-Denti, T.; Thiel, W.; Boudon, C.; Gisselhrrecht, J.-P.; Gross, M. *Helvetica Chimica Acta* **1997**, *80*, 343.
- (46) Camps, X.; Dietel, E.; Hirsch, A.; Pyo, S.; Echegoyen, L.; Hackbarth, S.; Röder, B. *Chemistry – A European Journal* **1999**, *5*, 2362.
- (47) Sayes, C. M.; Fortner, J. D.; Guo, W.; Lyon, D.; Boyd, A. M.; Ausman, K. D.; Tao, Y. J.; Sitharaman, B.; Wilson, L. J.; Hughes, J. B.; West, J. L.; Colvin, V. L. *Nano Letters* **2004**, *4*, 1881.
- (48) Rebecca, M.; Hsing-Lin, W.; Jun, G.; Srinivas, I.; Gabriel, M. o. A.; Jennifer, M.; Andrew, S. P.; Yuping, B.; Chun-Chih, W.; Zhong, C.; Yuan, G.; Rashi, I. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, *234*, 58.
- (49) Johnston, H. J.; Hutchison, G. R.; Christensen, F. M.; Aschberger, K.; Stone, V. *Toxicological Sciences* **2010**, *114*, 162.
- (50) Andrievsky, G.; Klochkov, V.; Derevyanchenko, L. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **2005**, *13*, 363.
- (51) Isakovic, A.; Markovic, Z.; Nikolic, N.; Todorovic-Markovic, B.; Vranjes-Djuric, S.; Harhaji, L.; Raicevic, N.; Romcevic, N.; Vasiljevic-Radovic, D.; Dramicanin, M.; Trajkovic, V. *Biomaterials* **2006**, *27*, 5049.
- (52) Kovoichich, M.; Espinasse, B.; Auffan, M.; Hotze, E. M.; Wessel, L.; Xia, T.; Nel, A. E.; Wiesner, M. R. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, 6378.
- (53) Rancan, F.; Rosan, S.; Boehm, F.; Cantrell, A.; Brellreich, M.; Schoenberger, H.; Hirsch, A.; Moussa, F. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2002**, *67*, 157.
- (54) Yamakoshi, Y.; Umezawa, N.; Ryu, A.; Arakane, K.; Miyata, N.; Goda, Y.; Masumizu, T.; Nagano, T. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 12803.
- (55) Macdonald, I. J.; Dougherty, T. J. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5*, 105.

- (56) Scharff, P.; Carta-Abelmann, L.; Siegmund, C.; Matyshevska, O. P.; Prylutska, S. V.; Koval, T. V.; Golub, A. A.; Yashchuk, V. M.; Kushnir, K. M.; Prylutsky, Y. I. *Carbon* **2004**, *42*, 1199.
- (57) Tabata, Y.; Murakami, Y.; Ikada, Y. *Cancer Science* **1997**, *88*, 1108.
- (58) Mroz, P.; Pawlak, A.; Satti, M.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, *43*, 711.
- (59) Tegos, G. P.; Demidova, T. N.; Arcila-Lopez, D.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Hamblin, M. R. *Chemistry and Biology* **2005**, *12*, 1127.
- (60) Yu, C.; Canteenwala, T.; Chiang, L. Y.; Wilson, B.; Pritzker, K. *Synthetic Metals* **2005**, *153*, 37.
- (61) Babincová, M.; Sourivong, P.; Leszczynska, D.; Babinec, P. *Laser Physics Letters* **2004**, *1*, 476.
- (62) Mashino, T.; Usui, N.; Okuda, K.; Hirota, T.; Mochizuki, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 1433.
- (63) Mashino, T.; Nishikawa, D.; Takahashi, K.; Usui, N.; Yamori, T.; Seki, M.; Endo, T.; Mochizuki, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 4395.
- (64) Moghimi, S. M.; Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A. *Mol Ther* **2005**, *11*, 990.
- (65) Hunter, A. C.; Moghimi, S. M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2010**, *1797*, 1203.
- (66) Parhamifar, L.; Larsen, A. K.; Hunter, A. C.; Andresen, T. L.; Moghimi, S. M. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4001.
- (67) Wang, M.; Huang, L.; Sharma, S. K.; Jeon, S.; Thota, S.; Sperandio, F. F.; Nayka, S.; Chang, J.; Hamblin, M. R.; Chiang, L. Y. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 4274.
- (68) Piotrovsky, L. B.; Kiselev, O. I. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **2005**, *12*, 397.
- (69) Friedman, S. H.; DeCamp, D. L.; Sijbesma, R. P.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Kenyon, G. L. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 6506.
- (70) Marchesan, S.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Balzarini, J.; Prato, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 3615.
- (71) Mashino, T.; Shimotohno, K.; Ikegami, N.; Nishikawa, D.; Okuda, K.; Takahashi, K.; Nakamura, S.; Mochizuki, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 1107.
- (72) Troshina, O. A.; Troshin, P. A.; Peregudov, A. S.; Kozlovskiy, V. I.; Balzarini, J.; Lyubovskaya, R. N. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, 2783.
- (73) Foley, S.; Crowley, C.; Smaih, M.; Bonfils, C.; Erlanger, B. F.; Seta, P.; Larroque, C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *294*, 116.
- (74) Gharbi, N.; Pressac, M.; Hadchouel, M.; Szwarc, H.; Wilson, S. R.; Moussa, F. *Nano Letters* **2005**, *5*, 2578.
- (75) Dugan, L. L.; Turetsky, D. M.; Du, C.; Lobner, D.; Wheeler, M.; Alml, C. R.; Shen, C. K.-F.; Luh, T.-Y.; Choi, D. W.; Lin, T.-S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 9434.
- (76) Ali, S. S.; Hardt, J. I.; Quick, K. L.; Sook Kim-Han, J.; Erlanger, B. F.; Huang, T.-t.; Epstein, C. J.; Dugan, L. L. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, *37*, 1191.
- (77) Osuna, S.; Swart, M.; Solà, M. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 3207.
- (78) Witte, P.; Beuerle, F.; Hartnagel, U.; Lebovitz, R.; Savouchkina, A.; Sali, S.; Guldi, D.; Chronakis, N.; Hirsch, A. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, 3599.

- (79) Beuerle, F.; Witte, P.; Hartnagel, U.; Lebovitz, R.; Parnig, C.; Hirsch, A. *Journal of Experimental Nanoscience* **2007**, *2*, 147.
- (80) Liu, G.-F.; Filipović, M.; Ivanović-Burmazović, I.; Beuerle, F.; Witte, P.; Hirsch, A. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 3991.
- (81) Mirkov, S. M.; Djordjevic, A. N.; Andric, N. L.; Andric, S. A.; Kostic, T. S.; Bogdanovic, G. M.; Vojinovic-Miloradov, M. B.; Kovacevic, R. Z. *Nitric Oxide* **2004**, *11*, 201.
- (82) Wolff, D. J.; Mialkowski, K.; Richardson, C. F.; Wilson, S. R. *Biochemistry* **2000**, *40*, 37.
- (83) Wolff, D. J.; Papoiu, A. D. P.; Mialkowski, K.; Richardson, C. F.; Schuster, D. I.; Wilson, S. R. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *378*, 216.
- (84) Chen, Y.-W.; Hwang, K. C.; Yen, C.-C.; Lai, Y.-L. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2004**, *287*, R21.
- (85) Chen, B.-X.; Wilson, S. R.; Das, M.; Coughlin, D. J.; Erlanger, B. F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 10809.
- (86) Braden, B. C.; Goldbaum, F. A.; Chen, B.-X.; Kirschner, A. N.; Wilson, S. R.; Erlanger, B. F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 12193.
- (87) Noon, W. H.; Kong, Y.; Ma, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 6466.
- (88) Sofou, P.; Elemes, Y.; Panou-Pomonis, E.; Stavrakoudis, A.; Tsikaris, V.; Sakarellos, C.; Sakarellos-Daitsiotis, M.; Maggini, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2823.
- (89) Liu, Y.; Jiao, F.; Qiu, Y.; Li, W.; Qu, Y.; Tian, C.; Li, Y.; Bai, R.; Lao, F.; Zhao, Y.; Chai, Z.; Chen, C. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 415102.
- (90) Zakharian, T. Y.; Seryshev, A.; Sitharaman, B.; Gilbert, B. E.; Knight, V.; Wilson, L. J. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12508.
- (91) Venkatesan, N.; Yoshimitsu, J.; Ito, Y.; Shibata, N.; Takada, K. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7154.
- (92) Chaudhuri, P.; Paraskar, A.; Soni, S.; Mashelkar, R. A.; Sengupta, S. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2505.
- (93) Iezzi, E. B.; Duchamp, J. C.; Fletcher, K. R.; Glass, T. E.; Dorn, H. C. *Nano Letters* **2002**, *2*, 1187.
- (94) Diener, M. D.; Alford, J. M.; Kennel, S. J.; Mirzadeh, S. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 5131.
- (95) Lammers, T.; Aime, S.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Kiessling, F. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 1029.
- (96) Wilson, J. D.; Broaddus, W. C.; Dorn, H. C.; Fatouros, P. P.; Chalfant, C. E.; Shultz, M. D. *Bioconjugate Chemistry* **2012**.



## *Chapitre 2 :*

# *Délivrance d'ADN plasmidique par des C<sub>60</sub> hexa-adduits polycationiques*



## I. Transfection par des vecteurs synthétiques: principes généraux

La transfection consiste, au sens large, en la délivrance d'oligonucléotides (ARN ou ADN) à l'intérieur de la cellule par un vecteur. En effet, les oligonucléotides ne peuvent pas passer seuls la membrane cellulaire, du fait de leur taille et de leur charge globale négative à pH neutre (répulsion électrostatique avec la membrane cellulaire, globalement chargée négativement).

Les vecteurs synthétiques classiques sont constitués de deux grands groupes: les lipides cationiques<sup>1</sup> et les polymères<sup>2</sup>/dendrimères<sup>3</sup> cationiques. La plupart des vecteurs dérivent de ces deux groupes. Grâce à des fonctions protonables, généralement des amines, ces composés forment des complexes stables avec les oligonucléotides, par interaction électrostatique avec le squelette phosphate. Ces complexes, appelés polyplexes (interaction oligonucleotide-polymère/dendrimère) ou lipoplexes (interaction oligonucléotide-lipide cationique) ont un mécanisme d'action proche (Figure 2.1<sup>4</sup>).

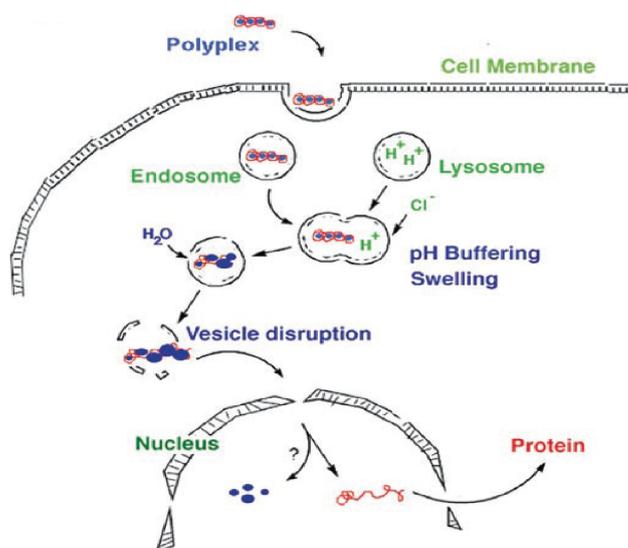


Figure 2.1<sup>4</sup>: Représentation schématique du mécanisme de transfection.

Dans un premier temps, les complexes oligonucléotides-molécules cationiques sont formés. Puis les particules sont ajoutées dans le milieu cellulaire (*in vitro*) ou injectées (*in vivo*). Ces particules sont chargées positivement et entrent en interaction électrostatique avec la membrane cellulaire pour finalement être internalisées dans des vésicules appelées endosomes. Ces endosomes sont adressés au lysosome, un compartiment cellulaire qui

dégrade les composants du cytoplasme par une action enzymatique à pH acide. A ce niveau, les fonctions amines qui ne sont pas toutes protonées à pH physiologique, agissent comme «une éponge à protons»<sup>5</sup> et provoquent un choc osmotique, induisant le relargage des complexes dans le cytoplasme. A ce stade, les complexes se séparent et les oligonucléotides sont alors aptes à agir dans le cytoplasme (*silencing*) ou sont incorporés dans le noyau pour exprimer l'ARN messager qui fournira la protéine d'intérêt.

L'intérêt d'un vecteur est donc de permettre à l'oligonucléotide de franchir toutes les barrières biologiques: -formation de complexes assez stables pour ne pas être dégradés dans le milieu de culture ou dans l'organisme.

- complexes aptes à franchir la membrane cellulaire.
- relargage efficace des oligonucléotides dans le cytoplasme.

A ce jour, en terme de vecteur composé de C<sub>60</sub>, un seul dérivé semble avoir une réelle efficacité en transfection (Figure 2.2, B).<sup>6</sup> Ce composé est issu d'un travail de longue haleine du groupe de *Nakamura* où une étude systématique<sup>7</sup> de structure-activité de 22 dérivés de C<sub>60</sub> cationiques a fourni le composé représenté en Figure 2.2 B. Cette équipe met notamment en avant le ratio hydrophile-hydrophobe à respecter pour obtenir des nanostructures stables de fullerène-ADN. De plus, cette étude ne révèle aucun effet phototoxique du C<sub>60</sub>, connu pour produire de l'oxygène singulet ou des radicaux libres, après photo-excitation.

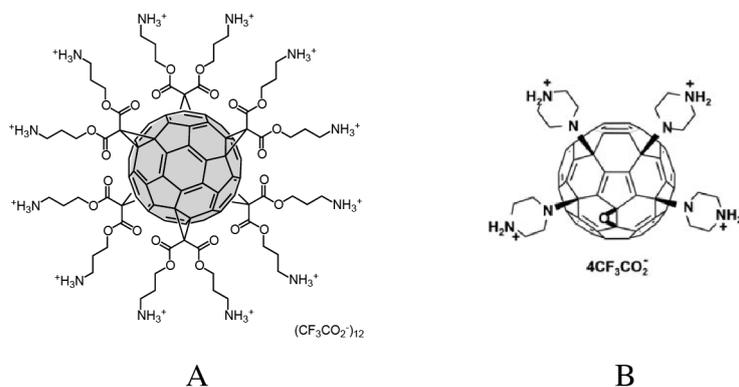


Figure 2.2: Dérivés de C<sub>60</sub> étudiés en transfection.

Dans cette même étude, les auteurs indiquent que le dérivé de C<sub>60</sub> hexa-adduit polycationique<sup>8</sup> représenté en Figure 2.2 A n'a aucune activité en terme de délivrance d'ADN. Cette conclusion a conduit à admettre qu'une distribution isotropique des charges positives en périphérie de la sphère de carbone ne permet pas de développer de composés capables de transfecter.<sup>9</sup>

En fait, notre équipe a constaté que ce n'était pas le cas.<sup>10</sup> Car comme les dendrimères<sup>4</sup>, en augmentant le nombre de générations, l'efficacité de transfection augmente. C'est dans ce contexte que notre laboratoire a conçu une série de dérivés de C<sub>60</sub> hexa-adduits polycationiques ayant un pouvoir de transfection remarquable.

## II. Synthèse de C<sub>60</sub> polycationiques.

A partir de ces travaux, notre groupe a décidé de développer trois générations de dendrimères avec le C<sub>60</sub> comme support tridimensionnel (Figure 2.3). Ainsi, le nombre de fonctions amines périphériques est doublé à chaque génération. **G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** contient 24 amines, **G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** contient 48 amines et **G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>**, 96 amines. Contrairement aux dendrimères classiques, le cœur compact C<sub>60</sub> mène à des systèmes globulaires dès les premières générations.<sup>11,12</sup> Le choix d'utiliser notre méthodologie de post-fonctionnalisation permet d'obtenir des composés (notamment **G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** et **G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>**) pratiquement inaccessibles par une autre voie de synthèse. La synthèse des molécules consiste à lier deux fragments: un dérivé de fullerène (Figure 2.7, composé **6**), commun aux trois produits finaux et une partie azoture comprenant les dendrons aromatiques avec les amines.

Pour obtenir les dendrons **G<sub>n</sub>N<sub>3</sub>**, la voie développée par *Hawker* et *Fréchet* pour la conception de dendrons polybenzylether<sup>13,14</sup> a été empruntée. La synthèse de **G1N<sub>3</sub>** (Figure 2.4) démarre avec le composé **1**<sup>15</sup> qui est réduit par LAH pour obtenir l'alcool benzylique **2**. Cet alcool est bromé par PPh<sub>3</sub>/NBS pour donner le composé **G1Br**. Puis le brome est substitué par une fonction azoture dans les conditions traditionnelles NaN<sub>3</sub>, DMF pour donner **G1N<sub>3</sub>**.

La même itération est répétée pour obtenir **G2N<sub>3</sub>** (Figure 2.5) et **G3N<sub>3</sub>** (Figure 2.6). L'alcool 3,5-dihydroxybenzylique est transformé par une réaction de Williamson avec **G1Br** pour fournir avec un bon rendement (97%) le dendron **3**. Une nouvelle bromation donne **G2Br**, suivie d'une SN<sub>2</sub> avec NaN<sub>3</sub> pour donner **G2N<sub>3</sub>**. Une dernière itération avec l'alcool **3**, 5-dihydroxybenzylique en présence de **G2Br** fournit l'alcool benzylique correspondant **4**. La séquence bromation/SN<sub>2</sub> donne **G3N<sub>3</sub>**.

La simplicité des réactions mises en œuvre a permis d'obtenir les dendrons avec des rendements relativement bons. Ainsi ces composés ont servi de précurseurs pour l'élaboration de plusieurs molécules complexes présentées dans ce chapitre et sont communément utilisés comme *building block* dans notre groupe.

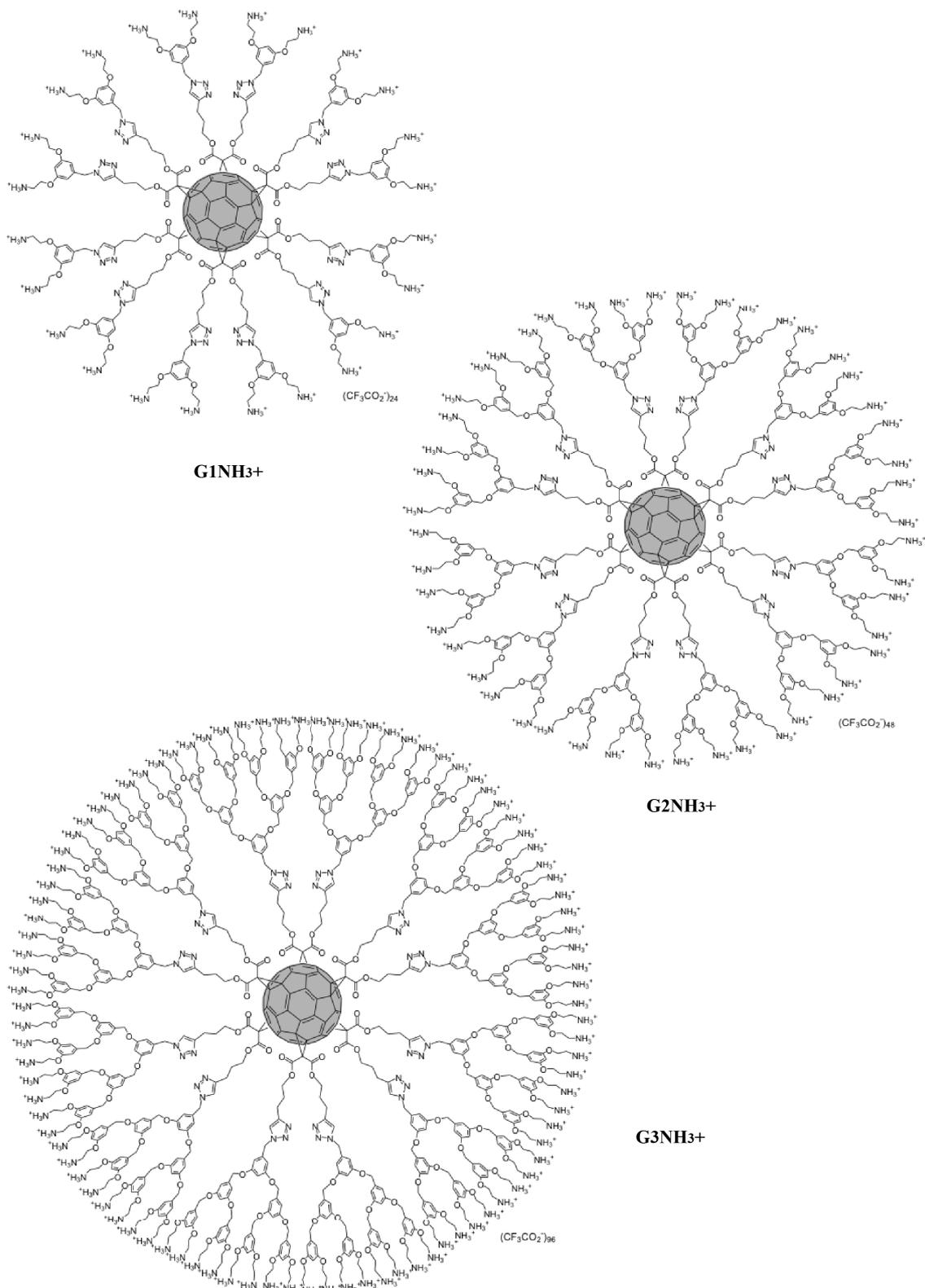


Figure 2.3: Présentation des molécules cibles.

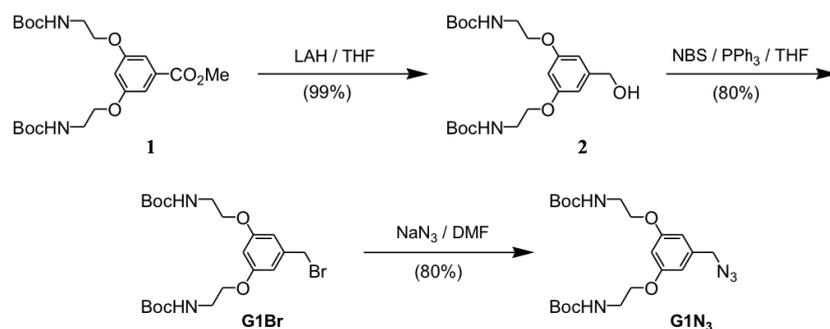


Figure 2.4: Schéma de synthèse de **G1N<sub>3</sub>**.

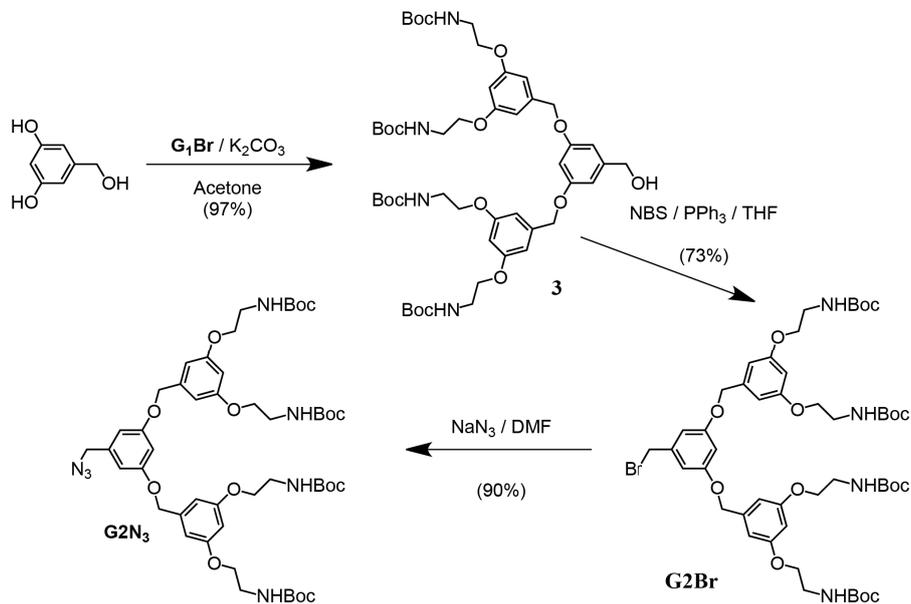


Figure 2.5: Schéma de synthèse de **G2N<sub>3</sub>**.

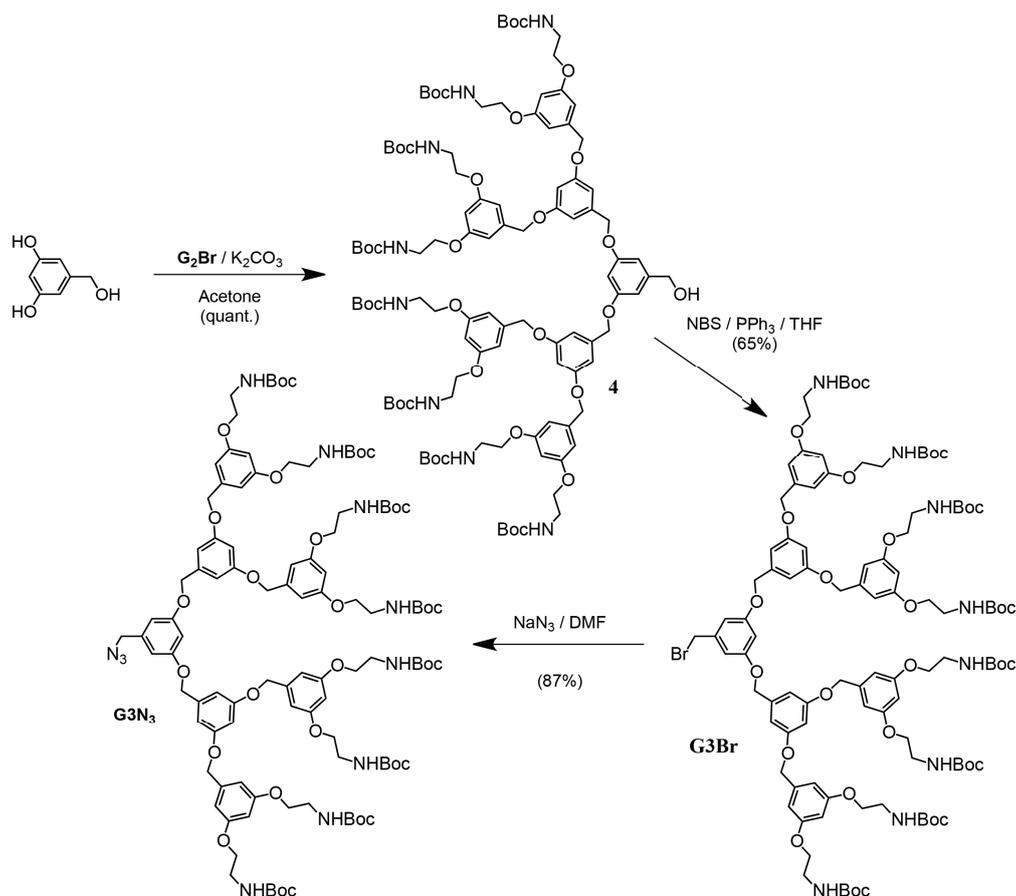


Figure 2.6: Schéma de synthèse de **G3N<sub>3</sub>**.

La partie  $C_{60}$  a été obtenu en 2 étapes à partir de produits commerciaux<sup>16</sup> (Figure 2.7). Dans un premier temps, une réaction d'estérification entre le 5-(triméthylsilyl)pent-4-yn-1-ol et du chlorure de malonyle est effectuée pour donner le malonate **5**. Puis une réaction de *Bingel* avec un large excès (100 équivalents) de  $CBr_4$  donne le dérivé **6** avec un rendement de 49 %. Par sa haute symétrie caractéristique, ce composé est facilement identifiable par RMN  $^{13}C$ . Les pics correspondant aux carbones  $sp^2$  du fullerène sont observés à 140,9 et 145,7 ppm. Tous les carbones  $sp^3$  de la sphère de carbone, magnétiquement équivalents, sont observés en un seul pic à 69,0 ppm.

Ensuite, les précurseurs **GnN<sub>3</sub>** ont été greffés autour du  $C_{60}$  par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de *Huisgen* catalysée au cuivre<sup>17,18</sup>, après déprotection *in situ* par du TBAF des fonctions alcynes. Les composés **G1NHBoc**, **G2NHBoc** et **G3NHBoc** ont été isolés avec de très bons rendements (68-89%) (en *one pot* 12 déprotections, suivies de 12 cycloadditions), mettant en avant l'efficacité de notre méthodologie. La spectroscopie RMN carbone n'a pas montré de défauts de nos produits (conservation du motif octaédrique), indiquant bien que toutes les fonctions alcynes ont réagi. Finalement les fonctions amines ont

été déprotégées en dissolvant  $GnNH\text{Boc}$  dans du TFA pour donner  $GnNH_3^+$ , sous forme de sels  $\text{TFA}^-$ .

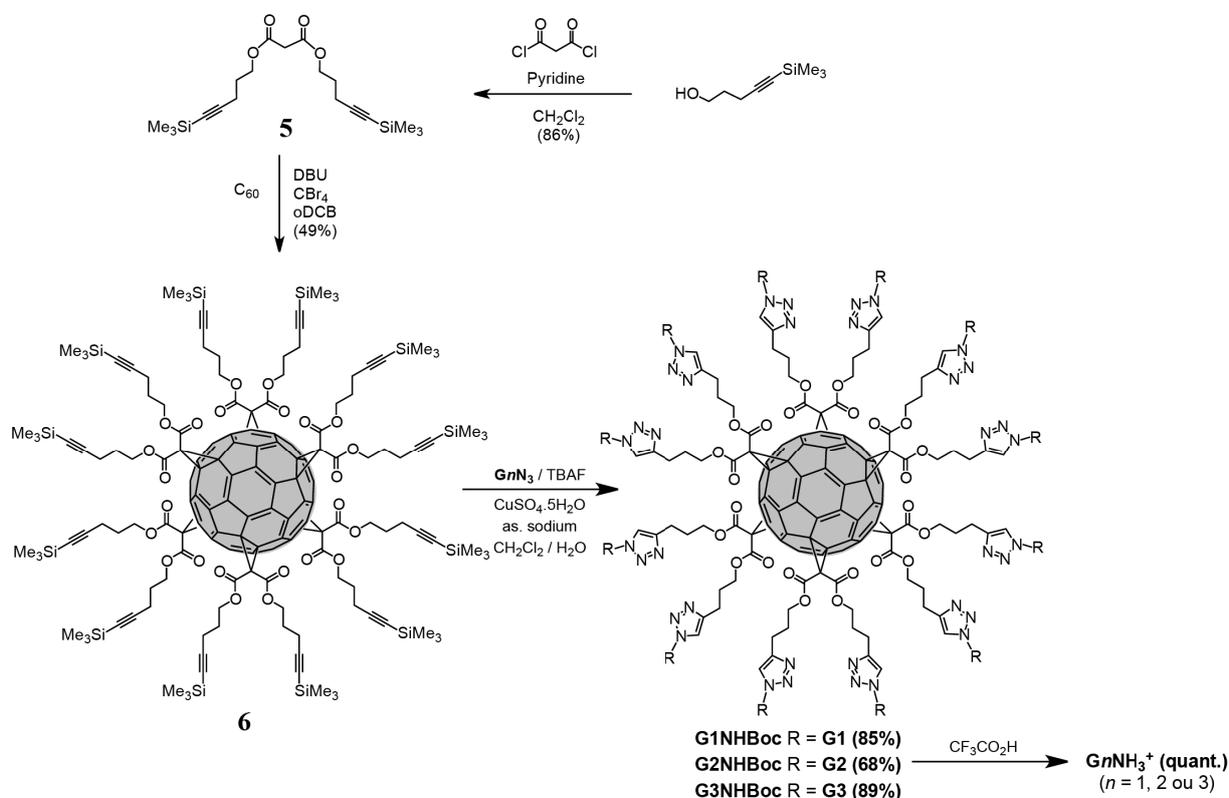


Figure 2.7: Schéma de synthèse des composés cibles.

Les composés finaux ont été caractérisés tant bien par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) que par IR et UV/Visible. Un haut niveau de fragmentation est observé au niveau des spectres de spectrométrie de masse (MALDI-TOF, FAB) n'a pas permis d'identifier nos composés par cette technique.

Les spectres UV/Visible correspondent à la signature de dérivés hexa-adduits, l'analyse par RMN du carbone confirme sans ambiguïté la structure chimique de  $GnNH_3^+$  (Figure 2.8). Les trois signaux du fullerène (carbone  $\text{sp}^2$  vers 141 et 145 ppm, carbone  $\text{sp}^3$  vers 69 ppm) sont présents. Encore une fois le haut niveau de symétrie de la molécule est confirmé: les 6 malonates sont magnétiquement équivalents.

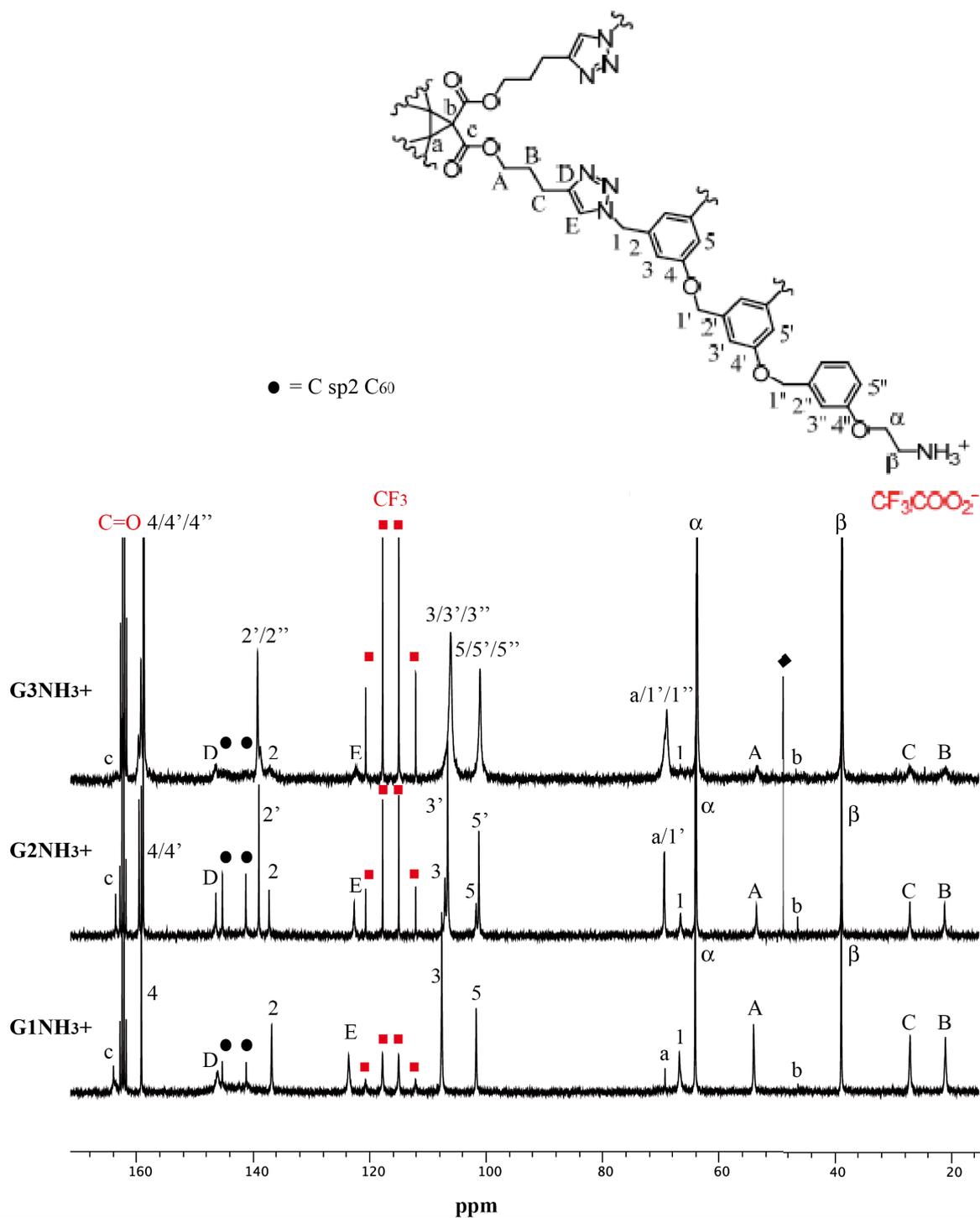


Figure 2.8: Spectres RMN (100 MHz, D<sub>2</sub>O) des composés finaux. Remarque: le losange correspond à du méthanol résiduel.

### III. Etudes physico-chimiques et transfection sur des cellules HeLa de C<sub>60</sub> polycationiques.

L'interaction électrostatique entre de l'ADN plasmidique (pCMV-Luc, plasmide porteur du gène codant pour la protéine luciférase) et nos différentes molécules a été quantifiée par

électrophorèse sur gel d'agarose, en présence de bromure d'éthidium (un agent intercalant de l'ADN, révélant aux UV). Les composés ont été mélangés au plasmide à des concentrations croissantes, en fonction du ratio N/P (nombre d'amines N apportées par les vecteurs sur le nombre P de phosphate apporté par l'ADN) (Figure 2.9), en condition isotonique (NaCl 150 mM) et iso-osmotique (5 % de Glucose). Dès que le ratio N/P atteint une valeur de 2, dans les deux conditions et pour les trois composés, une disparition de la fluorescence du bromure d'éthidium indique une condensation totale de l'ADN.

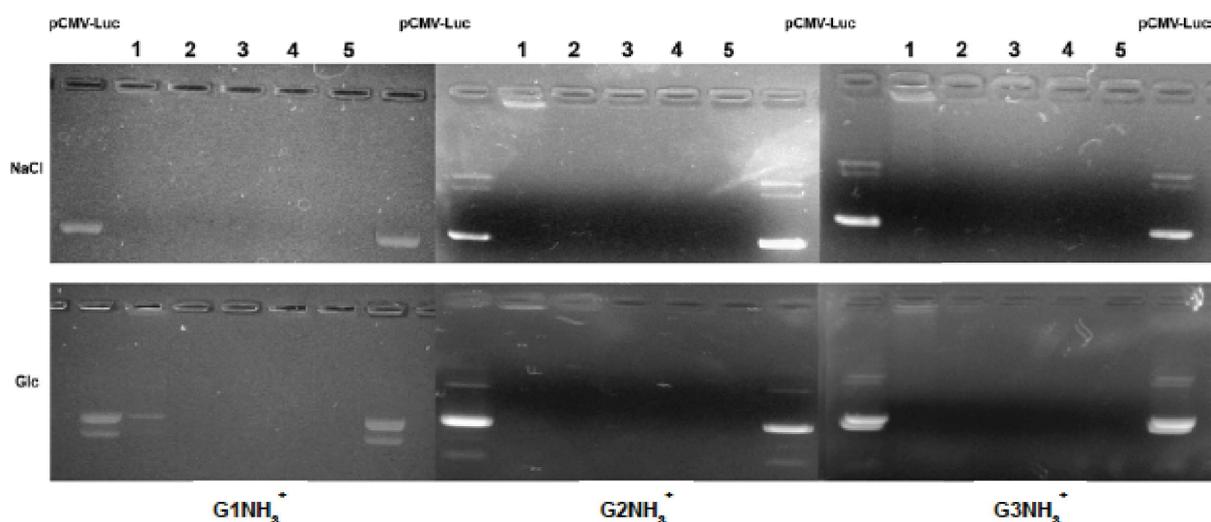


Figure 2.9: Gels d'électrophorèse (agarose) des complexes  $G_nNH_3^+$ -pCMVLuc à différentes concentrations N/P.

Les polyplexes ont ensuite été caractérisés par Microscopie Electronique à Transmission (MET) (Figure 2.10). Chaque image présente les polyplexes formés dans les conditions optimales de transfection. Ainsi les polyplexes préparés en milieu aqueux à 5% de glucose présentent un aspect sphérique, de type «donut» pour  $G2NH_3^+$  et  $G3NH_3^+$ . Ces particules sont plus petites que 100 nm. Ces observations ont été confirmées par Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL) (Figure 2.11) où la taille des complexes observés est aussi inférieure à 100 nm. De plus, les potentiels zêta mesurés montrent un potentiel de surface très fortement chargé positivement (Figure 2.11).

Quand les polyplexes sont préparés en milieu NaCl, les clichés de microscopie révèlent la formation de sphères agrégées micrométriques ressemblant aux agrégats observés avec de la polyéthylèneimine<sup>19</sup> (PEI, vecteur standard souvent employé en transfection).

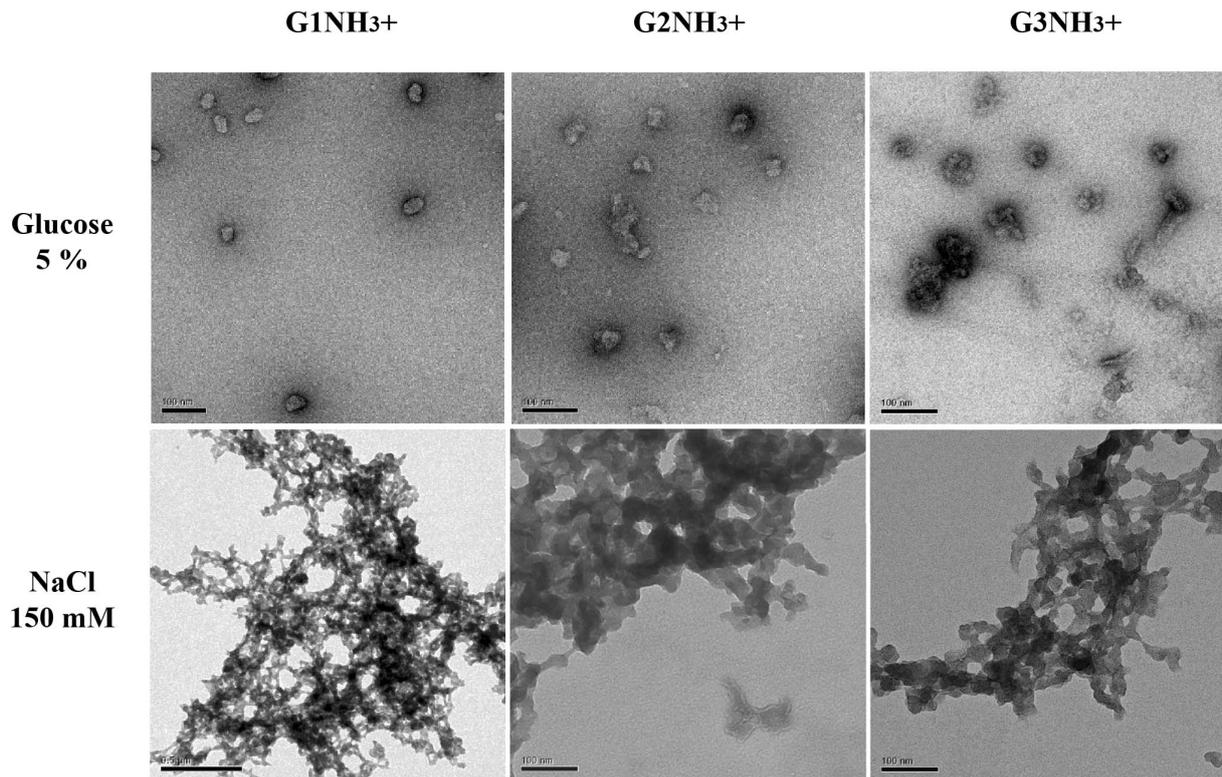


Figure 2.10: Images de MET des polyplexes préparés dans les conditions optimales de transfection. Barres d'échelle: 100 nm, sauf pour **G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** dans NaCl 150 mM: 0,5  $\mu$ m.

Au vu de ces résultats, des essais de transfection du plasmide pCMVLuc ont été effectués en culture cellulaire sur des cellules HeLa (Figure 2.12 et Figure 2.13). Les polyplexes ont été testés dans deux conditions: préparés dans un milieu iso-osmotique (5% de glucose) ou préparés dans un milieu isotonique (150 mM de NaCl), avant dépôt dans les puits de cultures de cellulaires. L'efficacité de transfection a été déterminée par l'expression de la luciférase en luminométrie. La toxicité apparente a été quantifiée par un dosage des protéines cellulaires. Un vecteur commercial (JetSI-Endo<sup>TM</sup>, Polyplus-Transfection) a été utilisé comme témoin positif.

Quand les complexes sont élaborés avec 5% de glucose (Figure 2.12), **G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** présente une efficacité de délivrance modeste. **G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** et **G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** montrent un potentiel de transfection dans le même ordre de grandeur que le vecteur commercial. De plus à la concentration optimale de N/P 2, ces deux composés ne montrent pas de toxicité apparente (pourcentage de protéines cellulaires mesuré élevé).

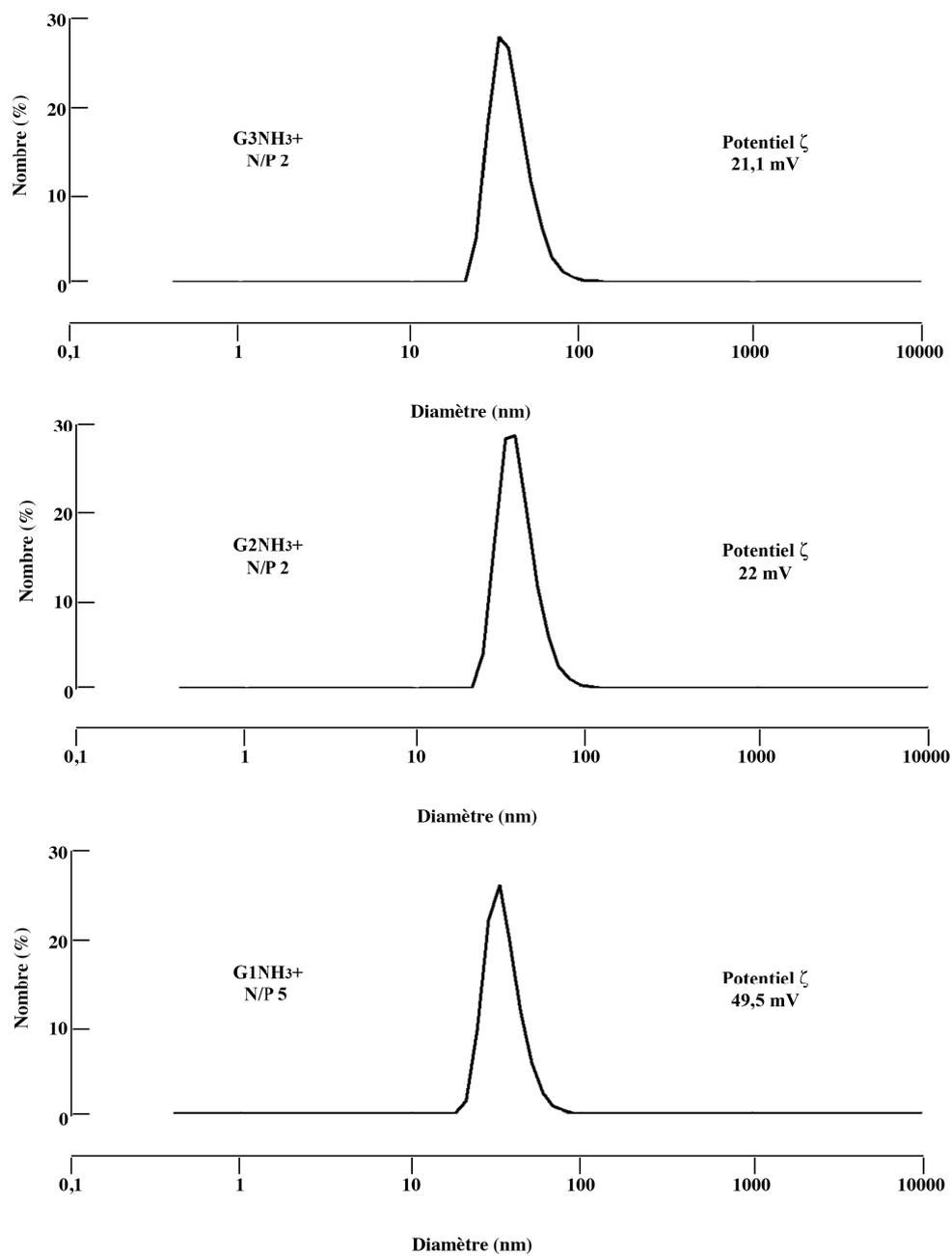


Figure 2.11: DDL des polyplexes formés dans un milieu aqueux à 5% de glucose, avec leur potentiel zêta ( $\zeta$ ) respectif dans ces conditions.

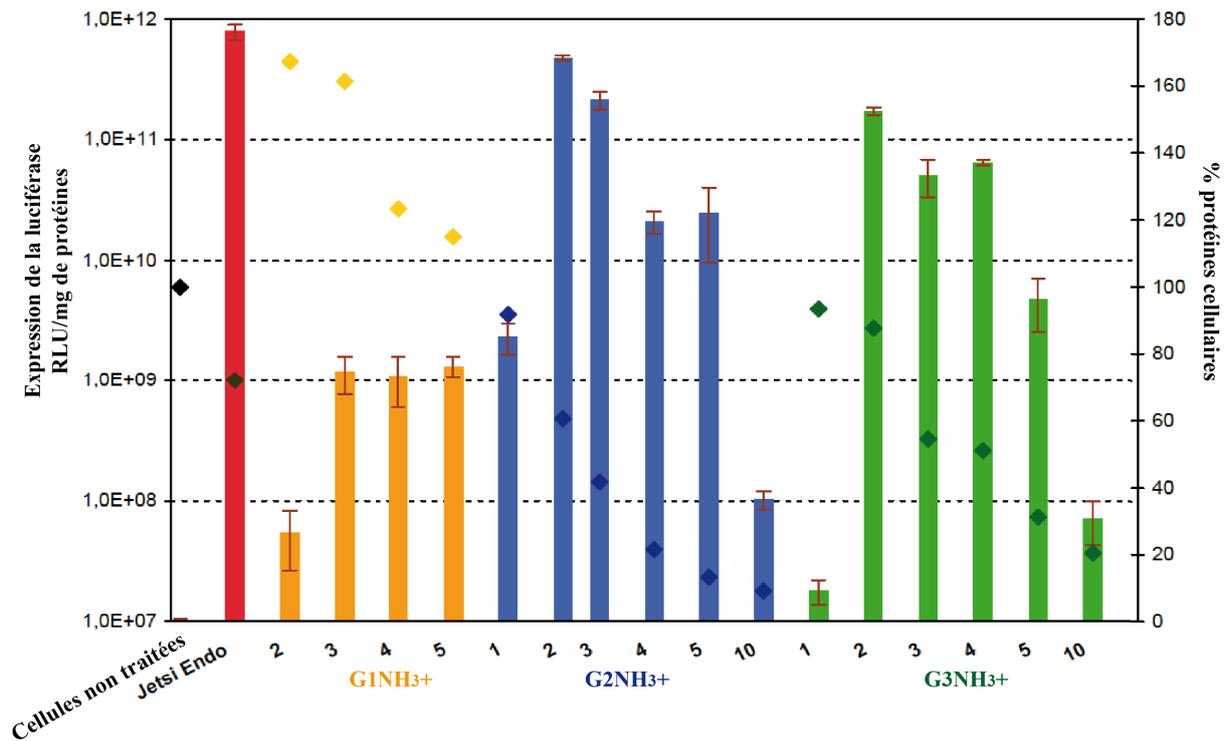


Figure 2.12: Délivrance de pCMVLuc à différent ratio N/P, pour des polyplexes préparés dans 5% de glucose. L'expression de la luciférase (histogramme) et le pourcentage de protéines cellulaires (losanges) sont donnés pour  $GnNH_3^+$ , Jetsi Endo (contrôle positif) et les cellules non traitées (témoin négatif).

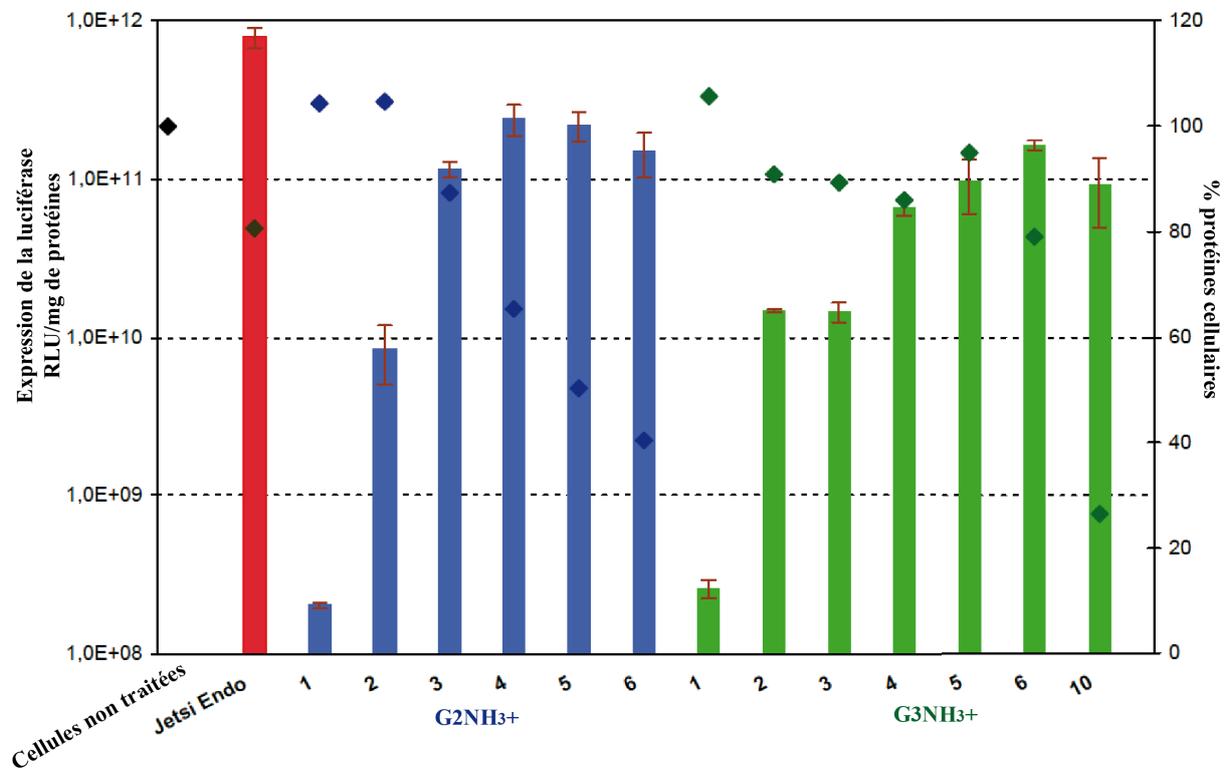


Figure 2.13: Délivrance de pCMVLuc à différent ratio N/P, pour des polyplexes préparés dans 150mM de NaCl. L'expression de la luciférase (histogramme) et le pourcentage de protéines cellulaires (losanges) sont donnés pour  $GnNH_3^+$ , Jetsi Endo (contrôle positif) et les cellules non traitées (témoin négatif).

La même tendance est constatée quand les complexes sont préparés avec 150 mM de NaCl (Figure 2.13). **G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** ne montre pas d'efficacité de transfection alors que **G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** et **G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** présentent un pouvoir de transfection au même niveau que le témoin positif. Le niveau de toxicité quant à lui reste relativement bas aux concentrations optimales de transfection.

Les forces électrostatiques formant les complexes sont plus faibles en milieu salin, il est alors logique de constater que **G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** n'a pas ou peu d'efficacité en transfection, probablement à cause du nombre limité de fonctions protonables. En comparaison, **G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** et **G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** compactent efficacement l'ADN plasmidique, forment des polyplexes stables chargés positivement avec celui-ci, dans le milieu de culture cellulaire, et permettent une délivrance de l'ADN dans les cellules.

#### IV. Conclusion

Des dérivés de C<sub>60</sub> hexa-adduit polycationiques sont capables d'être des vecteurs d'ADN efficaces avec une toxicité apparente relativement faible. En comparaison aux vecteurs dendritiques couramment développés qui présentent une efficacité de transfection à un nombre élevé de génération<sup>3</sup>, ces dérivés présentent une efficacité de transfection remarquable dès la seconde génération.

A l'aide de la méthodologie développée au laboratoire, la possibilité de di-fonctionnaliser les C<sub>60</sub> hexa-adduits<sup>16</sup> permet d'envisager la synthèse de systèmes pouvant, par exemple, cibler sélectivement des types cellulaires, favorisant ainsi la délivrance sélective d'oligonucléotides (Figure 2.14).

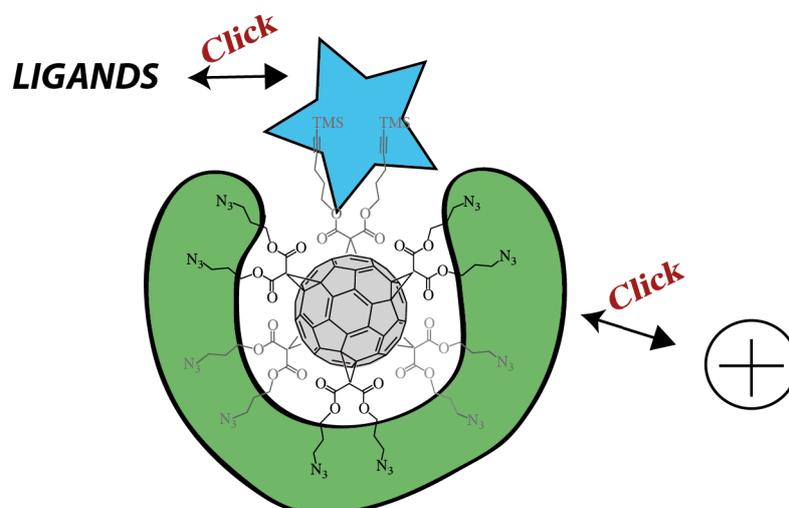


Figure 2.14: Dérivé di-fonctionnalisable permettant une sélectivité de transfection.

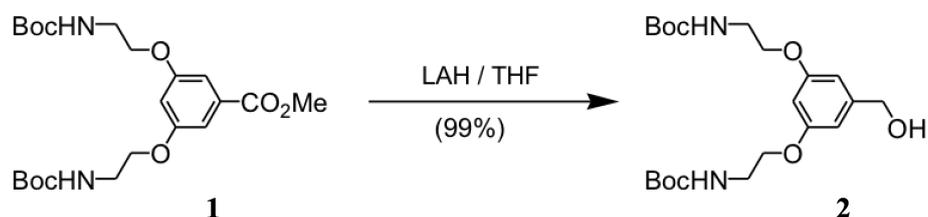
Aussi ce précurseur hexa-adduit di-fonctionnalisable, avec les synthons  $GnN_3$  disponibles au laboratoire, pourrait permettre de créer des composés amphiphiles qui pourraient s'auto-assembler. Ceci sera présenté dans le chapitre suivant.

## V. Partie expérimentale

### Synthesis.

**General:** Reagents and solvents were purchased as reagent grade and used without further purification. Compounds **1**<sup>15</sup>, **5**<sup>16</sup>, **6**<sup>16</sup>, **7**<sup>16</sup> were prepared according to previously reported procedure. All reactions were performed in standard glassware under an inert Ar or N<sub>2</sub> atmosphere. Evaporation and concentration were done at water aspirator pressure and drying in vacuo at 10<sup>-2</sup> Torr. Column chromatography: silica gel 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm) was purchased from E. Merck. Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on glass sheets coated with silica gel 60 F<sub>254</sub> purchased from E. Merck, visualization by UV light. IR spectra (cm<sup>-1</sup>) were measured on an ATI Mattson Genesis Series FTIR instrument. NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 or AC 400 with solvent peaks as reference. Elemental analysis were performed by the analytical service at the Laboratoire de Chimie de Coordination (Toulouse, France).

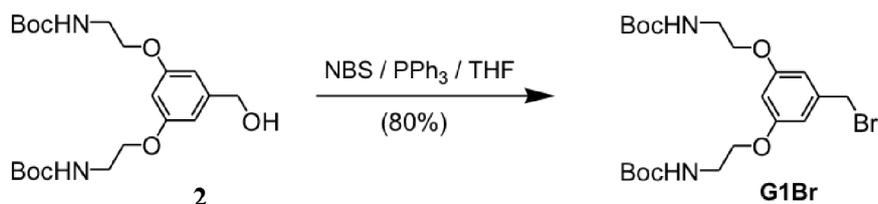
### Preparation of compound 2



A 1 M LAH solution in THF (8.2 mL, 8.23 mmol) was added dropwise to a solution of **1** (3.74 g, 8.23 mmol) in dry THF (100 mL) at 0°C under argon. After 3 h, MeOH (1 mL) was slowly added then H<sub>2</sub>O (several drops). The resulting mixture was filtered on Celite and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 1:1) gave **2** (3.52 g, 99%) as a white solid. IR (neat): 3347 (O-H), 3360 (N-H), 1689 (C=O) cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz,

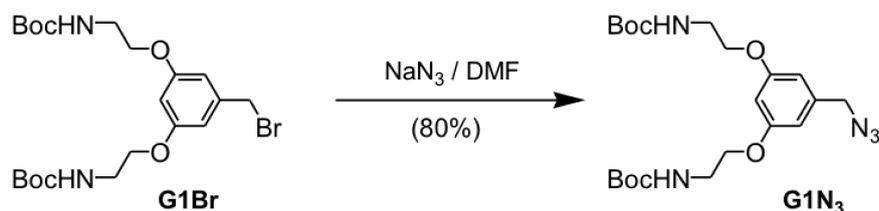
CDCl<sub>3</sub>): 6.53 (d,  $J = 2$  Hz, 2H), 6.37 (t,  $J = 2$  Hz, 1H), 4.95 (broad s, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.01 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 3.52 (m, 4H), 1.45 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 160.0, 156.0, 143.9, 105.5, 100.6, 79.7, 67.3, 65.0, 40.1, 28.5. Elemental analysis (%) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: C 59.14, H 8.03, N 6.57; found: C 58.56, H 8.04, N 6.31.

### Preparation of compound G1Br



A solution of **2** (3.52 g, 8.26 mmol), PPh<sub>3</sub> (2.82 g, 10.08 mmol) and *N*-bromosuccinimide (1.91 g, 10.07 mmol) in THF (50 mL) was stirred at room temperature. After 15 minutes, H<sub>2</sub>O was added to the mixture. The resulting aqueous layer was extracted with AcOEt (3 X). The combined organic layers were dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt 7:3) gave **G1Br** (3.24 g, 80%) as a white solid. IR (neat): 3366 (N-H), 1677 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.54 (d,  $J = 2$  Hz, 2H), 6.38 (t,  $J = 2$  Hz, 1H), 4.94 (broad s, 2H), 4.39 (s, 2H), 4.00 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 3.52 (m, 4H), 1.45 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 159.8, 155.5, 139.9, 107.8, 101.4, 79.8, 67.3, 40.0, 33.3, 28.4. Elemental analysis (%) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: C 51.54, H 6.80, N 5.72; found: C 51.27, H 6.59, N 5.57.

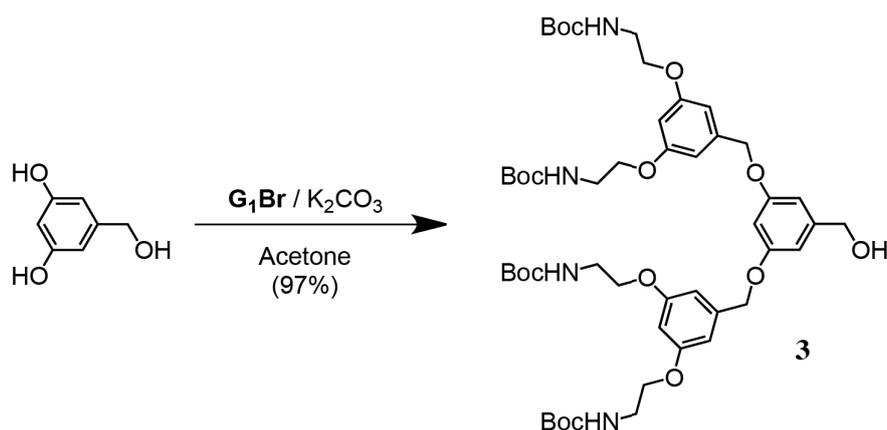
### Preparation of compound G1N<sub>3</sub>



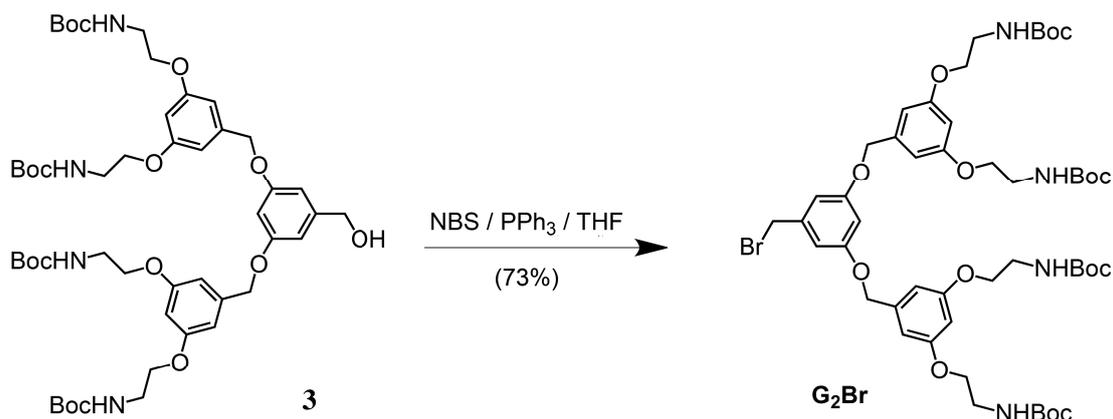
A solution of **G1Br** (0.92 g, 1.89 mmol) and NaN<sub>3</sub> (0.247 g, 3.8 mmol) in DMF (20 mL) was stirred at room temperature. After 12 h, H<sub>2</sub>O was added to the mixture. The resulting

aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 X). The combined organic layers were dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt 7:3) gave **G1N<sub>3</sub>** (0.69 g, 81%) as a white solid. IR (neat): 3345 (N-H), 2098 (N<sub>3</sub>), 1680 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.46 (d, *J* = 2 Hz, 2H), 6.41 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 4.96 (broad s, 2H), 4.26 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 5 Hz, 4H), 3.52 (m, 4H), 1.45 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 160.2, 156.0, 138.0, 107.0, 101.3, 79.7, 67.5, 54.9, 40.2, 28.5. Elemental analysis (%) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: C 55.86, H 7.37, N 15.51; found: C 55.50, H 7.09, N 15.11.

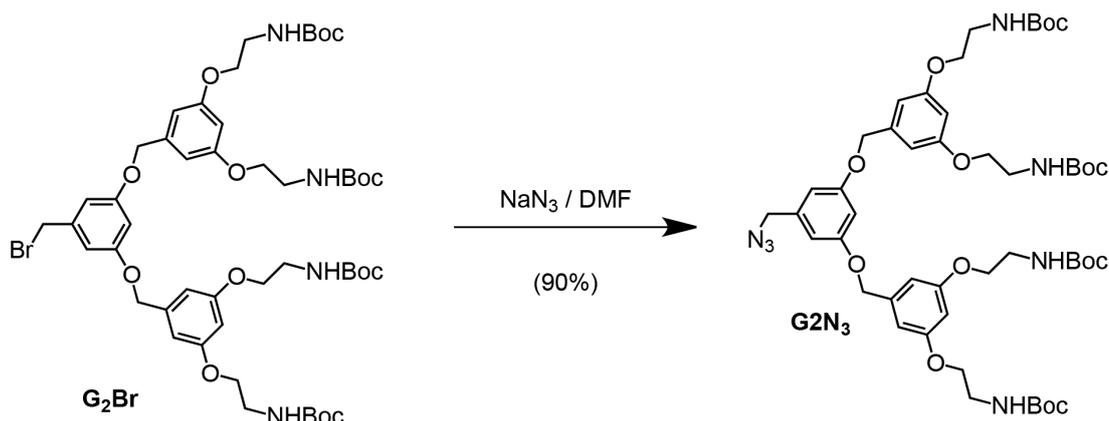
### Preparation of compound 3



A mixture of **G1Br** (3.24 g, 6.63 mmol), 3,5-dihydroxybenzyl alcohol (0.40 g, 3.87 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.59 g, 11.54 mmol) in acetone (55 mL) was heated under reflux. After 2 days, the mixture was filtered and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 8:2) gave **3** (2.67 g, 97%) as a white product. IR (neat): 3346 (O-H/N-H), 1686 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.61 (d, *J* = 2 Hz, 2H), 6.56 (d, *J* = 2 Hz, 4H), 6.50 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 6.39 (t, *J* = 2 Hz, 2H), 5.00 (broad s, 4H), 4.97 (s, 4H), 4.64 (d, 2H), 4.00 (t, *J* = 5 Hz, 8H), 3.51 (m, 8H), 1.45 (s, 36H). Elemental analysis (%) calcd for C<sub>49</sub>H<sub>72</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>: C 61.49, H 7.58, N 5.85; found: C 61.60, H 7.66, N 5.70.

**Preparation of compound G<sub>2</sub>Br**

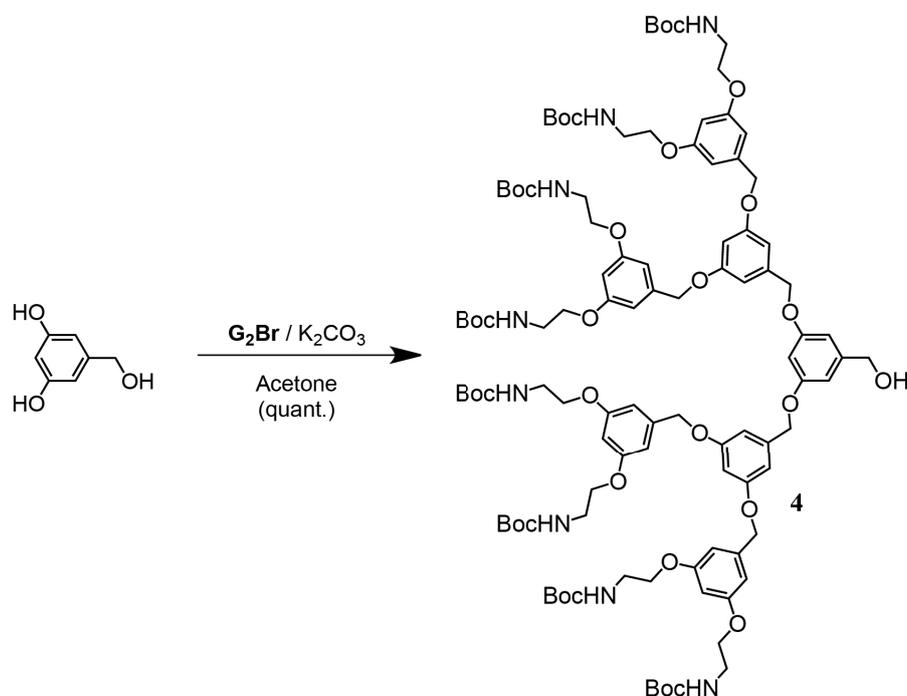
As described for **G<sub>1</sub>Br** from **3** (2.68 g, 2.80 mmol), PPh<sub>3</sub> (0.95 g, 3.63 mmol) and *N*-bromosuccinimide (0.65 g, 3.63 mmol) in THF (25 mL). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt 7:3) gave **G<sub>2</sub>Br** (2.08 g, 73%) as a white solid. IR (neat): 3347 (N-H), 1691 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.63 (d, *J* = 2 Hz, 2H), 6.56 (d, *J* = 2 Hz, 4H), 6.52 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 6.40 (t, *J* = 2 Hz, 2H), 4.98 (broad s, 4H), 4.96 (s, 4H), 4.41 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 5 Hz, 8H), 3.52 (m, 8H), 1.45 (s, 36H). Elemental analysis (%) calcd for C<sub>49</sub>H<sub>71</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>14</sub>·0.6 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C 55.69, H 6.81, N 5.24 ; found: C 55.76, H 6.86, N 5.25.

**Preparation of compound G<sub>2</sub>N<sub>3</sub>**

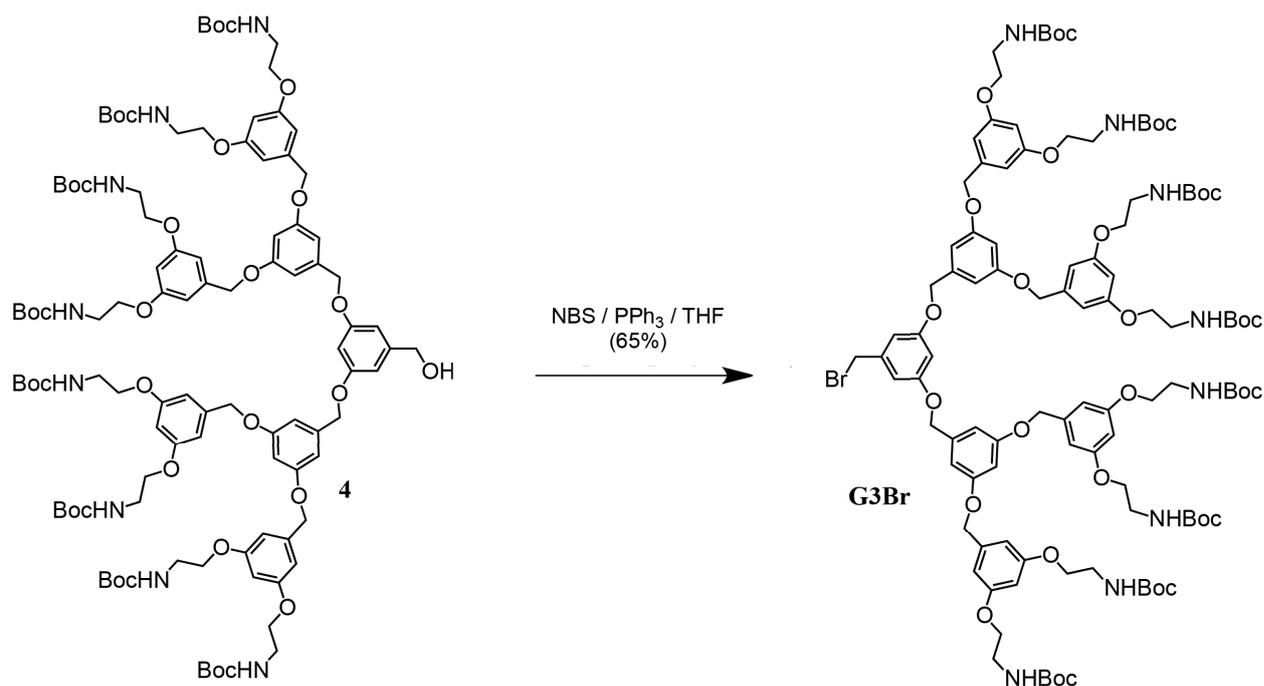
As described for **G<sub>1</sub>N<sub>3</sub>** from **G<sub>2</sub>Br** (600 mg, 0.59 mmol) and NaN<sub>3</sub> (76 mg, 1.17 mmol) in DMF (10 mL). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt 7:3) gave **G<sub>2</sub>N<sub>3</sub>** (521 mg, 90%) as a white solid. IR (neat): 3347 (N-H), 2100 (N<sub>3</sub>), 1694 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.55-6.57 (m, 7H), 6.40 (t, *J* = 2 Hz, 2H), 4.99 (broad s, 4H), 4.97 (s, 4H), 4.27 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 5 Hz, 8H), 3.52 (m, 8H), 1.45 (s, 36H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 160.2,

160.1, 156.0, 139.3, 137.8, 107.4, 106.1, 101.9, 101.0, 79.6, 70.0, 67.4, 54.9, 40.2, 28.5.  
Elemental analysis (%) calcd for  $C_{49}H_{71}N_7O_{14}$ : C 59.92, H 7.29, N 9.98; found: C 59.93, H 7.34, N 9.68.

#### Preparation of compound **4**

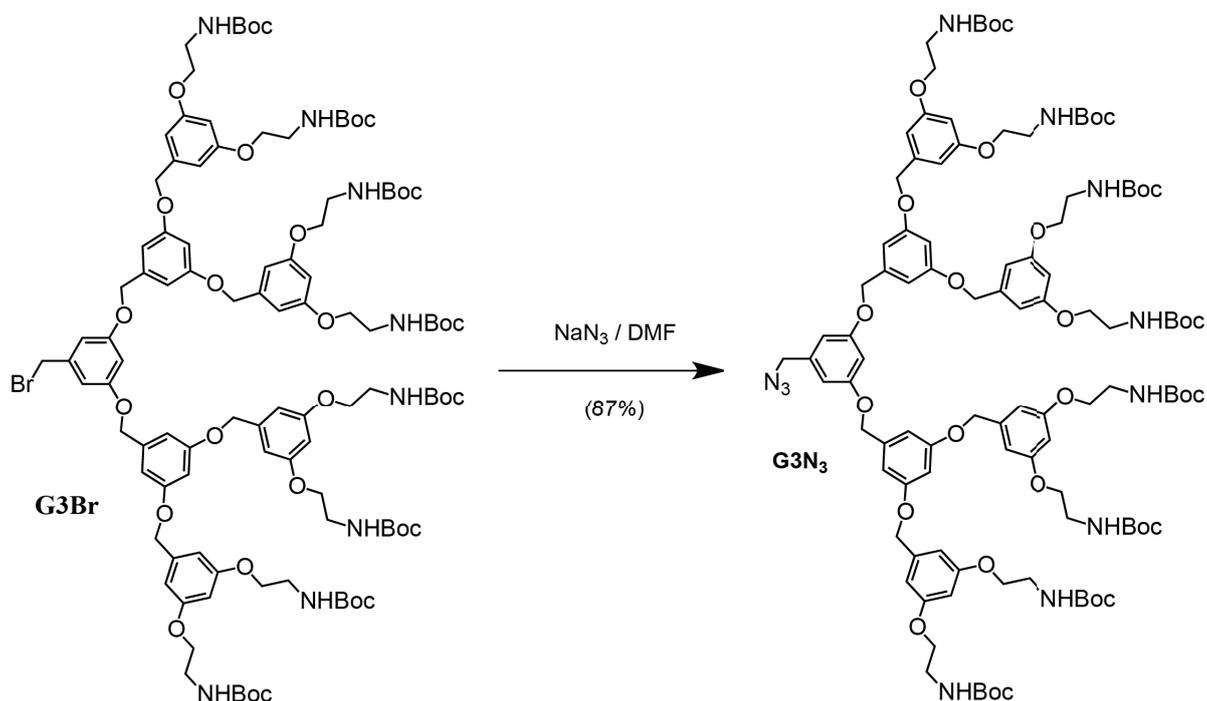


As described for **3** from  $G_2Br$  (1.47 g, 1.44 mmol), 3,5-dihydroxybenzyl alcohol (88 mg, 0.63 mmol) and  $K_2CO_3$  (0.346 g, 2.51 mmol) in acetone (25 mL). Column chromatography ( $SiO_2$ ,  $CH_2Cl_2/AcOEt$  8:2) gave **4** (1.33 g, quantitative) as a white solid. IR (neat): 3341 (O-H/N-H), 1694 (C=O).  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 6.64 (d,  $J = 2$  Hz, 4H), 6.59 (d,  $J = 2$  Hz, 2H), 6.55 (d,  $J = 2$  Hz, 8H), 6.52 (t,  $J = 2$  Hz, 2H), 6.49 (t,  $J = 2$  Hz, 1H), 6.38 (t,  $J = 2$  Hz, 4H), 5.04 (broad s, 8H), 4.98 (s, 4H), 4.95 (s, 8H), 4.61 (d, 2H), 3.98 (t,  $J = 5$  Hz, 16H), 3.50 (m, 16H), 1.44 (s, 72H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 160.1, 156.0, 143.9, 139.6, 139.5, 106.5, 106.2, 105.9, 101.7, 101.3, 101.0, 79.7, 70.1, 70.0, 67.4, 65.1, 40.2, 28.5. Elemental analysis (%) calcd for  $C_{105}H_{148}N_8O_{31} \cdot 0.5 CH_2Cl_2$ : C 61.49, H 7.29, N 5.44; found: C 61.47, H 7.48, N 5.57.

Preparation of compound **G3Br**

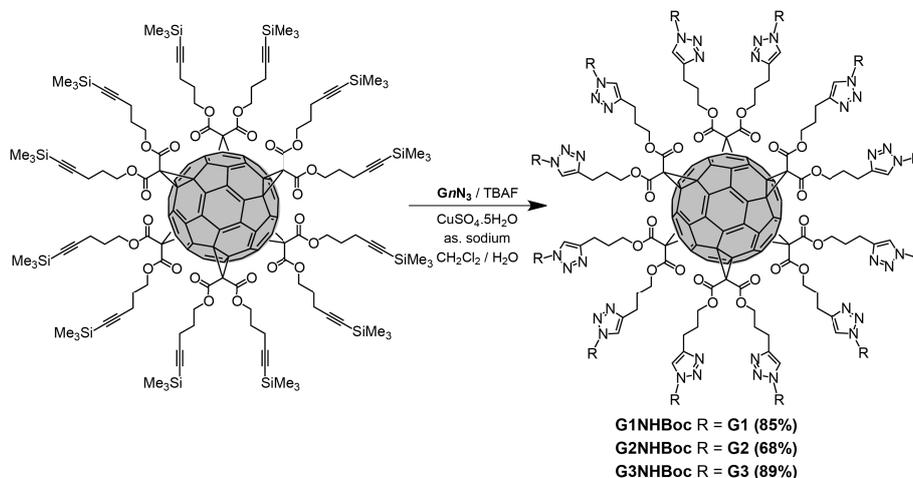
As described for **G1Br** from **4** (2.68 g, 2.80 mmol), PPh<sub>3</sub> (0.95 g, 3.63 mmol) and *N*-bromosuccinimide (0.65 g, 3.63 mmol) in THF (25 mL). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt 7:3) gave **G3Br** (2.08 g, 73%) as a white solid. IR (neat): 3347 (N-H), 1691 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.63 (d, *J* = 2 Hz, 2H), 6.56 (d, *J* = 2 Hz, 4H), 6.52 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 6.40 (t, *J* = 2 Hz, 2H), 4.98 (broad s, 4H), 4.96 (s, 4H), 4.41 (s, 2H), 4.01 (t, *J* = 5 Hz, 8H), 3.52 (m, 8H), 1.45 (s, 36H). Elemental analysis (%) calcd for C<sub>49</sub>H<sub>71</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>14</sub>·0.6 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C 55.69, H 6.81, N 5.24 ; found: C 55.76, H 6.86, N 5.25.

### Preparation of compound **G3N<sub>3</sub>**



As described for **G1N<sub>3</sub>** from **G2Br** (871 mg, 0.42 mmol) and  $\text{NaN}_3$  (54 mg, 0.84 mmol) in DMF (10 mL). Column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , cyclohexane/AcOEt; 1:1) gave **G3N<sub>3</sub>** (750 mg, 87%) as a white solid. IR (neat): 3352 (N-H), 2100 ( $\text{N}_3$ ), 1694 (C=O).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6.66 (d,  $J = 2$  Hz, 4H), 6.56-6.53 (m, 13H), 6.39 (t,  $J = 2$  Hz, 4H), 5.02 (broad s, 8H), 4.98 (s, 4H), 4.95 (s, 8H), 4.26 (s, 2H), 3.99 (t,  $J = 5$  Hz, 16H), 3.51 (m, 16H), 1.45 (s, 72H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 160.3, 160.2, 160.1, 156.0, 139.5, 139.3, 137.8, 107.4, 106.5, 106.2, 102.1, 101.7, 101.0, 79.7, 70.2, 70.0, 67.4, 54.9, 40.2, 28.5. Elemental analysis (%) calcd for  $\text{C}_{105}\text{H}_{147}\text{N}_{11}\text{O}_{30}$ : C 61.72, H 7.25, N 7.54; found: C 61.42, H 7.43, N 7.31.

### Preparation of compound **G1NHBoc**, **G2NHBoc** and **G3NHBoc**



**G1NHBoc.** A 1 M TBAF solution in THF (0.7 mL, 0.7 mmol) was added to a mixture of **6** (51 mg, 0.02 mmol), **G1N<sub>3</sub>** (294 mg, 0.65 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.8 mg, 0.005 mmol) and sodium ascorbate (2.3 mg, 0.015 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1, 2.5 mL). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> containing 5% methanol) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **G1NHBoc** (109 mg, 85%) as an orange glassy product. IR (neat): 3348 (N-H), 1743 (C=O ester), 1695 (C=O Boc). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 229 (253200), 278 (121100), 318 (sh, 53600), 334 (sh, 41700). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.52 (s, 12H), 6.37 (m, 36H), 5.38 (broad s, 24H), 5.20 (broad s, 24H), 4.30 (m, 24H), 3.92 (m, 48H), 3.46 (m, 48H), 2.74 (m, 24H), 2.07 (m, 24H), 1.43 (s, 216H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.7, 160.2, 155.9, 146.7, 145.7, 141.2, 137.4, 121.6, 107.0, 101.0, 79.5, 69.2, 67.3, 66.4, 53.9, 45.6, 40.0, 28.5, 28.0, 22.1. Elemental analysis (%) calcd for C<sub>390</sub>H<sub>480</sub>N<sub>60</sub>O<sub>96</sub>·6 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C 59.06, H 6.16, N 10.43; found: C 58.90, H 6.08, N 9.35.

### Preparation of compound **G2NHBoc**

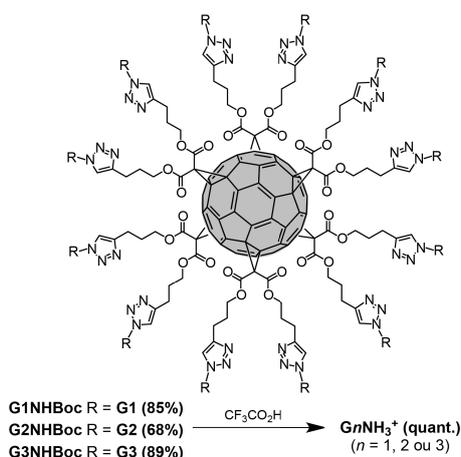
As described for **G1NHBoc** from **6** (85 mg, 0.03 mmol), **G2N<sub>3</sub>** (550 mg, 0.04 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.5 mg, 0.0028 mmol), sodium ascorbate (2.3 mg, 0.008 mmol) and TBAF (0.4 mL, 0.4 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1, 3 mL). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> containing 3% methanol) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **G2NHBoc** (270 mg, 68%) as an orange glassy product. IR (neat): 3350 (N-H), 1740 (C=O ester), 1694 (C=O Boc). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 230 (405500), 281 (147600), 318 (sh, 44700), 334 (sh, 35000). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.44 (broad s, 12H), 6.44 (m, 84H),

6.32 (m, 24H), 5.27-5.32 (m, 72H), 4.78 (s, 48H), 4.28 (m, 24H), 3.91 (m, 48H), 3.45 (m, 48H), 2.70 (m, 24H), 2.04 (m, 24H), 1.41 (s, 432H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.6, 160.2, 159.9, 156.0, 147.1, 145.8, 141.2, 139.0, 137.3, 121.6, 107.2, 106.1, 101.9, 100.7, 79.4, 69.9, 69.2, 67.2, 66.4, 53.8, 45.5, 40.0, 28.4, 28.1, 22.0. Elemental analysis (%) calcd for  $\text{C}_{726}\text{H}_{936}\text{N}_{84}\text{O}_{192} \cdot 2 \text{CHCl}_3$ : C 61.79, H 6.68, N 8.31; found: C 61.40, H 6.80, N 8.13.

### Preparation of compound G3NHBoc

As described for **G1NHBoc** from **6** (57 mg, 0.02 mmol), **G3N<sub>3</sub>** (550 mg, 0.27 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.4 mg, 0.0028 mmol), sodium ascorbate (1.1 mg, 0.006 mmol) and TBAF (0.3 mL, 0.3 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 1 mL). Column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gave **G3NHBoc** (451 mg, 89%) as an orange glassy product. IR (neat) 3363 (N-H), 1745 (C=O ester), 1695 (C=O Boc). UV/Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 231 (706500), 280 (228600), 318 (sh, 43100), 334 (sh, 33100).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.59 (broad s, 12H), 6.51 (m, 48H), 6.44 (m, 156H), 6.30 (m, 48H), 5.30 (s, 96H), 5.28 (s, broad, 96H), 4.76 (m, 48H), 4.70 (m, 24H), 4.33 (m, 24H), 3.88 (m, 192H), 3.42 (m, 192H), 2.74 (m, 24H), 2.11 (m, 24H), 1.40 (broad s, 864H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.7, 160.3, 160.1, 159.9, 156.0, 146.9, 145.9, 141.1, 139.3, 139.0, 137.6, 121.8, 107.1, 106.4, 106.1, 101.7, 101.5, 100.6, 79.4, 69.7, 69.2, 67.2, 66.4, 53.8, 45.3, 43.5, 40.1, 28.5, 28.1, 22.2. Elemental analysis (%) calcd for  $\text{C}_{1398}\text{H}_{1848}\text{N}_{132}\text{O}_{384}$ : C 63.01, H 6.99, N 6.94; found: C 62.81, H 6.96, N 6.48.

### Preparation of compound G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup> and G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>



**G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>·G1NHBoc** (93 mg, 0.012 mmol) was dissolved in TFA (2 mL). After 4 h, the mixture was evaporated and dried under vacuum to afford **G1NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** as its trifluoroacetate salt (98 mg, quantitative). Orange glassy product. IR (neat): 1742 (C=O ester), 1671 (C=O TFA). UV/Vis (H<sub>2</sub>O): 201 (576000), 275 (91500), 314 (sh, 45300), 332 (sh, 36200). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 7.67 (m, 12H), 6.52 (m, 12H), 6.46 (m, 24H), 5.35 (m, 24H), 4.12 (m, 72H), 3.33 (m, 48H), 2.57 (m, 24H), 1.84 (m, 24H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): 164.1, 162.4 (q, *J* = 36 Hz), 159.2, 146.1, 145.4, 141.3, 136.9, 123.7, 116.4 (q, *J* = 290 Hz), 107.6, 101.7, 69.2, 66.8, 64.1, 54.0, 46.3, 38.8, 27.0, 21.0.

**G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup>·G2NHBoc** (190 mg, 0.014 mmol) was dissolved in TFA (2 mL). After 4 h, the mixture was evaporated and dried under vacuum to afford as **G2NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** its trifluoroacetate salt (224 mg, quantitative). Orange glassy product. IR (neat): 1736 (C=O ester), 1671 (C=O TFA). UV/Vis (H<sub>2</sub>O): 203 (1238300), 280 (136600), 318 (sh, 40100), 334 (sh, 31900). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 7.36 (m, 12H), 6.48-6.45 (m, 84H), 6.36 (m, 24H), 5.22 (m, 24H), 4.64 (m, 72H), 4.03 (m, 96H), 3.28 (m, 96H), 2.39 (m, 24H), 1.65 (m, 24H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 163.7, 162.4 (q, *J* = 34 Hz), 160.2, 159.7, 159.0, 146.5, 145.4, 141.4, 139.1, 137.4, 122.8, 116.5 (q, *J* = 290 Hz), 107.1, 106.6, 101.7, 101.2, 66.6, 63.9, 53.6, 48.9, 46.4, 38.8, 27.1, 21.1.

**G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>·G3NHBoc** (251 mg, 0.009 mmol) was dissolved in TFA (2 mL). After 4 h, the mixture was evaporated and dried under vacuum to afford as **G3NH<sub>3</sub><sup>+</sup>** its trifluoroacetate salt (264 mg, quantitative). Orange glassy product. IR (neat) 1738 (C=O ester), 1671 (C=O TFA). UV/Vis (H<sub>2</sub>O): 203 (2779600), 280 (247200), 318 (sh, 41400), 334 (sh, 29100). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 7.59 (broad s, 12H), 6.50-6.10 (m, 252H), 4.80 (broad s, 24H), 4.70 (broad s, 144H), 3.85 (m, 216H), 3.2 (m, 192H), 2.30 (m, 24H), 1.65 (m, 24H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): 163.6, 162.4 (q, *J* = 35 Hz), 159.8, 159.4, 158.9, 146.4, 145.2, 141.5, 139.9, 138.9, 137.4, 122.5, 116.5 (q, *J* = 292 Hz), 106.1, 106.1, 106.1, 101.1, 101.1, 101.1, 69.4, 69.0, 66.7, 65.5, 63.8, 53.4, 48.9, 38.8, 27.4, 21.0.

### **Agarose gel electrophoresis analysis.**

Twenty microliters of water containing 5% glucose or 150 mM NaCl, 0.4 µg pCMVLuc and increasing amounts of cationic vectors **GnNH<sub>3</sub><sup>+</sup>** were subjected (30 min of complexation time) to electrophoresis in a 1% agarose gel containing 1 mM EDTA and 40 mM Tris acetate buffer and 0.5 µg/mL ethidium bromide, for 90 min at 100 V. DNA was visualized with an UV transilluminator at 254 nm.

### **Size of particles, $\zeta$ potential.**

The hydrodynamic radii were determined *via* dynamic light scattering measurements using a Malvern nanoZS apparatus with the following specifications: sampling time = 90 s; refractive index of medium (water with 5% glucose) = 1.340; refractive index of particles = 1.43; medium viscosity = 1.0140 cP temperature = 25°C. Data were analyzed using the multimodal number distribution software included with the instrument.  $\zeta$  potentials were measured with the same apparatus and with the following specifications: 20 measurements per sample; dielectric constant = 80; temperature = 25°C; beam mode F(Ka) = 1.5 (Smoluchowski model). Polyplexes (1 mL volume) were prepared as described for delivery experiment.

### **Electron microscopy analysis.**

Images were taken with a TEM Philips CM12 apparatus. Compounds were transferred onto ultrathin carbon film grids (Ted Pella, 1822-F, formvar removed) by placing the grid on top of 10 µL drop for 1 min. Grid with adherent particles was wicked from one side, placed on 100 µL water drop for 30 s for washing, wicked, placed for 1 min on 60 µL drop of freshly filtered 1.33% uranyl acetate, wicked again and air dried before imaging.

### **Cell culture.**

HeLa cells were grown in Eagle's MEM supplemented with 10% FBS, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere and all experiments were done in triplicates. The day before experiment, cells were seeded in 24-multiwell plates at 50.10<sup>3</sup> cells/well in fresh complete medium (1 mL).

### **Polyplexes formation for pCMVLuc delivery.**

The procedure is for a 24-multiwell plates experiment. Typically, an aqueous solution of the **GnNH<sub>3</sub><sup>+</sup>** (volume depending on the desired N/P ratio) is diluted up to 50  $\mu$ L in water containing 5% glucose or 150 mM NaCl. The solution is vortexed and left for 10 min. Separately, an aqueous solution of pCMVLuc (corresponding to 2  $\mu$ g of pCMVLuc) is diluted up to 50  $\mu$ L in water containing 5% glucose or 150 mM NaCl. Then, the solution is vortexed and left for 10 min, after which the G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> or G<sub>3</sub> solution is added to the pCMVLuc solution, and vigorously mixed (15 s). Finally, the polyplexes are incubated for 30 min at room temperature and added in each well by dilution with the cell medium without serum (1 mL). Four hours later, each well is completed with serum (0.1 mL). The gene expression profiles are analyzed 24 h after addition of polyplexes.

### **Quantification of the luciferase gene expression.**

Luciferase gene expression was determined 24 h after delivery with a commercial kit, using manufacturer's protocol (Luciferase Assay System, Promega, Charbonnières, France). The luminescence was measured from 2  $\mu$ L of lysate during 1 s with a luminometer (Centro LB960 XS; Berthold, Thoiry, France). Luciferase activity is expressed as the mean of light units integrated over 10 s (RLU) and normalized per mg of cell protein by using the BCA assay (Pierce, Brebières, France). The errors bars represent standard deviation derived from triplicate experiments.

JetSI™-ENDO is a transfection reagent (Polyplus transfection), which is used according to manufacturer's instructions.

## **VI. Bibliographie**

- (1) Lonez, C.; Vandenbranden, M.; Ruyschaert, J.-M. *Progress in Lipid Research* **2008**, *47*, 340.
- (2) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 7297.
- (3) Haensler, J.; Szoka, F. C. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 372.
- (4) Guillot-Nieckowski, M.; Eisler, S.; Diederich, F. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31*, 1111.
- (5) Behr, J.-P. *CHIMIA International Journal of Chemistry* **1997**, *51*, 34.
- (6) Maeda-Mamiya, R.; Noiri, E.; Isobe, H.; Nakanishi, W.; Okamoto, K.; Doi, K.; Sugaya, T.; Izumi, T.; Homma, T.; Nakamura, E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 5339.

- (7) Isobe, H.; Nakanishi, W.; Tomita, N.; Jinno, S.; Okayama, H.; Nakamura, E. *Chemistry – An Asian Journal* **2006**, *1*, 167.
- (8) Richardson, C. F.; Schuster, D. I.; Wilson, S. R. *Organic Letters* **2000**, *2*, 1011.
- (9) Ortiz Mellet, C.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 6728.
- (10) Sigwalt, D.; Holler, M.; Iehl, J.; Nierengarten, J.-F.; Nothisen, M.; Morin, E.; Remy, J.-S. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 4640.
- (11) Camps, X.; Schönberger, H.; Hirsch, A. *Chemistry – A European Journal* **1997**, *3*, 561.
- (12) Hirsch, A.; Vostrowsky, O. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, *2001*, 829.
- (13) Hawker, C.; Frechet, J. M. J. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1990**, 1010.
- (14) Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 7638.
- (15) Brouwer, Arwin J.; Mulders, Suzanne J. E.; Liskamp, Rob M. J. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, *2001*, 1903.
- (16) Iehl, J.; Nierengarten, J.-F. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 7306.
- (17) Iehl, J.; Pereira de Freitas, R.; Delavaux-Nicot, B.; Nierengarten, J.-F. *Chemical Communications* **2008**, 2450.
- (18) Pierrat, P.; Vanderheiden, S.; Muller, T.; Brase, S. *Chemical Communications* **2009**, 1748.
- (19) D Goula, J. S. R., P Erbacher, M Wasowicz, G Levi, B Abdallah and B A Demeneix *Gene Therapy* **1998**, *5*, 712.

*Chapitre 3 : Auto-assemblages de  
dérivés de C<sub>60</sub> hexa-adduits*



## I. C<sub>60</sub> amphiphiles décrits précédemment

Les composés amphiphiles sont généralement composés de deux parties, l'une hydrophile et l'autre hydrophobe. Classiquement, ces molécules sont constituées de chaînes aliphatiques pour la partie hydrophobe et de fonctions polaires telles que des amines, des acides carboxyliques ou encore de l'éthylène glycol pour la partie hydrophile.

Pour ce qui est des dérivés de C<sub>60</sub> amphiphiles, une revue de la littérature indique qu'ils ont notamment été utilisés pour la création de films de Langmuir et de films de Langmuir-Blodgett (LB). Bien que le C<sub>60</sub> lui-même peut former des films de Langmuir<sup>1</sup>, sa tendance à s'agréger à cause de fortes interactions  $\pi$ - $\pi$ <sup>1</sup> a conduit les chimistes à développer de nouvelles stratégies de synthèse pour obtenir des dérivés de C<sub>60</sub> formant des films fins plus stables. Par exemple, Wang et collaborateurs<sup>2</sup> ont créé trois dérivés amphiphiles de fullerènes (Figure 3.1). La balance hydrophile/hydrophobe a été déterminée en jouant sur la partie polaire des molécules, comportant soit une fonction amine ou carboxylique. De plus, cette équipe a produit un composé hexa-adduit de C<sub>60</sub> avec des chaînes alkyles. Ces produits ont montré la capacité à former des films à l'interface air-eau, plus stable que le C<sub>60</sub> non substitué. D'après l'étude, ce gain de stabilité serait lié à la fonctionnalisation du C<sub>60</sub>. L'organisation des molécules permettrait d'éviter les effets d'agrégation. Comme le montre la représentation schématique d'une couche de molécules du composé mono adduit ayant une fonction amine (Figure 3.1) sur support solide, l'interaction entre les sphères de carbone est diminuée grâce à la partie hydrophile qui peut partiellement s'intercaler entre les molécules. La stabilité la plus importante étant observée pour le dérivé hexa-adduit, qui, avec les chaînes alkyles périphériques, masque complètement le cœur C<sub>60</sub> empêchant toute agrégation par  $\pi$  *stacking*.

Dans la même idée, le groupe de Guldi<sup>3</sup> a conçu un fullerène amphiphile mono-adduit où la partie hydrophile comporte un complexe métallique de ruthénium, bon donneur d'électron, pouvant potentiellement effectuer des transferts d'électrons via le C<sub>60</sub>, bon accepteur d'électrons (Figure 3.2). L'incorporation de ce type de composé donneur-accepteur d'électrons dans des films fins semble particulièrement intéressante pour des applications en photovoltaïque<sup>4</sup>. Ainsi ce composé s'organise effectivement en film fin à l'interface air-eau permettant de déposer des films de LB sur des supports en quartz ou d'oxyde d'étain-indium. Les analyses du diagramme de compression isotherme de la pression de surface ( $\pi$ ) par rapport à l'aire de la surface ( $A$ ) sur l'eau et de microscopie à l'angle de Brewster confirment la formation du film. Celui-ci ne peut pas subir de cycle de compression/décompression indiquant que le procédé est irréversible et une transition de phase est observée à partir d'une

certaine pression exercée. D'une phase «liquide apparente», les molécules s'organisent alors en fibres de longueurs micrométriques, observées par microscopie à force atomique. Pour s'astreindre de ce phénomène d'agrégation due aux interactions fullerène-fullerène, notre groupe a démontré que le C<sub>60</sub> pouvait être encapsulé avec de longues chaînes alkyles empêchant l'agrégation.<sup>5</sup> Notre équipe a donc aussi développé un fullerène bis-adduit avec une tête polaire comprenant un complexe métallique de ruthénium, « encapsulé » par quatre chaînes alkyles<sup>6</sup> (Figure 3.2). Cette stratégie a effectivement permis de voir la formation de films de Langmuir et les cycles de compression/décompression observés ont montré une très bonne réversibilité contrairement au composé décrit par *Guldi* et collaborateurs.

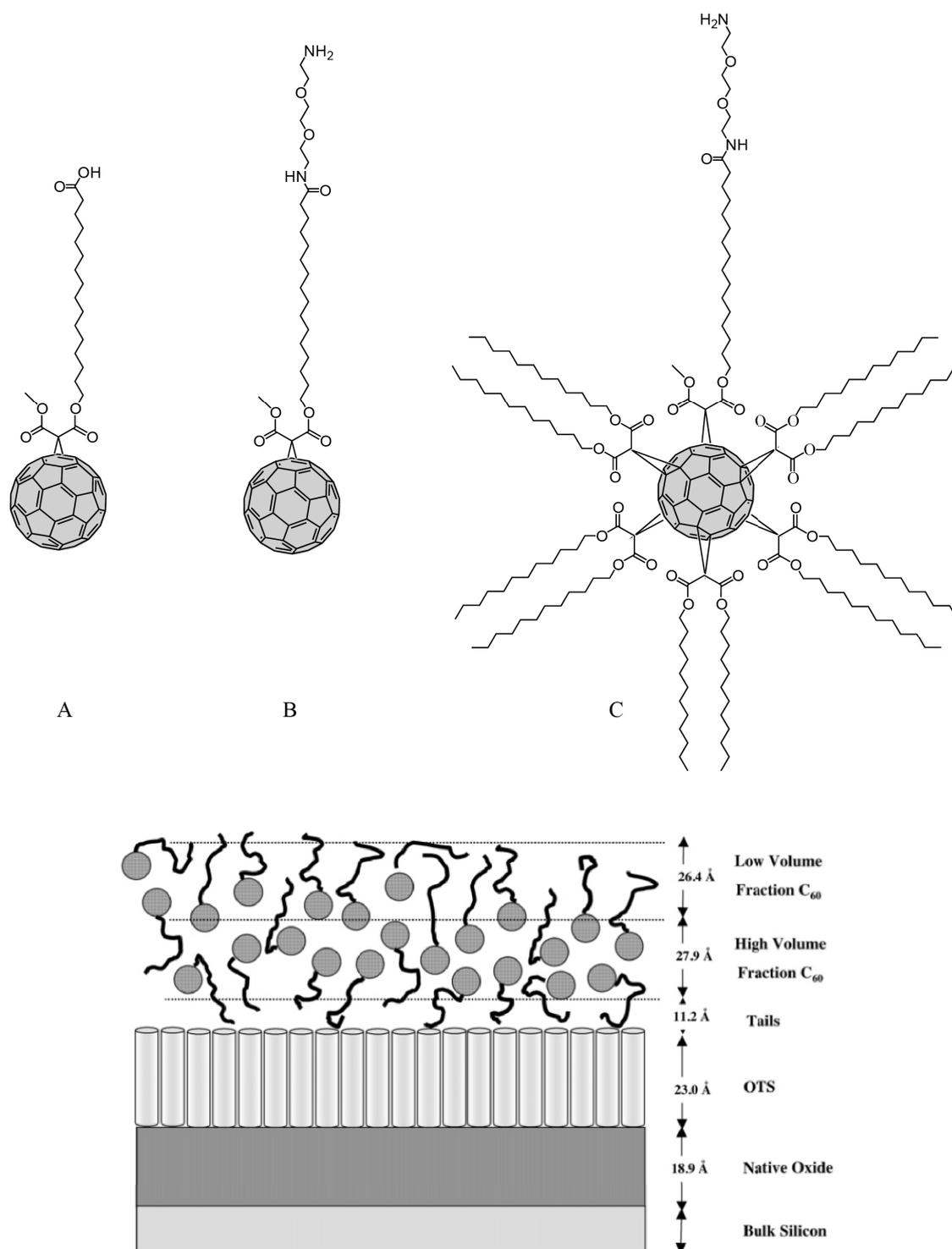


Figure 3.1: En haut: mono et hexa-adduits amphiphiles synthétisés par le groupe de Wang. En dessous: Schéma d'une monocouche de la molécule B sur support solide.<sup>2</sup>

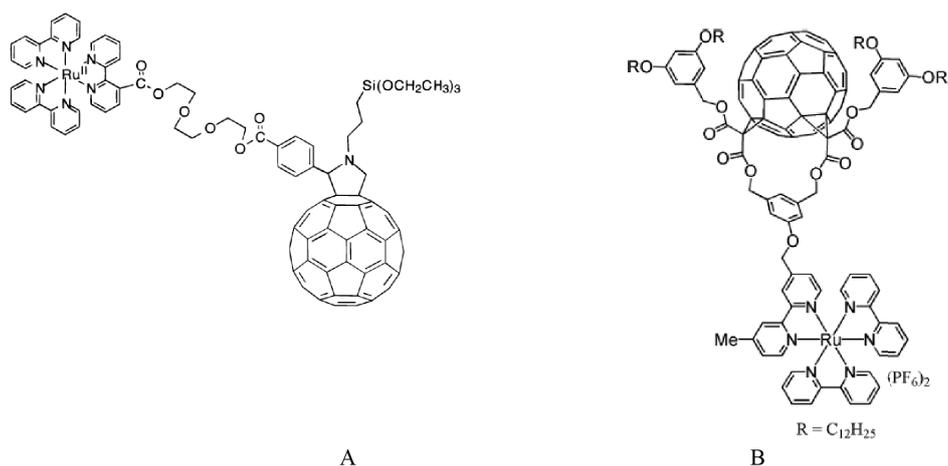


Figure 3.2: Composés de types donneur-accepteur d'électrons incorporés dans des films de Langmuir. A: Fullerène synthétisé par l'équipe de *Guldi*. B: Fullerène synthétisé dans notre équipe. Les chaînes aliphatiques permettent de stabiliser les films en évitant les phénomènes d'agrégation.

Avec la même stratégie d'encapsulation du  $C_{60}$ , plusieurs composés amphiphiles ont été élaborés.<sup>7,8,9</sup> Des composés relativement accessibles, comme le dérivé comportant deux groupements triéthylène glycol monométhyléther ou deux fonctions acides carboxyliques, à des composés synthétiquement plus élaborés comme les dendrimères, représentés dans la Figure 3.3, tous ont la capacité de former des films de Langmuir, tout en évitant les effets d'agrégations.

Enfin un  $C_{60}$  hexa-adduit<sup>10</sup>, ayant dix unités cholestérols pour partie hydrophobe et deux acides carboxyliques, a aussi montré la possibilité d'être incorporé dans des films de Langmuir et LB. Les auteurs ont indiqué que cette molécule s'auto-assemblait en bicouche. Plusieurs exemples d'auto-assemblages dictés par l'architecture des molécules ont été observés avec des dérivés de  $C_{60}$  amphiphiles.

Ainsi, un dérivé simple mono-adduit de fullerène a montré la capacité à s'organiser sous de forme de disques de 10 à 12 nm, en milieu aqueux.<sup>11</sup> Ses propriétés électrochimiques ont été étudiées et ont indiqué que des transferts d'électrons avaient lieu générant des fullerènes trianion relativement peu stables.

A partir de composés similaires, le groupe de *Prato* s'est intéressé à la nature des forces qui dirige l'auto-assemblage d'amphiphiles de fullerène mono-adduit.<sup>12</sup> En faisant varier la taille du *linker*, le nombre de charge, ou en incorporant une porphyrine, une variété de topologie a été observée. Alors que le composé le plus hydrophobe forme de gros agrégats sphériques (de 500 nm à 1, 2  $\mu\text{m}$ ), les composés plus hydrophiles forment des fibres de quelques dizaines de nanomètres. Un composé incorporant une porphyrine montre même la

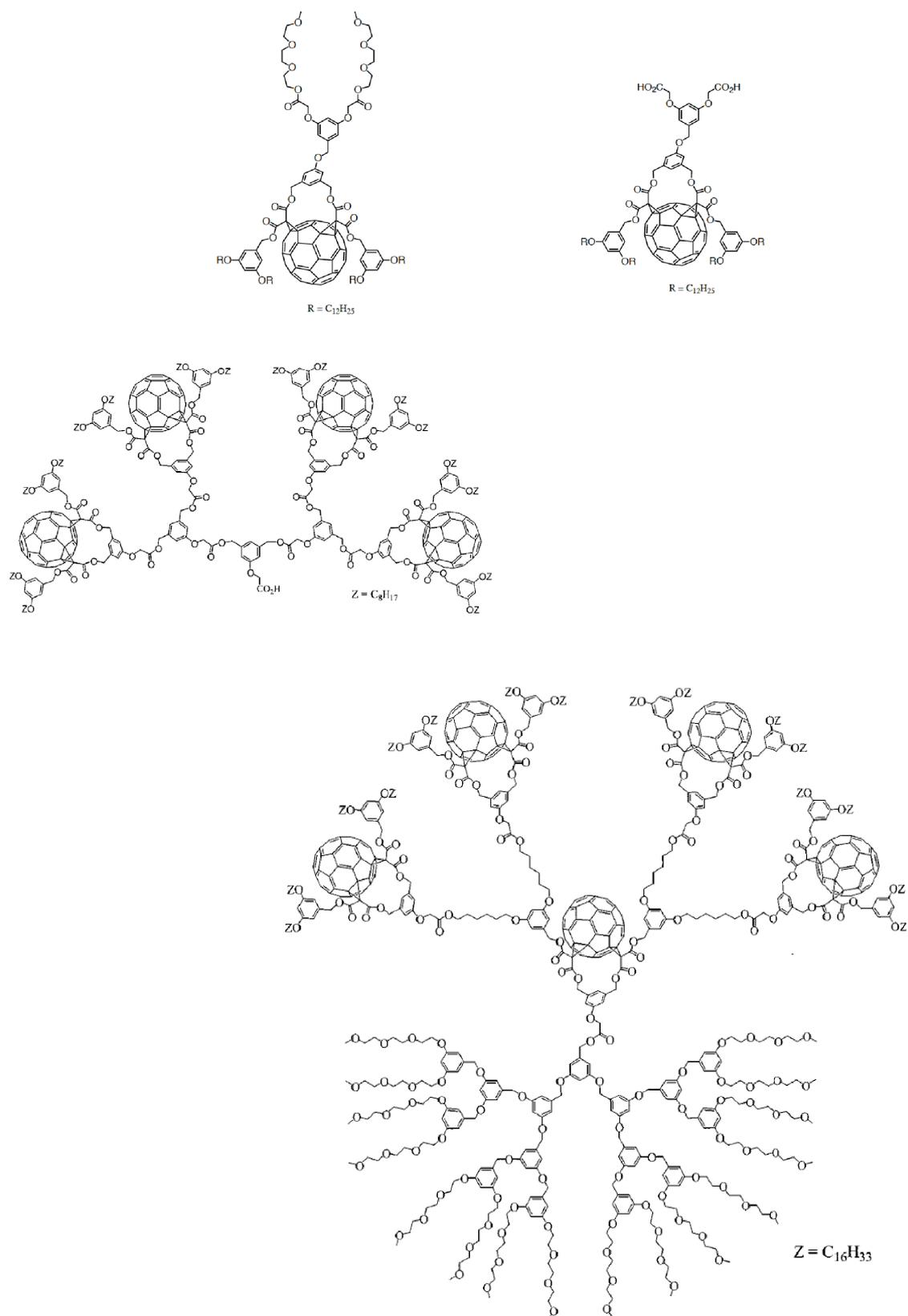


Figure 3.3: Série d'amphiphiles formant des films de Langmuir.

formation de nanotubules (Figure 3.4). Les auteurs concluent que l'auto-organisation du composé relativement peu hydrophile est dirigé par son hydrophobicité intrinsèque alors que

les autres espèces subissent un effet hydrophobe moindre. L'introduction d'interactions dirigées entre les molécules de fullerènes mono-adduit/porphyrine semble être la force majeure qui a permis la formation de nanotubes.

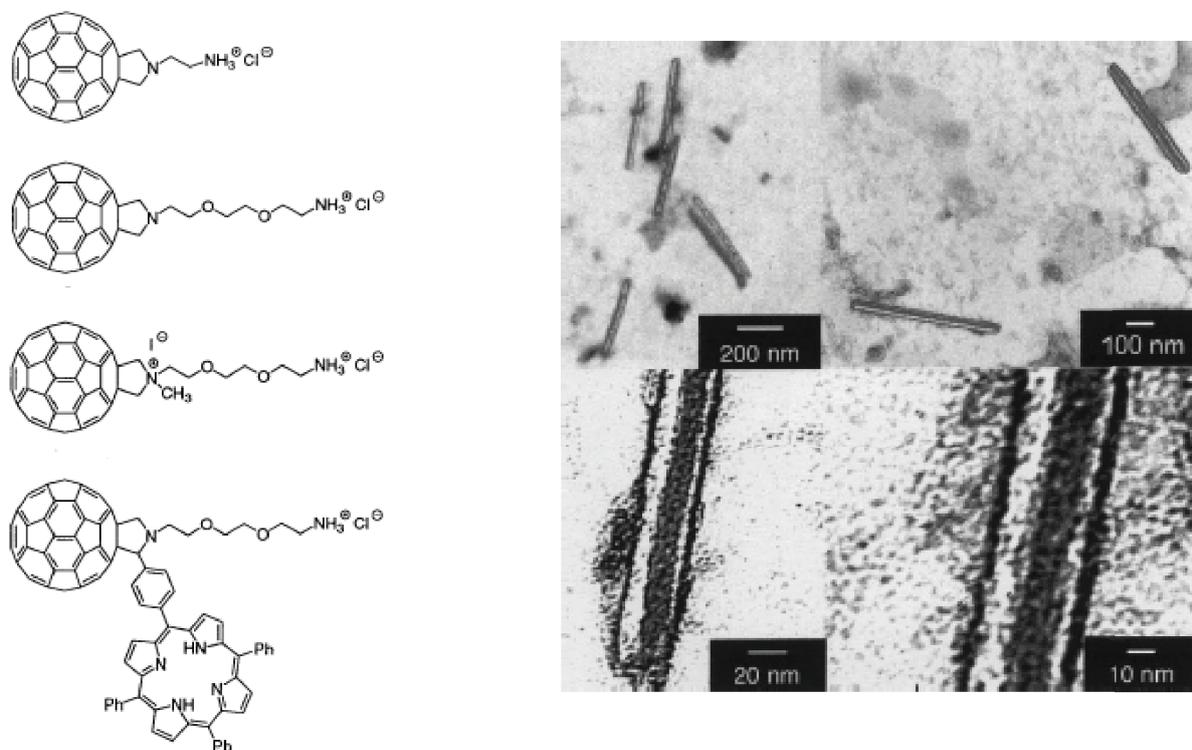


Figure 3.4: Composés amphiphiles créés par le laboratoire de *Prato*. Images de MET du composé C<sub>60</sub>-porphyrine s'assemblant en nanotubes.<sup>12</sup>

Dans une étude réalisée par le groupe de *Martin*<sup>13</sup>, trois composés mono-adduits sur lesquels ont été greffés une série de trois dendrons ont été synthétisés. Le ratio hydrophile/hydrophobe a été fixé par les dendrons contenant 4, 8 ou 16 acides carboxyliques. L'équipe a constaté que chaque molécule présentait une morphologie définie. Alors que les mono-adduits à 4 et 16 acides carboxyliques s'organisent en vésicules, le composé à 8 acides carboxyliques présente une conformation en corde dans les conditions de concentration adéquate. Les auteurs proposent d'incorporer ces composés dans des cellules photovoltaïques, les auto-assemblages observés pouvant aider à la conduction du courant.

Dans la même optique, *Aida* a créé un auto-assemblage élégant d'un système donneur-accepteur d'électrons sous forme de cristaux liquides.<sup>14</sup> Le caractère amphiphile du composé semble jouer un rôle positif dans la conduction électrique. Comparé à un composé modèle, totalement lipophile mais aussi cristal liquide, le composé amphiphile présente une

conduction dix fois meilleure. Ceci s'expliquerait par une meilleure organisation du dérivé amphiphile, évitant la formation de sites de piégeage du courant, au contraire du dérivé lipophile (Figure 3.5). En tirant profit de leurs résultats, les auteurs ont conçu un autre système donneur-accepteur d'électrons, amphiphile, à base de C<sub>60</sub>-porphyrine, avec une partie hydrophile composée de trois groupements triéthylène glycols.<sup>15</sup> Les auteurs ont observé un auto-assemblage en nanotube du composé. Le caractère amphiphile de celui-ci semble déterminant non seulement pour la formation de cette structure, mais aussi sur la conduction électrique. En effet, l'amphiphile permet une bonne ségrégation de la partie donneuse (porphyrine) et accepteur (C<sub>60</sub>) d'électrons, favorisant le transfert d'électrons (Figure 3.5).

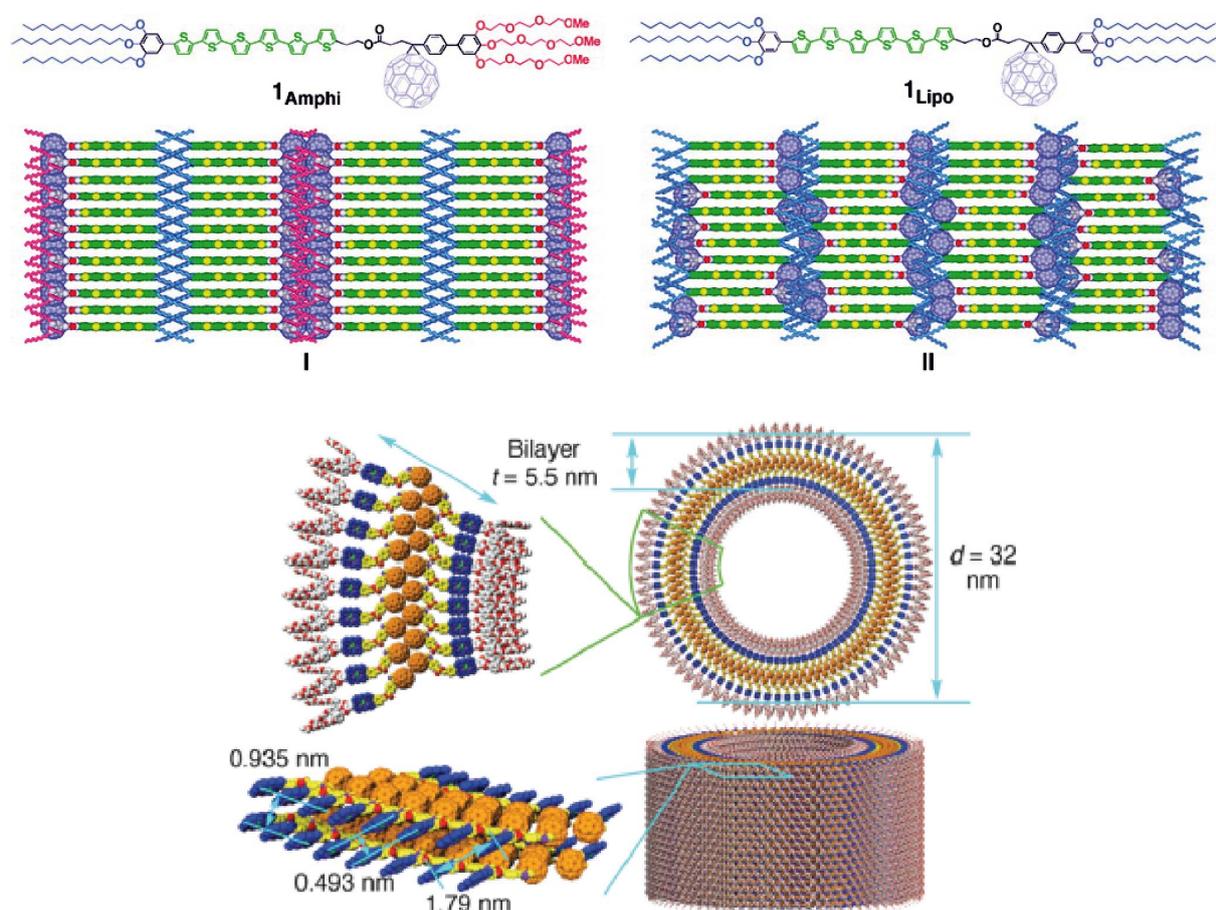


Figure 3.5: En haut: Composés amphiphile (1Amphi) et lipophile (1Lipo) s'organisant en cristaux liquides.<sup>14</sup> En bas: Dérivé de C<sub>60</sub> monoadduit-porphyrine avec des chaînes triéthylène glycols s'assemblant en nanotubes.<sup>15</sup>

En terme de structure, l'architecture en forme de vésicule a été couramment décrite pour les C<sub>60</sub> amphiphiles. L'un d'eux de type bolaamphiphile<sup>16</sup>, a montré la capacité à former des vésicules de tailles hétérogènes.<sup>17</sup> Un autre dérivé de C<sub>60</sub>, basé sur un système collecteur d'énergie (diphénylaminofluorène)-accepteur lié à deux chaînes oligoéthylène glycols, a aussi

montré une aptitude à former des vésicules de 20 à 70 nm, en bicouche.<sup>18</sup> Ce composé a notamment la propriété de réaliser de l'absorption à deux photons dans l'eau.

Le groupe de *Nakamura* s'est intéressé au développement de vésicules à base de  $C_{60}$  sur un motif original non-polaire ( $C_{60}$ )/polaire (anion formé sur le  $C_{60}$ )/non-polaire (chaînes alkyles perfluorées ou non)<sup>19</sup>, utilisant leur propre méthodologie pour obtenir des  $C_{60}$  penta-adduits. Une bibliothèque d'une vingtaine de composés a permis de mettre en évidence la formation de vésicules en bicouche de taille homogène de 25 à 60 nm de diamètre, relativement stables.<sup>20</sup> Ce gain de stabilité serait lié au motif ternaire des produits, où les chaînes alkyles mises en contact de l'eau forceraient une agrégation stable.

Une large contribution sur la formation et l'étude d'assemblages de fullerènes amphiphiles a été apportée par l'équipe de *Hirsch*. En 2000, cette équipe a décrit la formation de vésicules de  $C_{60}$  hexa-adduit [5:1], comportant cinq malonates avec des chaînes alkyles et un malonate dendritique avec des acides carboxyliques terminaux.<sup>21</sup> Une étude complète de l'assemblage de ce composé a montré la formation de vésicules nanométriques (50 à 150 nm de diamètre) potentiellement aptes à servir comme système de délivrance (des tests de cytotoxicité complémentaires n'ayant pas montré de fortes dégradations cellulaires)<sup>22</sup> (Figure 3.6). Une large variété de fullerènes amphiphiles hexa-adduit [5:1] et [3:3] a été produite par ce laboratoire.<sup>23, 24</sup> Ainsi, un produit obtenu par addition d'un macrocycle comprenant trois malonates (partie hydrophobe) et de trois autres malonates comprenant des acides carboxyliques sur le  $C_{60}$  a procuré un composé amphiphile hexa-adduit constituant de petites micelles sphériques de 5 nm<sup>25</sup> (Figure 3.6). De façon intéressante, le  $C_{60}$  qui forme des micelles a formellement le même nombre potentiel de charges négatives que celui formant des vésicules. En conséquence, des assemblages différents peuvent être obtenus en jouant sur l'addition régiosélective des malonates sur la sphère de carbone, plus qu'en jouant sur la balance hydrophobe/hydrophile.

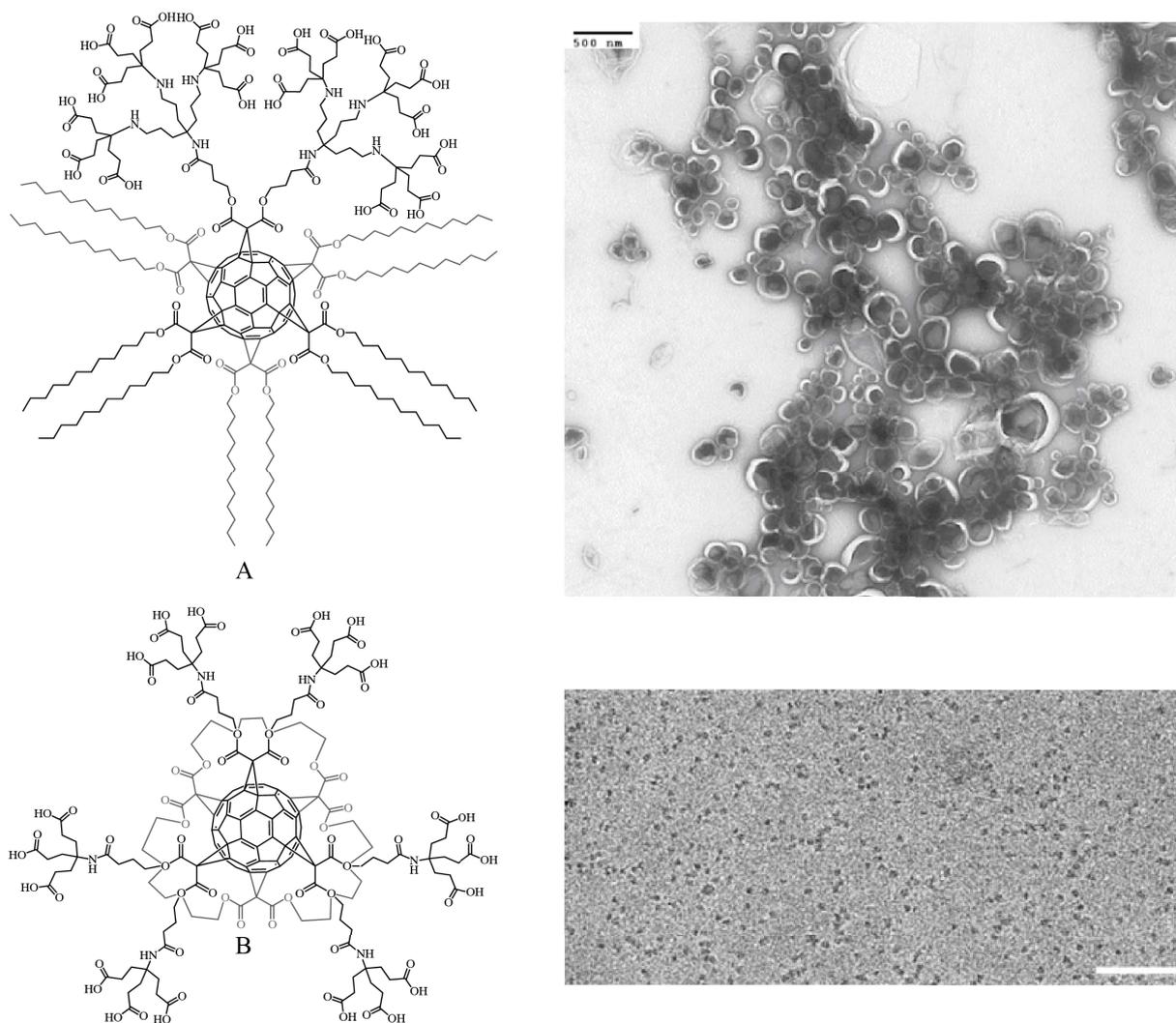


Figure 3.6: A: Structure du C<sub>60</sub> hexa-adduit formant des vésicules<sup>22</sup> (image de MET en haut, à droite). B: Structure du C<sub>60</sub> hexa-adduit formant des micelles<sup>23</sup> (image de MET en bas, à droite, échelle: 50nm).

Récemment, deux composés obtenus par notre méthodologie de post-fonctionnalisation par cycloaddition ont montré une forte tendance à l'agrégation sous forme de micelles.<sup>26</sup>

Dans ce contexte, le développement de nouveaux composés amphiphiles à base de fullerène semble un domaine attractif, tant pour des applications dans les matériaux (formation de films de Langmuir et Langmuir-Blodgett, systèmes photo et/ou électro-actif), que pour de possibles utilisations en tant que système de délivrance biologique. L'encapsulation de composés biologiquement actifs dans des vésicules ou micelles étant possible. Notre équipe s'est donc proposée de synthétiser une série de composés amphiphiles, ayant la possibilité de s'auto-assembler pour ces applications potentielles.

## II. Synthèse d'une série d'hexa-adduits amphiphiles

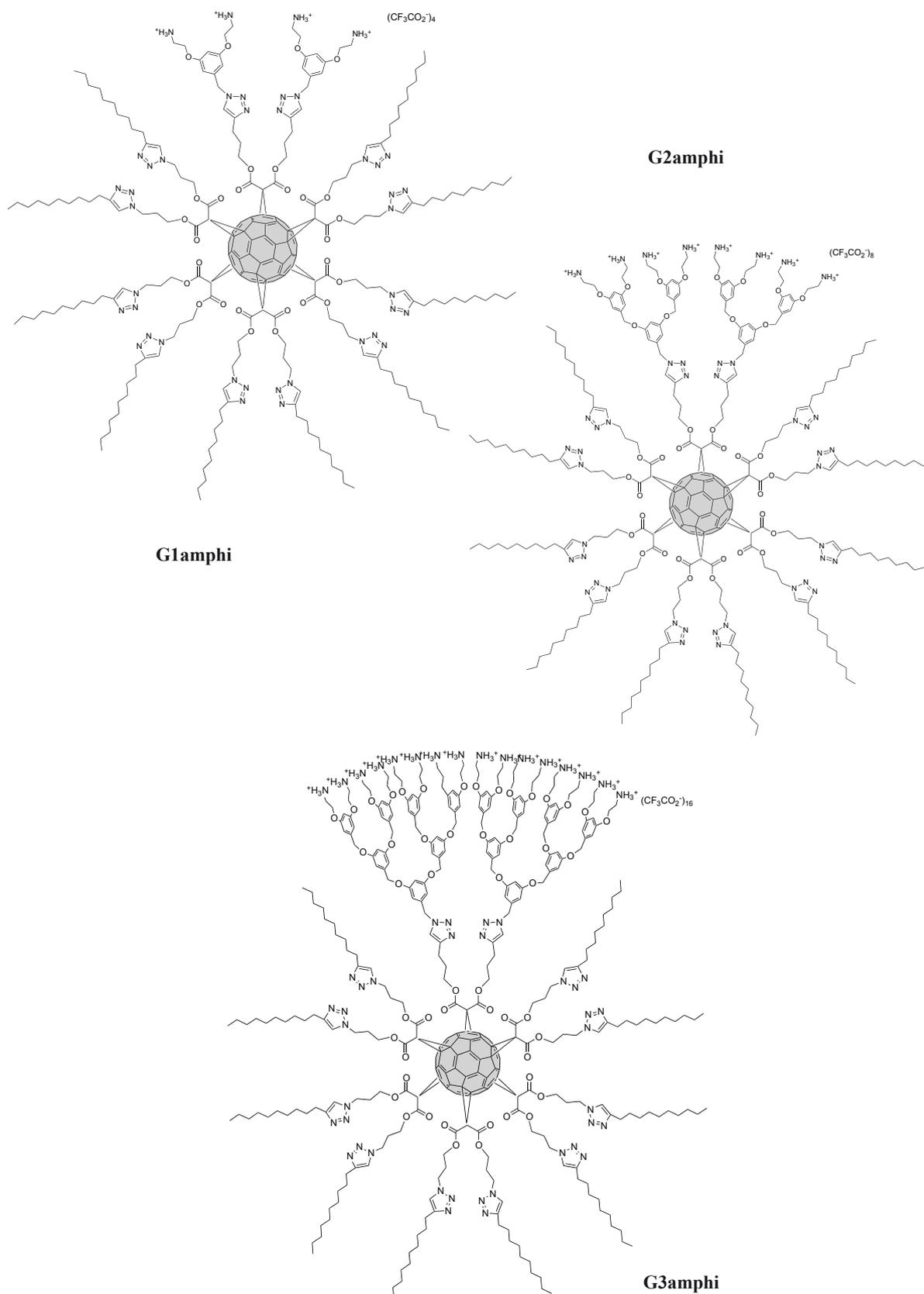


Figure 3.7: Série dendritique de dérivés hexa-adduits amphiphiles.

Tirant profit des synthons **GnN<sub>3</sub>** employés précédemment pour la conception de vecteurs de C<sub>60</sub> hexa-adduits polycationiques, (Chapitre 2 : II.) une courte série dendritique de trois molécules a été préparée (Figure 3.7). Le ratio hydrophobe/hydrophile a été défini par la variation de fonctions amines (4, 8 ou 16), la partie hydrophobe a été fixée par dix chaînes alkyles. Le C<sub>60</sub> hexa substitué n'a plus assez de réactivité pour présenter des propriétés électroniques intéressantes. Il a donc été employé ici uniquement comme support globulaire, capable de procurer des auto-assemblages. Une stratégie de post-fonctionnalisation «click-click» a permis d'obtenir ces produits à partir d'un C<sub>60</sub> hexa-adduit commun. Ce composé étant relativement simple à obtenir à partir de malonates, eux aussi, simples.

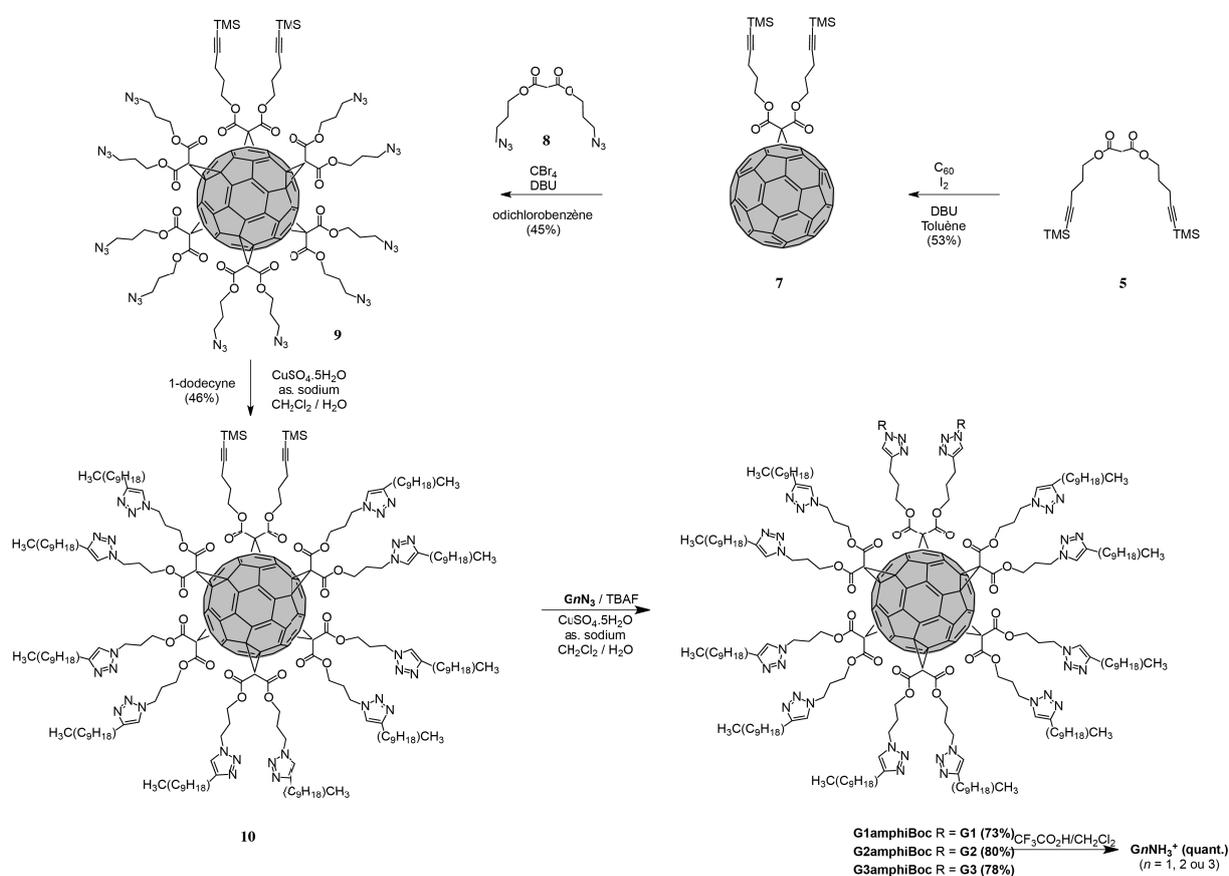


Figure 3.8: Schéma de synthèse des dérivés **G1amphi**, **G2amphi** et **G3amphi**.

Les trois synthèses commencent avec le même dérivé hexa-adduit [5:1] **9**, mis au point au laboratoire (Figure 3.8). Une réaction de *Bingel* du malonate contenant les deux fonctions alcynes protégées **5** (obtenu en deux étapes) avec le C<sub>60</sub>, en quantités stoechiométriques, dans des conditions de pseudo-haute dilution, fournit le mono-adduit **7** correspondant. Ensuite, la sphère de carbone est complétée par une seconde réaction de *Bingel*, dans les conditions de *Sun*, avec le malonate diazoturé **8**. Une première réaction de cycloaddition de *Huisgen*

catalysée au cuivre fournit le précurseur alcyne **10** comportant les chaînes alkyles avec un rendement relativement modeste (46%), comparé à d'autres composés similaires développés au laboratoire. Une seconde réaction de cycloaddition avec les dendrons **GnN<sub>3</sub>**, après déprotection *in situ* des alcynes, donne les composés **G1amphiBoc**, **G2amphiBoc**, **G3amphiBoc**. Finalement, les composés d'intérêt ont été obtenus en déprotégeant les Boc avec du TFA.

Ces produits ont été caractérisés, tant bien par RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C que par spectroscopie IR et UV.

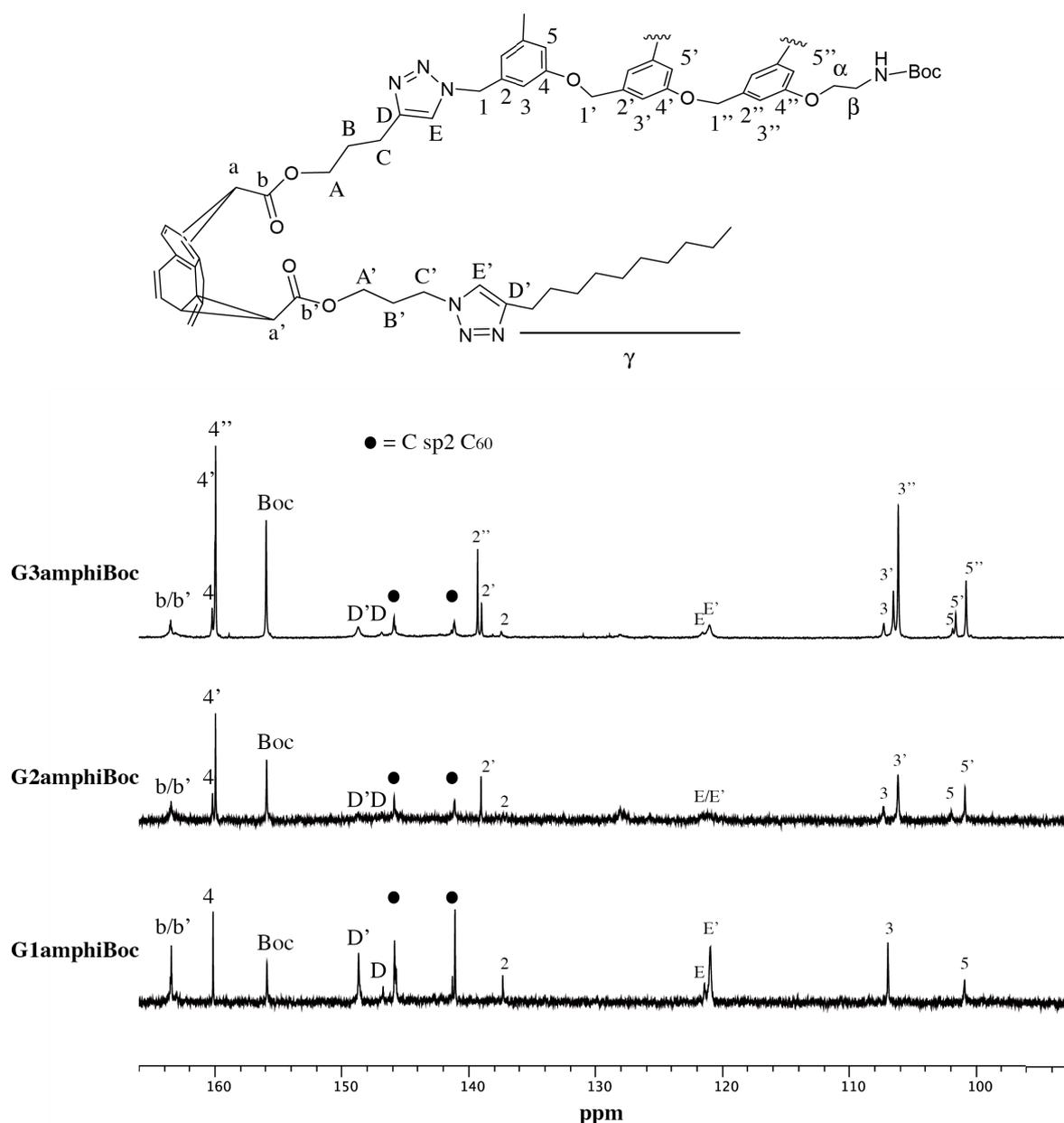


Figure 3.9: Spectres RMN <sup>13</sup>C de **G1amphiBoc**, **G2amphiBoc** (75 MHz) et **G3amphiBoc** (100 Mhz) dans du CDCl<sub>3</sub>.

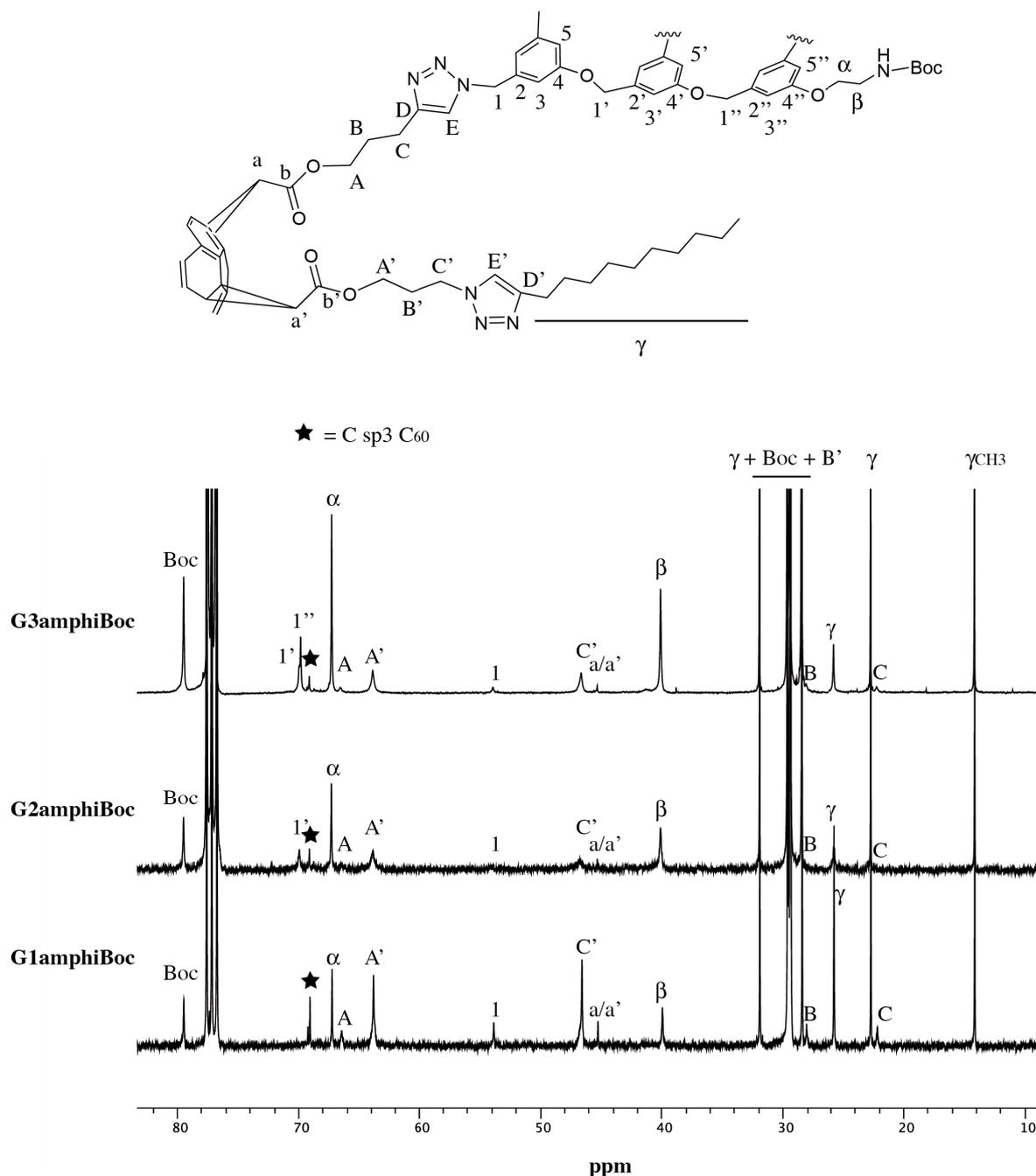


Figure 3.10: Spectres RMN <sup>13</sup>C de **G1amphiBoc**, **G2amphiBoc** (75 MHz) et **G3amphiBoc** (100 MHz) dans du CDCl<sub>3</sub>.

Un haut niveau de fragmentation en spectrométrie de masse (MALDI-TOF), probablement dû à la dégradation des dendrons amines, n'a pas permis d'identifier les produits finaux, ou les intermédiaires avec les amines protégées par cette analyse. À cause de leur caractère amphiphile, ces molécules s'agrègent, rendant l'analyse RMN <sup>13</sup>C difficile. Néanmoins, les RMN <sup>13</sup>C des trois composés montrent une symétrie pseudo-octaédrique caractéristique des C<sub>60</sub> hexa-adduits mixtes, avec deux ensembles de signaux vers 145 et 141 ppm correspondants aux carbones sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub>. Les signaux des deux carbones des cycles

triazoles étant aussi identifiables en deux pools de signaux vers 121 et 146 ppm. De plus, les analyses RMN  $^{13}\text{C}$  des précurseurs **G1amphiBoc**, **G2amphiBoc** et **G3amphiBoc**, n'ont montré aucune ambiguïté quand à la nature des produits (Figure 3.9, Figure 3.10).

Une analyse par MET des trois composés **G1amphi**, **G2amphi** et **G3amphi** a été réalisée (Figure 3.11). Les trois produits ont été dissous dans un mélange de solvants, THF/H<sub>2</sub>O à différents ratios, à température ambiante. Les composés ont été préparés avec une même concentration massique de 5 mg/mL. Globalement chacun des trois produits présente des auto-assemblages à différent niveau de concentration aqueuse. Il est à noter que **G3amphi** est le seul composé soluble dans l'eau sans la présence de THF (soluble à 5 mg/mL), à température ambiante.

**G1amphi** présente une capacité d'auto-organisation en particule sphérique d'aspect vésiculaire d'environ 150 nm de diamètre dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O (4:1). Lorsque le ratio passe à 1:1, les molécules semblent plutôt s'assembler en micelles sphériques de taille relativement homogène. En continuant d'augmenter la concentration d'eau, les particules coalescent et précipitent quand le pourcentage de THF devient faible (10%). Ainsi, pour une concentration THF/H<sub>2</sub>O de 1:9, de larges précipités polymorphes sont observés.

**G2amphi** montre un profil similaire. A un mélange THF/H<sub>2</sub>O de 4 pour 1, des particules sphériques de 50 à 125 nm sont observées avec la présence d'objets plus petits de 10 à 15 nm. Lorsque la quantité d'eau augmente, les grosses structures disparaissent pour laisser place aux petites particules de 10 à 15 nm. Ces particules pourraient être des micelles sphériques dont la population est assez homogène à un ratio THF/H<sub>2</sub>O de 1:9.

Quand à **G3amphi**, de petites particules sphériques d'une dizaine de nanomètres s'apparentant à des micelles sont observées, dans toutes les conditions de mélange THF/H<sub>2</sub>O. Les objets construits présentent une bonne homogénéité d'architecture.

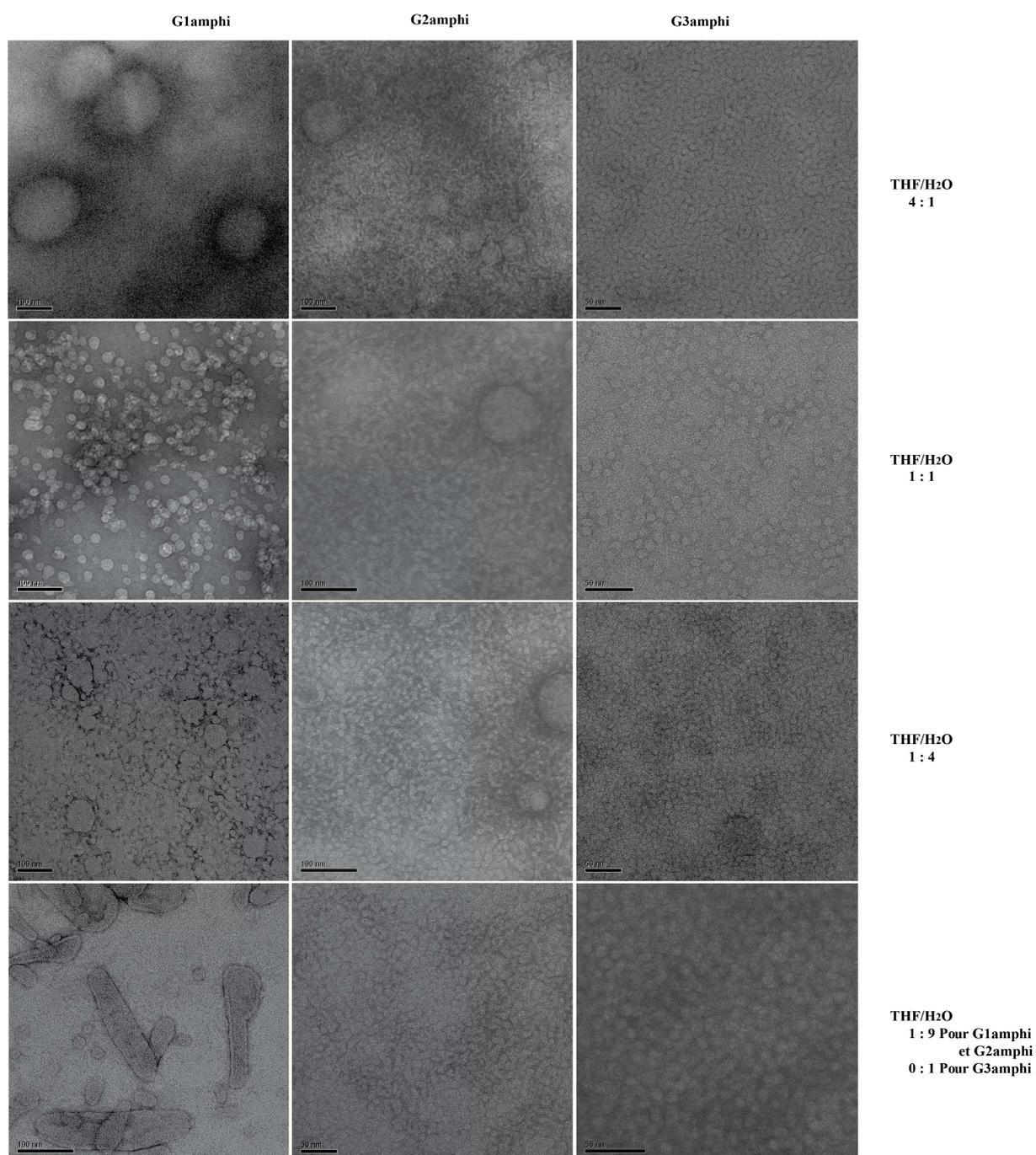


Figure 3.11: Images de MET de **G1amphi** (colonne de gauche, barres d'échelle = 100 nm), **G2amphi** (colonne du milieu, barres d'échelles = 100 nm, sauf pour THF/H<sub>2</sub>O à 1:9 où barre d'échelle = 50 nm), **G3amphi** (colonne de droite, barres d'échelle = 50 nm). Tous les échantillons ont été préparés à une concentration de 5 mg/mL.

L'analyse par DDL de **G3amphi** dans l'eau (Figure 3.12) corrobore avec les images de microscopie: de petites particules d'une dizaines de nanomètres sont observées.

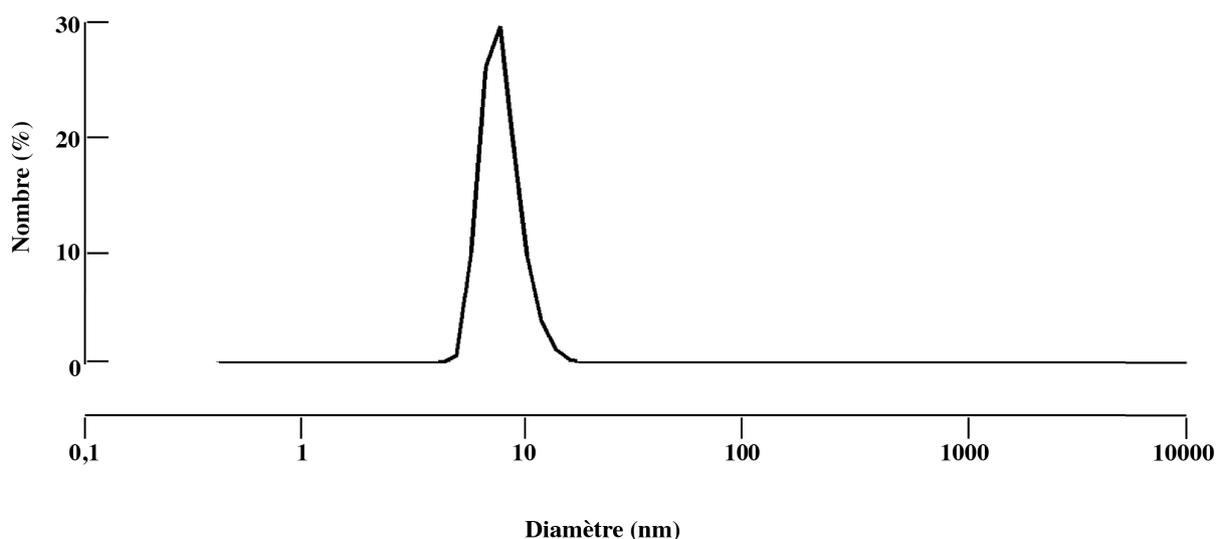


Figure 3.12: Analyse par DDL de la taille des structures formées par **G3amphi** dans l'eau, à 5 mg/mL.

En fait, le nombre de fonctions amines influe sur la solubilité des composés en phase aqueuse. Ce faisant **G1amphi**, composé le moins polaire forme des particules homogènes pour un ratio 1:1 de THF/H<sub>2</sub>O, mais précipite quand la teneur en eau augmente. L'obtention de particules homogènes pour **G2amphi**, s'observe avec une concentration en eau plus importante. Enfin, **G3amphi**, présente une solubilité raisonnable dans l'eau grâce à un nombre d'amines conséquent. La balance hydrophile/hydrophobe permet donc d'avoir des nanostructures en solution aqueuse. Ces propriétés pourraient être intéressantes pour encapsuler des composés hydrophobes en milieux biologiques, et potentiellement effectuer la délivrance de ces composés.

Des essais d'insertion de pyrène (composé hydrophobe modèle) dans la partie hydrophobe des micelles formées par **G3amphi** ont été réalisés et analysés par spectroscopie UV/visible (Figure 3.13). A une concentration à saturation et constante de pyrène de 10<sup>-5</sup> M, dans l'eau, a été ajoutée une concentration croissante de **G3amphi**. Aux plus faibles concentrations de **G3amphi** (0,01-0,03 mg/mL, soit 1,2 - 3,6.10<sup>-6</sup> M, en bleu clair et orange sur le graphique), le profil des spectres est proche de celui du pyrène seul (en rose). Quand la concentration de **G3amphi** augmente, l'absorption générale du spectre augmente aussi. La contribution du C<sub>60</sub> dans l'accroissement du signal est claire, mais on remarque aussi une participation du pyrène avec une augmentation de l'intensité des pics à 325 et 340 nm, pics qui sont caractéristiques de la signature du pyrène. L'augmentation de l'intensité de ces pics correspond à une solubilisation du pyrène dans un environnement hydrophobe. Le pyrène est

donc très probablement inséré à l'intérieur des micelles formées par **G3amphi**. Aux plus faibles concentrations de **G3amphi**, peu ou pas de micelles sont formées. En conséquence, peu ou pas de pyrène est solubilisé dans un milieu hydrophobe, ce qui pourrait expliquer le spectre observé.

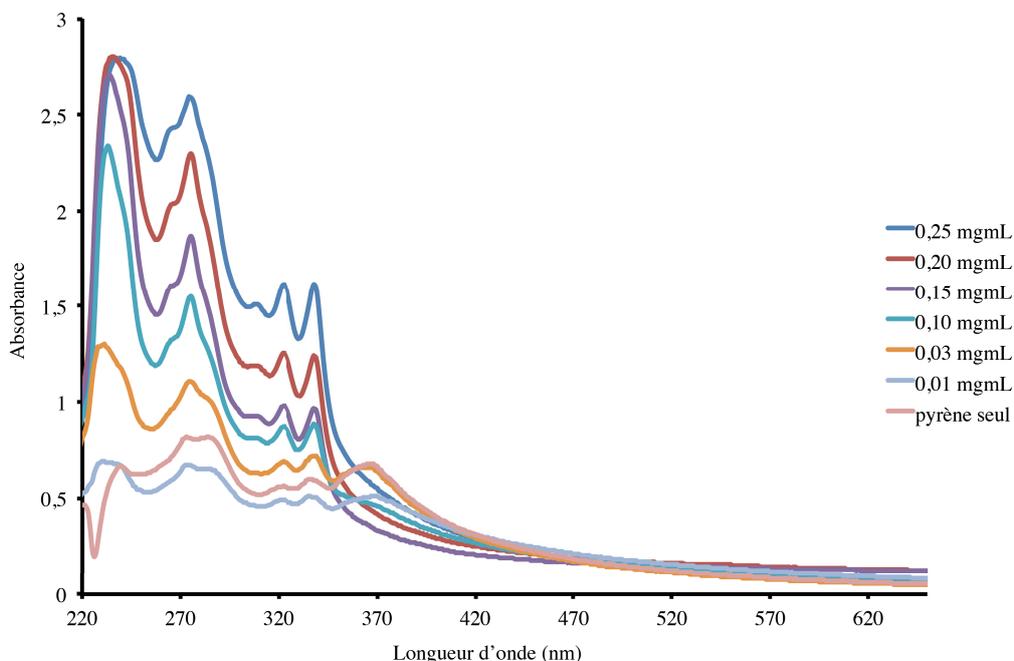


Figure 3.13: Spectres d'absorbance de **G3amphi** à différentes concentrations, en présence de pyrène ( $10^{-5}$  M), dans de l'eau.

Par déduction, l'analyse de ces spectres d'absorbance donne une approximation de la Concentration Micellaire Critique (CMC) qui doit être aux alentours de 0,03 mg/mL ( $3,6 \cdot 10^{-6}$  M). Une détermination plus fine de la CMC par fluorimétrie a été entreprise, mais n'a pas donné de résultat, probablement à cause du piégeage de la fluorescence par le C<sub>60</sub>.

Finalement, trois amphiphiles de C<sub>60</sub> hexa-adduits ont été synthétisés par notre méthodologie de post-fonctionnalisation par *click*. Ces composés ont montré une forte tendance à l'agrégation et forment des auto-assemblages guidés par leur balance hydrophile/hydrophobe intrinsèque. **G1amphi** et **G2amphi** pourraient former des films de Langmuir et Langmuir Blodgett. **G3amphi**, le plus hydrophile, a montré la capacité d'internaliser du pyrène, un composé hydrophobe.

Le ratio hydrophile/hydrophobe tend vers des composés globalement hydrophobes (4 ou 8 amines pour 10 chaînes alkyles) ou à «l'équilibre» (16 amines pour 10 chaînes alkyles). Toujours en tirant profit des synthons polyamines créés au laboratoire, notre équipe a trouvé judicieux de développer un composé largement polaire et de voir si ce composé a aussi la

faculté d'auto-assemblage. De plus, en incorporant directement une unité pyrène sur le composé, une étude spectroscopique du phénomène d'agrégation est envisageable.

### III. Auto-assemblage d'un composé hexa-adduit avec une unité pyrène

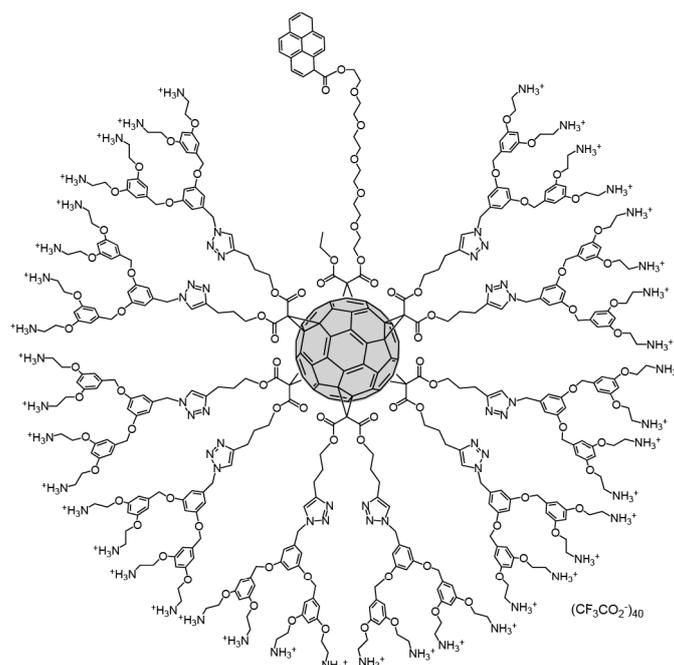


Figure 3.14: Composé amphiphile  $G2pyrNH_3^+$  présenté dans cette partie.

Le composé  $G2pyrNH_3^+$  (Figure 3.14) a été conçu pour effectuer des auto-assemblages guidés par le pouvoir d'agrégation connu du pyrène. Ce phénomène d'agrégation peut être suivi par spectroscopie d'émission et d'excitation où l'observation d'excimères<sup>27</sup> à l'état fondamental apporte la preuve de formation de dimères et d'agrégats. L'incorporation de 40 fonctions amines périphériques permet une bonne solubilité du produit dans l'eau. La stratégie de synthèse employée est toujours la même: création d'un dérivé hexa-adduit simple suivie d'une post-fonctionnalisation par «click».

La synthèse (Figure 3.15) débute par la monoprotection d'hexaéthylène glycol par une fonction TBDMS (composé publié précédemment<sup>28</sup>). Puis une estérification de cet alcool avec du chlorure de malonyle donne l'ester **11**. Une première réaction de *Bingel* fournit le mono-adduit **12**, suivie par une seconde réaction de *Bingel*, dans les conditions de *Sun*, pour obtenir

le dérivé hexa-adduit **13** comportant des fonctions alcynes protégées. Les dendrons **G2N<sub>3</sub>** ont ensuite été greffés par «click» sur le C<sub>60</sub>, après déprotection *in situ* des alcynes par du TBAF. Il est à noter que dans ces conditions le groupement TBDMS n'a pas été enlevé. L'utilisation de BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, en milieu anhydre, a permis de générer l'alcool **15**, sans que la dégradation du produit soit observée. Ce procédé avait déjà été utilisé pour déprotéger un groupement TBDMS en présence d'une fonction oxalimide sensible en milieu acide, sans altération de la molécule.<sup>29</sup> Puis **15** a été estérifié par du chlorure d'acyle de pyrène pour donner **G2pyrNHoc** avec un rendement de 78%. Finalement les fonctions amines ont été déprotégées avec du TFA pour obtenir **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>**.

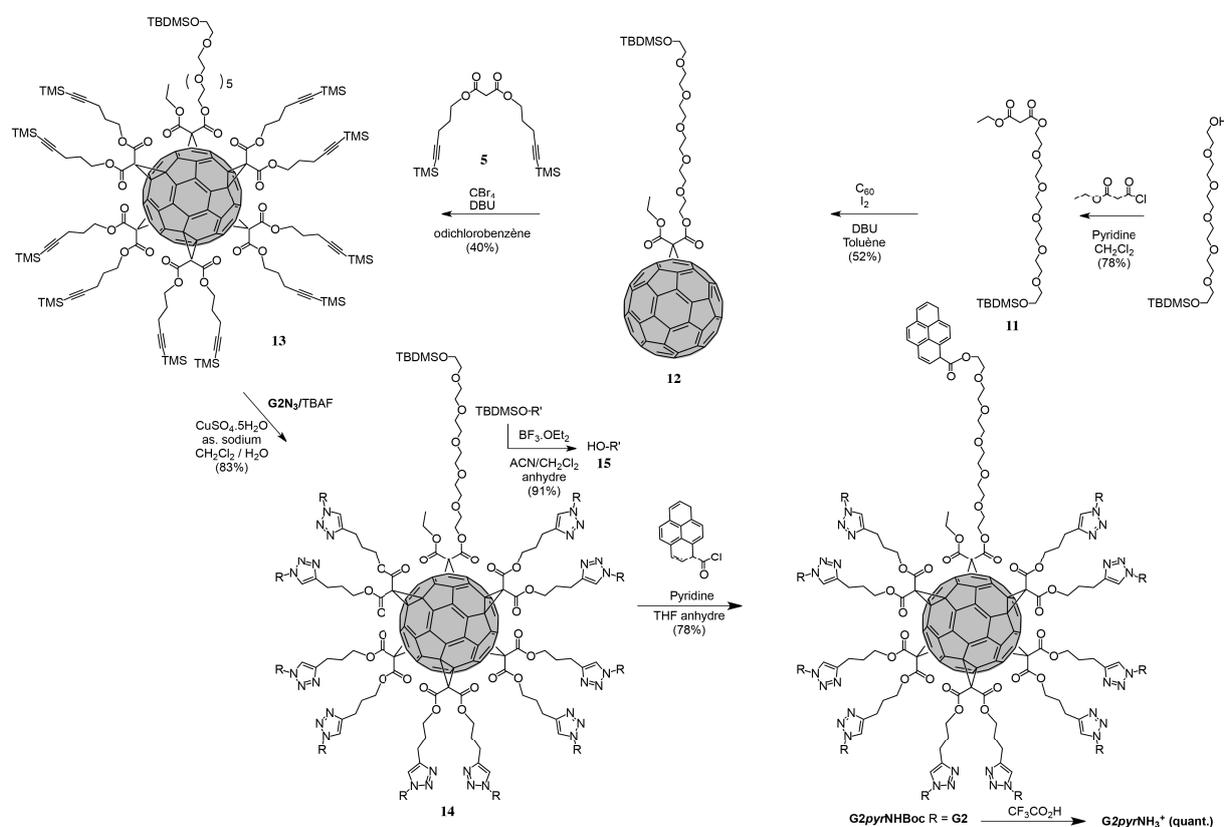


Figure 3.15: Schéma de synthèse de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>**.

La morphologie du composé a été étudiée par MET (Figure 3.16). Le produit a été solubilisé dans de l'eau avant d'être observé. L'image MET montre de petits agrégats de quelques nanomètres à une quinzaine de nanomètres, de forme sphérique irrégulière.

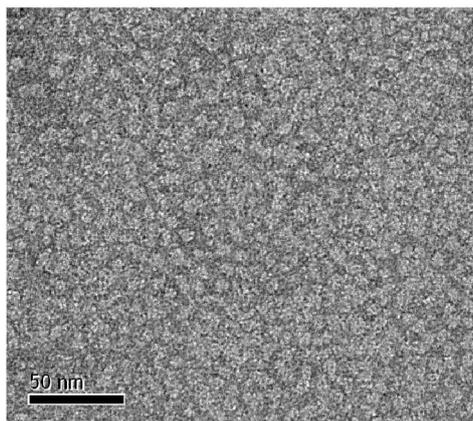


Figure 3.16: Image de MET de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>**, solubilisé dans de l'eau à 0,1 mg/mL.

L'analyse des phénomènes d'agrégation a été accomplie par spectroscopie UV/Vis, par l'équipe du Professeur Paola Ceroni (Bologne, Italie). Pour la réalisation de cette étude, un composé modèle **G2pyrOH** (Figure 3.17) a été synthétisé, simplement en déprotégeant les fonctions amines de la molécule alcool **15** par du TFA.

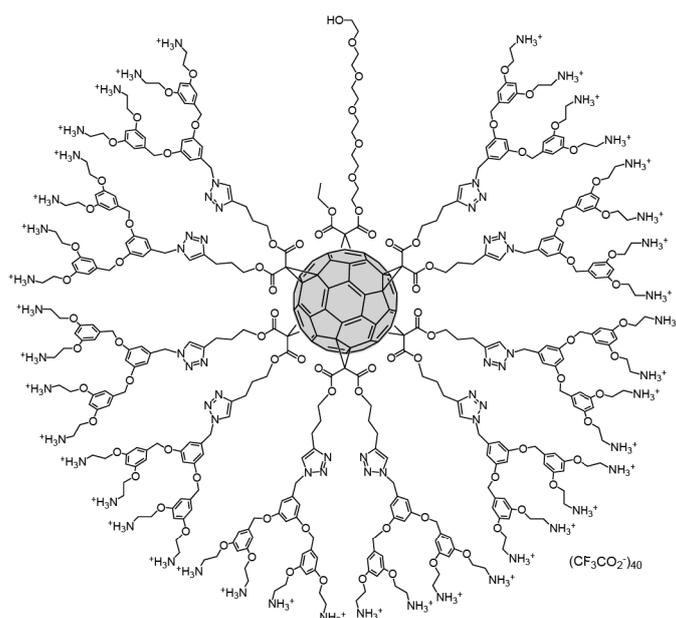
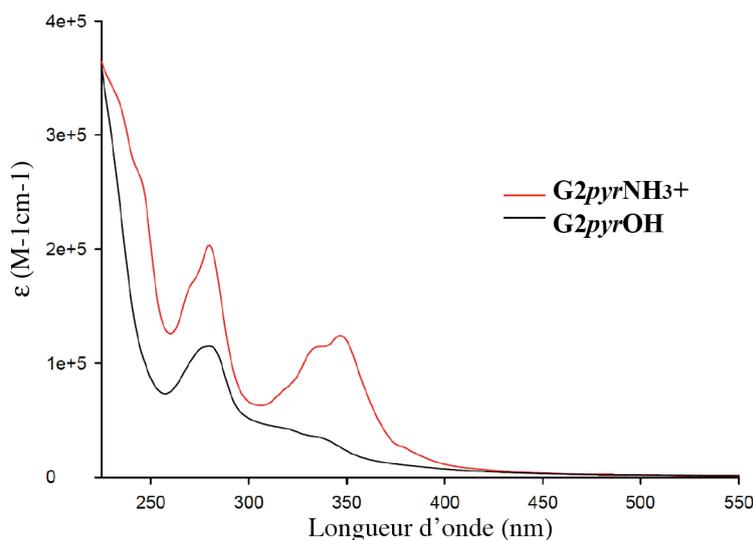
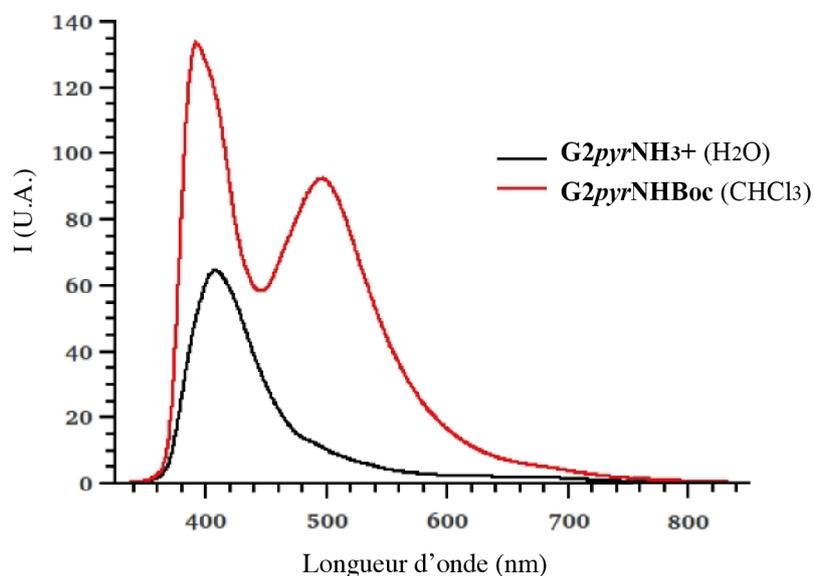


Figure 3.17: Composé modèle **G2pyrOH**.

Le spectre d'absorption de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>** a été comparé à celui de **G2pyrOH** dans l'eau (Figure 3.18). La présence du pyrène dans la molécule est indéniable: deux massifs propres à la contribution du pyrène vers 280 et 350 nm sont présents dans le spectre.

Figure 3.18: Spectres d'absorption dans l'eau de **G2pyrOH** et de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>**.

Comme attendu, aucune émission n'est observée pour **G2pyrOH**. Alors que **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>** présente une bande d'émission avec un maximum à 410 nm (Figure 3.19). Le rendement quantique d'émission, déterminé par l'équipe du Pr. Ceroni, est de 1 %, démontrant une efficacité d'extinction de 99 %. A 500 nm, une bande est à peine détectable comparée au spectre du précurseur **G2pyrNHBoc** (Figure 3.19).

Figure 3.19: Spectres d'émission de **G2pyrNHBoc** et de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>**.

La bande d'émission à 410 nm correspond à l'émission d'une unité pyrène monomérique, alors que l'émission à 500 nm correspond à la formation d'excimères entre

deux pyrènes. La formation de dimères à l'état fondamental est à exclure pour **G2pyrNHBoc**, parce que le spectre d'excitation du composé ne montre pas de dépendance de forme en fonction de la longueur d'onde d'émission. Alors que le spectre d'excitation de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>** montre une dépendance claire de la forme du spectre en fonction de la longueur d'onde d'émission. Ceci démontre la présence d'agrégats formés par les pyrènes, sans source d'excitation, donc à l'état fondamental.

Cette observation est confirmée par les temps de vie d'émission de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>** (Figure 3.20), qui montre une double décroissance, avec deux valeurs différentes de 5 ns et 21 ns, assignable respectivement à l'émission des monomères et à l'émission des agrégats.

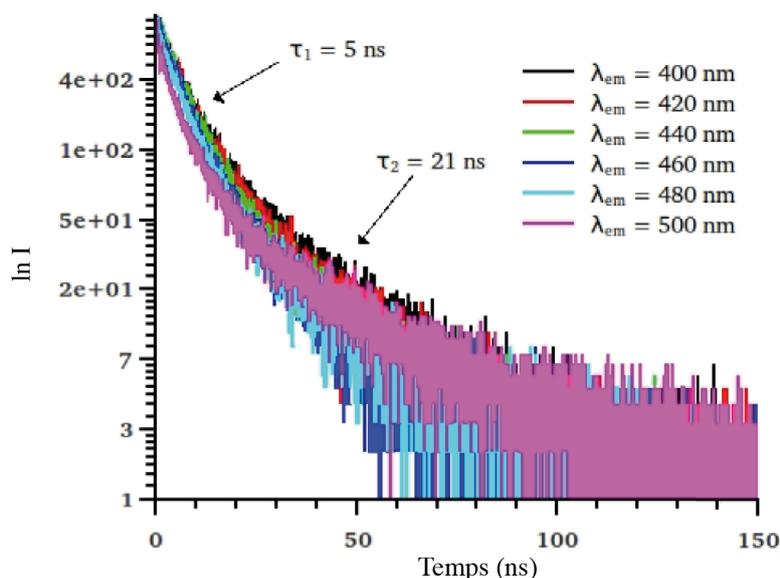


Figure 3.20: Décroissance d'intensité d'émission à différentes longueurs d'onde de **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>**, dans l'eau.

Au final, **G2pyrNH<sub>3</sub><sup>+</sup>** forme bien des assemblages dirigés par l'unité pyrène. Ainsi les agrégats observés en MET montrent de petites tailles variables. Ces variations de tailles peuvent provenir d'un équilibre dynamique entre les différentes architectures possibles (Figure 3.21). Les mesures spectroscopiques indiquent la présence de monomères (le pyrène, pouvant s'insérer dans les cycles aromatiques des dendrons) et de dimères dans le milieu. Ces dimères peuvent s'agréger en plusieurs unités, soit par un assemblage «dimère-dimère», soit par un assemblage non ordonné de plusieurs monomères. De plus, vu les petites tailles observées (moins de 15 nm), les particules «oligomères» ne doivent pas dépasser quelques molécules (moins d'une dizaine assurément).

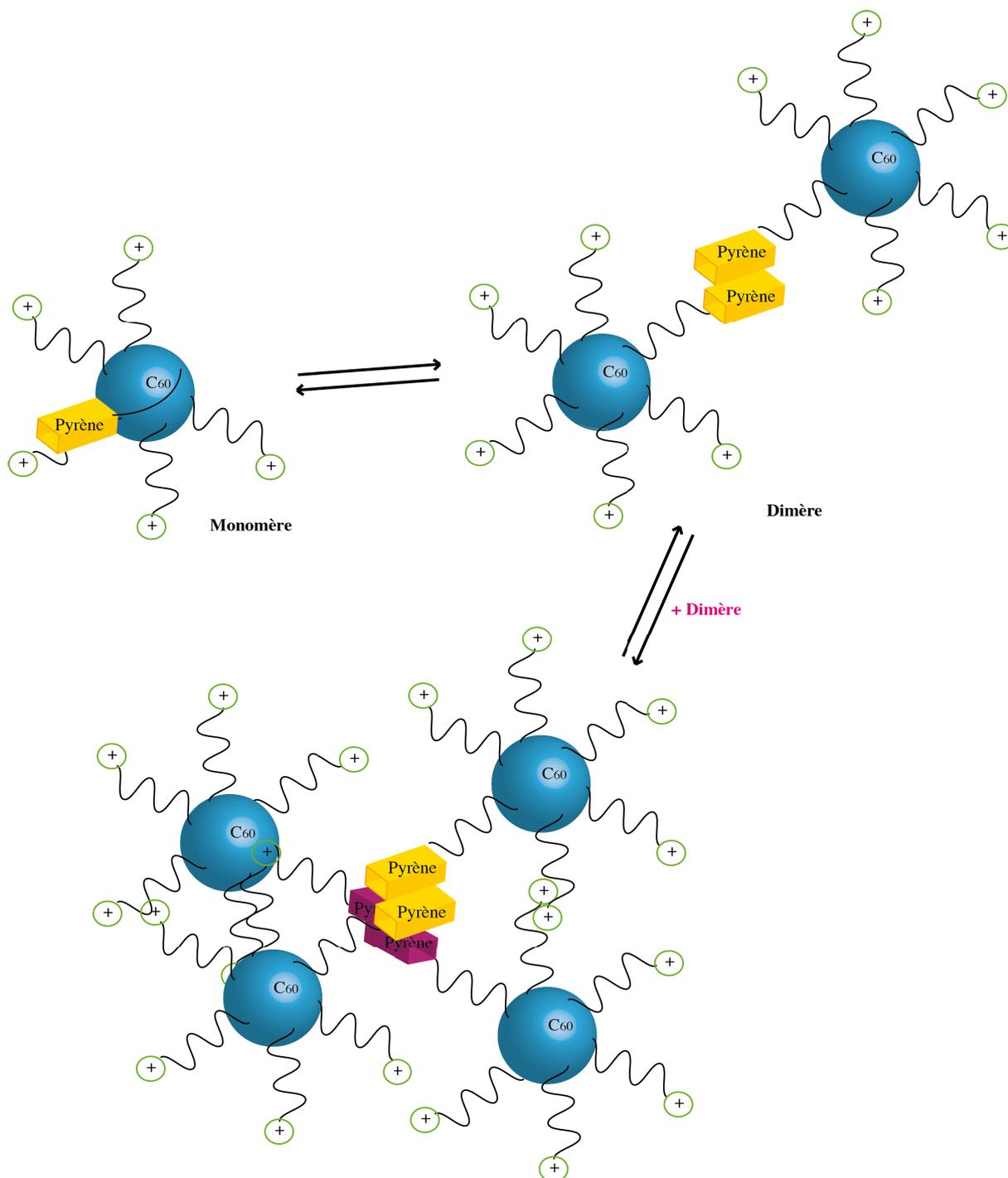


Figure 3.21: Dessin schématique, représentant les différentes entités possibles en solution aqueuse. Les unités monomères peuvent s'assembler en dimères pouvant conduire à la formation d'oligomères. Ces oligomères pouvant aussi se former par des assemblages non ordonnés. Les tailles observées en MET conduisent à penser que les agrégats ne doivent pas dépasser quelques molécules.

## IV. Conclusion

Les dendrons polycationiques développés dans le chapitre 2 ont permis de concevoir des molécules formant des structures d'aspect micellaire, grâce à une balance hydrophile/hydrophobe déterminée. En continuant nos investigations sur les assemblages de

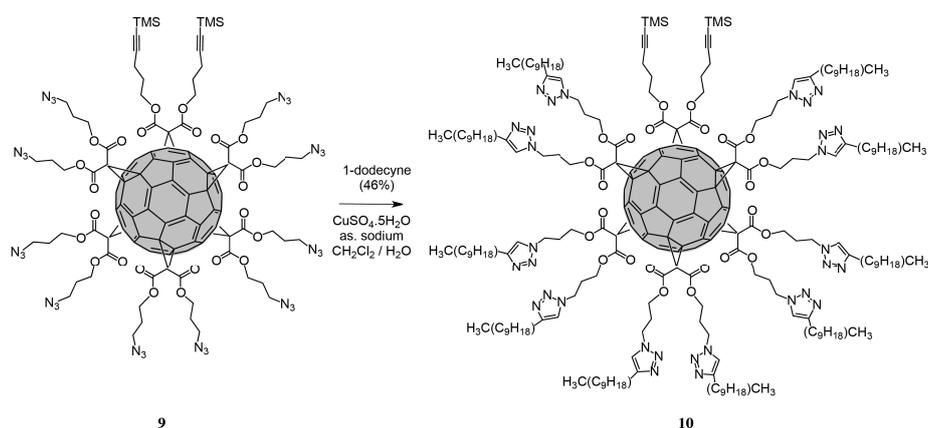
C<sub>60</sub> hexa-adduit, l'introduction d'un groupement pyrène en tant que groupement hydrophobe, a permis d'observer un auto-assemblage dirigé par la force d'agrégation du pyrène.

Notre équipe a décidé de mettre à profit les résultats observés pour créer des auto-assemblages directement applicables en biologie. Incorporer des sucres comme groupement polaire, pourrait permettre de former des entités supramoléculaires formant des systèmes multivalents, potentiellement inhibiteurs de bactéries ou de virus. Ce concept fera l'objet du chapitre 4.

## V. Partie Expérimentale

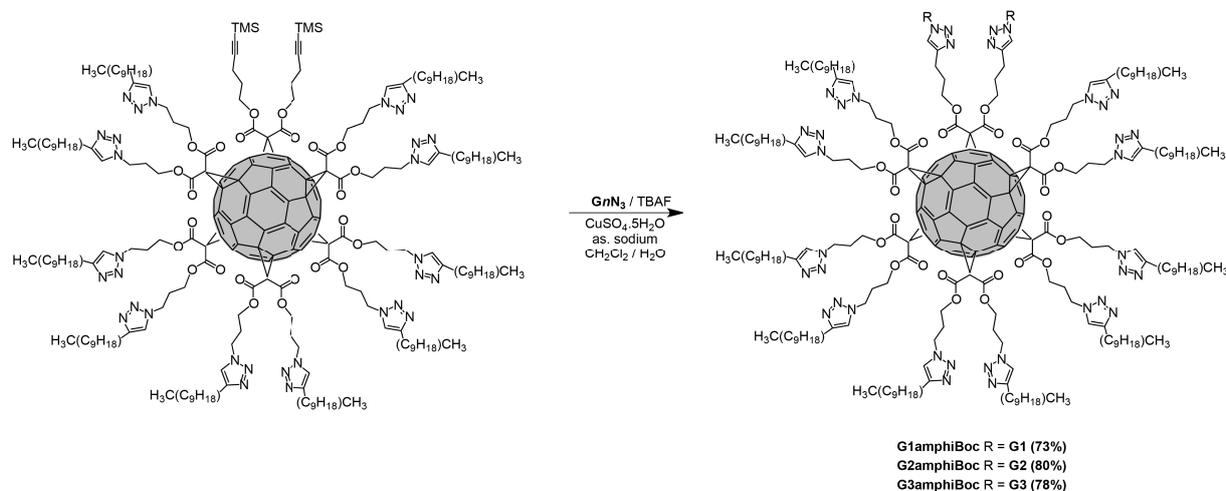
### Synthesis.

**General:** Reagents and solvents were purchased as reagent grade and used without further purification. Compounds **7**<sup>30</sup>, **8**<sup>31</sup>, **9**<sup>30</sup> and **mono TBDMS hexaethylene glycol**<sup>28</sup> were prepared according to previously reported procedure. All reactions were performed in standard glassware under an inert Ar or N<sub>2</sub> atmosphere. Evaporation and concentration were done at water aspirator pressure and drying in vacuo at 10<sup>-2</sup> Torr. Column chromatography: silica gel 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm) was purchased from E. Merck. Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on glass sheets coated with silica gel 60 F<sub>254</sub> purchased from E. Merck, visualization by UV light. IR spectra (cm<sup>-1</sup>) were measured on an ATI Mattson Genesis Series FTIR instrument. NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 or AC 400 with solvent peaks as reference. Elemental analysis were performed by the analytical service at the Laboratoire de Chimie de Coordination (Toulouse, France).

Preparation of compound **10**

A Mixture of **9** (209 mg, 86  $\mu$ mol), 1-dodecyne (0.25 mL, 1.11 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1.4 mg, 9  $\mu$ mol) and sodium ascorbate (5.1 mg, 26  $\mu$ mol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (5 mL, 1:1) was vigorously stirred at room temperature. After 24 h, the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with water, dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **10** (163 mg, 46%). Orange glassy product. IR (neat): 2177 (≡C-H), 1742 (C=O) cm<sup>-1</sup>. UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 232 (152000), 269 (99600), 282 (sh, 93000), 320 (sh, 52100), 340 (sh, 38400). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.36 (s, 10H), 4.37 (m, 44H), 2.66 (m, 20H), 2.31 (m, 20H), 2.12 (m, 4H), 1.91 (m, 4H), 1.63 (m, 20H), 1.24 (m, 140H), 0.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 30H), 0.13 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.4, 163.3, 148.6, 145.8-145.6 (several peaks), 141.2-140.9 (several peaks), 120.9, 104.9, 85.8, 69.1, 69.0, 65.8, 63.8, 46.5, 45.1, 31.8, 29.5 (two peaks), 29.4, 29.3 (two peaks), 29.2, 27.4, 25.7, 22.6, 16.4, 14.0, 0.0. MS (MALDI-TOF): 4103.88 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>244</sub>H<sub>310</sub>N<sub>30</sub>O<sub>24</sub>Si<sub>2</sub>: 4103.5). Elemental analysis (%) calcd for C<sub>244</sub>H<sub>310</sub>N<sub>30</sub>O<sub>24</sub>Si<sub>2</sub>·2CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C 69.14, H 7.41, N 9.83; found: C 69.20, H 6.90, N 9.70.

## Preparation of compound **G1amphiBoc**, **G2amphiBoc** and **G3amphiBoc**



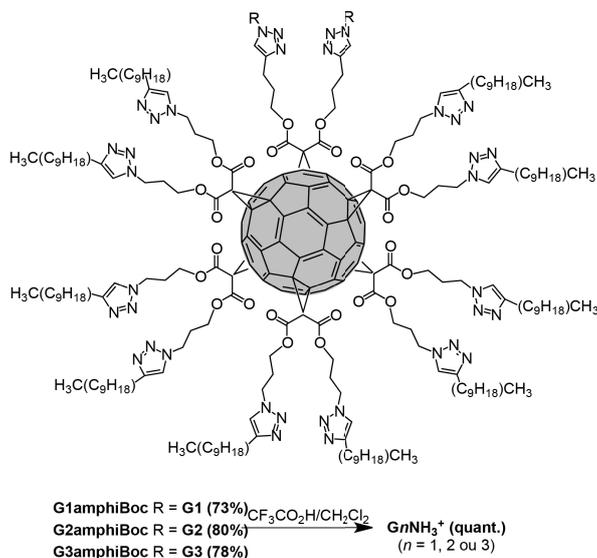
**G1amphiBoc.** A 1.0 M solution of TBAF in THF (0.15 mL, 0.15 mmol) was added to a vigorously stirred mixture of **10** (147 mg, 36  $\mu\text{mol}$ ), **G1N<sub>3</sub>** (50 mg, 111  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.6 mg, 4  $\mu\text{mol}$ ) and sodium ascorbate (2.2 mg, 12  $\mu\text{mol}$ ) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (2 mL, 1:1) at room temperature. After 24 h, the mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic layer was washed with water, dried ( $\text{MgSO}_4$ ) and concentrated. Column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95:5) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gave **G1amphiBoc** (127 mg, 73%). Orange glassy product. IR (neat): 3376 (N-H), 1743 (C=O ester), 1709 (C=O Boc). UV/Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 228 (198100), 246 (sh, 137600), 272 (108400), 317 (sh, 60500), 336 (sh, 45900).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.38 (broad s, 12H), 6.36 (m, 6H), 5.36 (s, 4H), 5.15 (broad s, 4H), 4.38 (m, 44H), 3.92 (m, 8H), 3.46 (m, 8H), 2.66 (m, 24H), 2.30 (m, 20H), 2.08 (m, 4H), 1.63 (m, 20H), 1.43 (s, 36H), 1.24 (m, 140H), 0.86 (t, J = 6,5 Hz, 30H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.4 (several peaks), 160.1, 155.9, 148.7, 146.7, 145.8-145.6 (several peaks), 141.3-141.1 (several peaks), 137.3, 121.4, 120.9, 106.9, 100.9, 79.5, 69.2, 69.1, 67.2, 66.5, 63.8, 53.8, 46.6, 45.2, 39.9, 31.9, 29.6 (two peaks), 29.5, 29.4 (two peaks), 29.3, 28.4, 28.0, 25.7, 22.7, 22.1, 14.1. MS (MALDI-TOF): 4858.68 (100%,  $[\text{M}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{280}\text{H}_{360}\text{N}_{40}\text{O}_{36}$ : 4858.76, *monoisotopic mass*). Elemental analysis (%) calcd for  $\text{C}_{280}\text{H}_{360}\text{N}_{40}\text{O}_{36} \cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : C 67.31, H 7.29, N 11.13; found: C 67.41, H 7.12, N 10.98.

**G2amphiBoc.** As described for **G1amphiBoc** from **10** (108 mg, 26  $\mu\text{mol}$ ), **G2N<sub>3</sub>** (103 mg, 105  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.6 mg, 4  $\mu\text{mol}$ ), sodium ascorbate (2.2 mg, 12  $\mu\text{mol}$ ) and

TBAF (0.3 mL, 0.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (3 mL, 1:1). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **G2amphiBoc** (124 mg, 80%). Orange glassy product. IR (neat): 3394 (N-H), 1741 (C=O ester), 1724 (C=O Boc). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 231 (133800), 276 (67700), 318 (sh, 33900), 340 (sh, 42200). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.37 (broad s, 12H), 6.49 (m, 14H), 6.36 (m, 4H), 5.36 (m, 4H), 5.15 (m, 8H), 4.84 (s, 8H), 4.37 (m, 44H), 3.96 (m, 16H), 3.49 (m, 16H), 2.66 (m, 24H), 2.31 (m, 20H), 2.09 (m, 4H), 1.60 (m, 20H), 1.43 (s, 72H), 1.24 (m, 140H), 0.86 (t, J = 6,5 Hz, 30H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.5 (several peaks), 160.2, 160.0, 155.9, 148.7, 147.0, 145.8-145.6 (several peaks), 141.3-141.1 (several peaks), 139.0, 137.3, 121.0, 107.3, 106.1, 101.9, 100.8, 79.5, 70.0, 69.2, 69.1, 67.3, 66.4, 63.9, 54.2, 46.7, 45.3, 45.2, 40.1, 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 28.4, 25.7, 22.7, 22.4, 14.1. Elemental analysis (%) calcd for C<sub>336</sub>H<sub>436</sub>N<sub>44</sub>O<sub>52</sub>·2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C 66.63, H 7.29, N 10.11; found: C 66.48, H 7.25, N 9.65.

**G3amphiBoc**. As described for **G1amphiBoc** from **10** (89 mg, 22 μmol), **G3N<sub>3</sub>** (148 mg, 72 μmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.6 mg, 4 μmol), sodium ascorbate (2.2 mg, 12 μmol) and TBAF (0.3 mL, 0.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (3 mL, 1:1). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **G3amphiBoc** (136 mg, 78%). Orange glassy product. IR (neat) 3344 (N-H), 1744 (C=O ester), 1699 (C=O Boc). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 233 (190800), 277 (94700), 322 (sh, 36400), 343 (sh, 25100). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.37 (broad s, 12H), 6.57 (m, 8H), 6.49 (m, 16H), 6.35 (m, 8H), 5.35 (m, 4H), 5.17 (m, 16H), 4.85 (s, 16H), 4.80 (m, 8H), 4.37 (m, 44H), 3.94 (m, 32H), 3.46 (m, 32H), 2.66 (m, 24H), 2.30 (m, 20H), 2.10 (m, 4H), 1.59 (m, 20H), 1.42 (s, 144H), 1.24 (m, 140H), 0.86 (m, 30H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.5 (several peaks), 160.2, 160.0, 159.9, 156.0, 148.7, 146.9, 145.9-145.7 (several peaks), 141.3-141.0 (several peaks), 139.3, 139.0, 137.4, 121.5, 121.0, 107.3, 106.5, 106.1, 101.8, 101.6, 100.7, 79.5, 69.9, 69.8, 69.2, 69.1, 67.3, 66.6, 63.9, 53.9, 46.6, 45.3 (two peaks), 40.1, 31.9, 29.7, 29.4 (two peaks), 28.4, 28.0, 25.8, 22.7, 22.2, 14.1. Elemental analysis (%) calcd for C<sub>448</sub>H<sub>588</sub>N<sub>52</sub>O<sub>84</sub>·2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C 65.79, H 7.37, N 9.05; found: C 65.29, H 7.00, N 8.77.

## Preparation of compound **G1amphi**, **G2amphi** and **G3amphi**



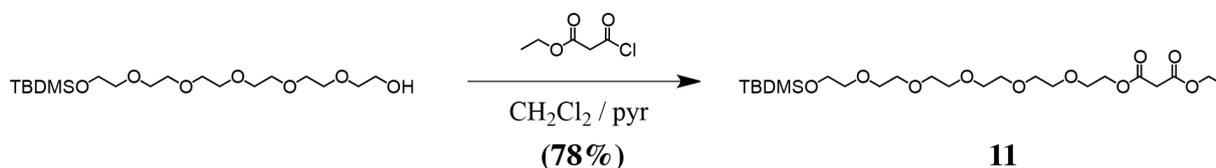
**G1amphi.** **G1amphiBoc** (66 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL; 1:1). After 20 min, the mixture was evaporated and dried under vacuum to afford **G1amphi** as its trifluoroacetate salt (69 mg, quantitative). Orange glassy product. IR (neat): 1743 (C=O ester), 1675 (C=O TFA). UV/Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 228 (96400), 244 (68800), 273 (53100), 313 (sh, 31500), 338 (sh, 21600).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.44 (broad s, 12H), 6.32 (m, 6H), 5.29 (m, 4H), 4.44 (m, 44H), 4.00 (m, 8H), 3.23 (m, 8H), 2.73 (m, 24H), 2.34 (m, 20H), 2.03 (m, 4H), 1.64 (m, 20H), 1.24 (m, 140H), 0.86 (m, 30H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.5, 161.0 (q,  $J = 33$  Hz), 159.4, 147.8, 146.3, 145.8-145.6 (several peaks), 141.3-141.1 (several peaks), 136.9, 122.5 (broad), 116.1 (q,  $J = 289$  Hz), 107.5, 101.2, 69.3, 69.2, 67.2, 66.4, 63.7, 53.8, 47.6, 45.3, 39.2, 32.0, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3 (three peaks), 29.2 (two peaks), 29.1, 27.8, 24.9, 22.8, 21.4, 14.2.

**G2amphi.** **G2amphiBoc** (103 mg, 17  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL; 1:1). After 20 min, the mixture was evaporated and dried under vacuum to afford **G2amphi** as its trifluoroacetate salt (104 mg, quantitative). Orange glassy product. IR (neat): 1744 (C=O ester), 1675 (C=O TFA). UV/Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 229 (166500), 273 (78900), 317 (sh, 40800), 338 (sh, 29800).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.94 (m, 12H), 6.35 (m, 28H), 5.35 (m, 4H), 4.46 (m, 52H), 3.96 (m, 16H), 3.15 (m, 16H), 2.77 (m, 24H), 2.38 (m, 20H), 2.05 (m, 4H), 1.65 (m, 20H), 1.25 (m, 140H), 0.85 (m, 30H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.4 (several peaks), 160.0 (q,  $J = 41$  Hz), 159.0, 155.9, 148.7, 146.9, 145.9-145.6 (several peaks), 141.3-140.9

(several peaks), 139.6, 135.7, 128.1, 124.5, 114.8 (q,  $J = 193$  Hz), 107.2, 106.1, 101.6, 100.6, 69.8, 69.2, 69.1, 68.3, 65.7, 63.5, 48.9, 45.4, 45.2, 39.6, 31.9, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 28.7, 23.9, 23.1, 22.7, 14.1.

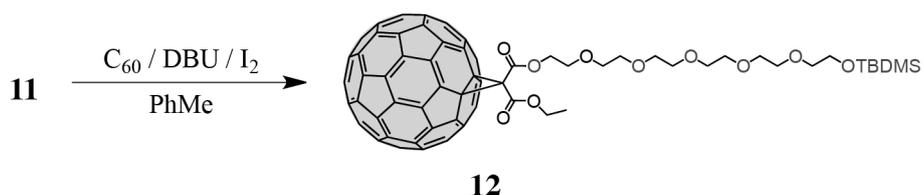
**G3amphi. G3amphiBoc** (115 mg, 14  $\mu$ mol) was dissolved in TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL; 1:1). After 20 min, the mixture was evaporated and dried under vacuum to afford **G3amphi** as its trifluoroacetate salt (117 mg, quantitative). Orange glassy product. IR (neat) 1746 (C=O ester), 1673 (C=O TFA). UV/Vis (MeOH): 205 (593100), 230 (264600), 276 (94600), 317 (sh, 39600), 340 (sh, 28000). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 7.71 (broad s, 12H), 6.74-6.55 (m, 42H), 5.46 (m, 4H), 5.00 (m, 16H), 4.93 (m, 8H), 4.31 (m, 44H), 4.23 (m, 32H), 3.37 (m, 32H), 2.60 (m, 24H), 2.20 (m, 20H), 2.03 (m, 4H), 1.58 (m, 20H), 1.23 (m, 140H), 0.85 (m, 30H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 164.5 (several peaks), 161.6, 161.3, 160.7, 158.9 (q,  $J = 43$  Hz), 148.6, 147.7, 147.0-146.8 (several peaks), 142.7-142.4 (several peaks), 141.3, 140.8, 139.1, 124.0 (broad), 116.0 (q,  $J = 285$  Hz), 108.2, 107.7, 107.6, 102.9, 102.5, 102.3, 71.0, 70.7, 70.6, 67.2, 65.4, 65.2, 59.5, 54.9, 48.0, 47.2, 40.2, 33.0, 30.7, 30.4, 30.3, 30.2, 29.1, 26.5, 23.7, 22.9, 14.5.

### Preparation of compound 11



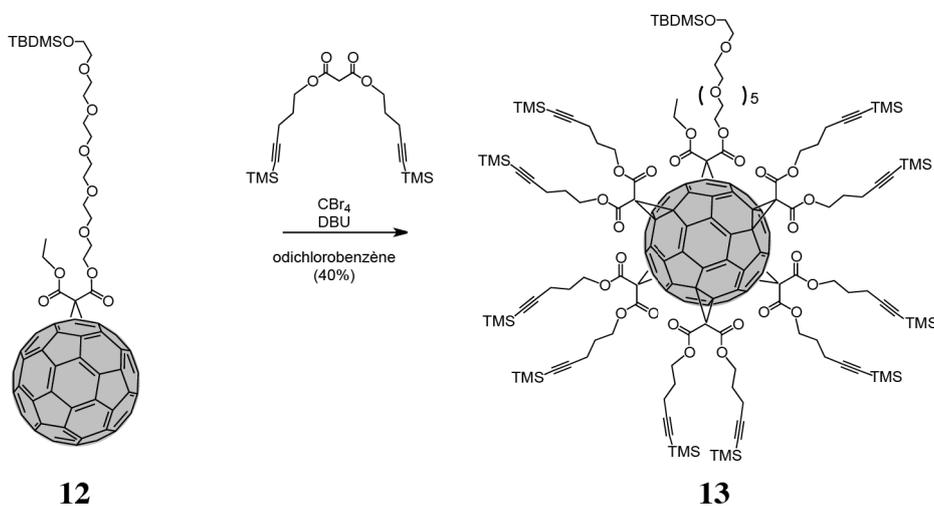
Ethyl malonyl chloride (0.61 mL, 4.8 mmol) was added to a stirred solution of monoTBDMS-hexaethylene glycol (2.3 g, 5.80 mmol) and pyridine (0.5 mL, 6.18 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL) at 0°C. After 1 h, the mixture was allowed to slowly warm to room temperature (within 1 h), then stirred for 12 h and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt 7:3) yielded **2** (1.91 g, 78%). Colorless oil. IR (neat): 1734 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.30 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 4.20 (q,  $J = 7$  Hz, 2H), 3.78 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 3.72 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 3.64 (m, 16H), 3.55 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 3.40 (s, 2H), 1.28 (t,  $J = 7$  Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.7, 166.5, 72.8, 70.8, 70.7, 69.0, 64.7, 62.8, 61.6, 41.6, 26.0, 18.4, 14.2, -5.1.

## Preparation of compound 12



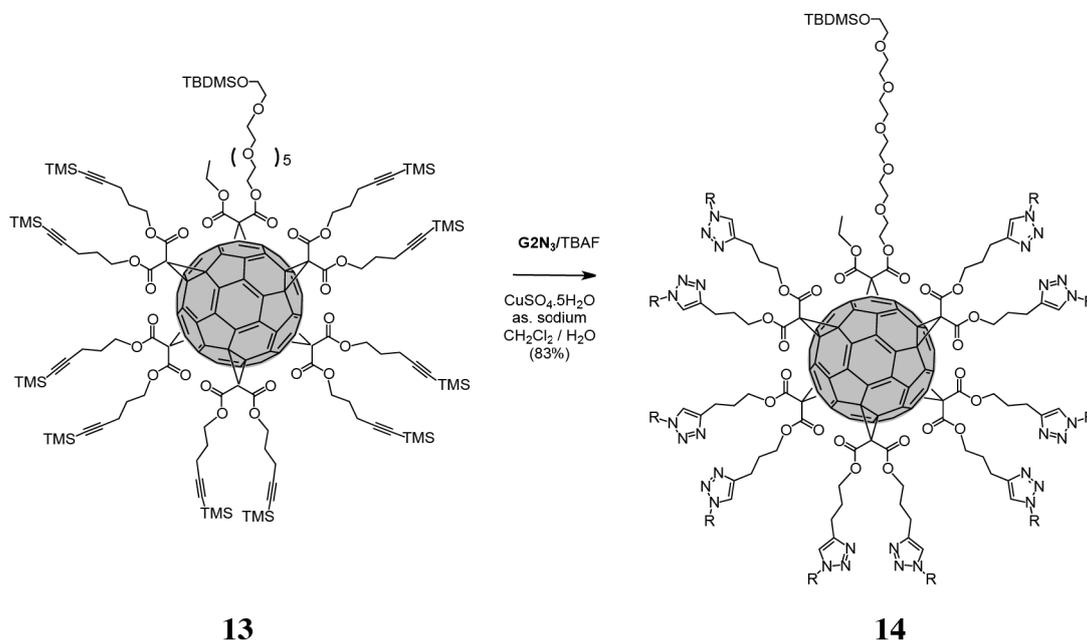
DBU (0.55 mL, 3.68 mmol) was added to a stirred solution of  $\text{C}_{60}$  (1.058 g, 1.47 mmol),  $\text{I}_2$  (559 mg, 2.20 mmol) and **11** (750 mg, 1.47 mmol) in toluene (1 L) at room temperature. The resulting solution was stirred for 1 h, then filtered through a short plug of  $\text{SiO}_2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  1:1) and evaporated. Column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  8:2) gave **12** (924 mg, 51%). Dark brown solid. IR (neat): 1742 (C=O). UV/Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 258 (152800), 326 (46500), 426 (2940), 486 (1670), 688 (200).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.64 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 4.55 (q,  $J = 7$  Hz, 2H), 3.87 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 3.75 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 3.64 (m, 16H), 3.54 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 1.48 (t,  $J = 7$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163.7, 163.5, 145.4, 145.3 (three peaks), 145.0, 144.8, 144.7, 144.0, 143.2, 143.1 (two peaks), 142.3, 142.0, 141.0 (two peaks), 139.3, 139.0, 72.8, 71.6, 70.8 (three peaks), 70.7 (two peaks), 68.9, 66.3, 63.6, 62.8, 52.2, 26.1, 18.5, 14.4, -5.1. MS (MALDI-TOF): 1267.2 (8%,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{83}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{SiK}$ : 1267.23), 1251.2 (100%,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{83}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{SiNa}$ : 1251.26), 1137.1 (5%,  $[\text{M}-\text{TBDMS}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{77}\text{H}_{30}\text{O}_{10}\text{Na}$ : 1137.17), 805.0 (2%,  $[\text{C}_{61}\text{CO}_2\text{Et}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{64}\text{H}_5\text{O}_2$ : 805.03), 720.2 (60%,  $[\text{C}_{60}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{60}$ : 720.00).

## Preparation of compound 13



DBU (1.7 mL, 11.36 mmol) was added to a stirred solution of **12** (709 mg, 0.28 mmol), CBr<sub>4</sub> (18.9 g, 57 mmol) and **5** (2.2 g, 5.78 mmol) in ODCB (110 mL) at room temperature. The resulting solution was stirred for 72 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 95:5) and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, toluene/AcOEt; 93.5:6.5) gave **13** (721 mg, 40 %). Orange glassy product. IR (neat) 2176 (=), 1745 (C=O) cm<sup>-1</sup>. UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): λ<sub>max</sub> (ε) = 244 (93900), 271 (71200), 280 (72600), 320 (sh, 43900), 338 (sh, 33300). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.41 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 4.36 (t, *J* = 7 Hz, 20H), 4.33 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 3.72-3.53 (m, 22H), 2.33 (t, *J* = 7 Hz, 20H), 1.92 (m, 20H), 1.33 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.15 (m, 90H), 0.06 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.7, 163.5, 145.8 (several peaks), 141.0 (several peaks), 105.0, 85.7, 72.6, 70.7, 70.6, 70.5, 69.0, 68.6, 65.8, 65.5, 62.9, 62.7, 45.3, 45.2, 42.5, 27.5, 25.9, 18.3, 16.4, 14.0, 0.1, -5.3. MS (MALDI-TOF): 3121.95 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>178</sub>H<sub>194</sub>O<sub>30</sub>Si<sub>11</sub>: 3122.37).

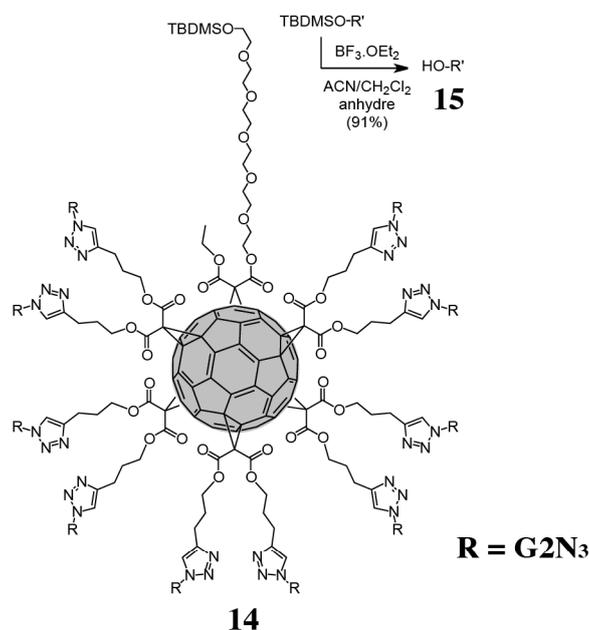
### Preparation of compound **14**



A 1.0 M solution of TBAF in THF (1.2 mL, 1.2 mmol) was added to a vigorously stirred mixture of **G2N3** (1.04 g, 1.06 mmol), **13** (300 mg, 96 μmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2 mg, 13 μmol) and sodium ascorbate (6 mg, 5 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (5 mL, 1:1) at room temperature. After 2 days, the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with water, dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 96:4)

followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **14** (980 mg, 83%). Orange glassy product. IR (neat) 3352 (N-H) 1740 (C=O ester) 1699 (C=O Boc). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 230 (370900), 281 (136600), 325 (sh, 40500), 340 (sh, 32400). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.44 (s, 10H), 6.45 (m, 60H), 6.33 (m, 30H), 5.33 (m, 40H), 5.25 (m, 40H), 4.91 (m, 2H), 4.79 (m, 22H), 4.28 (m, 20H), 3.92 (m, 80H), 3.61 (m, 22H), 3.46 (m, 80H), 2.70 (m, 20H), 2.05 (m, 20H), 1.42 (s, 360H), 1.42 (m, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.04 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.5 (several peaks), 160.0, 159.8, 155.9, 146.6, 145.7 (several peaks), 141.0 (several peaks), 138.9, 137.4, 121.4, 107.0, 106.0, 101.7, 100.6, 79.3, 72.5, 70.6, 70.5, 70.4, 69.7, 69.0, 68.5, 67.1, 66.2, 65.8, 53.6, 45.4, 45.3, 39.9, 28.3, 25.8, 21.9, 18.2, 13.9, -5.4.

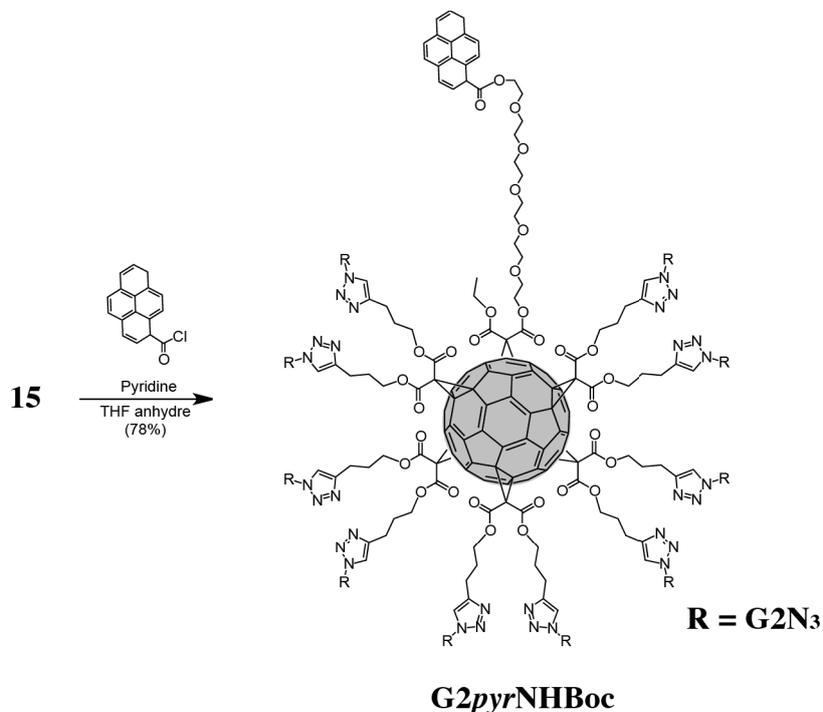
### Preparation of compound **15**



BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (0.1 mL, 0.81 mmol) was added to a solution of **14** (340 mg, 29 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>CN (2:1, 3 mL) at room temperature. After 20 min, a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (5 mL) was slowly added to the reaction mixture. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub> (3x). The combined organic layers were washed with water, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and evaporated to give **15** (250 mg, 74%). Orange glassy product. IR (neat) 3345 (N-H) 1740 (C=O ester) 1697 (C=O Boc). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 230 (379400), 281 (139000), 320 (sh, 46900), 340 (sh, 34700). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.44 (s, 10H), 6.45 (m, 60H), 6.33 (m, 30H), 5.33 (m, 40H), 5.25 (m, 40H), 4.90 (m, 2H), 4.80 (m, 22H), 4.28 (m, 20H), 3.93 (m, 80H), 3.59 (m, 22H), 3.46 (m, 80H), 2.70 (m, 20H), 2.05 (m, 20H), 1.42 (s, 360H), 1.42 (m,

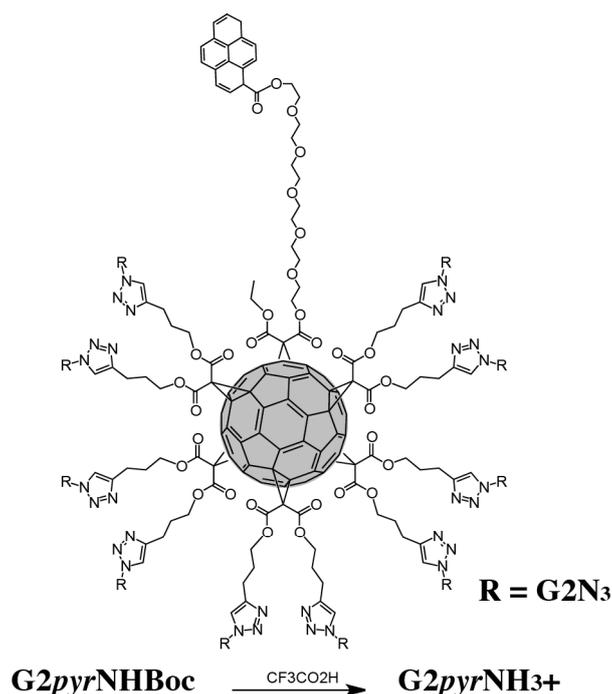
3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.6 (several peaks), 160.1, 159.8, 156.0, 146.7, 145.7 (several peaks), 141.1 (several peaks), 139.0, 137.4, 121.6, 107.1, 106.0, 101.8, 100.7, 79.4, 72.5, 70.4, 69.8, 69.1, 68.6, 67.2, 66.4, 53.7, 45.4, 45.3, 40.0, 28.4, 22.0, 14.1.

### Preparation of compound **G2pyrNHBoc**



1-Pyrene acyl chloride (153 mg, 621  $\mu$ mol) was added to a stirred solution of **15** (142 mg, 12  $\mu$ mol) and pyridine (0.06 mL, 774  $\mu$ mol) in anhydrous THF (2.5 mL) at 0°C. After 1 h, the mixture was allowed to slowly warm to room temperature (within 1 h), then stirred for 12 h and filtered through a short plug of Celite. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90:10) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **G2pyrNHBoc** (113 mg, 78%). Brown orange glassy product. IR (neat) 3343 (N-H), 1740 (C=O ester), 1696 (C=O Boc). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 234 (558900), 244 (503500), 270 (sh, 255800), 278 (346000), 316 (sh, 115900), 332 (181600), 345 (217700). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 9.15 (m, 1H), 8.38 (m, 8H), 7.92 (m, 10H), 6.40 (m, 90H), 5.20 (m, 80H), 4.72 (m, 26H), 4.16 (m, 20H), 3.88 (m, 80H), 3.57 (m, 20H), 3.43 (m, 80H), 2.52 (m, 20H), 2.03 (m, 20H), 1.40 (s, 360H), 1.26 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173.0, 170.2, 163.5 (several peaks), 160.0, 159.7, 155.8, 146.6, 145.7 (several peaks), 141.1 (several peaks), 138.8, 137.3, 132.1, 130.8, 130.3, 128.3, 126.9, 126.2, 125.6, 124.7, 124.2, 124.0, 121.6, 107.1, 106.0, 101.7, 100.6, 79.3, 70.4, 69.8, 69.1, 67.1, 66.7, 66.3, 65.6, 53.7, 45.5, 45.4, 39.9, 28.3, 21.9, 13.8.

## Preparation of compound $G2pyrNH_3^+$



$G2pyrNHBoc$  (95 mg, 8  $\mu$ mol) was dissolved in TFA (2 mL). After 20 min, the mixture was evaporated and dried under vacuum to afford  $G2pyrNH_3^+$  as its trifluoroacetate salt (99 mg, quantitative). Brown orange glassy product. IR (neat) 1739 (C=O ester), 1674 (C=O TFA). UV/Vis (MeOH): 205 (1140300), 233 (514900), 244 (427100), 269 (sh, 239300), 278 (299400), 331 (sh, 161300), 345 (183700).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ): 8.84 (m, 1H), 8.22 (m, 8H), 7.79 (m, 10H), 6.49 (m, 90H), 5.21 (m, 40H, partially masked by  $H_2O$  signal), 4.80 (m, 26H, partially masked by  $H_2O$  signal), 4.08 (m, 80H), 3.98 (m, 20H), 3.83 (m, 20H), 3.27 (m, 80H), 2.31 (m, 20H), 1.71 (m, 20H), 1.26 (m, 3H).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ): 174.8, 172.6, 164.5 (several peaks), 161.4, 160.5, 158.8 (q,  $J = 42$  Hz), 155.8, 146.9 (several peaks), 142.6 (several peaks), 140.9, 138.9, 133.5, 132.1, 131.5, 129.5, 129.2, 128.0, 127.4, 126.9, 126.6, 125.9, 125.2, 123.6, 115.9 (q,  $J = 284$  Hz), 108.1, 107.6, 102.8, 102.2, 70.9, 70.6, 67.6, 66.7, 65.3, 54.6, 47.4, 40.1, 28.9, 22.6, 14.3.

### Size of particles, $\zeta$ potential.

The hydrodynamic radii were determined *via* dynamic light scattering measurements using a Malvern nanoZS apparatus with the following specifications: sampling time = 90 s; refractive index of medium (water with 5% glucose) = 1.340; refractive index of particles = 1.43; medium viscosity = 1.0140 cP temperature = 25°C. Data were analyzed using the multimodal number distribution software included with the instrument.  $\zeta$  potentials were

measured with the same apparatus and with the following specifications: 20 measurements per sample; dielectric constant = 80; temperature = 25°C; beam mode F(Ka) = 1.5 (Smoluchowski model).

### Electron microscopy analysis.

Images were taken with a TEM Philips CM12 apparatus. Compounds were transferred onto ultrathin carbon film grids (Ted Pella, 1822-F, formvar removed) by placing the grid on top of 10 µL drop for 1 min. Grid with adherent particles was wicked from one side, placed on 100 µL water drop for 30 s for washing, wicked, placed for 1 min on 60 µL drop of freshly filtered 1.33% uranyl acetate, wicked again and air dried before imaging.

## VI. Bibliographie

- (1) Obeng, Y. S.; Bard, A. J. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 6279.
- (2) Gao, Y.; Tang, Z.; Watkins, E.; Majewski, J.; Wang, H.-L. *Langmuir* **2005**, *21*, 1416.
- (3) Guldi, D. M.; Maggini, M.; Mondini, S.; Guérin, F.; Fendler, J. H. *Langmuir* **1999**, *16*, 1311.
- (4) Luo, C.; Guldi, D. M.; Maggini, M.; Menna, E.; Mondini, S.; Kotov, N. A.; Prato, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 3905.
- (5) Nierengarten, J.-F.; Schall, C.; Nicoud, J.-F.; Heinrich, B.; Guillon, D. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 5747.
- (6) Cardinali, F.; Gallani, J.-L.; Schergna, S.; Maggini, M.; Nierengarten, J.-F. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 2969.
- (7) Felder, D.; Gutiérrez Nava, M.; del Pilar Carreón, M.; Eckert, J.-F.; Luccisano, M.; Schall, C.; Masson, P.; Gallani, J.-L.; Heinrich, B.; Guillon, D.; Nierengarten, J.-F. *Helvetica Chimica Acta* **2002**, *85*, 288.
- (8) Felder, D.; Gallani, J.-L.; Guillon, D.; Heinrich, B.; Nicoud, J.-F.; Nierengarten, J.-F. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 201.
- (9) Nierengarten, J.-F. o.; Eckert, J.-F. o.; Rio, Y.; del Pilar Carreón, M.; Gallani, J.-L.; Guillon, D. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 9743.
- (10) Felder-Flesch, D.; Bourgoigne, C.; Gallani, J.-L.; Guillon, D. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 6507.
- (11) Nakashima, N.; Ishii, T.; Shirakusa, M.; Nakanishi, T.; Murakami, H.; Sagara, T. *Chemistry – A European Journal* **2001**, *7*, 1766.
- (12) Georgakilas, V.; Pellarini, F.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Melle-Franco, M.; Zerbetto, F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 5075.
- (13) Munoz, A.; Illescas, B. M.; Sanchez-Navarro, M.; Rojo, J.; Martin, N. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 16758.

- (14) Li, W.-S.; Yamamoto, Y.; Fukushima, T.; Saeki, A.; Seki, S.; Tagawa, S.; Masunaga, H.; Sasaki, S.; Takata, M.; Aida, T. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 8886.
- (15) Charvet, R.; Yamamoto, Y.; Sasaki, T.; Kim, J.; Kato, K.; Takata, M.; Saeki, A.; Seki, S.; Aida, T. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 2524.
- (16) Fuhrhop, J. r.-H.; Wang, T. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 2901.
- (17) Sano, M.; Oishi, K.; Ishi-i, T.; Shinkai, S. *Langmuir* **2000**, *16*, 3773.
- (18) Wang, M.; Nalla, V.; Jeon, S.; Mamidala, V.; Ji, W.; Tan, L.-S.; Cooper, T.; Chiang, L. Y. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 18552.
- (19) Homma, T.; Harano, K.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1665.
- (20) Homma, T.; Harano, K.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 6364.
- (21) Brettreich, M.; Burghardt, S.; Böttcher, C.; Bayerl, T.; Bayerl, S.; Hirsch, A. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 1845.
- (22) Partha, R.; Lackey, M.; Hirsch, A.; Casscells, S. W.; Conyers, J. *Journal of Nanobiotechnology* **2007**, *5*, 6.
- (23) Braun, M.; Hartnagel, U.; Ravanelli, E.; Schade, B.; Böttcher, C.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, *2004*, 1983.
- (24) Burghardt, S.; Hirsch, A.; Schade, B.; Ludwig, K.; Böttcher, C. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 2976.
- (25) Schade, B.; Ludwig, K.; Böttcher, C.; Hartnagel, U.; Hirsch, A. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 4393.
- (26) Yu, X.; Zhang, W.-B.; Yue, K.; Li, X.; Liu, H.; Xin, Y.; Wang, C.-L.; Wesdemiotis, C.; Cheng, S. Z. D. *Journal of the American Chemical Society* **2012**.
- (27) Birks, J. B. *Reports on Progress in Physics* **1975**, *38*, 903.
- (28) Hicks, M. R.; Rullay, A. K.; Pedrido, R.; Crout, D. H.; Pinheiro, T. J. T. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 3726.
- (29) King, S. A.; Pipik, B.; Thompson, A. S.; DeCamp, A.; Verhoeven, T. R. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 4563.
- (30) Iehl, J.; Nierengarten, J-F. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 7306.
- (31) Iehl, J.; Pereira de Freitas, R.; Delavaux-Nicot, B.; Nierengarten, J-F. *Chemical Communications* **2008**, *44*, 2450.

*Chapitre 4 :*  
*Synthèses de dérivés de C<sub>60</sub> multi-*  
*mannosylés*



## I. Dérivés de C<sub>60</sub> fonctionnalisés par des sucres

Le premier dérivé de C<sub>60</sub>-sucre a été proposé par *Vasella* et ses collaborateurs<sup>1</sup> (Figure 4.1). Cette équipe a produit une liaison spiro entre le sucre et la sphère de carbone par cycloaddition d'un carbène. Le groupe de *Kobayashi*<sup>2</sup> a obtenu des dérivés de fullerène contenant des sucres *via* une cycloaddition d'un azoture suivi d'un réarrangement ou bien *via* une cycloaddition d'un nitrène généré *in situ* pour former l'azafulleroïde correspondant (Figure 4.1). En 2001, la même équipe propose de transformer ces azafulleroïdes en fullerénols<sup>3</sup> (C<sub>60</sub> polyhydroxylé simplement par action de NaOH) pour augmenter la solubilité des produits en milieux aqueux. Ces composés ont ainsi démontré une modeste activité de liaison avec une lectine (protéine se liant spécifiquement à des sucres), la concanavaline A (ConA) (lectine modèle, couramment employée pour identifier des interactions avec des composés sucrés). Les lectines sont des protéines impliquées dans les processus de reconnaissance cellulaire et sont donc des cibles thérapeutiques attractives. Ceci sera présenté par quelques exemples choisis.

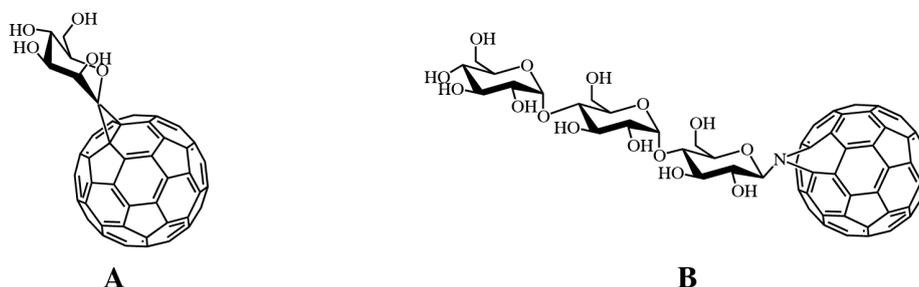


Figure 4.1: Premiers dérivés de C<sub>60</sub>-sucre proposés, par l'équipe de *Vasella*<sup>1</sup> (A) et *Kobayashi*<sup>2</sup> (B).

En utilisant la même méthodologie pour former des azafulleroïdes-sucres, les équipes de *Mikita* et *Yano*<sup>4</sup> ont utilisé la capacité de production d'oxygène singulet du C<sub>60</sub> par photoexcitation, pour créer des radicaux libres aptes à détruire des cellules. L'intérêt des sucres est de solubiliser la sphère de carbone, tout en favorisant un ancrage sur/dans les cellules par des interactions sucre-récepteur cellulaire. De la sorte, ces laboratoires ont montré un effet phototoxique (après irradiation laser) des dérivés sur une culture cellulaire de HeLa. Cependant, les auteurs ont conclu que cette cytophototoxicité était relativement faible.

Le groupe de *Toshima* a aussi mis à profit les propriétés de photosensibilisation du C<sub>60</sub> faiblement fonctionnalisé, pour effectuer du photoclivage de la protéase du VIH-1<sup>5,6</sup> (Figure

4.2). L'incorporation d'un sucre permettrait de créer des liaisons hydrogènes qui stabiliseraient le complexe C<sub>60</sub>-protease. La photodégradation serait ainsi sélective de la protéine cible.



Figure 4.2: Fullerènes synthétisés par le groupe de *Toshima*<sup>5,6</sup> photodégradant la protéase du VIH-1.

La synthèse d'hybride C<sub>60</sub>-sucre reste, dans ces exemples, basée sur l'incorporation d'un sucre permettant de potentiellement utiliser les propriétés électroniques du fullerène. Ces produits mono substitués présentent généralement une faible, voire une très faible solubilité dans l'eau, ce qui peut être un obstacle à leur utilisation biologique. L'addition de plusieurs sucres sur la sphère de carbone ferait du C<sub>60</sub> une plateforme originale. Ces composés polysucres pourraient avoir des effets multivalents reconnus en biologie.<sup>7,8</sup> Et la solubilité des produits obtenus serait accrue en milieu aqueux.

Alors que la mono addition reste abordable par cycloaddition d'azote (vu précédemment), par cycloaddition 1,3-dipolaire<sup>9</sup> ou bien encore par réaction de *Bingel*<sup>10,11</sup>, des additions multiples régiosélectives sont plus délicates à obtenir. En effet, les rendements de ces réactions avec des sucres sont faibles et ne permettent donc pas directement d'accéder à des substitutions plus importantes sur le C<sub>60</sub>.

Néanmoins *Nakamura* a développé une stratégie permettant d'insérer cinq entités sucres de manière totalement contrôlée.<sup>12</sup> En utilisant la cycloaddition de *Huisgen* catalysée au cuivre, ce groupe a réussi à incorporer des trisaccharides encombrés de façon remarquable<sup>13</sup> (Figure 4.3).

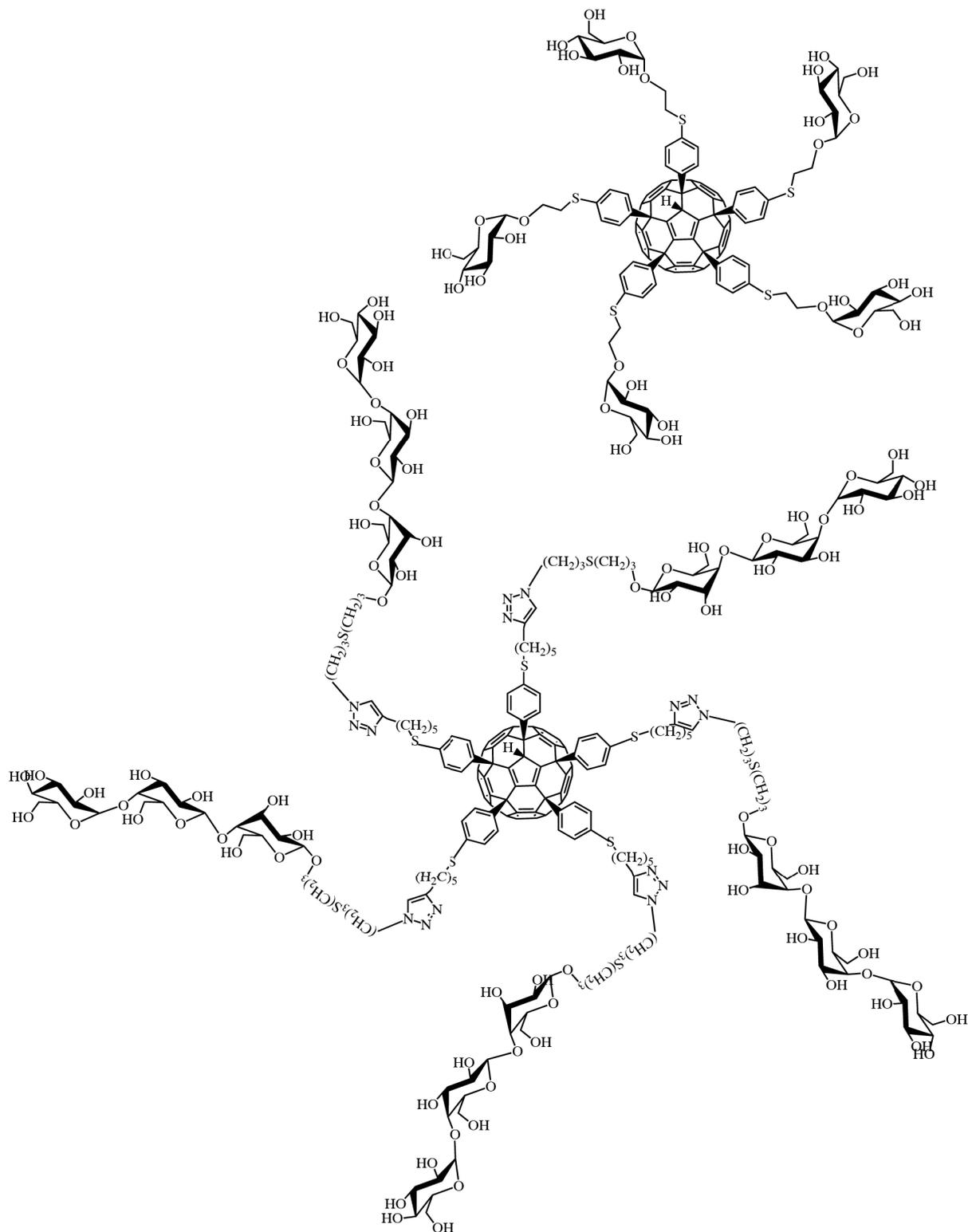


Figure 4.3: Dérivés glycoconjugués proposés par Nakamura<sup>12,13</sup>.

La «*click chemistry*» semble encore une fois un outil de choix pour le greffage de sucres sur le C<sub>60</sub>. Par réaction de *Bingel*, notre équipe a développé des C<sub>60</sub> hexa-adduits simples avec des fonctions alcynes ou azotures périphériques capables de lier des sucres par cycloaddition<sup>14</sup>

(Figure 4.4). Cette méthodologie est très efficace et permet de placer douze sucres en périphérie présentant une distribution globulaire caractéristique du motif hexa-adduit, avec de hauts rendements. De ce fait, les composés produits ont une bonne solubilité dans l'eau et peuvent donc être une plateforme pour une présentation multivalente de ligands.

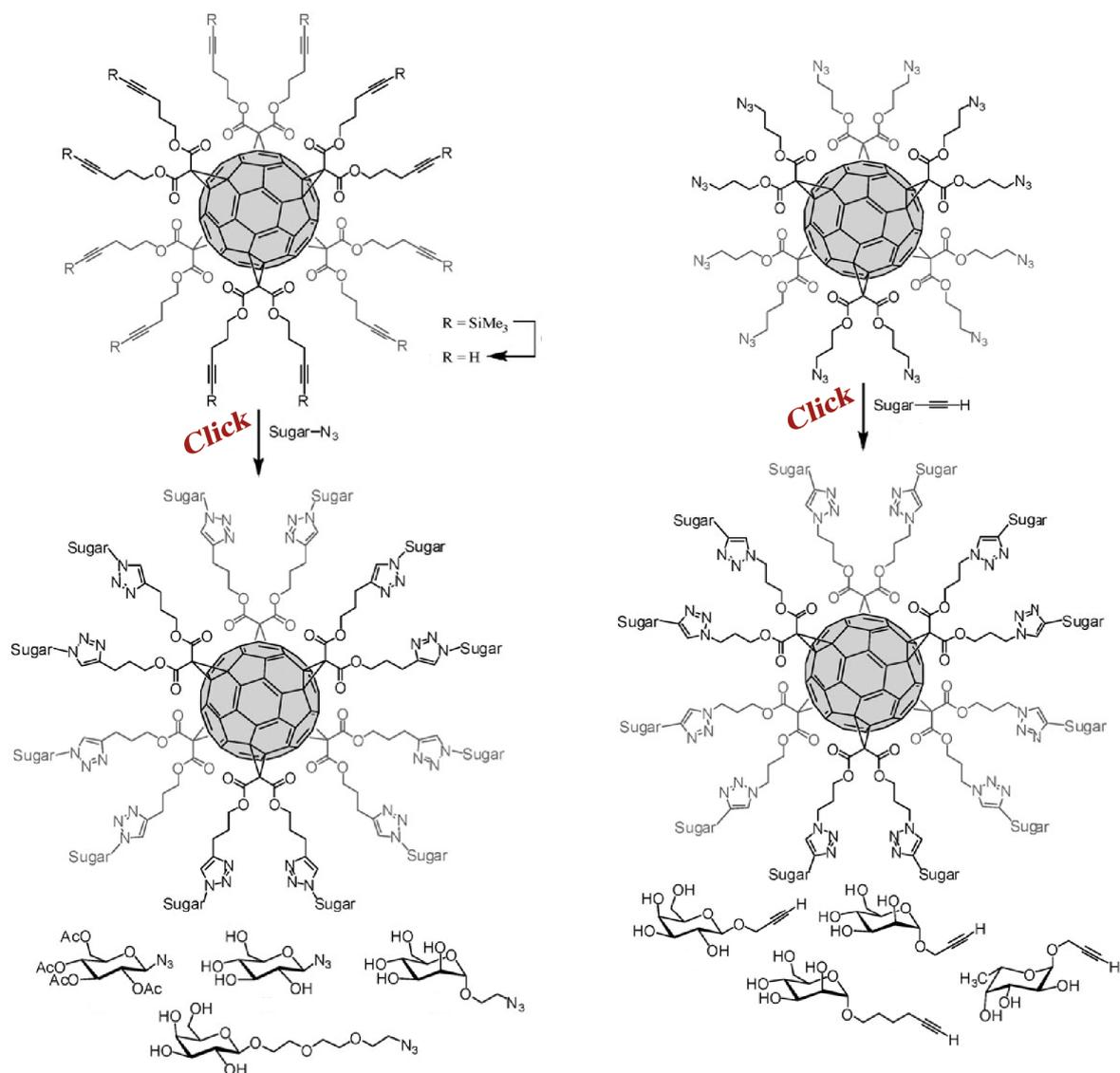


Figure 4.4: Méthodologie développée au laboratoire pour incorporer de façon régiosélective 12 sucres.<sup>14</sup> Les deux synthons hexa-adduits alcynes (vrais ou protégés) et azotures permettent d'obtenir de façon relativement aisée des composés sucres inaccessibles par une autre voie de synthèse.

Notre équipe en collaboration avec le laboratoire du professeur *Compain*, a mis en avant un effet multivalent impressionnant d'un composé hexa-adduit avec des iminosucres périphériques.<sup>15</sup> Des essais d'inhibition de glycosidases ont montré que, comparé à

l'iminosucre simple, le composé dodécasubstitué avait une efficacité d'inhibition jusque trois ordres de grandeur supérieure.

La même méthodologie a fourni des hexa-adduits à 12 sucres qui ont aussi montré un effet multivalent sur une lectine (PA-IL) bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste).<sup>16</sup> Cette lectine est impliquée dans la reconnaissance de glycoconjugués sur des tissus humains. Les glycofullerènes synthétisés ont dévoilé un effet de *clustering*<sup>8</sup> avec une constante de liaison jusque 12000 fois supérieure au sucre monovalent.

De façon inattendue, un effet multivalent a été observé sur une enzyme (heptosyltransferase WaaC, impliquée dans la biosynthèse de liposaccharide bactérien). Le mécanisme d'inhibition reste non résolu actuellement.<sup>17</sup>

Des glycofullerènes dodécamannosylés ont dévoilé un pouvoir de liaison de l'ordre du micromolaire envers une lectine adhésive FimH de *E.coli* (bactérie responsable d'infections urinaires).<sup>18</sup>

Pour augmenter l'effet multivalent potentiel des dérivés hexa-adduits, l'équipe du professeur *Martin* a créé des sucres dendrimérisés greffés en surface par «click», passant ainsi de 12 à 24 sucres par molécule<sup>19</sup> (Figure 4.5).

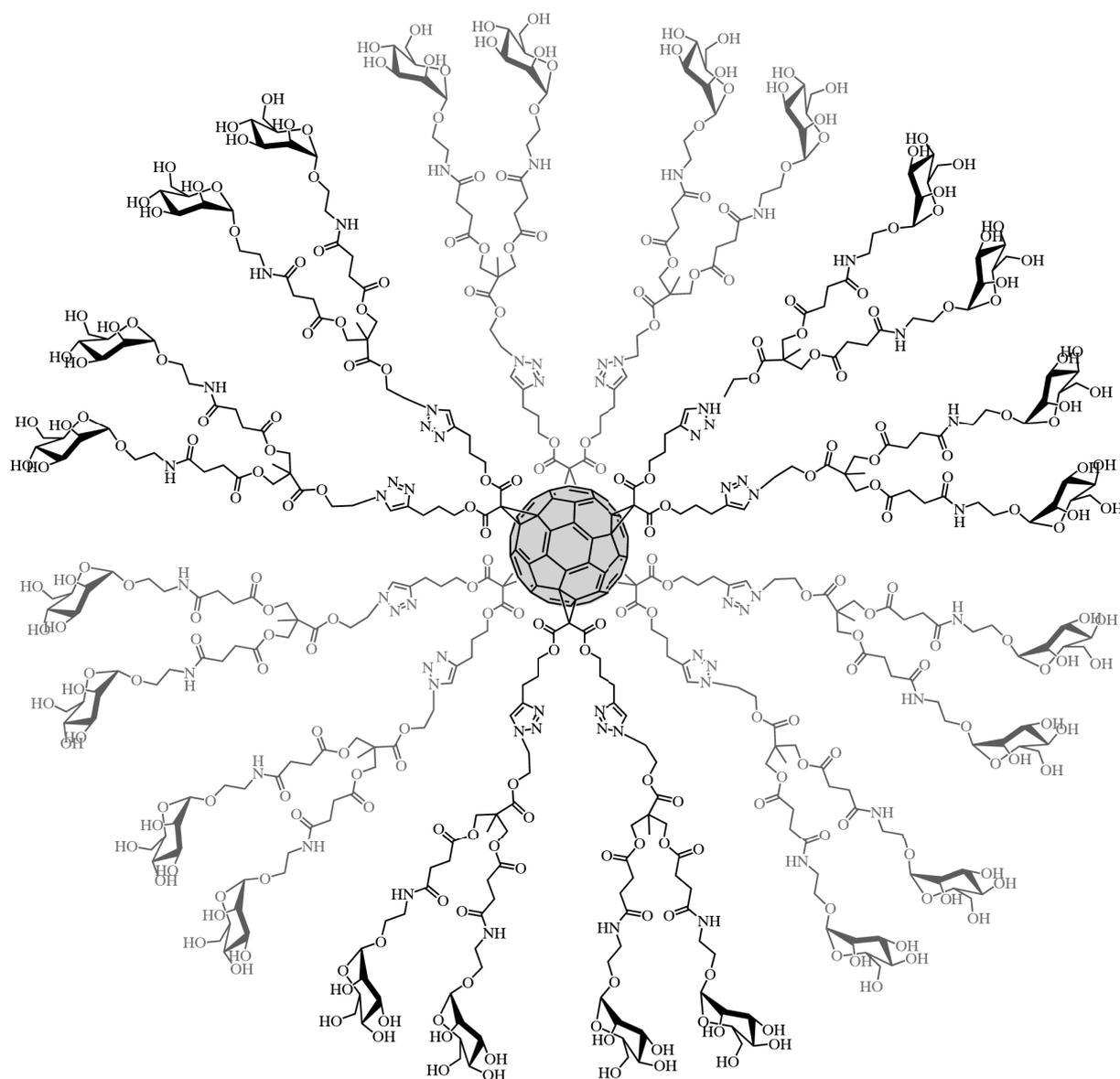


Figure 4.5:  $C_{60}$  présentant 24 sucres périphériques grâce à une stratégie dendritique.<sup>19</sup>

Toujours dans le but d'augmenter l'effet multivalent des glycofullerènes, le groupe de *Kobayashi* a usé d'une approche supramoléculaire. C'est-à-dire que cette équipe a utilisé les propriétés d'auto-assemblages du  $C_{60}$  (voir Chapitre 3) pour former des agrégats où le nombre potentiel de sucres en un point de l'espace est drastiquement augmenté.<sup>20</sup> Ainsi, ce groupe a mis en évidence une augmentation de l'effet multivalent lorsque leur composé est préparé de façon à s'auto-assembler en milieu aqueux.<sup>21</sup>

Pour accroître le nombre de sucres (et donc potentiellement l'effet multivalent) de nos composés, une optimisation de notre stratégie de post-fonctionnalisation par *click* a été entreprise. Dans cette optique plusieurs chemins sont envisageables, comme d'utiliser les propriétés d'auto-assemblage du  $C_{60}$  (approche supramoléculaire), ou bien encore de dendrimériser nos composés (approche covalente). La partie II de ce chapitre sera consacrée à

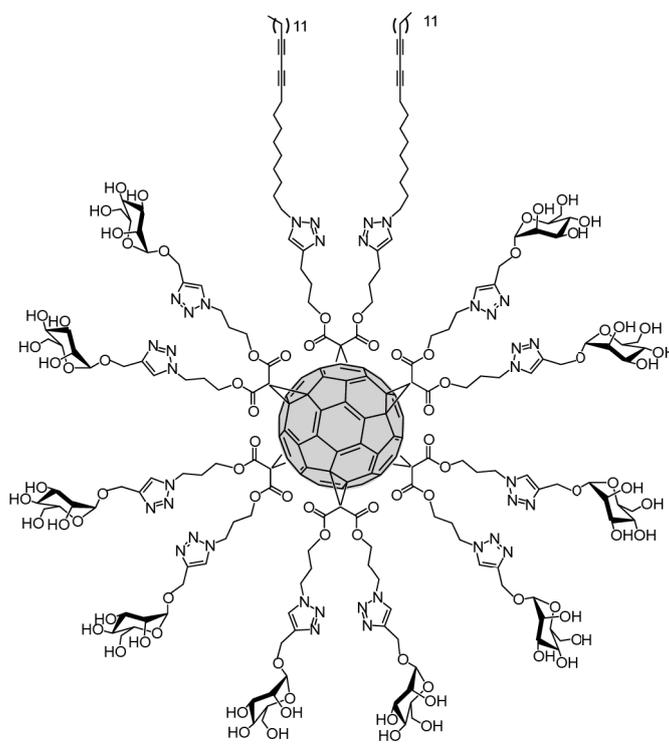
la synthèse et aux premiers résultats biologiques obtenus de composés hexa-adduit mannosylés, formant des micelles dans l'eau. La partie III de ce chapitre présentera la synthèse dendritique d'un composé modèle à 13 molécules de C<sub>60</sub>, puis la synthèse d'un composé contenant formellement 120 sucres de type mannose et les premiers résultats biologiques obtenus.

## II. C<sub>60</sub> mannosylés auto-assemblables: synthèse, caractérisation et premières évaluations biologiques.

La partie précédente a montré que les dérivés de C<sub>60</sub> pouvaient jouer un rôle non négligeable en tant que plateforme multivalente. Pour accroître cet effet multivalent, une approche supramoléculaire semble séduisante (pour des exemples récents d'auto-assemblages ayant des effets multivalents en biologie, voir la mini-revue de *Barnard et K. Smith*<sup>22</sup>). En effet, en peu d'étapes de synthèse, avec des synthons relativement simples, le nombre de ligand peut radicalement être augmenté.

Dans cette optique, la synthèse du composé C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> a suscité notre intérêt. Le choix de cette molécule a été dirigé par trois facteurs: le cœur C<sub>60</sub>, le sucre, la partie hydrophobe. Le précurseur C<sub>60</sub> hexa-adduit présente deux fonctions *clickables*, alcyne et azoture. Cette possibilité de di-fonctionnalisation permet de créer un composé amphiphile (voir Chapitre 2, partie II) modulable à souhait. Ici, le choix du sucre s'est fait sur un mannose. Le dérivé mannose-alcyne étant facilement synthétisable depuis le mannose commercial. De plus, ce sucre est impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques où la multivalence peut être invoquée. Cependant grâce à la modularité du synthon C<sub>60</sub>, l'incorporation d'un autre type de sucre est possible. Le choix de la chaîne alkyle en C<sub>25</sub> avec une fonction butadiyne est issu d'une collaboration avec l'équipe du Docteur Alain Wagner (Illkirch, France). D'une part, la décision de mettre deux longues chaînes grasses a été décidé pour contrebalancer la polarité fournie par les 10 sucres et donc forcer à l'agrégation, *a priori*. D'autre part, la fonction diacétylène permet de photopolymériser notre composé et de former des agrégats polydiacétyléniques. Cette dernière assertion est issue de plusieurs années de recherche de la part du groupe du Dr Alain Wagner dont les derniers résultats en date sont présentés dans la thèse du Docteur Emmanuelle Morin-Picardat (thèse de doctorat, Université De Strasbourg, 2012). Ainsi l'emplacement de la fonction polymérisable au sein de la chaîne alkyle provient de l'expérience de cette équipe qui a constaté qu'à cet endroit la propagation de

polymérisation était la plus efficace. Tout comme les sucres, les chaînes grasses peuvent être modulées à souhait.



**C60manC25**

Figure 4.6: Molécule cible comprenant un support C<sub>60</sub> hexa-adduit difonctionnalisable, dix mannoses périphériques et deux chaînes grasses photopolymérisables.

L'article récent de l'équipe de Doris<sup>23</sup> souligne les potentiels avantages que peuvent avoir les polydiacétylènes agrégés sous forme de micelles, en terme d'application biologique. Ce papier met en avant l'utilisation de ces micelles pour effectuer de l'imagerie et de la délivrance de médicaments *in vivo*. Les auteurs concluent: «les micelles diacétylènes photopolymérisées ont les caractéristiques avantageuses (taille, synthèse facile, toxicité basse) mais surpassent les défauts inhérents (faible stabilité, temps de circulation dans l'organisme court, rétention de médicaments instable) des micelles non polymérisées classiques».

La synthèse débute avec le dérivé de C<sub>60</sub> **9**, présenté au chapitre 2 partie II.2. (Figure 4.1). Une première cycloaddition catalysée au cuivre entre **9** et le **mannose-alcyne**<sup>14</sup> (produit par l'équipe du Professeur Stéphane Vincent (Namur, Belgique)) donne le précurseur **C<sub>60</sub>manTMS** avec un bon rendement de 78%. Finalement, la synthèse est terminée par une

nouvelle cycloaddition entre la **chaîne alkyle-azoture** (produite par l'équipe d'Alain Wagner depuis le produit tosylé<sup>24</sup>) qui procure C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> avec un rendement remarquable de 98%.

Le choix de ces conditions réactionnelles provient d'un savoir acquis au laboratoire. Les premiers essais de couplage de C<sub>60</sub> hexa-adduit azotures avec des sucres-alcyne ont été testés dans les conditions standards CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Dans ce mélange, les produits partiellement *clickés* précipitaient au cours de la réaction, empêchant d'obtenir les produits finaux. Le mélange THF:DMSO:H<sub>2</sub>O a permis d'éviter ce problème en solubilisant aussi bien les réactifs que les intermédiaires réactionnels. De plus, le choix du micro-onde a permis de diminuer considérablement le temps de réaction (passant de plus de 40 heures à moins de 2 heures). Pour enlever les éventuelles traces de cuivre après chaque réaction de *Huisgen*, les composés ont été systématiquement passés sur une colonne d'exclusion stérique (Sephadex<sup>TM</sup>).

La caractérisation de ces deux produits s'est avérée délicate. Malgré tout, aucun doute ne subsiste sur l'identité des produits. A propos de la formation de C<sub>60</sub>manTMS, le spectre IR n'indique plus le signal correspondant aux azotures. De plus le composé **9**, est relativement instable, les fonctions azotures pouvant possiblement soit se décomposer en nitrène au cours du temps ou soit réagir avec le cœur C<sub>60</sub> par cycloaddition.<sup>17,25</sup> Ainsi, si le produit avait encore des fonctions azotures, la formation de polymères insolubles serait apparue au cours du temps. Hors après plus d'un an de stockage sans précaution particulière, le produit se dissout totalement dans l'eau, sans précipité. Ces constatations amènent à penser que tous les azotures ont effectivement été transformés.

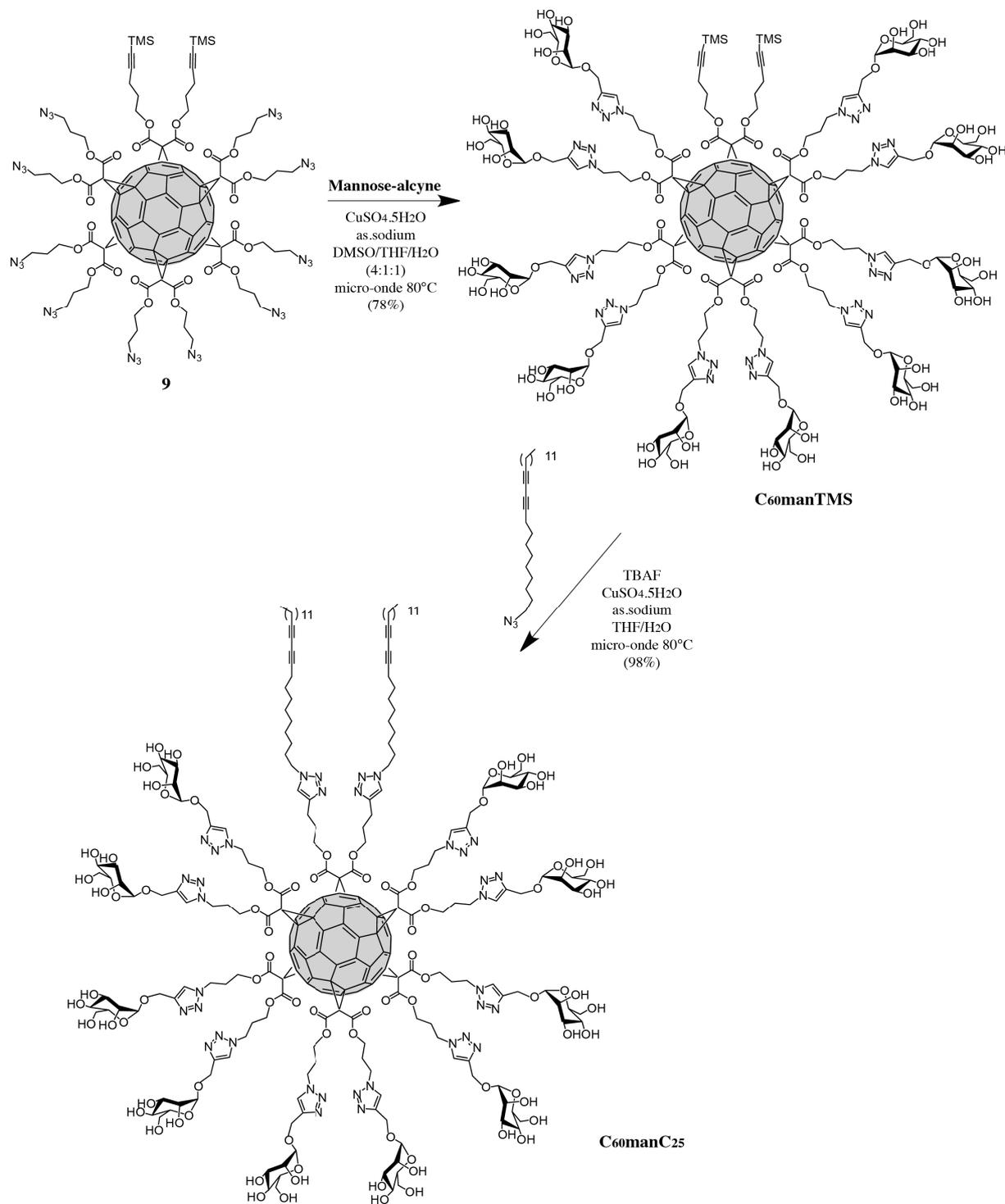


Figure 4.7: Schéma de synthèse de C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>.

L'analyse RMN carbone des produits est difficile à interpréter à cause de signaux larges. Ce phénomène a déjà été constaté par d'autres équipes<sup>11-13</sup> qui ont conclu que cet événement serait lié à la présence d'agrégats en solution. Par conséquent, l'outil de choix pour identifier nos composés a été la spectrométrie de masse (MALDI-TOF). La Figure 4.8 représente un spectre caractéristique de glycofullerène hexa-adduit (ici le composé C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>).<sup>17</sup> En dépit du haut niveau de fragmentation, le pic de l'ion moléculaire est observable avec un atome de sodium, suivi d'une série de fragments typiques. Ces fragments correspondent à des réactions de *retro-Bingel* et à l'hydrolyse de l'ester malonique suivie d'une décarboxylation.

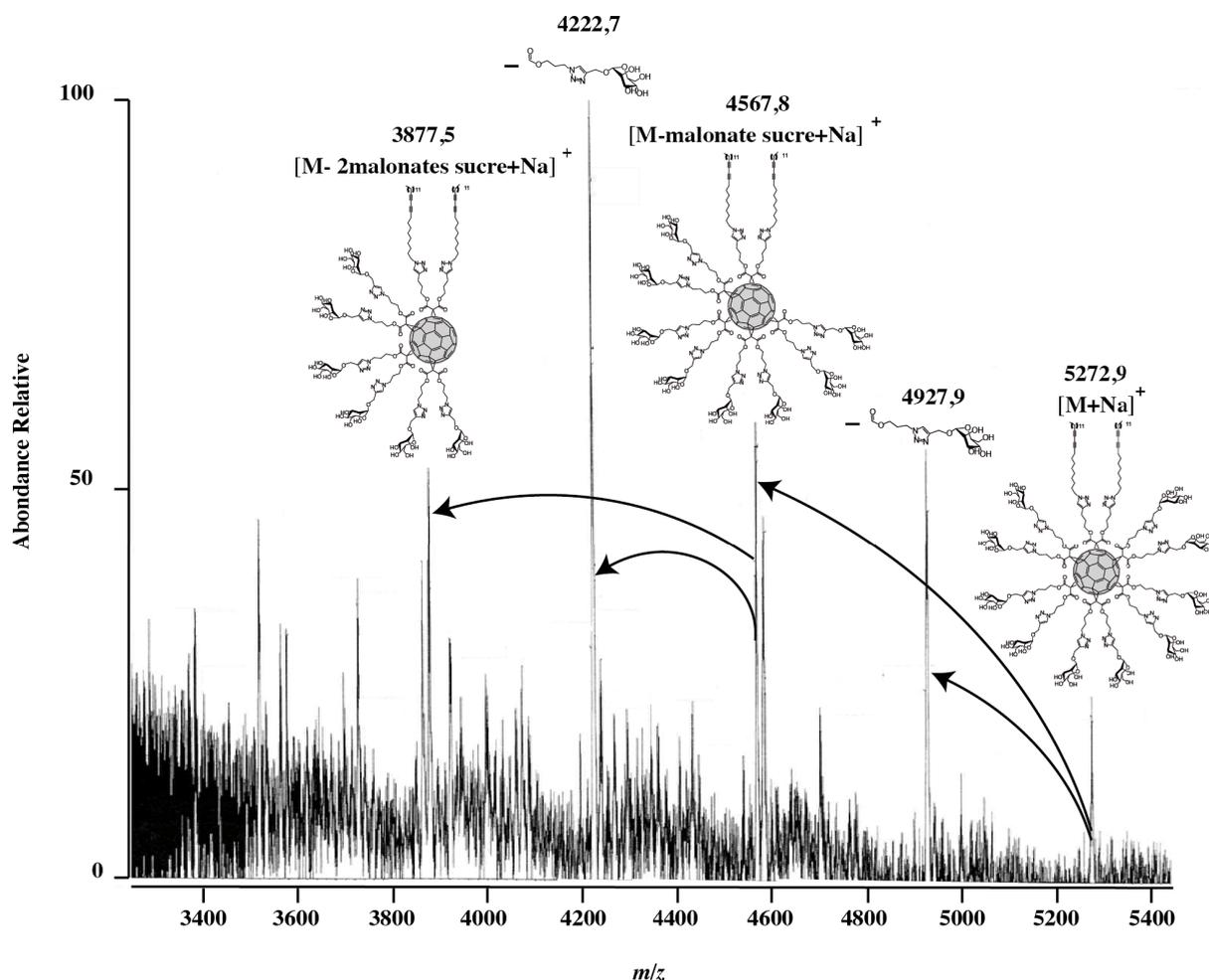


Figure 4.8: Spectre de masse (MALDI-TOF) de la molécule C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>. Une série typique de fragments issue de réactions de *retro-Bingel* ainsi que le clivage d'un ester malonique suivi d'une décarboxylation est observée.

Par la suite, les fonctions butadiynes de C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> ont été soumises à polymérisation (Figure 4.9). Pour se faire, le produit a été mis en solution dans de l'eau milliQ, dans une cuve à quartz, à une concentration élevée (10 mg/mL) pour provoquer la formation d'agrégats et

permettre la propagation de la chaîne ène-yne. La cuve a été placée dans un four UV (Cross-Linker Bio-Link 254, Fischer Bioblock) puis irradiée pendant deux heures à 254 nm avec des lampes d'une puissance de 48 W.

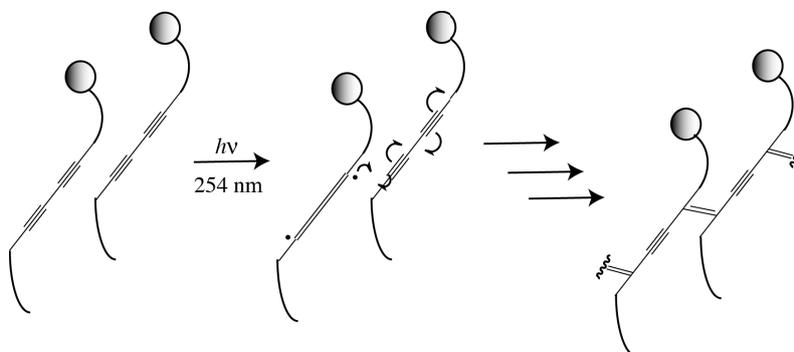


Figure 4.9: Schéma de la photopolymérisation de composés diacétyléniques<sup>23</sup>. L'irradiation UV produit une initiation radicalaire de la polymérisation permettant la formation de l'enchaînement ène-yne.

L'analyse du produit **C<sub>60</sub>manPOL** a été réalisée dans un premier temps par spectroscopie UV (Figure 4.10).

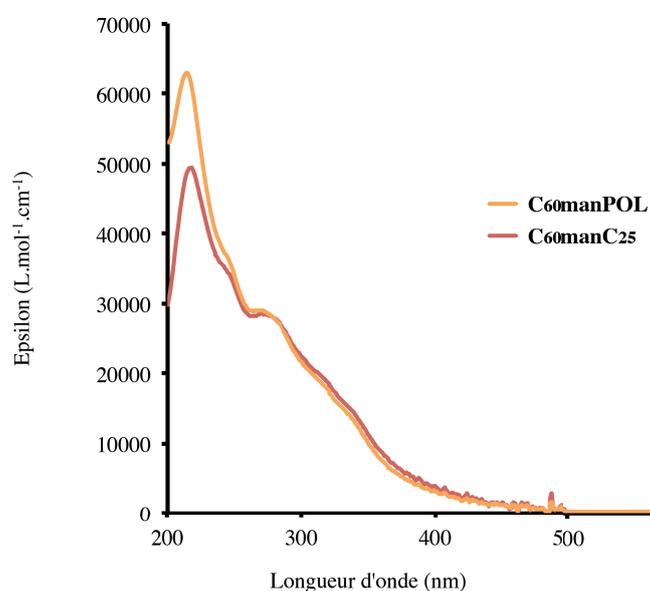


Figure 4.10: Spectre d'absorption de **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>** et **C<sub>60</sub>manPOL** (H<sub>2</sub>O).

Une augmentation du maximum d'absorption est observée pour le produit polymérisé. Ce constat peut être dû à la formation du système ène-yne. Le motif des spectres est similaire et est toujours caractéristique de la signature des C<sub>60</sub> hexa-adduits, ce qui amène à penser que l'irradiation du composé n'a pas été destructrice.

Ensuite, les composés **C<sub>60</sub>manTMS**, **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>** et **C<sub>60</sub>manPOL** ont été analysés en solution par DDL (Figure 4.11), dans de l'eau milliQ, à 0,1 mg/mL (environ 2.10<sup>-5</sup> M). Les trois produits présentent des populations homogènes d'objet. D'une façon logique, **C<sub>60</sub>manTMS**, qui a la partie hydrophobe la plus courte forme les objets les plus petits.

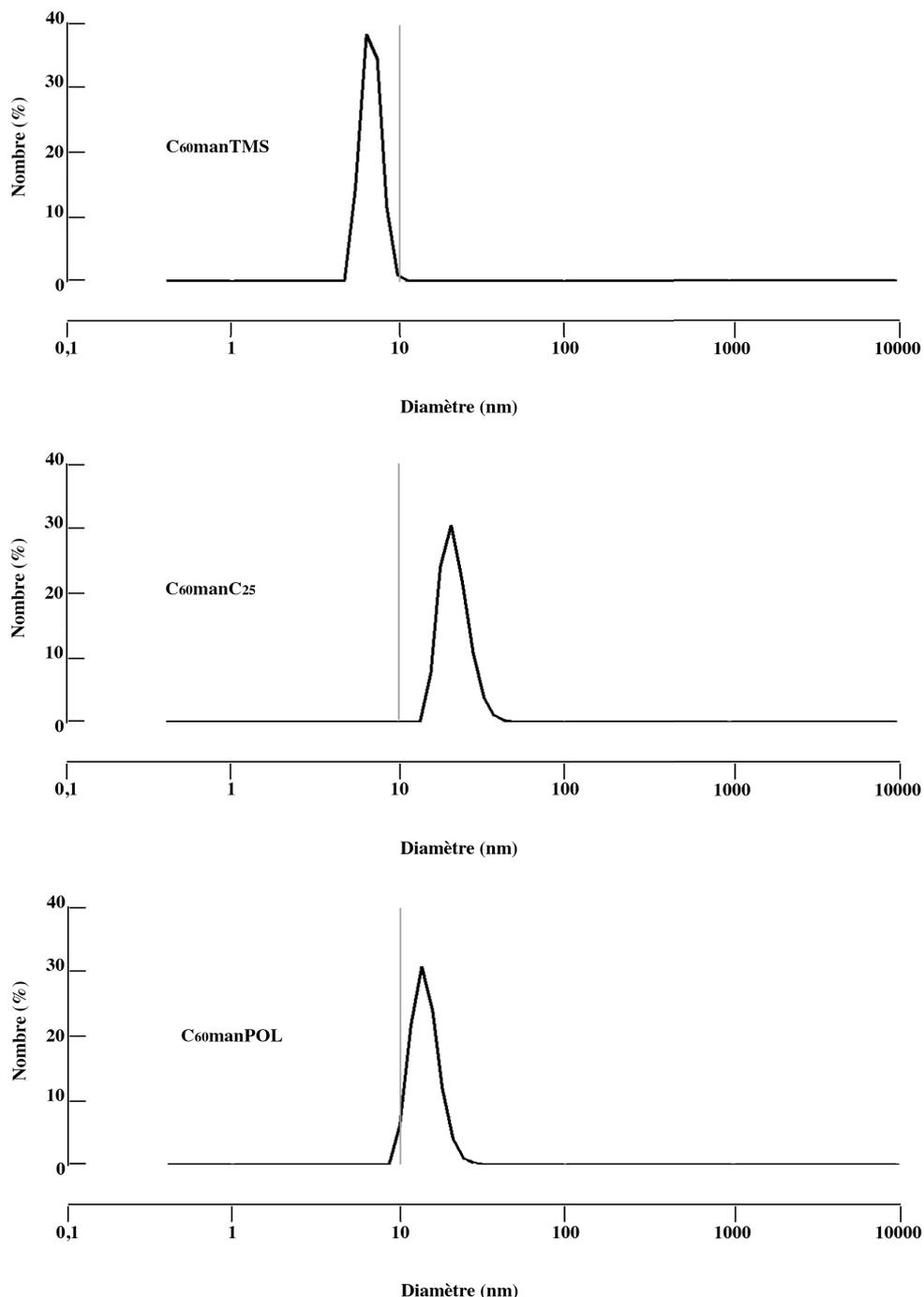


Figure 4.11: Profils DDL dans l'eau des C<sub>60</sub> hexa-adduits mannosylés à 0,1 mg/mL (2.10<sup>-5</sup> M environ).

**C<sub>60</sub>manPOL** présente des objets plus compacts en solution par rapport au produit non polymérisé **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>**. Ce constat peut être dû à la formation de systèmes conjugués diminuant l'aspect dynamique des agrégats.

Pour confirmer ces résultats, la morphologie des trois molécules a été analysée par MET, dans les mêmes conditions de préparation (solution d'eau à  $2.10^{-5}$  M) (Figure 4.12). L'analyse DDL est en parfait accord avec les clichés de microscopie. Les trois composés présentent des populations homogènes d'objet. Ces objets s'apparentent à des micelles.

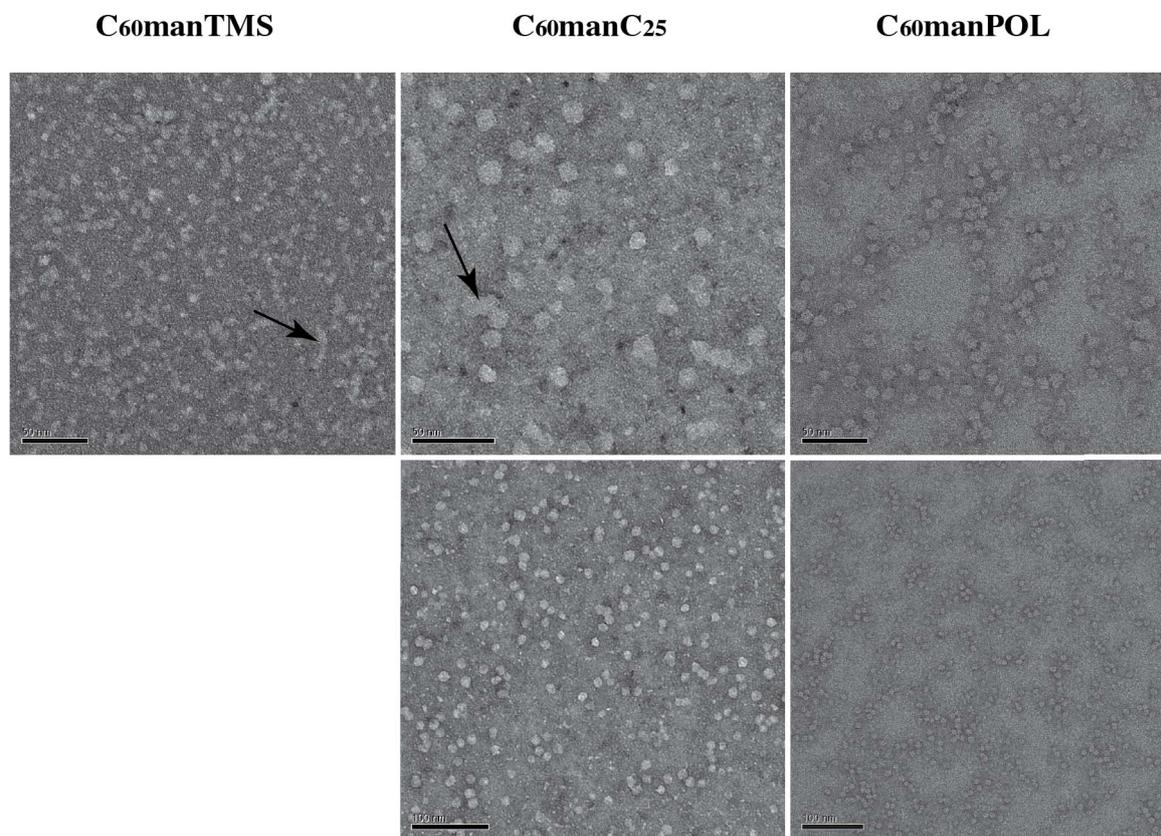


Figure 4.12: Images de MET des glycofullerènes (0,1 mg/mL dans de l'eau), barre d'échelle: en haut, 50 nm et en bas, 100 nm. Les flèches indiquent des «micelles allongées» représentant le caractère dynamique des particules.

**C<sub>60</sub>manTMS** forme les objets les plus petits. Les micelles créées par **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>** sont plus grosses que celles de **C<sub>60</sub>manPOL**. Le caractère dynamique des micelles formées par **C<sub>60</sub>manTMS** et **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>** semble fortement diminué pour **C<sub>60</sub>manPOL**. En effet, peu ou plus de «micelles allongées» sont observables comme pour **C<sub>60</sub>manTMS** et **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>** (indiquant un échange intermicellaire rapide des molécules) mais des particules sphériques relativement bien définies. Ainsi, une stabilité des micelles formées aurait été induite par la photopolymérisation.

Par la suite la cytotoxicité des composés a été déterminée par un test MTT. Ce test a été réalisé par le Dr Denis Weltin du laboratoire Phytodia (Illkirch, France). Brièvement, ce test consiste en la quantification de cellules vivantes et actives. Après addition du composé à tester, un sel de tétrazolium est ajouté au milieu de culture. Celui-ci est réduit par une enzyme mitochondriale impliquée dans la chaîne respiratoire. Le produit forme un précipité de

couleur violette. Un dosage spectrophotométrique à 595 nm permet alors de quantifier le nombre de cellules vivantes ayant une activité métabolique.

La Figure 4.13 montre les résultats du test MTT réalisé à différentes concentrations des produits sur des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Ces cellules n'ont pas de récepteurs spécifiques aux mannoses, ce test est donc utilisé pour déterminer une toxicité non sélective. L'addition du sel de tétrazolium s'est effectuée après 24 heures d'incubation des molécules dans le milieu de culture cellulaire.

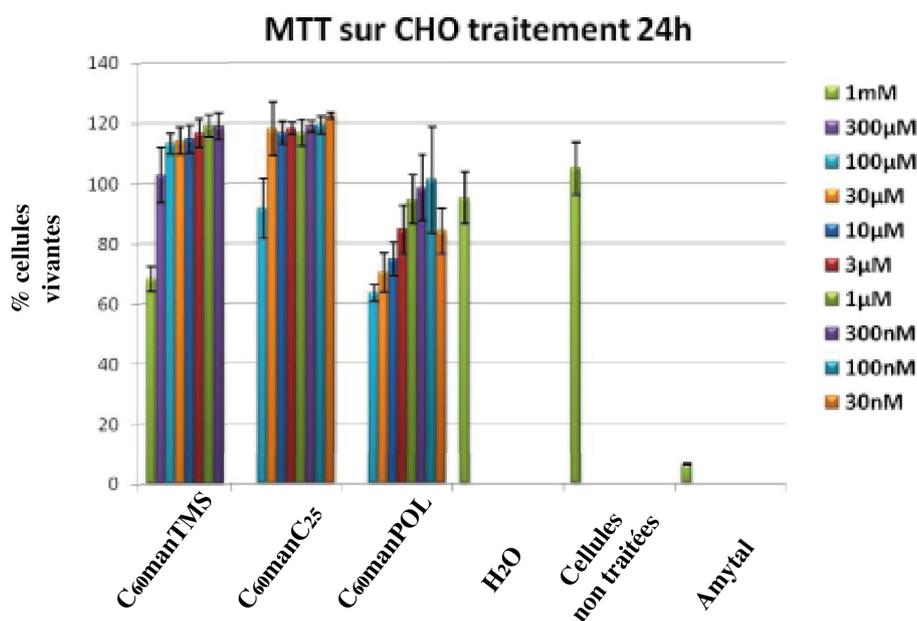


Figure 4.13: Tests MTT des glycofullerènes.

Les produits ont été solubilisés dans de l'eau avant d'être ajoutés au milieu de culture cellulaire. L'ajout d'eau a été utilisé comme témoin négatif de la toxicité. L'ajout d'amytal (drogue inhibitrice de la chaîne respiratoire) a été utilisé comme témoin positif de la toxicité. Au final la toxicité a été évaluée en comparaison des cellules non traitées. Ces tests indiquent une cytotoxicité modeste de C<sub>60</sub>manTMS (à 1 mM, 60% des cellules sont vivantes) et C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> (à 100 µM, une très faible toxicité est observée). C<sub>60</sub>manPOL présente une toxicité légèrement plus importante (60 % de cellules vivantes à 100 µM) mais qui reste raisonnable.

La différence de toxicité entre le composé non polymérisé et polymérisé est difficile à expliquer. Une hypothèse pourrait être que le composé polymérisé est plus soluble dans l'eau et donc, pour une concentration donnée, plus de molécules pourraient interagir avec les membranes cellulaires.

Une première évaluation biologique a été de déterminer l'affinité que pourrait avoir ces composés envers une lectine (FimH) issue d'une souche *E.coli* UTI89 (uropathogénique) par des tests d'hémagglutination. Ces analyses ont été réalisées par l'équipe du Pr Stéphane Vincent (Namur, Belgique). Succinctement, l'addition d'une bactérie (ici, UTI89) à des globules rouges produit une matrice due à l'interaction des lectines (ici, FimH) avec le glycocalyx des erythrocytes. Ce réseau matriciel provoque l'agglutination des globules rouges. Une addition subséquente d'un inhibiteur peut empêcher la réaction d'agglutination. Le titre d'inhibition est défini comme la concentration la plus basse du glycoconjugué à laquelle l'hémagglutination n'est pas encore observée. FimH est une lectine sélective du D-mannose, monovalente. Les résultats des essais d'inhibition d'hémagglutination sont représentés dans le Tableau 4.1 pour les deux composés qui ont été testés.

Ligand	Mannose-alcyne	C <sub>60</sub> manC <sub>25</sub>	C <sub>60</sub> manPOL
Titre d'inhibition (μM)	395	65,5	24

Tableau 4.1: Inhibition d'hémagglutination.

Les titres d'inhibition sont environ deux à trois fois plus bas que le monomère **mannose-alcyne**. Ces résultats indiquent par conséquent que les composés gardent une activité inhibitrice envers FimH.

D'après l'article de l'équipe de *Doris*, les micelles diacétyléniques et polydiacétyléniques peuvent internaliser des médicaments hydrophobes<sup>23</sup>. Comme C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> peut se lier à une lectine sélective du mannose, si ce produit peut encapsuler un composé hydrophobe, il pourrait donc hypothétiquement faire de la délivrance ciblée. Dans cette optique, une étude qualitative d'internalisation d'un composé hydrophobe modèle (du pyrène) a été réalisée avec nos trois produits par spectroscopie UV/Visible (Figure 4.14). Cette analyse permettra d'avoir une estimation de la CMC. Des analyses de fluorimétrie n'ont pas permis d'obtenir une CMC à cause probablement d'un piégeage de la fluorescence du pyrène par le C<sub>60</sub>.

Comme dans le chapitre 3 partie II, le profil d'absorption du pyrène dans l'eau (à 10<sup>-5</sup> M) a été analysé en fonction d'un ajout croissant de l'un des trois composés synthétisés précédemment. Si le pyrène se solubilise dans un environnement hydrophobe, son profil d'absorption devrait être modifié. C'est effectivement ce qui est observé pour C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> et C<sub>60</sub>manPOL. En plus de la signature de ces deux molécules, les pics caractéristiques du

pyrène augmentent en fonction de l'ajout des fullerènes. Le pyrène est donc solubilisé de mieux en mieux, probablement dans un environnement hydrophobe et probablement à l'intérieur des micelles. La polymérisation ne semble pas avoir enlevé la capacité d'internalisation du pyrène. En comparaison, l'absorption du pyrène ne varie pas quand une quantité croissante du précurseur C<sub>60</sub>manTMS est ajoutée. Ainsi, le composé précurseur ne solubilise pas le pyrène, vraisemblablement à cause d'une partie hydrophobe trop courte.

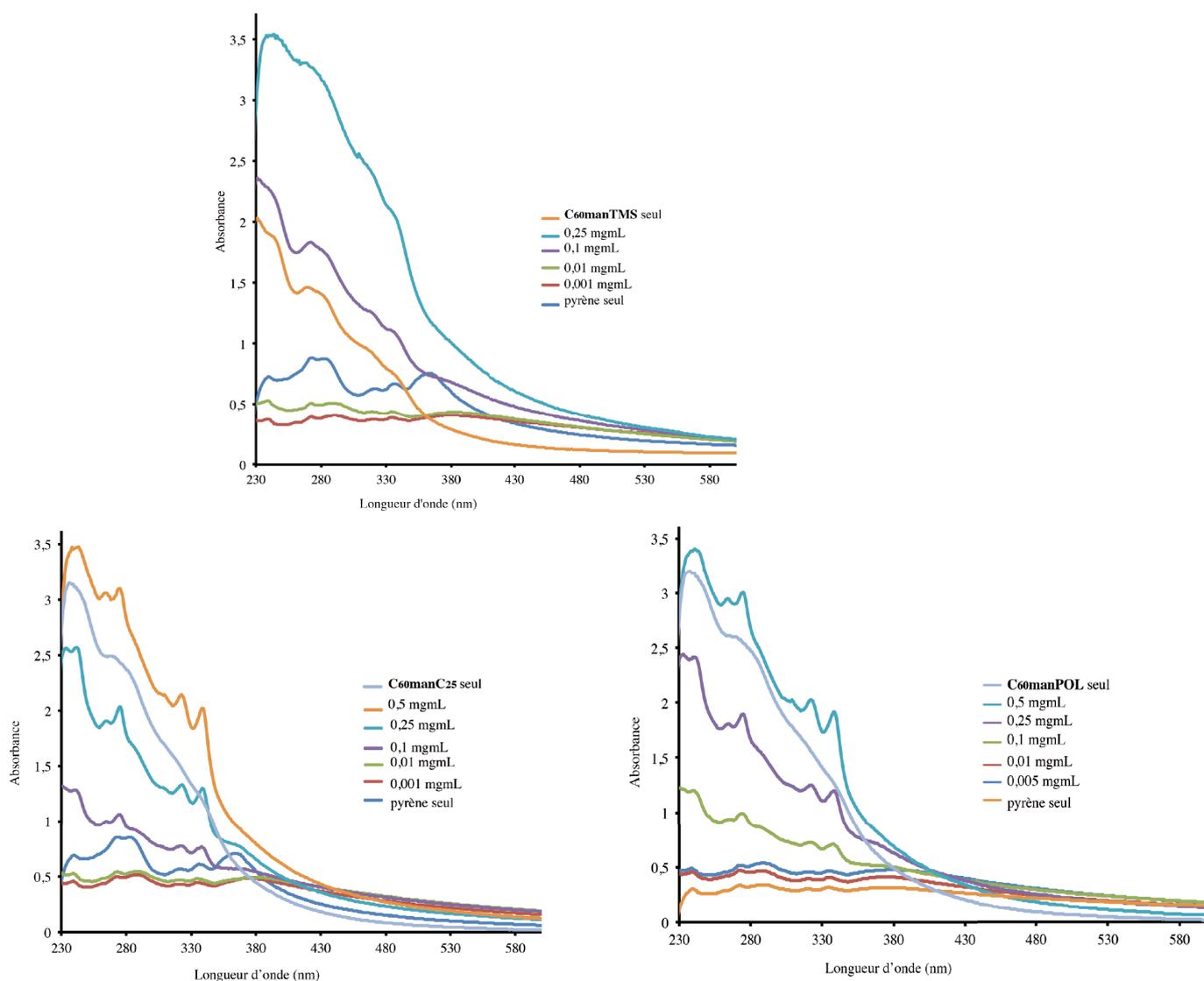


Figure 4.14: Spectres d'absorption à différentes concentrations de C<sub>60</sub>manTMS (en haut), de C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> (en bas, à gauche), de C<sub>60</sub>manPOL (en bas, à droite) en présence d'une quantité fixe de pyrène (10<sup>-5</sup> M), dans de l'eau. En comparaison, les spectres d'absorption des fullerènes sans pyrène (C<sub>60</sub>manTMS seul, C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> seul et C<sub>60</sub>manPOL seul) sont présentés.

A la vue de ces spectres, les CMC de C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub> et C<sub>60</sub>manPOL doivent être comprises entre 0,1 mg/mL (1,9.10<sup>-5</sup> M) et 0,01 mg/mL (1,9.10<sup>-6</sup> M).

Actuellement, ces composés sont testés par le Dr. Evelyne Schaeffer (IBMC, Strasbourg) en tant qu'inhibiteur de la trans-infection du VIH-1. En effet, des résultats préliminaires

menés par l'équipe du Dr. Alain Wagner ont montré que des composés amphiphiles constitués d'une tête polaire mannose et d'une longue chaîne grasse avaient une bonne activité d'inhibition.<sup>26</sup> Ici, l'augmentation du nombre de mannose apportée par nos produits pourrait permettre d'accroître significativement l'inhibition de la trans-infection.

En parallèle, le Dr Evelyne Schaeffer a soumis ces composés à des tests anti-inflammatoires (*en cours*), pouvant avoir un impact sur des maladies auto-immunes comme le lupus. La multivalence de nos composés fait d'eux des candidats idéaux comme plateforme présentatrice de ligands.

Pour conclure, des fullerènes amphiphiles comportant des sucres mannoses ont été produits. L'identité de ces composés a été établie par spectrométrie de masse. La RMN a montré des signaux larges, fournissant une première preuve de la formation d'agrégats de nos composés. L'analyse DDL et MET ont confirmé la formation d'agrégats sous forme de micelles. Ces structures peuvent encapsuler des composés hydrophobes. Comme les mannoses peuvent se lier sélectivement à des lectines bactériennes, ces produits pourraient hypothétiquement faire de la délivrance ciblée.

$C_{60}manC_{25}$  a des fonctions butadiynes polymérisables qui peuvent former des polymères micellaires dont le caractère dynamique semble amoindri. Le caractère dynamique des objets micellaires est modulable, en fonction de l'application ciblée. Si le caractère amphiphile est prévalent sur la formation de structure micellaire, la polymérisation n'est alors pas nécessaire. Par exemple, l'aspect amphiphile des molécules semble prévalent pour l'interaction de celles-ci avec la lectine DC-SIGN (responsable de la trans-infection du VIH). En contrepartie, pour effectuer de la délivrance de médicaments, un caractère micellaire stabilisé sera souhaité.<sup>23</sup> Dans ce cas, la polymérisation pourrait permettre cela. On peut donc jouer sur la dualité polymérisée/non polymérisée, en fonction de l'application ciblée.

Au final, ces composés ont montré que la conception de  $C_{60}$  hexa-adduits amphiphiles avec des sucres pourrait avoir un impact biologique (ces composés présentant une cytotoxicité faible). De plus, la grande modularité de l'échafaudage employé, pourrait permettre de fournir une grande diversité d'amphiphiles dont la nature des sucres et des chaînes grasses peut varier à souhait.

Cette partie a présenté la formation d'entités supramoléculaires qui permettent d'accroître le nombre de sucres dans un point donné de l'espace de façon drastique. Toujours dans l'esprit d'augmenter la valence de nos composés et par défi de synthèse, la prochaine partie proposera une construction covalente comportant, théoriquement, 120 sucres périphériques (un  $C_{60}$  central autour duquel sont greffés 12  $C_{60}$ ). Après un rapide aperçu de

l'état de l'art des constructions de «C<sub>60</sub> autour d'un C<sub>60</sub>», la description d'un composé modèle sera suivie de la synthèse d'une molécule à 120 mannoses.

### III. C<sub>60</sub> autour d'un C<sub>60</sub>

#### III. 1. Construction d'un composé modèle

La fabrication de molécules riches en fullerène repose sur la chimie des dendrimères. Le terme fullerodendrimère est souvent employé. Une très large contribution de notre groupe dans ce domaine est résumée dans une revue récente.<sup>27</sup> Tous les assemblages de ces fullerodendrimères situent les C<sub>60</sub> en périphérie de la molécule. Les sphères de carbone sont mono ou di-fonctionnalisées. Le principal intérêt de ces molécules pourrait être dans le domaine des matériaux car les propriétés électroniques de la sphère de carbone sont conservées.

La synthèse de molécules riches en fullerènes multisubstitués de manière contrôlée reste, à ce jour, un réel défi synthétique. La synthèse d'un heptafullerène (tout hexa-adduit) par le groupe de Hirsch semble être la seule molécule synthétisée présentant des C<sub>60</sub> autour d'un C<sub>60</sub><sup>28</sup> (Figure 4.15).

Ce produit a été synthétisé à partir de trois fragments clefs: l'espaceur macrocyclique contenant deux malonates, des C<sub>60</sub> hexa-adduits mixtes [5:1] et un C<sub>60</sub> central. L'ensemble de la synthèse subit le coût de faibles rendements ne permettant de fournir que 13 mg du composé final.

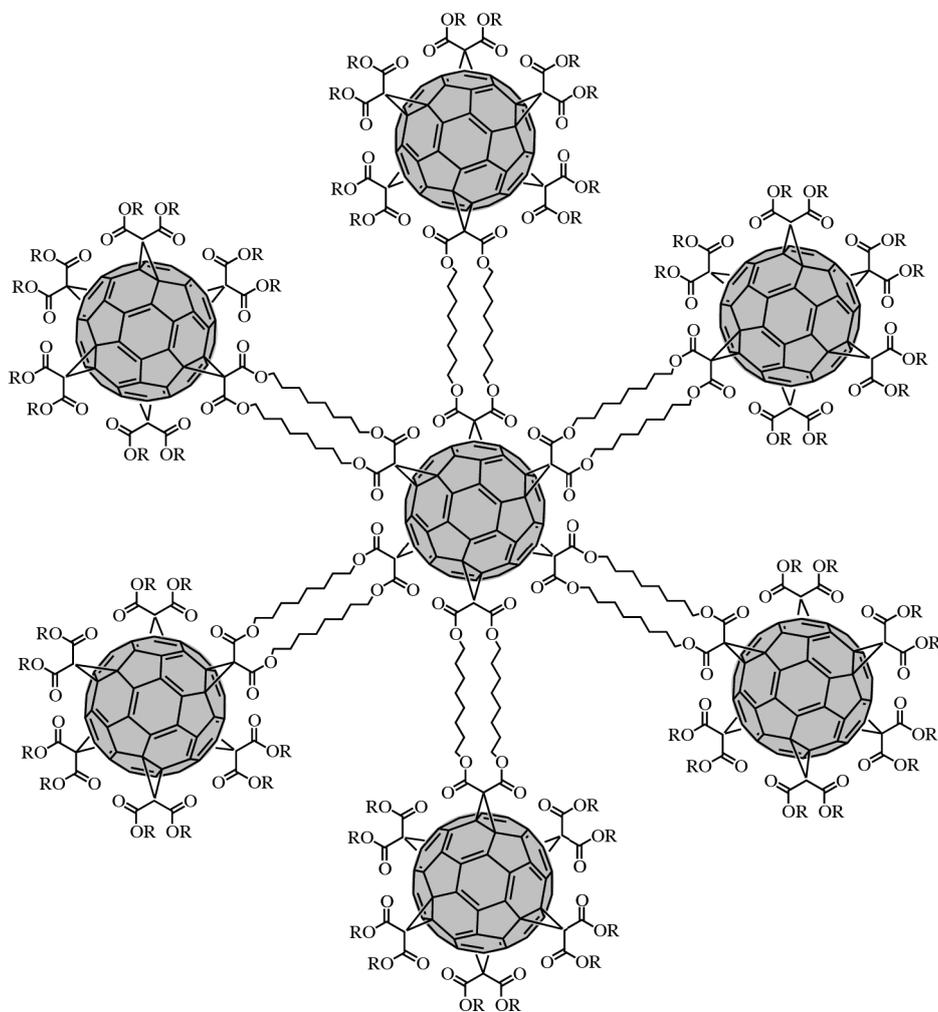


Figure 4.15: Heptafullerène synthétisé par le groupe de *Hirsch*<sup>28</sup>.

En mettant à profit une stratégie de post-fonctionnalisation par *click* notre équipe a contourné les problèmes de bas rendements pour créer un composé constitué de 13 C<sub>60</sub> (Figure 4.16). L'incorporation d'une chaîne hexaéthylèneglycol crée une distance suffisante pour placer les fullerènes périphériques.

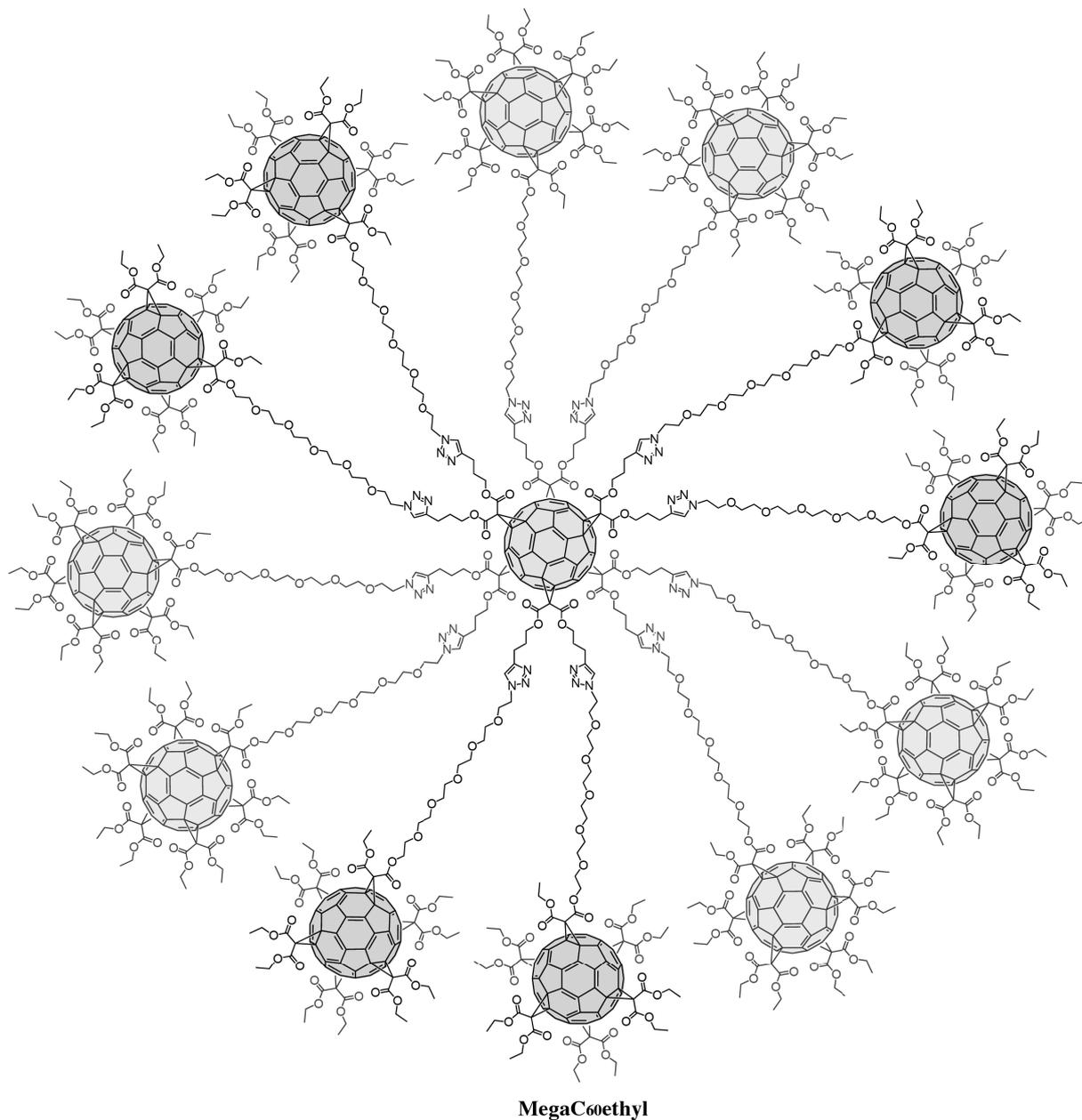


Figure 4.16: Molécule modèle cible élaborée par post-fonctionnalisation *click* de 12 C<sub>60</sub> autour d'un C<sub>60</sub> central.

Ainsi la synthèse démarre avec le dérivé **12** présenté dans le chapitre 2 partie II.3. (Figure 4.17). Ce mono-adduit est transformé en hexa-adduit par l'addition de diéthyle malonate pour donner le composé **16** avec un rendement de 56%.

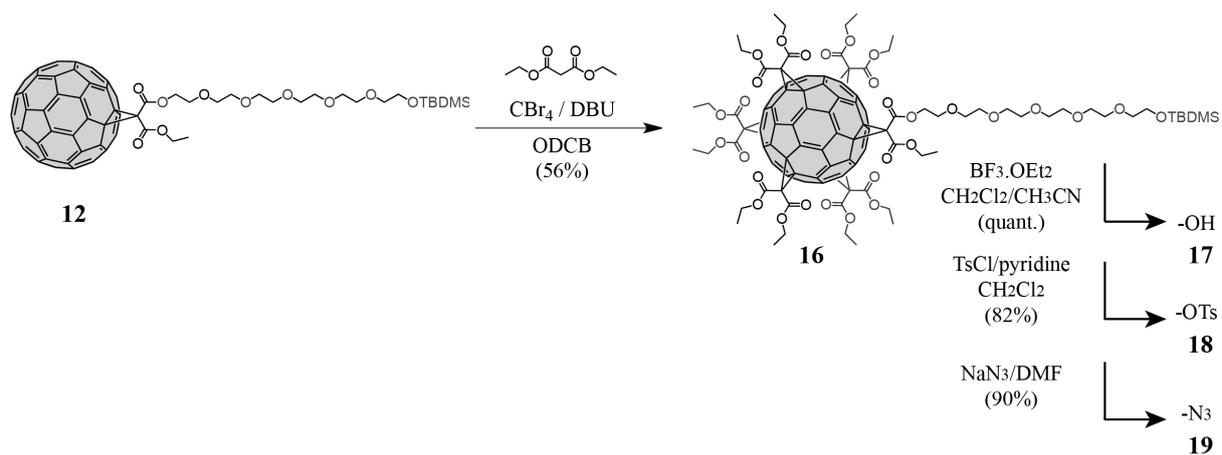


Figure 4.17: Voie de synthèse pour obtenir le composé **19**.

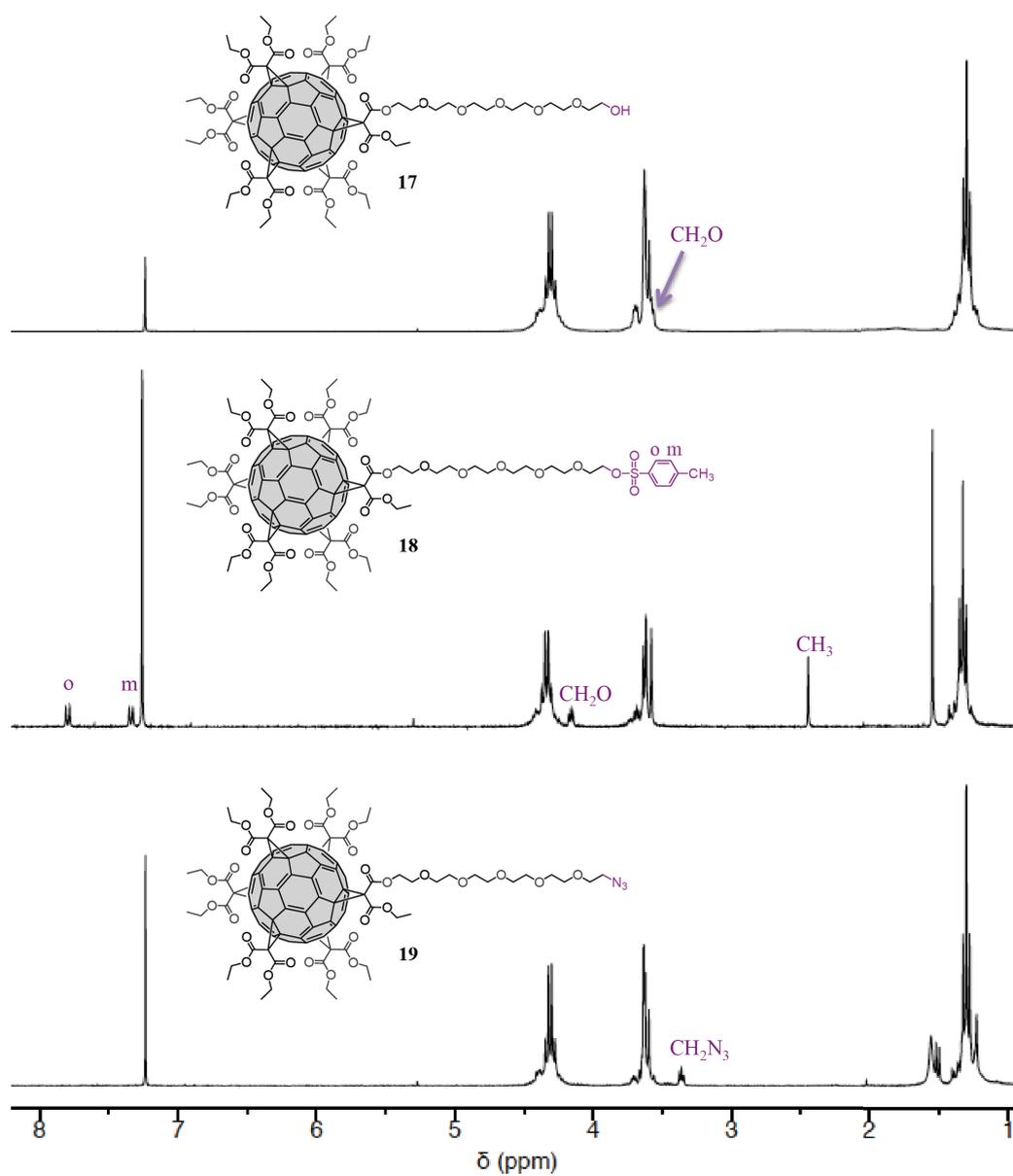


Figure 4.18: Suivi RMN <sup>1</sup>H (300 Mhz, CDCl<sub>3</sub>) de la transformation alcool à azoture.

L'alcool est déprotégé dans les mêmes conditions que décrites dans le chapitre 3 partie III. pour donner la molécule **17**. Puis cet alcool est tosylé (**18**). Enfin une substitution nucléophile avec NaN<sub>3</sub> procure le C<sub>60</sub> hexa-adduit **19**, prêt à être engagé dans la dernière étape de cette synthèse. La transformation de l'alcool **17** en azoture **19** n'a posé aucune incertitude par RMN <sup>1</sup>H (Figure 4.18).

Le composé azoture **19** a été obtenu à l'échelle de 150 à 190 mg plusieurs fois. Lors de la préparation de celui-ci, aucune réaction parasite envers la sphère de carbone n'a été constatée, probablement dû à la faible réactivité des dérivés hexa-adduits. Néanmoins, les composés C<sub>60</sub>-azotures sont relativement instables et ce composé a donc été préparé juste avant son utilisation.

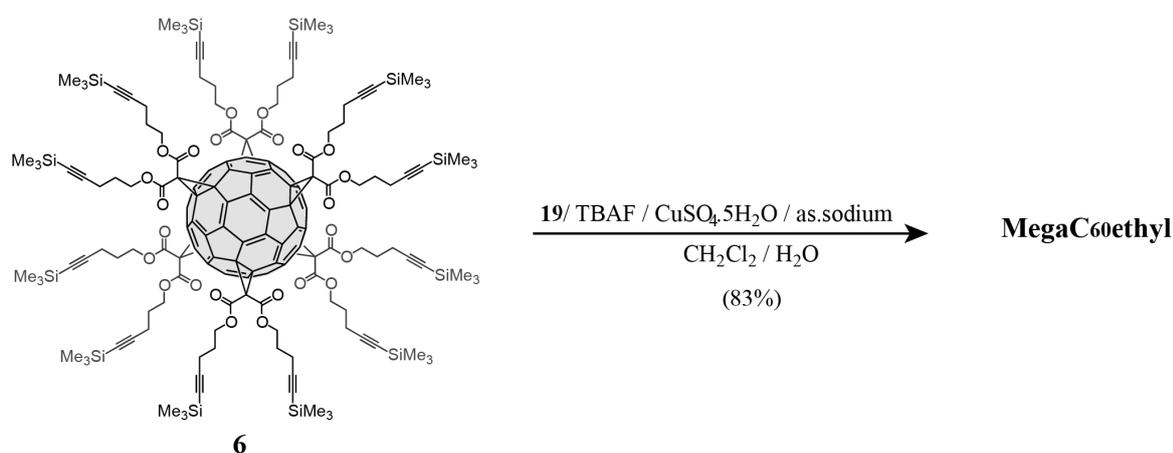


Figure 4.19: Réaction formant **MegaC<sub>60</sub>ethyl**.

Finalement le composé **19** a été soumis à la réaction *click* catalysée au cuivre I en présence du C<sub>60</sub> hexa-adduit alcyne **6**. Après cinq jours de réaction, une CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 85:15) ne montre que deux taches: l'excès du composé **19** qui migre au sommet de la plaque et une tache très polaire au bas de la plaque. Après purification, le composé polaire isolé s'est avéré correspondre au produit désiré **MegaC<sub>60</sub>ethyl**, obtenu avec un rendement remarquable de 83%.

Toutes les analyses (IR, UV/visible, RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, Masse) ont permis de certifier la bonne identité du produit. Surtout, aucun défaut n'a été constaté par RMN, toutes les fonctions alcynes ont réagi. Cette dernière observation a conduit notre équipe à conclure que le produit obtenu est monodisperse.

L'analyse  $^1\text{H}$  de **MegaC<sub>60</sub>ethyl** indique clairement la symétrie octaédrique du C<sub>60</sub> central. Notamment un seul singulet vers 7,48 ppm correspondant aux 10 protons triazoles est observé (Figure 4.20).

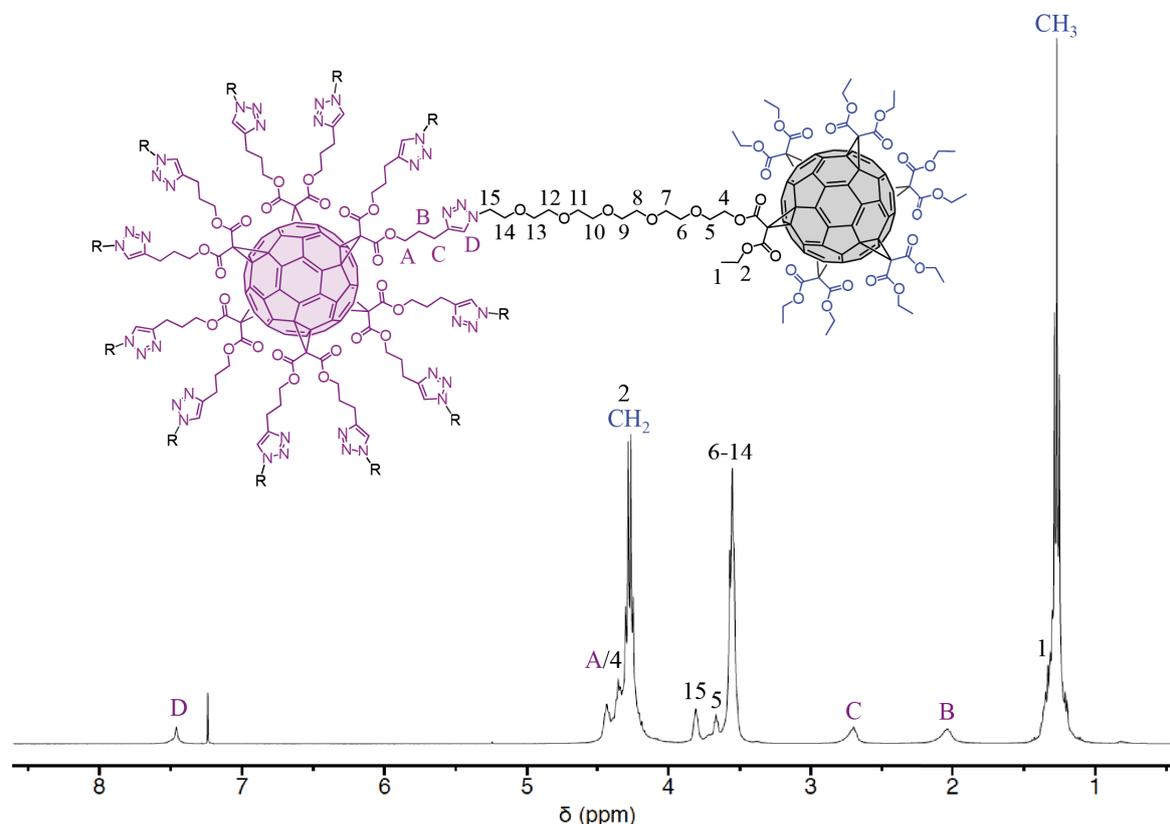


Figure 4.20: Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 Mhz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la molécule **MegaC<sub>60</sub>ethyl**.

L'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  conforte l'idée d'un produit monodisperse (Figure 4.21). Tous les carbones  $\text{sp}^2$  des C<sub>60</sub> présentent deux ensembles de signaux à 141,1 et 145,8 ppm, indiquant encore une fois la haute symétrie de notre composé. De même les deux pics vers 121 et 146 ppm représentent les signaux correspondants aux carbones des cycles triazoles, tous magnétiquement équivalents. D'une manière générale, le spectre montre une haute symétrie de l'ensemble de la molécule, avec un profil spectral très simple.

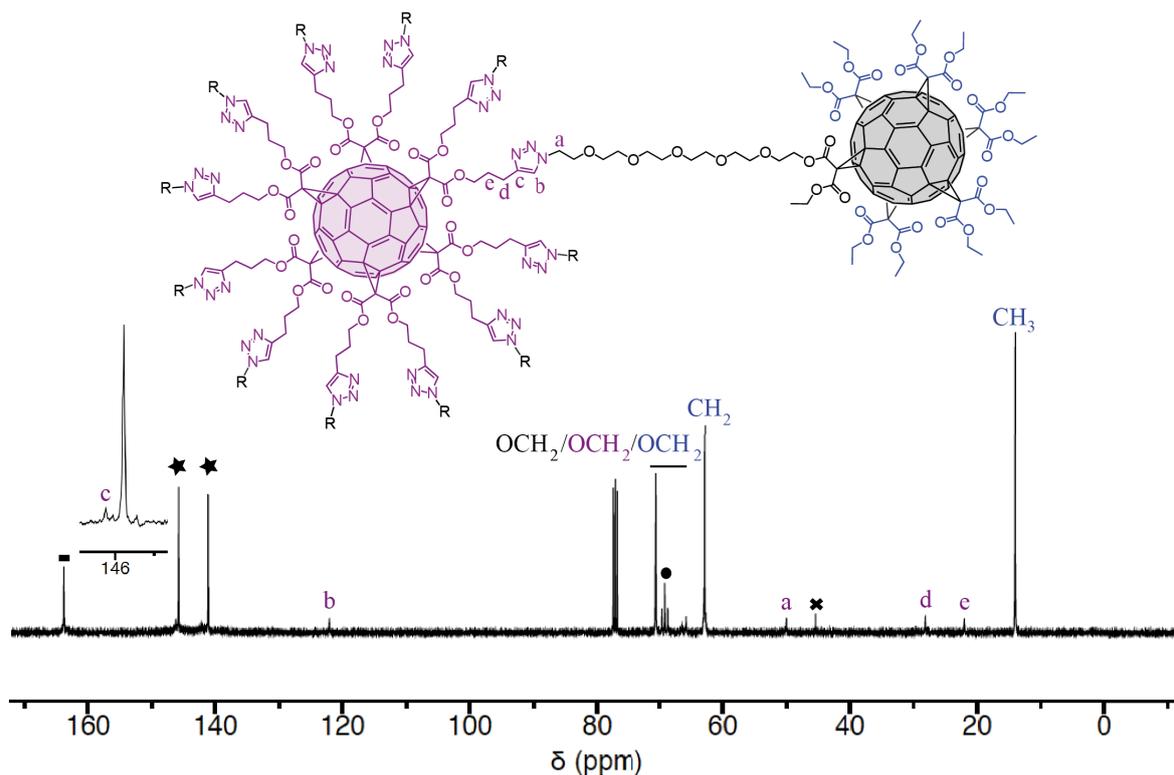


Figure 4.21: Spectre RMN <sup>13</sup>C (100 Mhz, CDCl<sub>3</sub>) de la molécule **MegaC<sub>60</sub>ethyl**. Le rectangle correspond aux signaux des carbones ester, les étoiles aux carbones sp<sup>2</sup> des C<sub>60</sub>, le rond aux carbones sp<sup>3</sup> des C<sub>60</sub> (assignés par DEPT) et la croix aux carbones des cyclopropanes (assignés par DEPT).

La mesure par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a été aussi un indice permettant d'identifier le produit. Le profil général du spectre montre des massifs larges. Chaque massif présente un fragment caractéristique (la fragmentation est identique à celle du spectre de masse de **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>**). En plus du massif comportant le pic de l'ion moléculaire, les massifs correspondants à la fragmentation typique par réaction de rétro-*Bingel* (perte d'un malonate avec deux C<sub>60</sub>) et d'hydrolyse suivie d'une décarboxylation sont observables (perte d'un demi-malonate avec un C<sub>60</sub>) (Figure 4.22).

Dans chaque massif, la fragmentation des diéthyles malonates par le même chemin est observée: réaction de rétro-*Bingel* et hydrolyse suivie d'une décarboxylation. La Figure 4.23, montre un zoom sur le massif de l'ion moléculaire. Ainsi, la largeur des massifs s'explique par cet ensemble de fragmentation. Les fragments obtenus par rétro-*Bingel* sont clairement identifiables. La même analyse peut être menée pour la fragmentation par décarboxylation des diéthyles malonates.

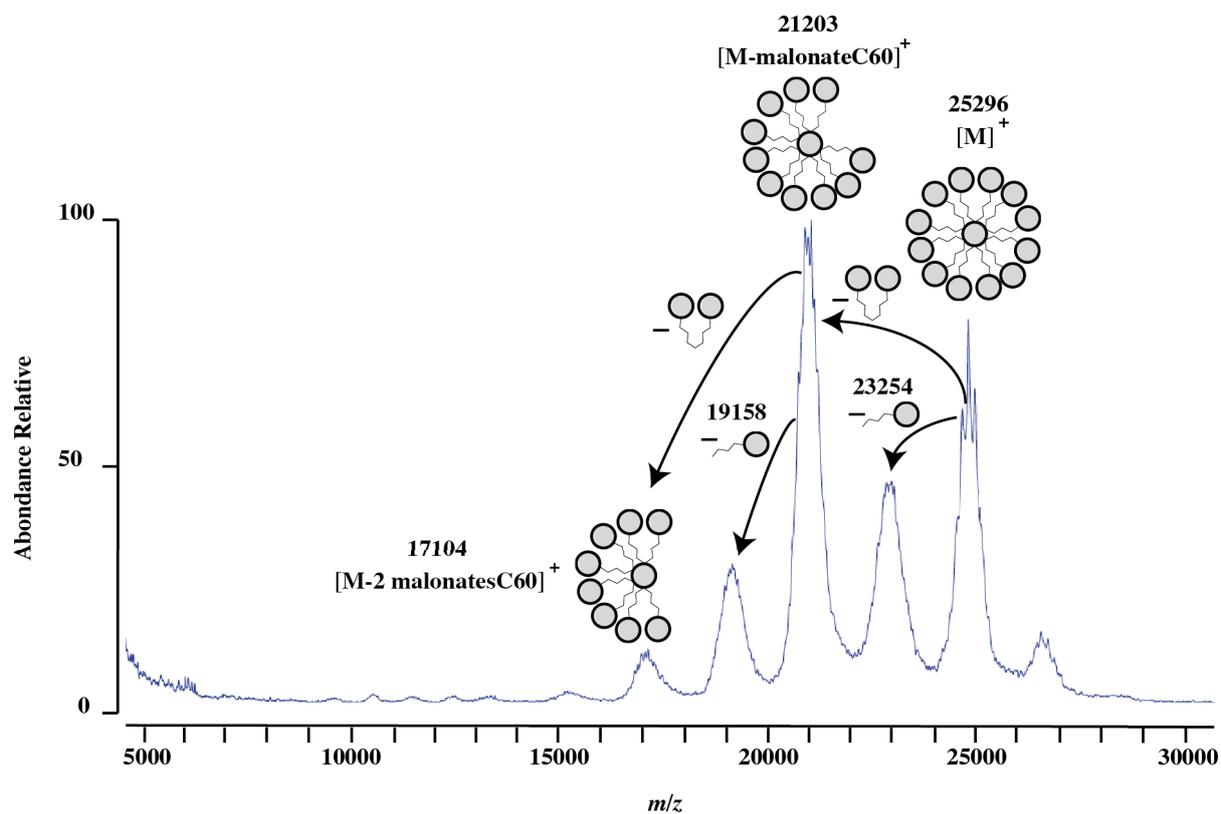


Figure 4.22: Spectre de masse (MALDI-TOF) de **MegaC<sub>60</sub>ethyl**.

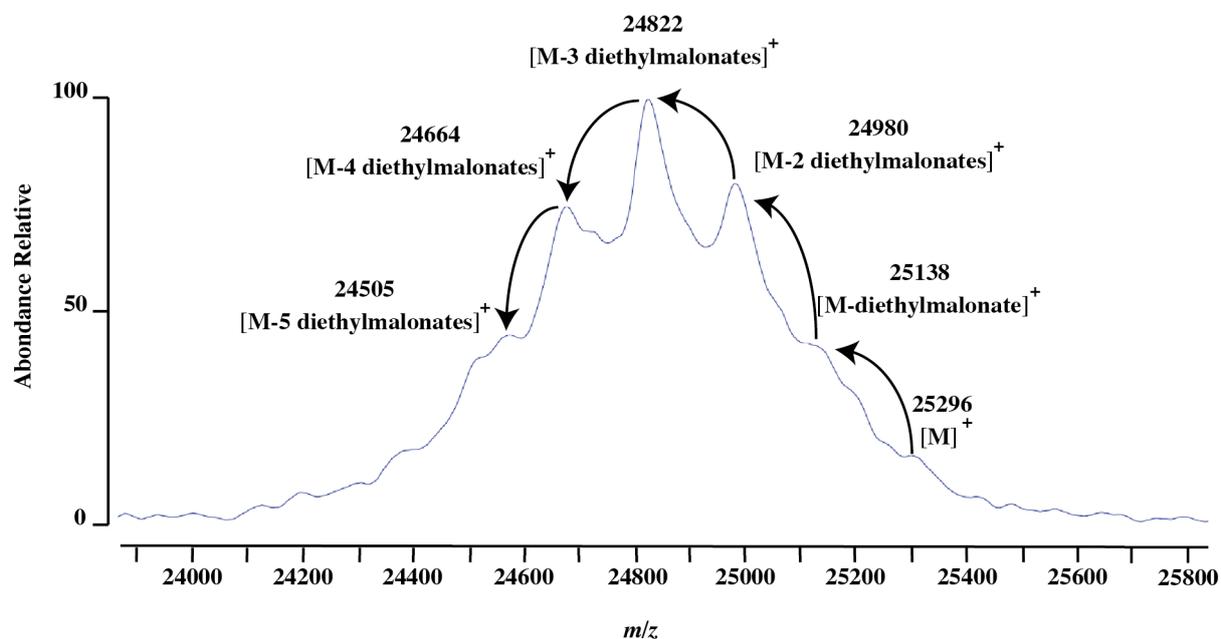


Figure 4.23: Zoom du pic de l'ion moléculaire de **MegaC<sub>60</sub>ethyl**. La fragmentation par rétro-Bingel est représentée.  
Remarque: la fragmentation par décarboxylation suivie par d'une hydrolyse est observable aussi.

Après avoir validé notre composé modèle comme plateforme offrant 120 groupements fonctionnels périphériques, notre attention s'est tournée vers la conception d'une molécule à 120 mannoses.

### III. 2. Approche dendritique ultra rapide pour incorporer 120 sucres à partir de précurseurs $C_{60}$ hexa-adduits.

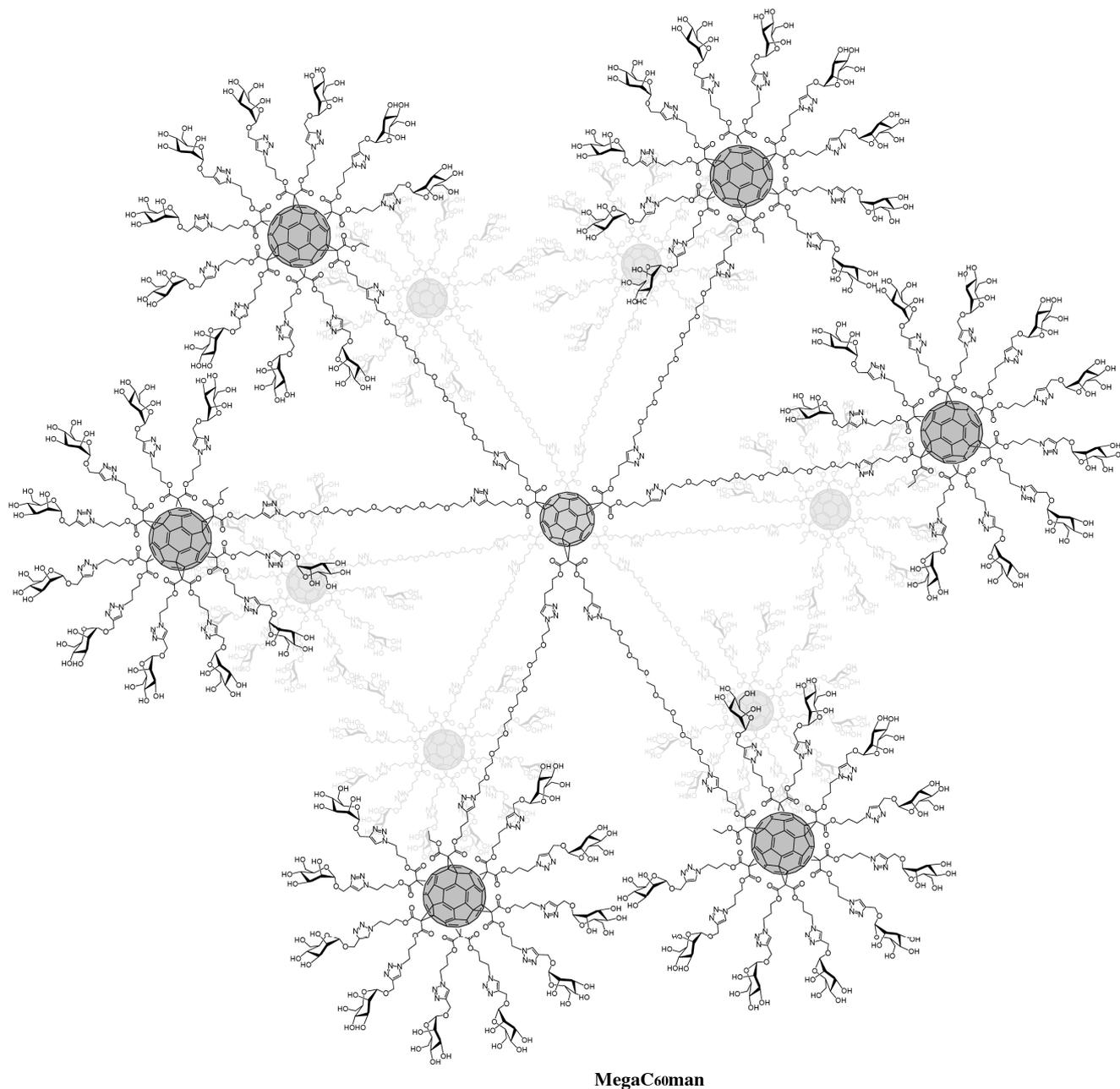


Figure 4.24: Structure du composé cible comportant théoriquement 120 mannoses.

En gardant la même voie de synthèse, avec une légère modification de l'échafaudage, la conception d'une molécule à 13 C<sub>60</sub> contenant 120 mannoses a été envisageable (Figure 4.24). La taille de la chaîne éthylène glycol a été augmentée pour éviter un encombrement stérique empêchant la totale réaction de la sphère centrale.

La synthèse débute par la formation du mono-adduit **21**, en faisant réagir le malonate **20** en présence de C<sub>60</sub> dans les conditions de *Bingel* (Figure 4.25).

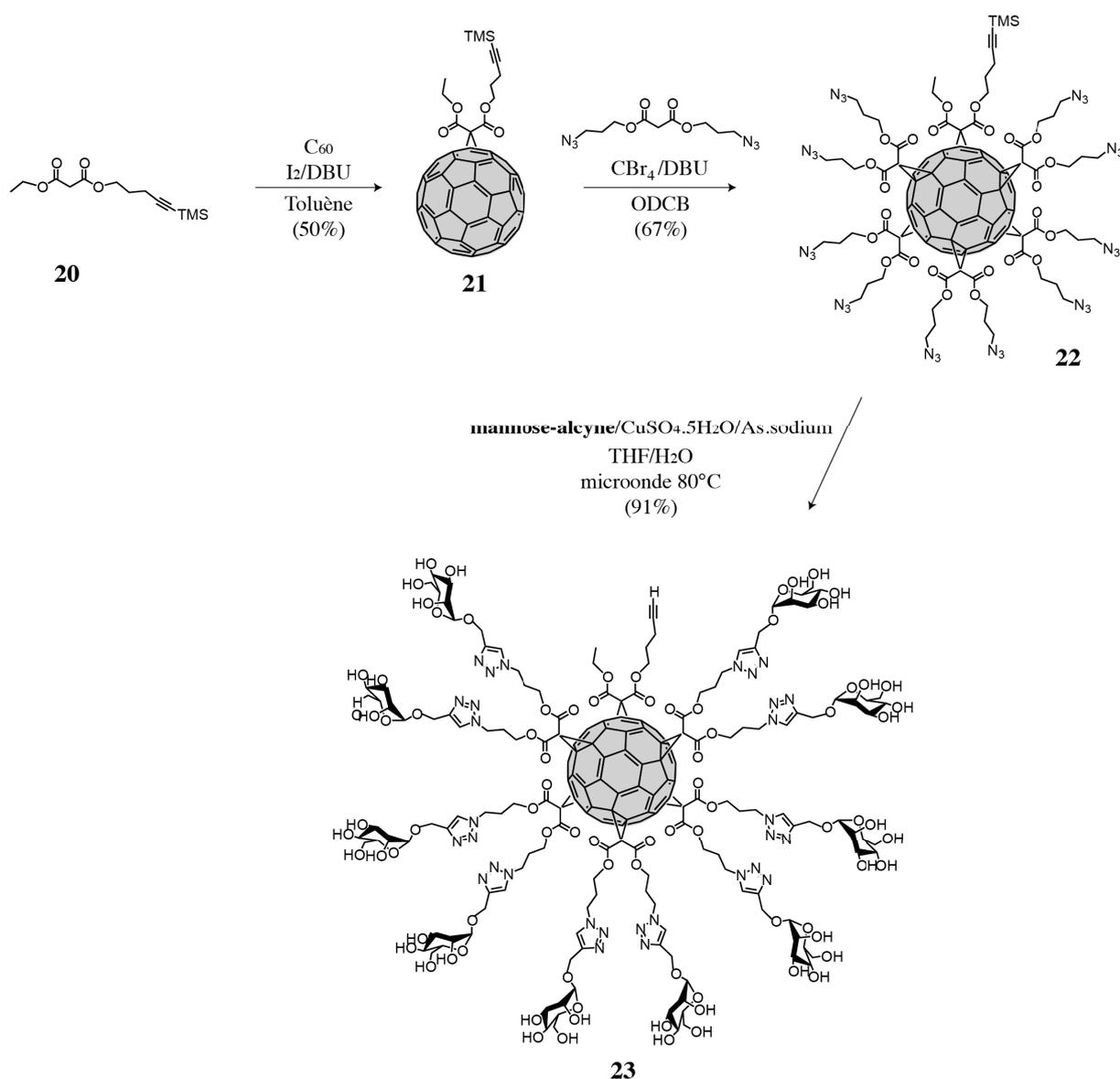


Figure 4.25: Synthèse du précurseur **23**.

La sphère de carbone est complétée avec le malonate diazoture pour donner le dérivé **22**, relativement instable. Cet hexa-adduit est directement mis en réaction avec le sucre **mannose-alkyne**<sup>14</sup> pour produire le composé **23**. L'analyse de ce produit s'est révélée difficile. Les signaux RMN sont larges mais indiquent malgré tout la formation des cycles triazoles.

L'identité du composé a été confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Comme observé précédemment dans ce chapitre, l'ion moléculaire avec un atome de sodium est associé à un ensemble de fragments spécifiques (*retro-Bingel* et hydrolyse, suivie d'une décarboxylation). De façon étonnante, le groupement TMS semble avoir été enlevé durant la *work up* de la manipulation (précipitation suivie de lavages extensifs au méthanol, pour enlever l'excès de **mannose-alcyne**). En effet, ni en RMN, ni en spectrométrie de masse le groupement TMS n'a été détecté.

La prochaine étape a été d'introduire l'espaceur éthylène glycol **24**<sup>29</sup> sur le composé **23** (Figure 4.26). En mettant un large excès de diazoture, le monomère **25** a été formé préférentiellement.

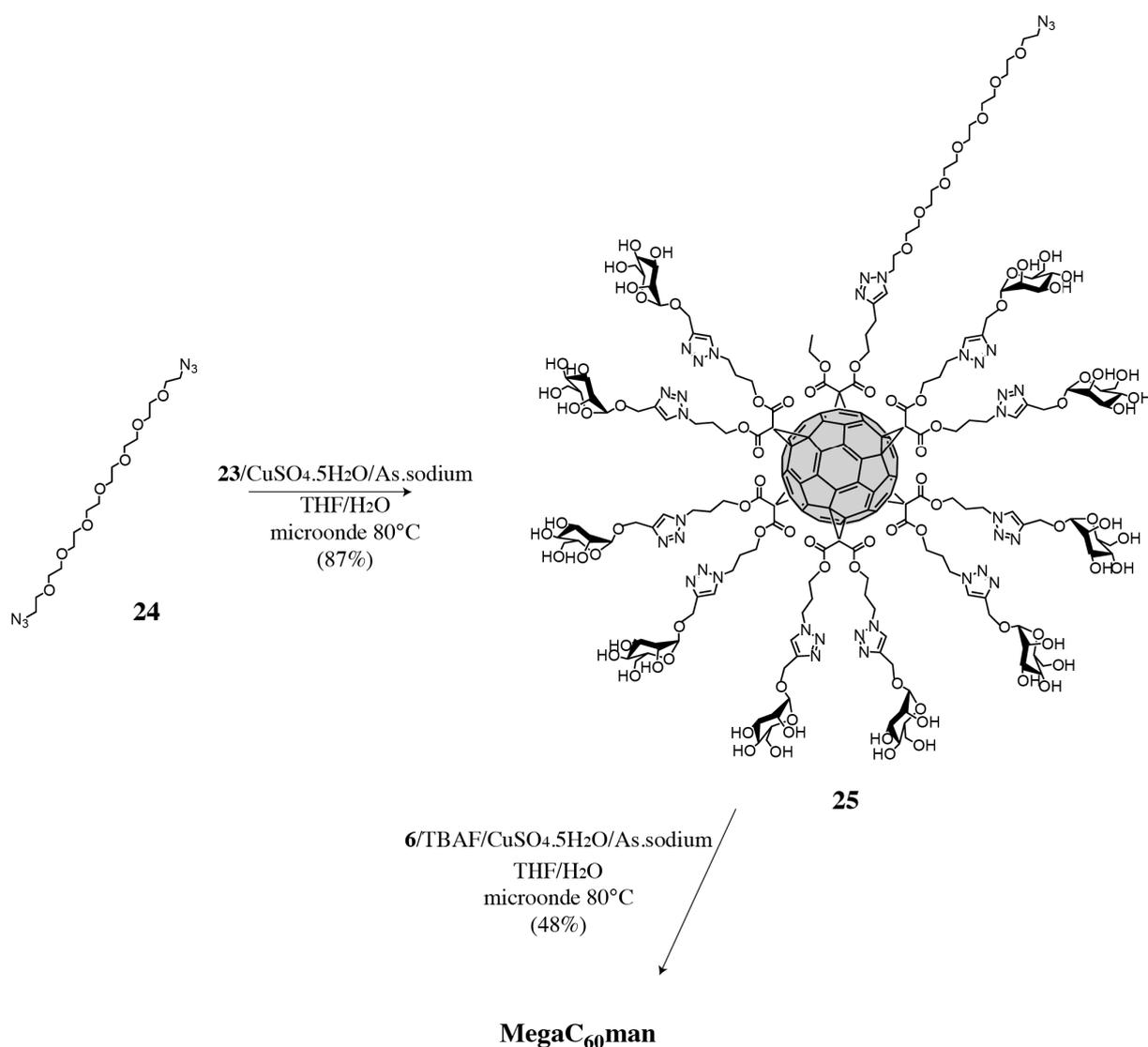


Figure 4.26: Synthèse de **MegaC<sub>60</sub>man**.

Le produit hexa-adduit avec un azoture présente une relative instabilité. Ce composé a donc été rapidement mis en réaction avec l'hexa-adduit **6**, présenté en Figure 4.19 pour fournir **MegaC<sub>60</sub>man** avec un rendement de 48%. Ce produit a été purifié par colonne d'exclusion stérique pour éliminer les sels de cuivre et d'ammonium puis par dialyse avec un seuil de coupe de 25000 Dalton. La dialyse a permis d'enlever l'excès de précurseur **25** et conforte l'idée qu'un produit de haut poids moléculaire a été formé. Néanmoins, la monodispersité du produit ne peut pas être garantie. Les mesures RMN montrent de larges signaux, synonymes d'agrégation (Figure 4.27), rendant difficiles des conclusions sur une structure monodisperse.

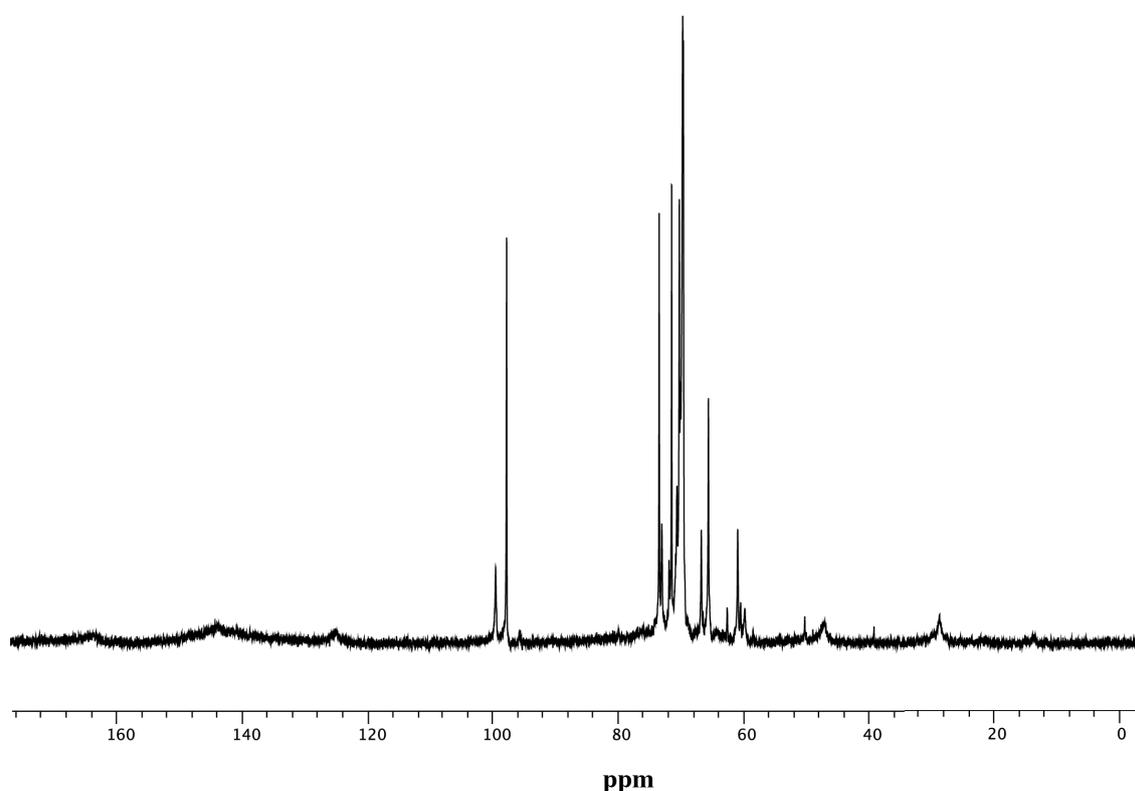


Figure 4.27: Spectre <sup>13</sup>C (100 Mhz, D<sub>2</sub>O) de la molécule **MegaC<sub>60</sub>man**.

Cependant, le profil du spectre UV/visible conserve toujours le profil caractéristique des dérivés de C<sub>60</sub> hexa-adduits (Figure 4.28). Le produit n'a pas pu être identifié par spectrométrie de masse à cause de fragmentations importantes. Des essais d'analyse par HPLC-SEC n'ont malheureusement rien donné, à cause probablement des phénomènes d'agrégation.

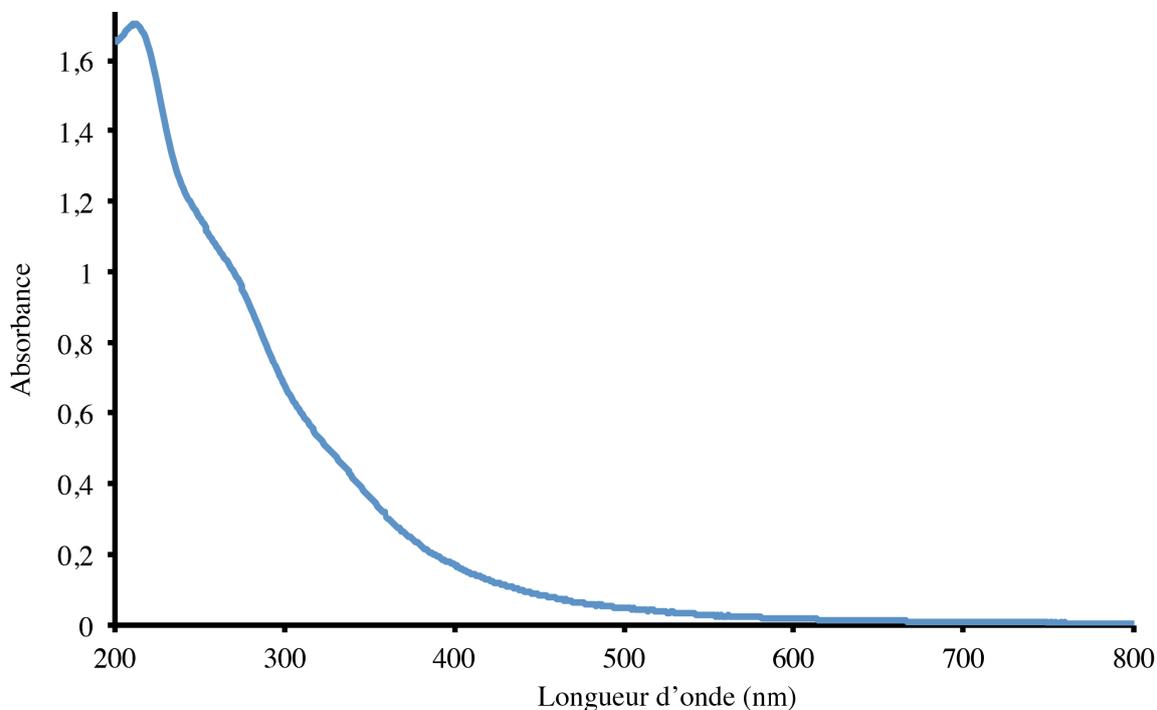


Figure 4.28: Spectre UV/visible de **MegaC<sub>60</sub>man** réalisé dans l'eau.

Pour voir si effectivement **MegaC<sub>60</sub>man** s'agglomère, des clichés de microscopie électronique à transmission ont été réalisés (Figure 4.29). Ceux-ci montrent de longs agrégats de plusieurs centaines de nanomètres, pouvant être dû à la coloration des grilles de carbone par l'acétate d'uranyle. Un zoom sur ces agrégats montre la présence de petits objets sphériques de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres. Ces images confirment donc la formation d'agrégats. De plus, les plus petites particules observables pourraient correspondre à des molécules uniques.

L'analyse DDL corrobore ces observations, avec l'observation d'agrégats dont le diamètre est estimé à 255 nm de diamètre environ (Figure 4.30).

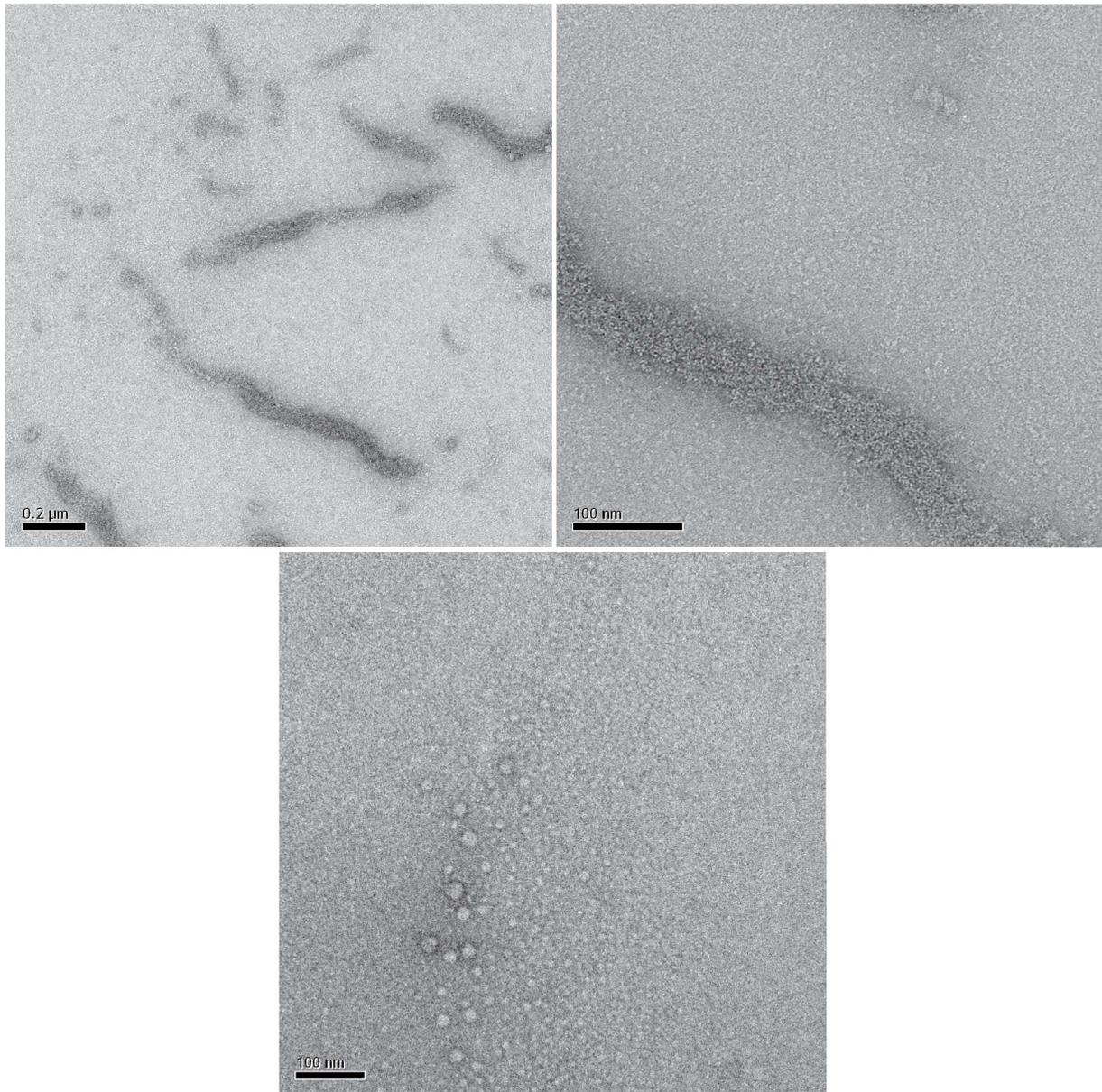


Figure 4.29: Images de MET de **MegaC<sub>60</sub>man** dissout dans l'eau (0,1 mg/mL).

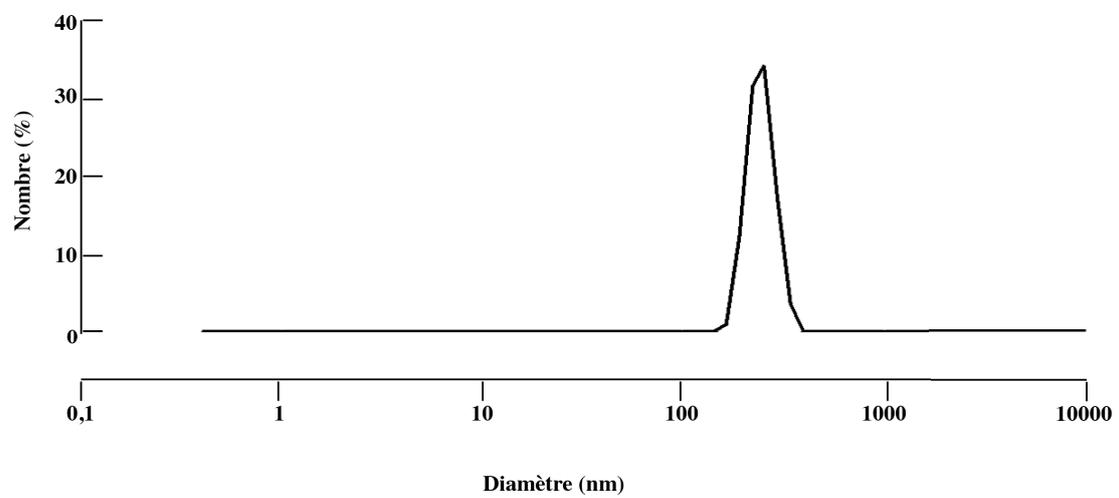


Figure 4.30: Profil DDL de **MegaC<sub>60</sub>man** dans l'eau à 0,1 mg/mL.

Un essai préliminaire d'inhibition d'hémagglutination a été réalisé envers la lectine FimH (Tableau 4.2), une lectine monovalente sélective du mannose. Malgré la fonctionnalisation originale des mannoses, ceux-ci gardent une activité biologique intéressante envers cette lectine. L'effet multivalent du composé sera testé envers la ConA (lectine multivalente commerciale, sélective du mannose) par l'équipe du Dr Evelyne Schaeffer. Dans le même temps, l'équipe du Dr Schaeffer teste ce composé en temps qu'anti-inflammatoire.

Ligand	Mannose-alcyne	MegaC <sub>60</sub> man
Titre d'inhibition (μM)	395	1,5

Tableau 4.2: Test d'inhibition d'hémagglutination réalisé avec la lectine FimH.

Pour conclure, cette partie a montré la possibilité d'utiliser des C<sub>60</sub> hexa-adduits comme précurseur à la construction de dendrimères offrant dès la première génération 120 groupements fonctionnels périphériques.

En comparaison à l'approche supramoléculaire développée en partie II de ce chapitre, un effort de synthèse supplémentaire est nécessaire. Cependant, cette approche propose un positionnement des sucres dans l'espace différent.

## IV. Conclusion

Ce chapitre a présenté deux approches pour augmenter de façon drastique la multivalence intrinsèque que proposent les dérivés de C<sub>60</sub> hexa-adduits.

L'approche supramoléculaire, par la formation de micelles, a permis de créer des objets présentant une quantité conséquente de sucres en un point de l'espace.

L'approche covalente a permis d'offrir une plateforme dendritique offrant 120 groupements fonctionnels d'une manière expéditive.

Globalement toutes les constructions qui ont été présentées jusqu'ici dans ce manuscrit sont basées sur une méthodologie de post-fonctionnalisation permettant d'incorporer un ou deux groupements fonctionnels par *click*. La régiosélectivité de ces fonctionnalisations reste limitée.

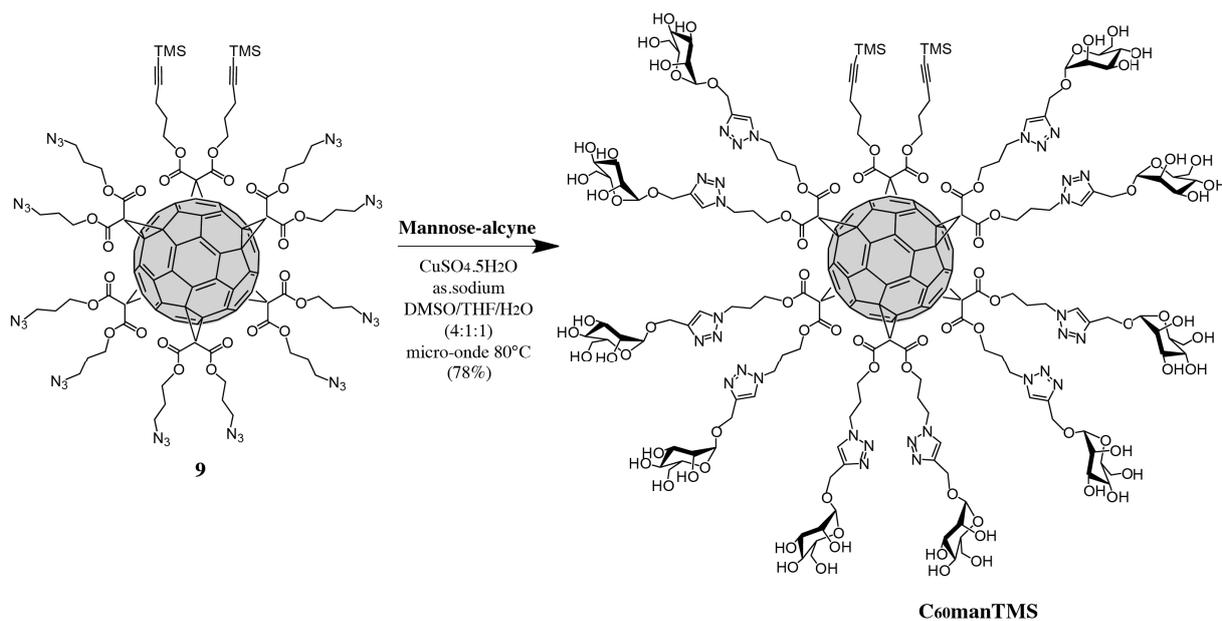
Pour augmenter la puissance de notre méthodologie, le développement de nouveaux précurseurs multifonctionnels régiospécifiques semble être un objectif majeur. C'est dans ce

but que de nouveaux dérivés de C<sub>60</sub> multi-adduits régiospécifiques ont été développés dans le chapitre 5 de cette thèse. Ces composés apportent des éléments de réponses quant à la possibilité de produire des dérivés comportant potentiellement plus de deux groupes fonctionnalisables, de manière régiosélective.

## V. Partie expérimentale

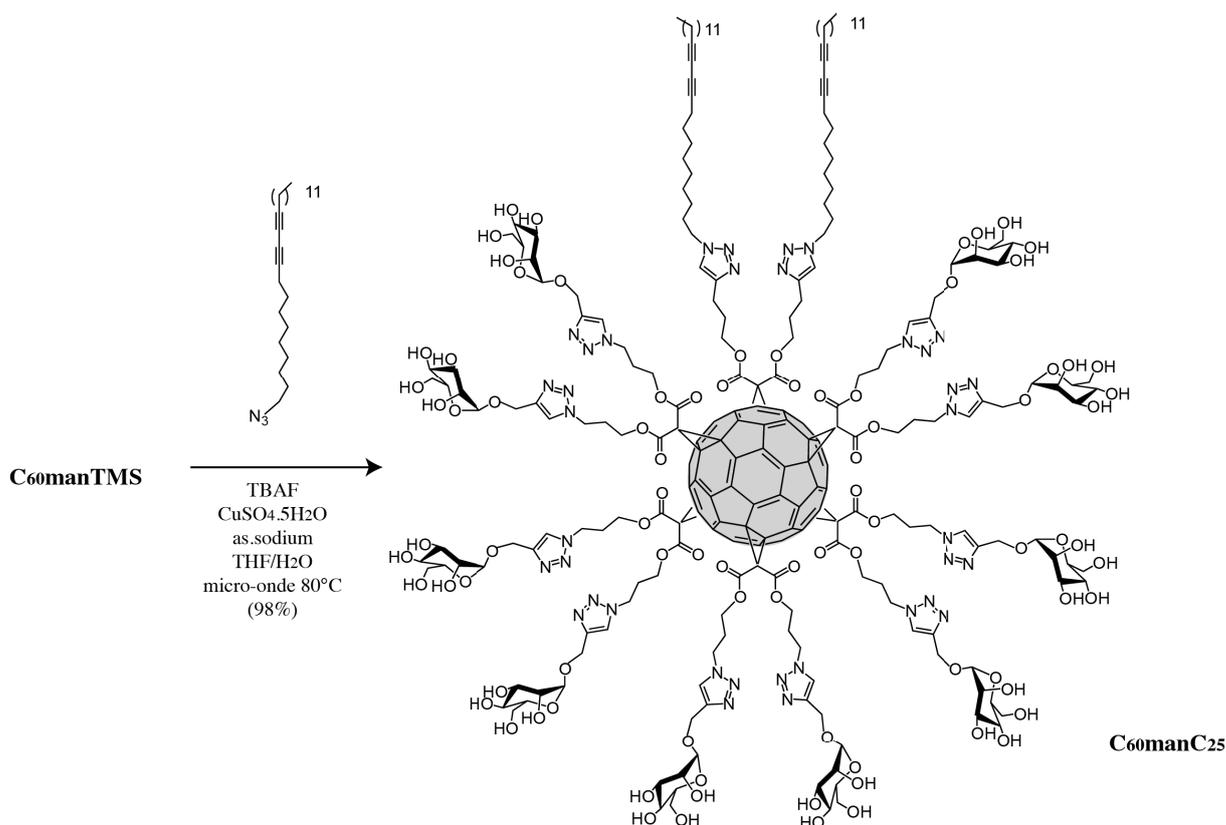
### Synthesis.

**General:** Reagents and solvents were purchased as reagent grade and used without further purification. Compounds **6**<sup>30</sup>, **9**<sup>30</sup>, **24**<sup>29</sup> and **mannose-alkyne**<sup>14</sup> were prepared according to previously reported procedure. All reactions were performed in standard glassware under an inert Ar or N<sub>2</sub> atmosphere. Evaporation and concentration were done at water aspirator pressure and drying in vacuo at 10<sup>-2</sup> Torr. Column chromatography: silica gel 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm) was purchased from E. Merck. Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on glass sheets coated with silica gel 60 F<sub>254</sub> purchased from E. Merck, visualization by UV light. IR spectra (cm<sup>-1</sup>) were measured on an ATI Mattson Genesis Series FTIR instrument. NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 or AC 400 with solvent peaks as reference. MALDI-MS mass spectra of glycofullerenes were recorded in University of Mons (UMH, Mass Spectrometry Research Group - CISM) using a Waters QToF Premier mass spectrometer equipped with a nitrogen laser, operating at 337 nm with a maximum output of 500 J.m<sup>-2</sup> delivered to the sample in 4 ns pulses at 20 Hz repeating rate. Time-of-flight mass analyses were performed in the reflectron mode at a resolution of about 10,000. All the samples were analyzed using dihydroxybenzoic acid (DHB), that matrix was prepared as 20 mg/mL solution in acetone. The matrix solution (1 μL) was applied to a stainless steel target and air dried. Samples were dissolved in water to obtain 1 mg/mL solutions. 1 μL aliquots of those solutions were applied onto the target area already bearing the matrix crystals, and air-dried. For the recording of the single-stage MS spectra, the quadrupole (rf-only mode) was set to pass all the ions of the distribution, and they were transmitted into the pusher region of the time-of-flight analyzer where they were mass analyzed with 1 s integration time. Data were acquired in continuum mode until acceptable averaged data were obtained.

Preparation of compound C<sub>60</sub>manTMS

A mixture of **9** (492 mg, 0.20 mmol), **mannose-alkyne** (528 mg, 2.42 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (3.2 mg, 0.02 mmol) and sodium ascorbate (12 mg, 0.06 mmol) in THF/DMSO/H<sub>2</sub>O (20 mL, 4:1:1) was vigorously stirred, at 80°C, under microwave irradiation, in a sealed tube. After 1 hour, the mixture is concentrated. A minimal amount of water is added, followed by precipitation with methanol. The precipitate is extensively washed with methanol. A Sephadex<sup>TM</sup> G-25 column (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) gave **C<sub>60</sub>manTMS** (658 mg, 71%). Brown-orange glassy solid. IR (neat): 3306 (OH), 1738 (C=O) cm<sup>-1</sup>. UV/Vis (H<sub>2</sub>O): 214 (138500), 246 (sh, 77300), 270 (61300), 323 (sh, 33900), 343 (sh, 23400). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): 8.00 (m), 4.92 (m), 4.58 (m), 3.89-3.61 (m), 2.81 (m), 2.25 (m), 0.12 (s). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): 165.6-162.3, 148.6-144.6, 144.6-142.8, 142.8-138.8, 126.7-123.7, 102.5, 99.4, 82.9, 72.8, 70.5, 70.0, 69.4-69.0, 66.6, 65.3-63.8, 60.8, 60.3, 59.3, 48.4-44.7, 30.8-26.6, 14.9, 0.0. MS (MALDI-TOF): 4645.4 (31%, [M+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>214</sub>H<sub>230</sub>O<sub>84</sub>N<sub>30</sub>Si<sub>2</sub>Na: 4645.4), 4572.4 (58%, [M-TMS+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>211</sub>H<sub>221</sub>O<sub>84</sub>N<sub>30</sub>SiNa: 4572.2), 4500.3 (80%, [M-2 TMS +Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>208</sub>H<sub>212</sub>O<sub>84</sub>N<sub>30</sub>Na: 4499.0), 4300.0 (28%, [M-1/2 malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>201</sub>H<sub>210</sub>O<sub>76</sub>N<sub>27</sub>Si<sub>2</sub>Na: 4299.1), 4227.2 (38%, [M-TMS-1/2 malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>198</sub>H<sub>201</sub>O<sub>76</sub>N<sub>27</sub>SiNa: 4225.9), 4155.2 (49%, [M-2 TMS-1/2 malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>195</sub>H<sub>193</sub>O<sub>76</sub>N<sub>27</sub>Na: 4153.7), 3940.2 (45%, [M- malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>187</sub>H<sub>190</sub>O<sub>68</sub>N<sub>24</sub>Si<sub>2</sub>Na: 3940.8), 3868.1 (79%, [M-TMS-malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>184</sub>H<sub>181</sub>O<sub>68</sub>N<sub>24</sub>SiNa: 3867.6), 3796.1 (100%, [M-2 TMS- malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>181</sub>H<sub>172</sub>O<sub>68</sub>N<sub>24</sub>Na: 3794.4), 3595.0 (32%, [M-1 malonate -1/2 malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for

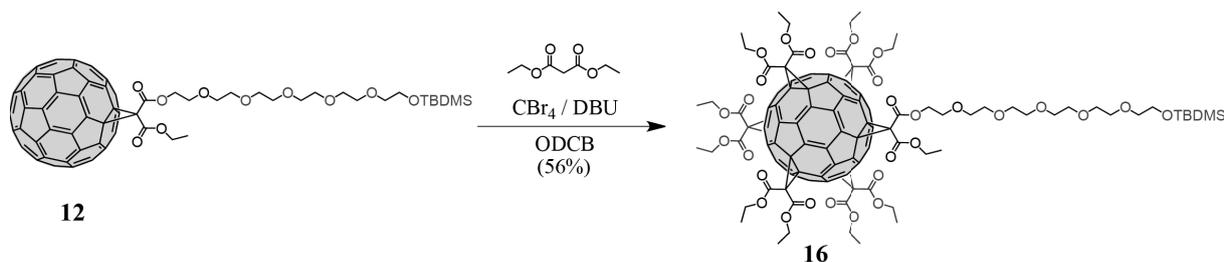


Preparation of compound C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>

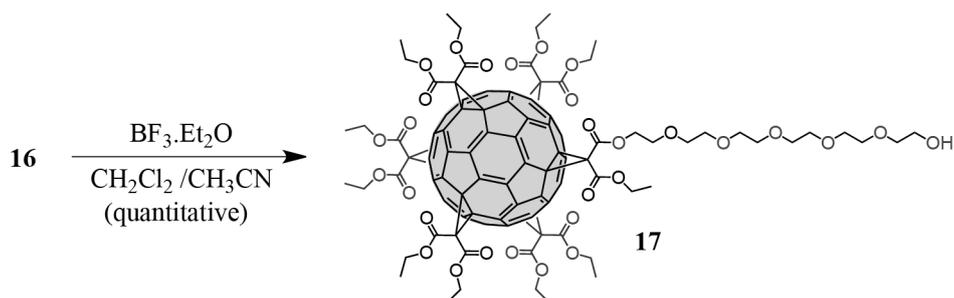
A 1.0 M TBAF solution in THF (0.1 mL, 0.1 mmol) was added to a vigorously stirred mixture of **C<sub>60</sub>manTMS** (198 mg, 0.043 mmol), **azide-alkyl chain** (50 mg, 0.130 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 mg, 0.006 mmol) and sodium ascorbate (3 mg, 0.018 mmol) in THF/H<sub>2</sub>O (2.5 mL, 1:1.5), at 80°C, under microwave irradiation, in a sealed tube. After 1 hour, the mixture is concentrated. A minimal amount of water is added, followed by precipitation with acetone. The precipitate is extensively washed with acetone then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A Sephadex™ G-75 column (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) gave **C<sub>60</sub>manC<sub>25</sub>** (220 mg, 98%). Brown-orange glassy solid. IR (neat): 3327 (OH), 1738 (C=O) cm<sup>-1</sup>. UV/Vis (H<sub>2</sub>O): 218 (49500), 244 (sh, 34600), 271 (28500), 318 (sh, 19000), 342 (sh, 13800). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): 8.03 (m), 5.01 (m), 4.13-3.40 (m), 2.19 (m), 1.29 (m), 0.91 (m). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): 163.2 (broad), 146.7 (broad), 143.7 (broad), 124.9 (broad), 99.3 (broad), 97.7, 95.6, 73.4, 71.4, 70.2, 69.6, 65.6, 62.6, 60.9, 58.5, 47.0 (broad), 32.2, 29.8 (broad), 22.8, 19.3, 14.1. MS (MALDI-TOF): 5272.9 (24%, [M+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>258</sub>H<sub>300</sub>O<sub>84</sub>N<sub>36</sub>Na: 5272.3), 4927.9 (55%, [M-1/2 sugar malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>245</sub>H<sub>280</sub>O<sub>76</sub>N<sub>33</sub>Na: 4926.0), 4567.8 (58%, [M-sugar malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>231</sub>H<sub>260</sub>O<sub>68</sub>N<sub>30</sub>Na: 4567.7), 4221.7 (100%, [M-sugar malonate-1/2 sugar malonate+Na]<sup>+</sup>, calcd

for  $C_{218}H_{240}O_{60}N_{27}Na$ : 4221.4), 3877.5 (56%,  $[M-2 \text{ sugar malonates}+Na]^+$ , calcd for  $C_{205}H_{220}O_{52}N_{24}Na$ : 3875.0).

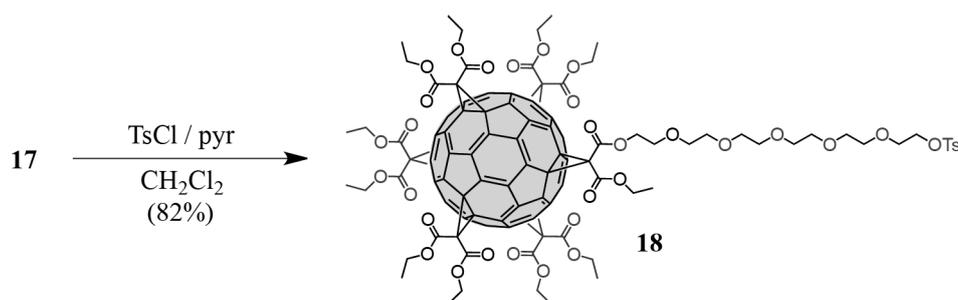
### Preparation of compound 16



DBU (0.7 mL, 4.67 mmol) was added to a stirred solution of **12** (275 mg, 0.24 mmol),  $CBr_4$  (7.42 g, 22.4 mmol) and diethyl malonate (391 mg, 2.44 mmol) in ODCB (45 mL) at room temperature. The resulting solution was stirred for 72 h, then filtered through a short plug of  $SiO_2$  (toluene/AcOEt 1:1) and concentrated. Column chromatography ( $SiO_2$ , toluene/AcOEt 8:2) gave **16** (255 mg, 56%). Orange glassy product. IR (neat) 1742 (C=O). UV/Vis ( $CH_2Cl_2$ ): 237 (98800), 275 (68000), 338 (sh, 24400).  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 4.41 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 4.33 (q,  $J = 7$  Hz, 22H), 3.76 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 3.65 (m, 18H), 3.55 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 1.39 (t,  $J = 7$  Hz, 3H), 1.33 (t,  $J = 7$  Hz, 30H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 163.8 (several peaks), 145.8 (several peaks), 141.1 (several peaks), 72.7, 70.7 (two peaks), 70.6, 69.1 (two peaks), 68.7, 65.8, 63.1, 63.0, 62.9, 62.7, 62.6, 45.4, 45.2, 42.5, 26.0, 18.4, 14.1, -5.2. MS (MALDI-TOF): 2041.5 (30%,  $[M+Na]^+$ , calcd for  $C_{118}H_{94}O_{30}SiNa$ : 2041.6), 2018.5 (100%,  $[M]^+$ , calcd for  $C_{118}H_{94}O_{30}Si$ : 2018.6), 1973.4 (35%,  $[M-OEt]^+$ , calcd for  $C_{116}H_{89}O_{29}Si$ : 1973.5), 1927.5 (5%,  $[M-TBDMS+Na]^+$ , calcd for  $C_{112}H_{80}O_{30}Na$ : 1927.5), 1904.4 (25%,  $[M-TBDMS]^+$ , calcd for  $C_{112}H_{80}O_{30}$ : 1904.5), 1860.3 (4%,  $[M-C(CO_2Et)_2]^+$ , calcd for  $C_{111}H_{84}O_{26}Si$ : 1860.5), 1623.2 (8%,  $[M-OCH_2(CH_2OCH_2)_5CH_2OTBDMS]^+$ , calcd for  $C_{100}H_{554}O_{23}$ : 1623.3).

**Preparation of compound 17**

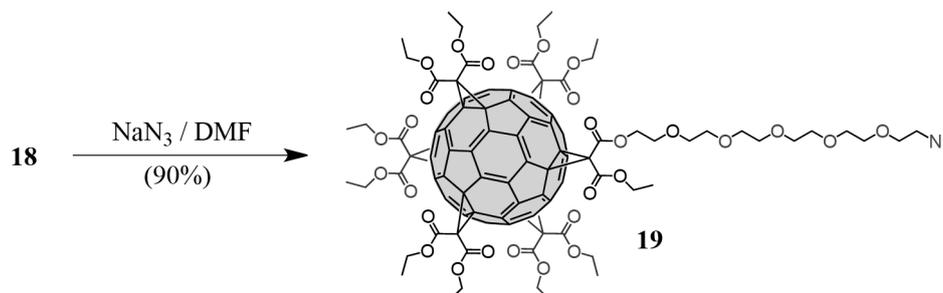
BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (0.1 mL, 0.81 mmol) was added to a solution of **16** (131 mg, 64 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>CN (2:1, 3 mL) at room temperature. After 20 min, a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (5 mL) was slowly added to the reaction mixture. The aqueous layer was extracted with CHCl<sub>3</sub> (3x). The combined organic layers were washed with water, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated to give **17** (124 mg, quantitative). Orange glassy product. IR (neat): 3474 (OH), 1738 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 244 (98000), 270 (71200), 280 (72700), 319 (sh, 42200), 336 (sh, 32500). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.39 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 4.33 (q, *J* = 7 Hz, 22H), 3.75-3.55 (m, 22H), 1.39 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 1.33 (t, *J* = 7 Hz, 30H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.8 (several peaks), 145.8 (several peaks), 141.1 (several peaks), 72.5, 70.7 (two peaks), 70.6, 70.5 (two peaks), 70.3 (two peaks), 69.1 (two peaks), 69.0, 68.6, 65.8, 63.1, 63.0 (two peaks), 62.9, 62.8, 62.7 (two peaks), 62.6, 62.5, 61.7, 45.4, 45.2, 42.5, 14.1.

**Preparation of compound 18**

A solution of **17** (261 mg, 137 μmol), pyridine (0.27 mL, 3.35 mmol) and TsCl (582 mg, 3.05 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was stirred at room temperature for 3 h, filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 1:1) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 8:2) gave **18** (230 mg, 82%). Orange glassy product. IR (neat) 1740 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.79 (d, *J* = 7 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 7 Hz, 2H), 4.41 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 4.33 (q, *J* = 7 Hz, 22H), 4.15 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 3.75-3.55 (m, 20H), 2.44 (s, 3H), 1.39 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 1.33 (t, *J* = 7 Hz, 30H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.8 (several peaks), 145.8 (several peaks), 144.8, 141.2 (several peaks), 133.1, 129.9, 128.0, 70.8, 70.7, 70.6, 69.3,

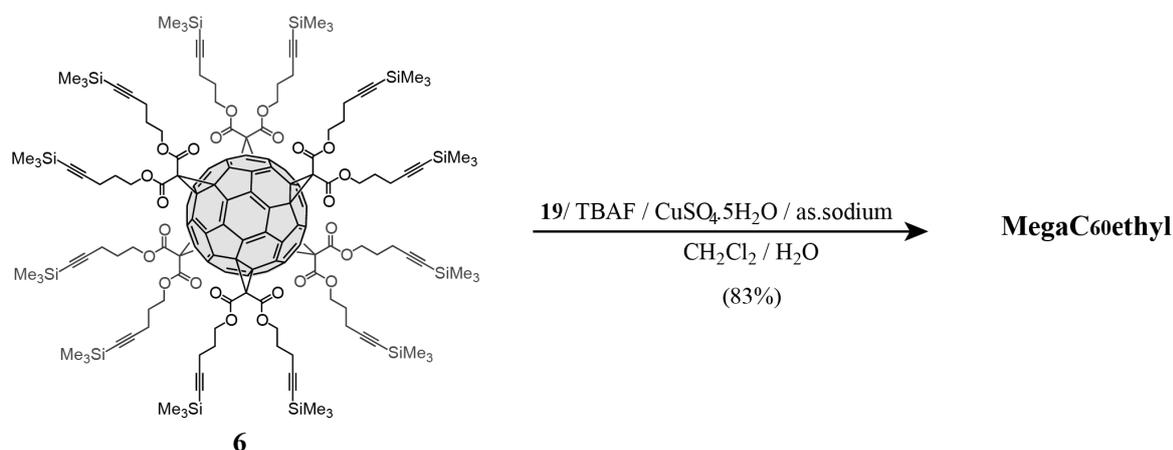
69.2, 69.1, 68.8, 68.7, 68.5, 65.8, 63.1, 63.0 (two peaks), 62.9, 62.8, 62.7, 62.6, 45.5, 45.3, 42.6, 21.7, 14.1.

### Preparation of compound **19**



A mixture of **18** (230 mg, 112  $\mu\text{mol}$ ) and  $\text{NaN}_3$  (110 mg, 1.69 mmol) in DMF (5 mL) was stirred for 2 days, diluted with water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with water (3x), dried ( $\text{MgSO}_4$ ) and concentrated to give **19** (193 mg, 90%) which used in the next step as received. Orange glassy product. IR (neat): 2102 ( $\text{N}_3$ ), 1739 ( $\text{C}=\text{O}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.39 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 4.33 (q,  $J = 7$  Hz, 22H), 3.75-3.5 (m, 20H), 3.38 (t,  $J = 6$  Hz, 2H), 1.37 (t,  $J = 7$  Hz, 3H), 1.33 (t,  $J = 7$  Hz, 30H).

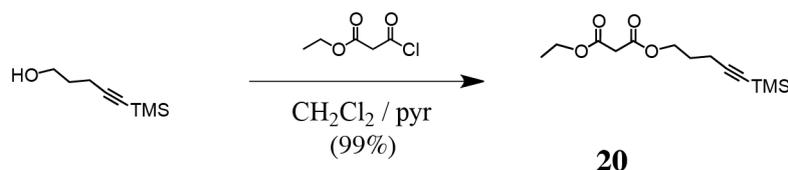
### Preparation of compound **MegaC<sub>60</sub>ethyl**



A 1.0 M TBAF solution in THF (0.1 mL, 0.10 mmol) was added to a vigorously stirred mixture of **19** (190 mg, 98  $\mu\text{mol}$ ), **6** (21 mg, 7  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mg, 3  $\mu\text{mol}$ ) and sodium ascorbate (1 mg, 5  $\mu\text{mol}$ ) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (4 mL, 1:1) at room temperature. After 5 days, the mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic layer was washed with water, dried ( $\text{MgSO}_4$ ) and concentrated. Column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gave **MegaC<sub>60</sub>ethyl** (148 mg, 83%). Orange glassy product. IR (neat) 1737 ( $\text{C}=\text{O}$ ). UV/Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 243 (1288400), 270

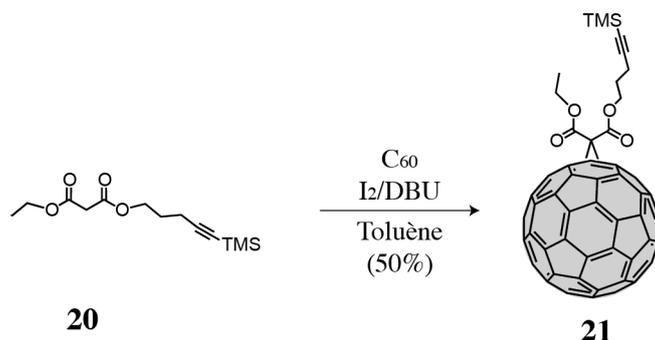
(951700), 280 (961100), 319 (sh, 557400), 336 (sh, 426100). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.48 (s, 12H), 4.43 (t, *J* = 6 Hz, 24H), 4.35 (t, *J* = 6 Hz, 24H), 4.29 (q, *J* = 7 Hz, 264H), 3.83 (broad t, 24H), 3.66 (broad t, 24H), 3.57 (m, 216H), 2.72 (broad t, 24H), 2.06 (broad t, 24H), 1.29 (broad t, *J* = 7 Hz, 396H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.8 (several peaks), 146.2, 145.8 (several peaks), 141.1 (several peaks), 122.1, 70.5, 69.5, 69.1, 69.0, 68.6, 68.4, 66.4, 65.8, 63.1, 63.0, 62.9, 62.7 (two peaks), 62.5, 50.0, 45.4, 45.3, 28.1, 22.1, 14.1. MS (MALDI-TOF): *m/z* = *see text*.

### Preparation of compound **20**



Ethyl malonyl chloride (0.61 mL, 4.8 mmol) was added to a stirred solution of 5-(trimethylsilyl)-1-pentyn-3-ol (2.3 g, 5.80 mmol) and pyridine (1.3 mL, 6.18 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) at 0°C. After 1 h, the mixture was allowed to slowly warm to room temperature (within 1 h), then stirred for 12 h and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:8) yielded **20** (3.69 g, 99%). Colorless oil. IR (neat): 2175 (C≡C), 1733 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.23 (m, 4H), 3.38 (s, 2H), 1.87 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 1.29 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 0.15 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.4, 105.4, 63.9, 61.5, 42.5, 27.5, 16.4, 14.0, 0.0.

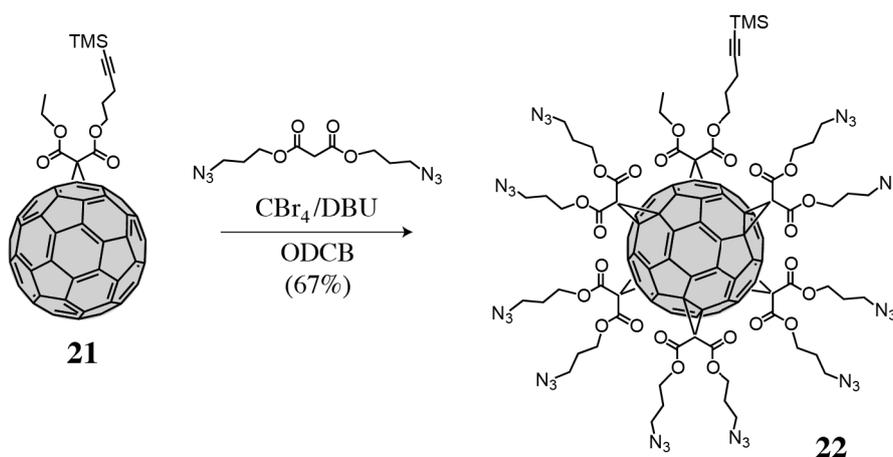
### Preparation of compound **21**



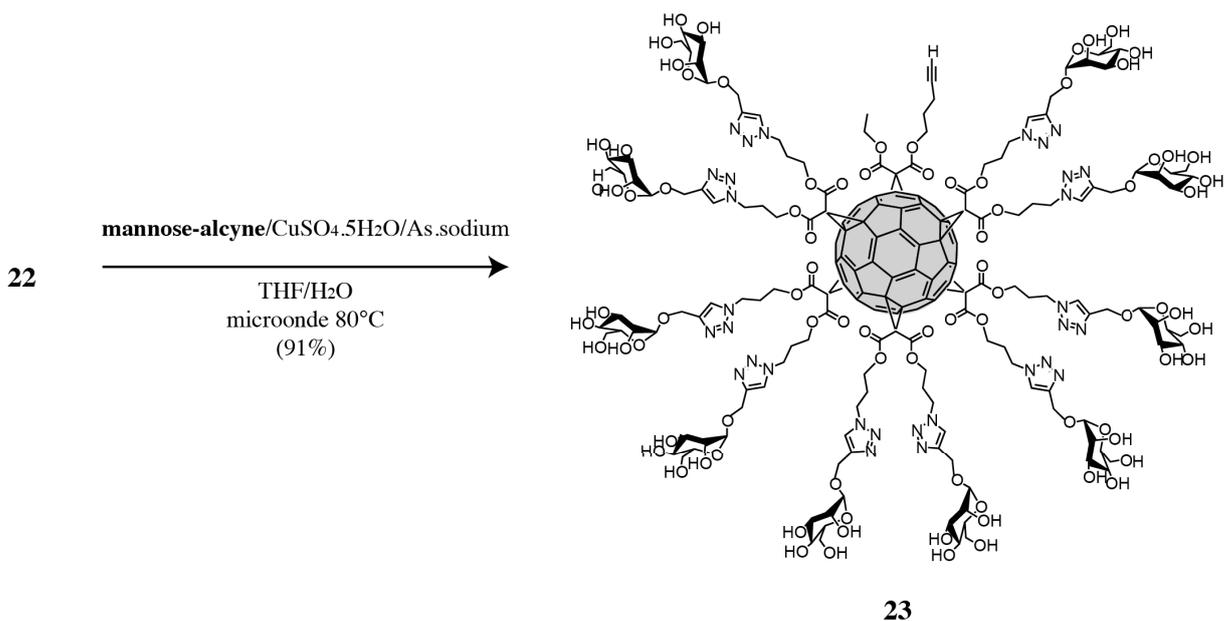
DBU (0.52 mL, 3.48 mmol) was added to a stirred solution of C<sub>60</sub> (1 g, 1.39 mmol), I<sub>2</sub> (528 mg, 2.08 mmol) and **20** (375 mg, 1.39 mmol) in toluene (1 L) at room temperature. The resulting solution was stirred for 1 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (toluene) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/toluene 2:8) gave **21** (1.363 g,

50%). Dark brown solid. IR (neat): 2176 (C≡C) 1747 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 326 (38000). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.59 (m, 4H), 2.46 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.07 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 1.51 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 0.18 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.3, 146.27, 145.9, 145.1, 145.0, 144.9, 144.7, 144.5 (two peaks), 144.4, 143.7, 143.2, 142.8, 142.0, 141.7, 140.7, 139.0, 138.7, 104.9, 85.8, 71.4, 65.6, 63.3, 51.9, 26.7, 16.4, 14.1, 0.0. MS (MALDI-TOF): 988.1 ([M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>73</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Si: 988.1).

### Preparation of compound **22**

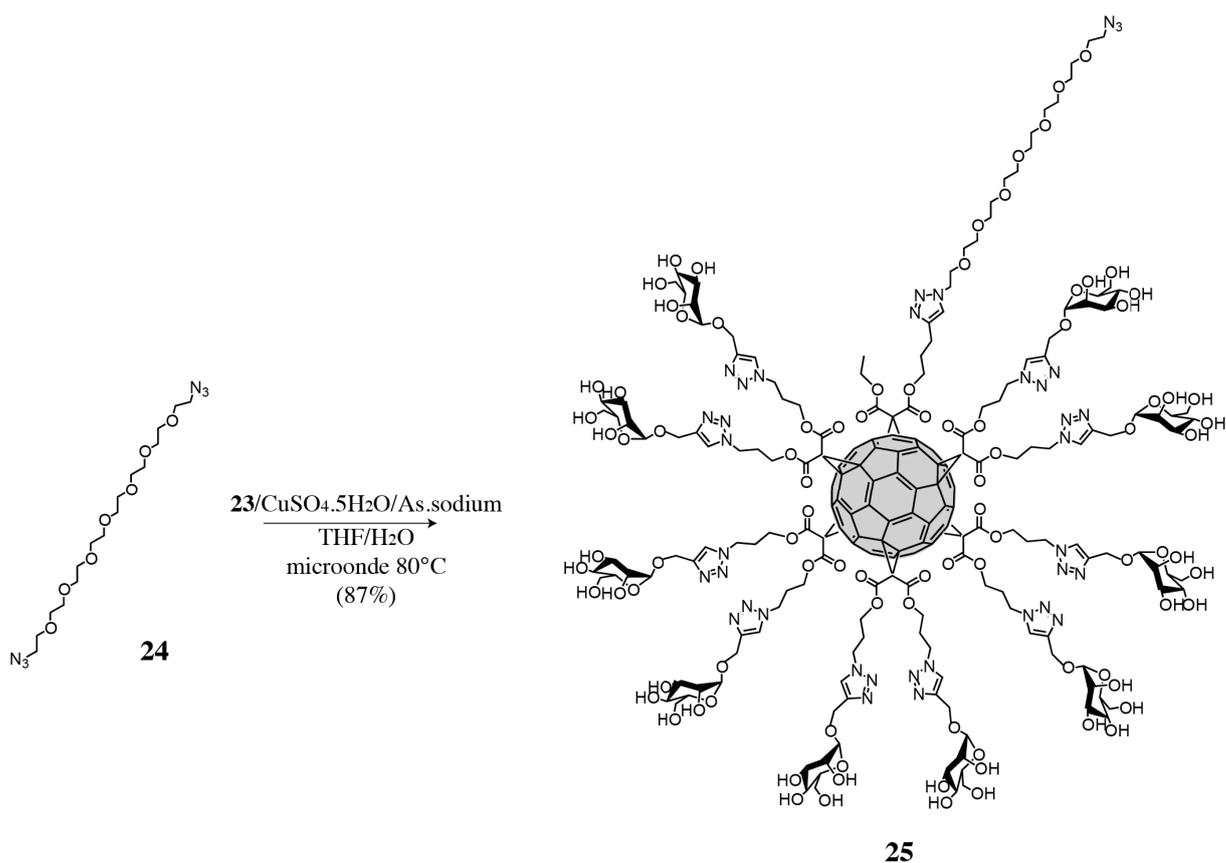


DBU (0.5 mL, 3 mmol) was added to a stirred solution of **21** (140 mg, 0.14 mmol), CBr<sub>4</sub> (4.7 g, 14 mmol) and diazide malonate<sup>25</sup> (459 mg, 1.7 mmol) in ODCB (30 mL) at room temperature. The resulting solution was stirred for 72 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt 2:1) gave **22** (220 mg, 67%). Orange glassy product. IR (neat) 2092 (N<sub>3</sub>), 1742 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.35 (m, 24H), 3.41 (m, 20H), 2.34 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 1.95 (m, 22H), 1.34 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 0.15 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.5 (several peaks), 145.8 (several peaks), 141.1 (several peaks), 105.2, 85.8, 69.2, 69.0, 65.6, 63.9, 63.2, 48.0, 45.5, 45.2, 28.0, 27.5, 16.5, 14.1, 0.1.

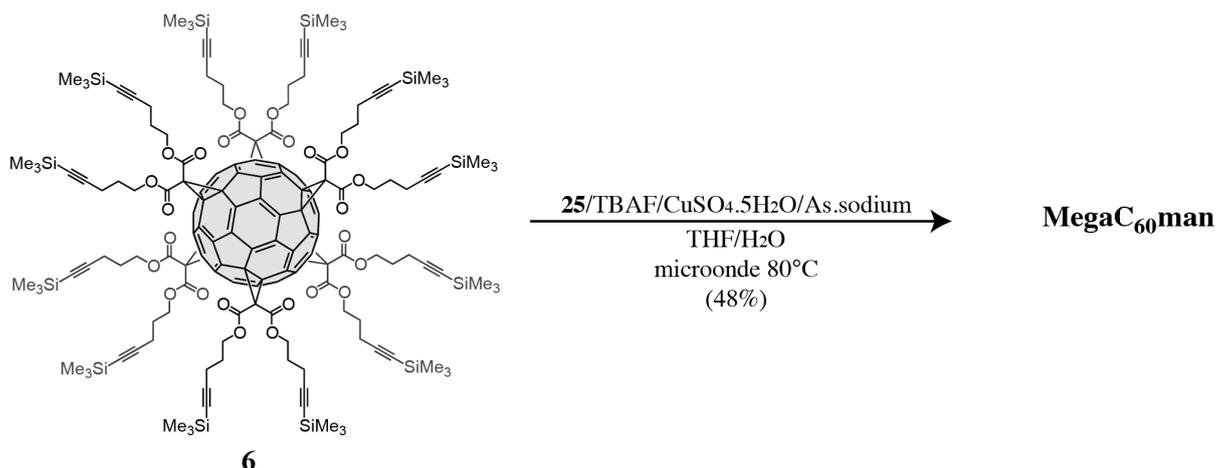
Preparation of compound **23**

A mixture of **22** (367 mg, 157  $\mu\text{mol}$ ), **mannose-alkyne** (412 mg, 1.89 mmol),  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (15 mg, 94  $\mu\text{mol}$ ) and sodium ascorbate (30 mg, 152  $\mu\text{mol}$ ) in THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (7 mL, 1:1) with few drops of DMSO was vigorously stirred, at 80°C, under microwave irradiation, in a sealed tube. After 1 hour, the mixture is concentrated. A minimal amount of water is added, followed by precipitation with methanol. The precipitate is extensively washed with methanol. A Sephadex™ G-50 column ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  9:1) gave **23** (647 mg, 91 %). Brown-orange glassy solid. IR (neat) 3308 (OH), 1738 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ . UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 214 (152500), 247 (sh, 87100), 270 (70200), 323 (sh, 37200), 344 (sh, 15000);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.05 (m), 4.80 (m), 4.43 (m), 3.75 (m), 2.25 (m), 1.16 (m).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  163.8 (broad), 145.6 (broad), 141.2 (broad), 125.1 (broad), 99.6, 73.0, 70.7, 70.1, 66.7, 64.6, 60.9, 58.3, 47.6, 45.6, 38.9, 31.8, 28.7, 13.7. MS (MALDI-TOF): 4465.6 (8%,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{205}\text{H}_{216}\text{O}_{84}\text{N}_{30}\text{Na}$ : 4465.3), 4120.5 (8%,  $[\text{M}-1/2 \text{ malonate}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{192}\text{H}_{197}\text{O}_{76}\text{N}_{27}\text{Na}$ : 4119.2), 3759.4 (34%,  $[\text{M}-1 \text{ malonate}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{178}\text{H}_{177}\text{O}_{68}\text{N}_{24}\text{Na}$ : 3761.1), 3414.2 (26%,  $[\text{M}-1 \text{ malonate}-1/2\text{malonate}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{165}\text{H}_{157}\text{O}_{60}\text{N}_{21}\text{Na}$ : 3415.0), 3054.2 (36%,  $[\text{M}-2 \text{ malonates}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{151}\text{H}_{136}\text{O}_{52}\text{N}_{18}\text{Na}$ : 3056.8), 2708.9 (21%,  $[\text{M}-2 \text{ malonates}-1/2\text{malonate}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{138}\text{H}_{117}\text{O}_{44}\text{N}_{15}\text{Na}$ : 2710.7), 2349.7 (17%,  $[\text{M}-\text{TMS}-3 \text{ malonates}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{124}\text{H}_{97}\text{O}_{36}\text{N}_{12}\text{Na}$ : 2352.6), 2003.6 (8%,  $[\text{M}-3 \text{ malonates}-1/2\text{malonate}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{111}\text{H}_{77}\text{O}_{28}\text{N}_9\text{Na}$ : 2006.5), 1644.4 (6%,  $[\text{M}-4 \text{ malonates}+\text{Na}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{97}\text{H}_{57}\text{O}_{20}\text{N}_6\text{Na}$ : 1648.3).

## Preparation of compound **25**



A mixture of **23** (273 mg, 60  $\mu$ mol), **24** (481 mg, 1.14 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (3 mg, 19  $\mu$ mol) and sodium ascorbate (12 mg, 60  $\mu$ mol) in THF/H<sub>2</sub>O (3.5 mL, 0.5:3) was vigorously stirred, at 80°C, under microwave irradiation, in a sealed tube. After 1 hour, the mixture is concentrated. THF and the major part of water are evaporated. Then the crude mixture is precipitated by addition of a mixture of acetone/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and extensively washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and acetone. A Sephadex<sup>TM</sup> G-50 column (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) gave **25** (254 mg, 87 %). Brown-orange glassy solid. There is probably traces of “di clicked” DS176, which will be removed in the next step. IR (neat) 3324 (OH), 2107 (N<sub>3</sub>), 1738 (C=O) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (H<sub>2</sub>O): 212, 247(sh), 278 (sh), 344 (sh); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.05 (m), 4.80 (m), 4.43 (m), 3.66 (m), 2.25 (m), 1.24 (m). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  163.6 (broad), 146.6 (broad), 143.8 (broad), 125.0 (broad), 99.5, 97.8 73.5, 73.0, 71.5, 70.7, 70.2, 70.1, 69.7, 69.3 66.7, 65.6, 64.2, 60.9, 59.8, 50.3, 49.0, 47.2, 39.2, 28.8, 31.8, 28.7, 21.2, 13.6.

**Preparation of compound MegaC<sub>60</sub>man**

A 1.0 M TBAF in THF (40  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{mol}$ ) is added to a mixture of **25** (254 mg, 52  $\mu\text{mol}$ ), **6** (9.1 mg, 3  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1 mg, 6  $\mu\text{mol}$ ) and sodium ascorbate (3 mg, 15  $\mu\text{mol}$ ) in THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (3.5 mL, 0.5:3). The resulting mixture was vigorously stirred, at 80°C, under microwave irradiation, in a sealed tube. After 2 hours, the mixture is concentrated. The crude mixture is purified by a Sephadex<sup>TM</sup> G-100 column ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  9:1) followed by a dialysis against milli-Q water (MolecularWeightCutOff: 25000) to give **MegaC<sub>60</sub>man** (84 mg, 47 %). Brown-orange glassy solid. IR (neat) 3251 (OH), 1732 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 212, 275 (sh), 344 (sh); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.10 (m), 4.99(m), 3.67 (m), 2.30 (m), 1.28 (m). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  164.2 (broad), 144.2 (broad), 125.4 (broad), 99.5, 97.7, 95.6, 73.4, 73.0, 71.8, 71.4, 70.6, 70.2, 70.0, 69.6, 69.5, 66.7, 65.5, 64.2, 62.6, 60.9, 60.5, 60.4, 59.8, 50.2, 47.2, 39.2, 28.4, 13.5.

**VI. Bibliographie**

- (1) Uhlmann, P.; Harth, E.; Naughton, A. B.; Vasella, A. *Helvetica Chimica Acta* **1994**, *77*, 2335.
- (2) Yashiro, A.; Nishida, Y.; Ohno, M.; Eguchi, S.; Kobayashi, K. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 9031.
- (3) Kato, H.; Yashiro, A.; Mizuno, A.; Nishida, Y.; Kobayashi, K.; Shinohara, H. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 2935.
- (4) Mikata, Y.; Takagi, S.; Tanahashi, M.; Ishii, S.; Obata, M.; Miyamoto, Y.; Wakita, K.; Nishisaka, T.; Hirano, T.; Ito, T.; Hoshino, M.; Ohtsuki, C.; Tanihara, M.; Yano, S. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 3289.
- (5) Tanimoto, S.; Sakai, S.; Matsumura, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chemical Communications* **2008**, 5767.
- (6) Tanimoto, S.; Sakai, S.; Kudo, E.; Okada, S.; Matsumura, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chemistry – An Asian Journal* **2012**, *7*, 911.
- (7) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28*, 321.
- (8) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 555.

- (9) Dondoni, A.; Marra, A. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 1649.
- (10) Enes, R. F.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; El-Agamey, A.; McGarvey, D. J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11873.
- (11) Kato, H.; Böttcher, C.; Hirsch, A. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, *2007*, 2659.
- (12) Isobe, H.; Mashima, H.; Yorimitsu, H.; Nakamura, E. *Organic Letters* **2003**, *5*, 4461.
- (13) Isobe, H.; Cho, K.; Solin, N.; Werz, D. B.; Seeberger, P. H.; Nakamura, E. *Organic Letters* **2007**, *9*, 4611.
- (14) Nierengarten, J.-F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Munoz, A.; Martin, N.; Rojo, J.; Sanchez-Navarro, M.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Buffet, K.; Durka, M.; Vincent, S. P. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 3860.
- (15) Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 5753.
- (16) Cecioni, S.; Oerthel, V.; Iehl, J.; Holler, M.; Goyard, D.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Nierengarten, J.-F.; Vidal, S. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 3252.
- (17) Durka, M.; Buffet, K.; Iehl, J.; Holler, M.; Nierengarten, J.-F.; Vincent, S. P. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 641.
- (18) Durka, M.; Buffet, K.; Iehl, J.; Holler, M.; Nierengarten, J.-F.; Taganna, J.; Bouckaert, J.; Vincent, S. P. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 1321.
- (19) Sánchez-Navarro, M.; Muñoz, A.; Illescas, B. M.; Rojo, J.; Martín, N. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 766.
- (20) Nishida, Y.; Mizuno, A.; Kato, H.; Yashiro, A.; Ohtake, T.; Kobayashi, K. *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 1452.
- (21) Kato, H.; Kaneta, N.; Nii, S.; Kobayashi, K.; Fukui, N.; Shinohara, H.; Nishida, Y. *Chemistry & Biodiversity* **2005**, *2*, 1232.
- (22) Barnard, A.; Smith, D. K. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 6572.
- (23) Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 400.
- (24) Morin, E.; Guenet, J.-M.; Diaz, D. D.; Remy, J.-S.; Wagner, A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 12495.
- (25) Iehl, J.; Pereira de Freitas, R.; Delavaux-Nicot, B.; Nierengarten, J.-F. *Chemical Communications* **2008**, 2450.
- (26) Dehuysen, L. S., E.; Chaloin, O.; Mueller, G.C.; Baati, R.; Wagner A.. *Journal of Medicinal Chemistry* **submitted**.
- (27) Hahn, U.; Vögtle, F.; Nierengarten, J.-F. o. *Polymers* **2012**, *4*, 501.
- (28) Witte, P.; Hörmann, F.; Hirsch, A. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 7423.
- (29) Sekiguchi, H.; Muranaka, K.; Osada, A.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 5732.
- (30) Iehl, J.; Nierengarten, J.-F. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 7306.

*Chapitre 5 :*  
*Synthèses régio-sélectives de dérivés bis*  
*et tris-adjuits de C<sub>60</sub>*



## I. Introduction

Les trois précédents chapitres ont été consacrés à la synthèse de composés dérivés de précurseurs «stars» du laboratoire permettant par post-fonctionnalisation «click» d'obtenir des produits élaborés. La régio-sélectivité de ces réactions fournit des C<sub>60</sub> hexa-adduits octaédriques ne comportant qu'une ou deux fonctions. Pour avoir une diversité de fonctionnalité plus conséquente ou une régio-fonctionnalité différente autour de la sphère de carbone, des additions contrôlées régio-sélectives d'adduits s'imposent.

Dans ce contexte, l'addition étape par étape de malonate s'avère extrêmement fastidieuse par la difficulté des purifications. En effet une seconde réaction de *Bingel*<sup>1</sup> peut fournir 8 régio-isomères de bis-adduits, une troisième addition, 46 régio-isomères. En employant cette stratégie, le groupe de *Hirsch* a réussi à obtenir différents régio-isomères et à définir des caractéristiques analytiques propres à chacun.<sup>2,3</sup> Une nomenclature triviale a ainsi été développée pour définir les différents bis-adduits (Figure 5.1). Par extension, cette nomenclature permet aussi de définir les tris-adduits et tetra-adduits de C<sub>60</sub>.

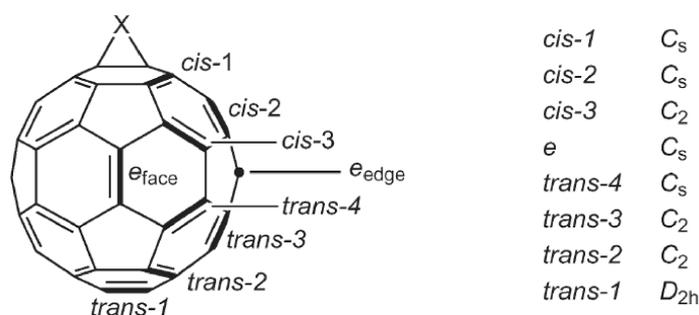


Figure 5.1: Nomenclature des différents bis-adduits de C<sub>60</sub>, avec leur groupe de symétrie dans le cas d'adduit de symétrie C<sub>2v</sub><sup>4</sup>.

La terminologie est déterminée en fonction de la première addition sur le C<sub>60</sub>. La sphère de carbone est ainsi découpée en deux hémisphères: la partie *cis*, se situant du côté du premier adduit et la partie *trans*, dans l'hémisphère opposée au premier adduit. La zone équatoriale *e*, délimite les deux hémisphères. L'hémisphère *cis* présente trois «doubles liaisons» différentes (*cis-1*, *cis-2*, *cis-3*) et l'hémisphère *trans* présente quatre «doubles liaisons» différentes (*trans-1*, *trans-2*, *trans-3*, *trans-4*). De façon intéressante, l'addition d'adduits n'ayant pas de chiralité peut induire une chiralité inhérente au C<sub>60</sub>. Ce phénomène est aussi constaté pour les adduits supérieurs (par exemple *e,e,e* de symétrie C<sub>3</sub>). Une chiralité non-inhérente au C<sub>60</sub> peut aussi être obtenue à partir d'adduits de structure différente ou non symétrique.

La synthèse dirigée semble être l'approche la plus intéressante pour obtenir des régio-isomères de manière contrôlée. Le premier exemple de synthèse dirigée provient du groupe de *Diederich*<sup>5</sup> (Figure 5.2). Cette équipe a développée un groupement composé: d'un malonate, permettant l'ancrage de l'édifice sur le C<sub>60</sub>, d'un groupe directeur (cycle aromatique) amenant la régio-sélectivité de l'addition des fonctions butadiènes par réaction de *Diels-Alder*. Ce motif d'addition *e, e, trans-1* permet d'aller plus en avant dans la fonctionnalisation du C<sub>60</sub>, grâce aux trois doubles liaisons libres qui amènent à l'hexa-adduit de symétrie octaédrique. Ainsi des additions contrôlées ont fourni des dérivés tetra, penta et hexa-adduits.<sup>5-7</sup>

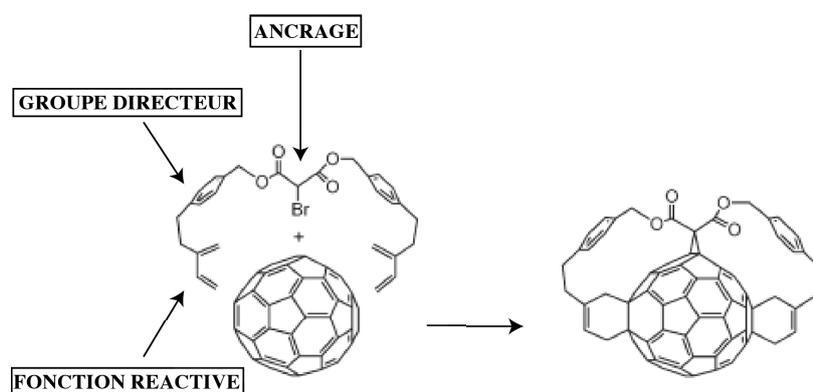


Figure 5.2: Groupement directeur développé par l'équipe de *Diederich*.

Dans la même philosophie, une approche systématique a été développée où un groupement directeur relié à des espaceurs permet d'effectuer une double réaction de *Bingel* fournissant dans l'idéal, sélectivement, un régio-isomère (Figure 5.3). La même stratégie a été employée, avec trois malonates pour obtenir des tris-adduits.

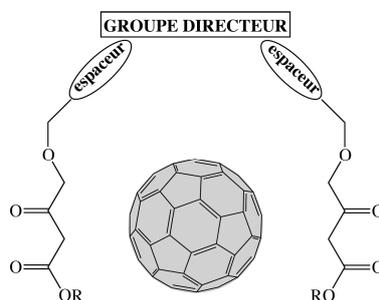


Figure 5.3: Schéma de l'approche par double cyclopropanation pour obtenir sélectivement des régio-isomères.

La nature du groupe directeur et de l'espaceur ainsi que sa longueur définissent quel régio-isomère sera obtenu. Généralement, des investigations par modélisation définissent les paramètres à choisir en fonction de l'isomère ciblé.

La Figure 5.4 présente quelques exemples issus de la littérature de régio-isomères obtenus sélectivement, par cette approche. En utilisant la base de Tröger comme groupe directeur<sup>8</sup>, le groupe de Diederich a obtenu le dérivé *e*. En allongeant par deux cycles aromatiques la taille de la base de Tröger, le dérivé *trans-1* a été obtenu avec un rendement remarquable de 38%. En substituant la base de Tröger par une porphyrine, le dérivé *trans-1*

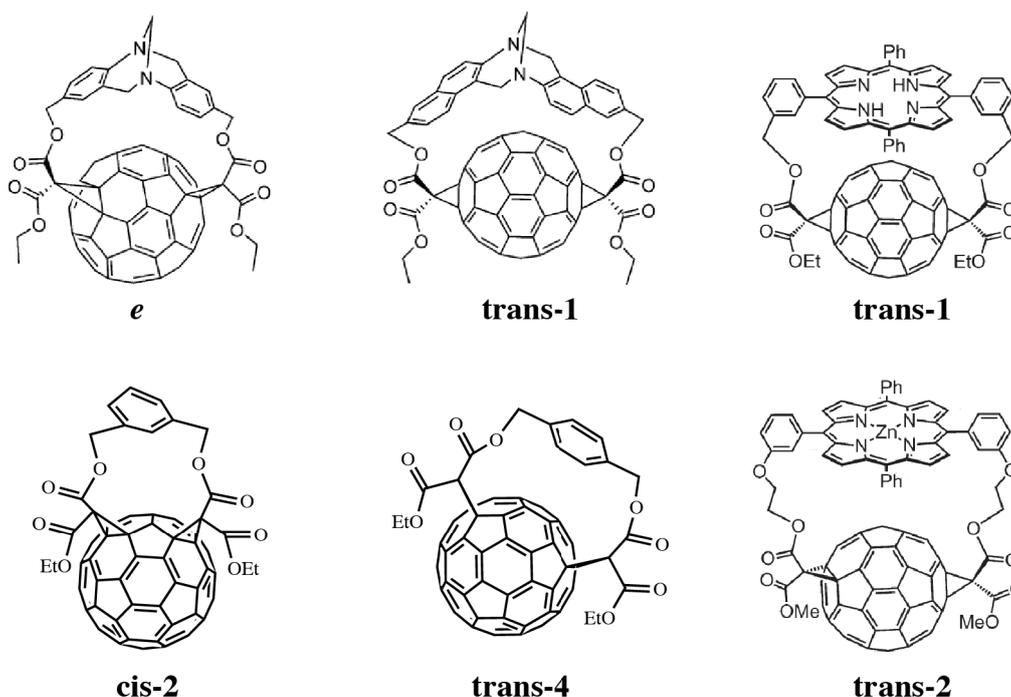


Figure 5.4: Exemples de régio-isomères obtenus par la stratégie de double cyclopropanation.

est encore obtenu sélectivement.<sup>9</sup> En faisant varier la taille de l'espaceur entre la porphyrine et les malonates, la sélectivité s'est déplacée vers l'obtention du dérivé *trans-2*.<sup>10</sup> D'autres régio-isomères ont pu être obtenus, par exemple, avec un dérivé xylène fournissant le dérivé *cis-2* ou encore *trans-4*.<sup>11</sup> La régio-sélectivité de l'addition étant déterminée par le positionnement des substituants autour du cycle benzénique.

Par cette stratégie, le groupe de *Diederich* a développé un bis-malonate incorporant un éther couronne comme groupe directeur, pour cibler sélectivement la position *trans-1*<sup>12</sup> (Figure 5.5). Ce groupement a pu être enlevé en présence de TsOH pour générer deux acides maloniques, qui deviennent dès lors fonctionnalisables. Ainsi, un dérivé hexa-substitué de façon originale a pu être obtenu.<sup>13,14</sup>

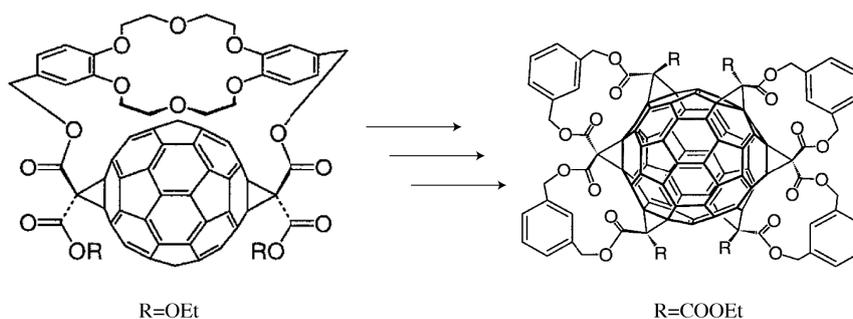


Figure 5.5:  $C_{60}$  hexa-adduit de *Diederich*.

En opposition à cette méthode, une approche macrocyclique a été proposée par le laboratoire de *Hirsch* (Figure 5.6).<sup>15,16</sup> Dans cette stratégie, une réaction de cyclisation d'un diol de taille définie avec du chlorure de malonyle, dans des conditions de pseudo-haute dilution, produit principalement deux macrocycles à deux et trois malonates. La taille de ces macrocycles déterminera la régio-sélectivité de la réaction de *Bingel* sur le  $C_{60}$ .

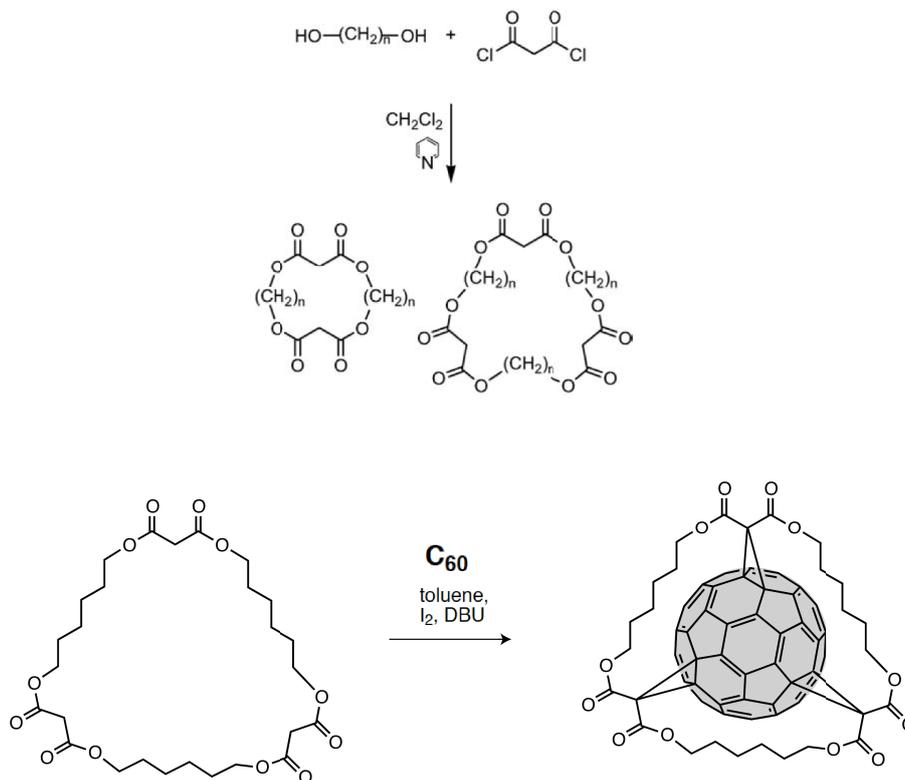


Figure 5.6: Synthèse de macrocycles à deux et trois malonates (en haut). Réaction de *Bingel* fournissant le régio-isomère *e,e,e* (en bas).

Par exemple, le tris-malonate cyclique avec une chaîne alkyle à huit carbones fournit sélectivement le régio-isomère tris-adduit *e,e,e*. Une étude systématique des macrocycliques de différente taille a fourni une grande diversité de bis et tris-adduits. Dans certains cas, comme pour le tris-adduits *e,e,e* représenté, les doubles liaisons libres permettant d'aller à

l'hexa-adduit octaédrique sont disponibles. Ainsi, l'équipe de *Hirsch* a pu créer des hexa-adduits mixtes.<sup>15,16</sup>

Une approche singulière a été développée par l'équipe de *Rubin*.<sup>17,18</sup> Le groupe directeur a été conçu de manière à cibler la position *trans-1* (Figure 5.7). Pour une multi-addition régio-sélective, cette position est un point névralgique. Car la position *trans-1* laisse disponible les doubles liaisons amenant au C<sub>60</sub> hexa-adduit octaédrique et aux adduits inférieurs de manière contrôlée.

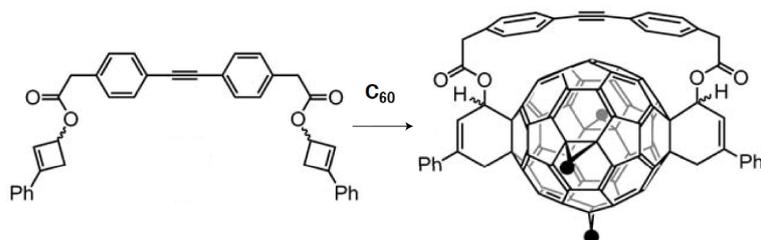


Figure 5.7: Groupe directeur développé par l'équipe de *Rubin* permettant d'accéder à sept C<sub>60</sub> hexa-adduits différents.

L'introduction du groupe directeur est réalisée par une double réaction de *Diels-Alder*, fournissant le dérivé *trans-1*. Se faisant, trois positions sont accessibles à des additions successives. De plus, ce groupement est enlevable par action de TsOH/DMAD (diméthyle acétylèncarboxylate) dans du toluène, à reflux, laissant trois autres sites disponibles pour fournir des fullerènes hexa-adduits multifonctionnels. Ainsi, par cette méthodologie, le laboratoire de *Rubin* a synthétisé en parallèle sept régio-isomères de C<sub>60</sub> hexa-adduits.

Une autre méthodologie originale a été employée par le groupe de *Kräutler* pour obtenir le dérivé *trans-1*<sup>19</sup> (Figure 5.8).

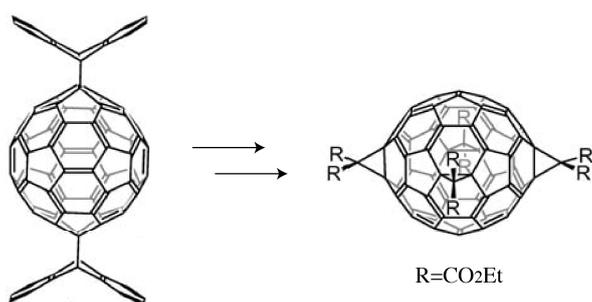


Figure 5.8: Addition topochimique d'anthracènes sur la position *trans-1* menant à la formation régio-spécifique d'un tetradduit.

Chauffer un mono-adduit de C<sub>60</sub>-anthracène, à l'état solide, fournit spécifiquement un bis-adduit sur la position *trans-1*. Un effet *template* serait la cause de cette spécificité.<sup>19</sup> Les quatre positions équatoriales ont pu alors être complétées régio-sélectivement. La labilité thermique des adduits d'anthracènes sur le C<sub>60</sub> permet d'effectuer une *retro-Diels-Alder* pour fournir spécifiquement un dérivé tétra-adduit.<sup>20</sup>

Les différents exemples présentés peuvent former des C<sub>60</sub> multifonctionnels. Cependant la synthèse des groupes directeurs peut s'avérer longue et/ou ardue. En opposition, l'approche macrocyclique fournit en une étape des groupes directeurs, simplement. Cependant, cette méthode souffre d'un handicap: le macrocyclique ne peut pas être enlevé, empêchant d'aller plus en avant dans la fonctionnalisation.

Dans ce contexte, notre objectif a été de partir de groupes directeurs facilement accessibles. De plus, ceux-ci devront permettre une fonctionnalisation multiple, efficace et simple à mettre en œuvre. Idéalement ces groupes directeurs pourront être facilement enlevés ou post-fonctionnalisables pour fournir une bibliothèque de dérivés multi-fonctionnalisables à souhait, en fonction de l'application visée.

Notre attention s'est donc tournée vers l'utilisation de dérivés du silicium. Les dérivés silylés sont largement utilisés comme groupe protecteur de fonctions alcool ou d'alcyne. En choisissant judicieusement l'espaceur, ce type de groupe directeur pourrait fournir des régio-isomères intéressants et post-fonctionnalisables. En partant de ce postulat, la prochaine partie de ce chapitre sera consacrée à la synthèse de groupes directeurs à base de silicium visant la formation du bis-adduit *trans-1*, pierre angulaire permettant d'accéder à des adduits multiples de fullerène. Puis une autre partie développera la synthèse d'un groupe directeur silylé à trois malonates et l'analyse des produits formés après réaction avec le C<sub>60</sub>.

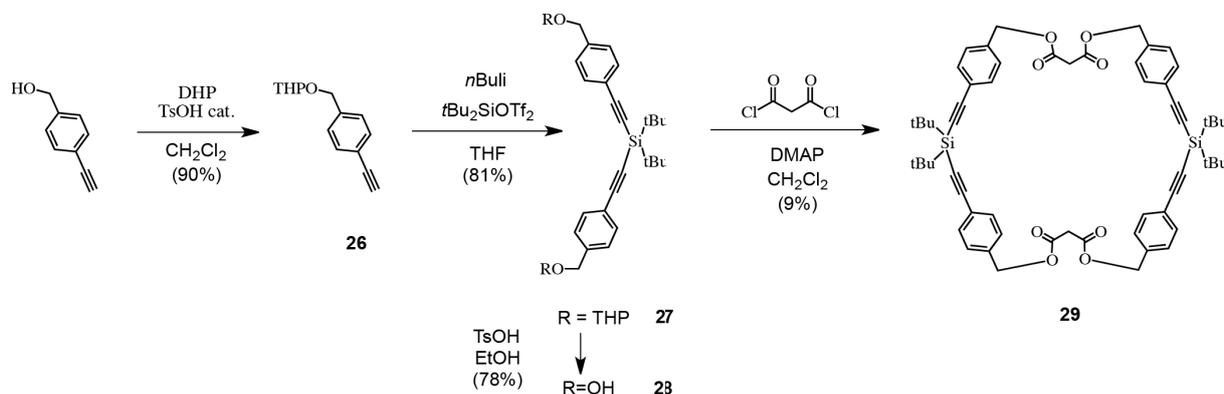
Pour une revue sur la multi-fonctionnalisation du C<sub>60</sub>, le lecteur est invité à consulter le chapitre «Spacer-Controlled Multiple Functionalization of Fullerenes Templates» dans «Templates in Chemistry I» (édition Springer) et la revue de *Thilgen* et *Diederich*<sup>21</sup> qui présente aussi la chiralité des C<sub>60</sub> multi-adduits.

## II. Synthèse de C<sub>60</sub> multi-adduits à partir de dérivés bis-adduits.

Notre première approche s'est tournée vers la synthèse d'un macrocycle (Figure 5.9). Une modélisation avec le logiciel Spartan<sup>®</sup> montre que les cycles aromatiques pourraient diriger l'addition des malonates en position *trans-1*. De plus, l'enchaînement alcyne-aromatique fournit une rigidité au cycle qui devrait aider à la sélectivité de la réaction. L'intégration du silicium permet d'avoir une distance entre les malonates d'environ 15 Å ce qui permettrait au C<sub>60</sub> de pouvoir s'insérer dans le macrocycle.

Le composé **29** a donc été obtenu en quatre étapes à partir de produits commerciaux. La synthèse démarre avec la protection de l'alcool 4-éthynylbenzilique sous forme de THP<sup>22</sup> pour donner le composé **26**. La formation de la pince **27** est réalisée par action de *n*-Buli suivie de

l'addition de *t*-Bu<sub>2</sub>SiOTf<sub>2</sub>. Ensuite les alcools sont déprotégés dans des conditions classiques (TsOH/EtOH) pour fournir le dérivé **28**. Ce diol a ensuite été soumis à une réaction de macrocyclisation dans des conditions de pseudo-haute dilution pour fournir le macrocycle **29** avec un rendement faible de 9%. La variation du mode d'addition (ajout de DMAP dans une solution de diol et chlorure de malonyle ou ajout séparé de diol et DMAP dans une solution de chlorure de malonyle) n'a pas permis d'augmenter ce rendement. La formation du cycle à un malonate n'a pas été détectée (probablement à cause d'une tension de cycle trop importante) et seulement des traces de cycles à trois malonates ont été visibles sur CCM. La formation de l'entité monomérique semble défavorable par rapport à celle des oligomères. Cependant grâce à la simplicité des réactions mises en oeuvre, cette voie de synthèse est facilement répétable et plusieurs centaines de milligrammes du macrocycle **29** ont été obtenu.

Figure 5.9: Schéma réactionnel du composé **29**.

L'analyse RMN du produit **29** montre la haute symétrie du composé (RMN <sup>1</sup>H présentée en Figure 5.13). L'identité du macrocycle a été certifiée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) qui montre un pic moléculaire correspondant à un macrocycle à deux malonates. De plus des cristaux de bonne qualité ont été obtenus par diffusion lente de *n*-pentane dans une solution de **29** dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La structure obtenue par diffraction des rayons X est représentée Figure 5.10. Le composé se présente sous la forme d'un parallélogramme, la force du *packing* étant dirigée par des interactions de type  $\pi$ -*stacking* et  $\pi$ -H intra-moléculaires. La rigidité de la structure au niveau de l'enchaînement aromatique - alcyne est claire et la distance de 14 Å entre les carbones benzyliques (à l'état solide) conforte dans l'idée que le C<sub>60</sub> puisse s'insérer à l'intérieur du macrocyclique.

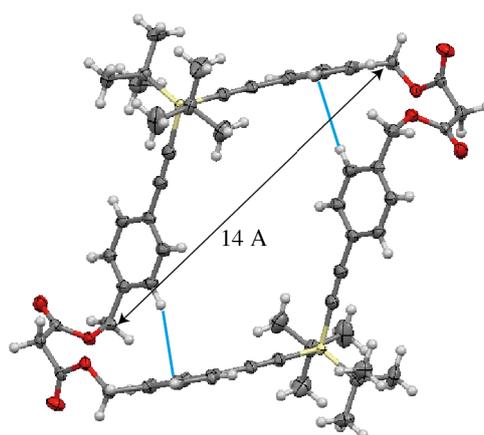


Figure 5.10: Structure RX du composé **29**. Les traits bleus représentent les interactions  $\pi$ -H. Représentation ORTEP. Les ellipsoïdes représentent 50% de probabilité de densité électronique. Les hydrogènes ont été représentés avec un rayon fixé à 0,2 Å.

La prochaine étape a donc été de réaliser une réaction de cyclisation sur le  $C_{60}$  dans des conditions classiques (pseudo-haute dilution, mélange stoechiométrique du  $C_{60}$  et du macrocyclique), à température ambiante. Le rendement des composés obtenus est très faible et pourrait être dû à la dégradation du macrocycle. De fait, le suivi de la réaction par CCM a montré que le macrocyclique est consommé plus rapidement que le  $C_{60}$ . Cette réaction a donc été répétée à  $-15^\circ\text{C}$  (Figure 5.11). Dans ces conditions, deux dérivés bis-adduits de  $C_{60}$  ont pu être isolés: le dérivé *trans-1* (8%) et le dérivé *trans-3* (18%).

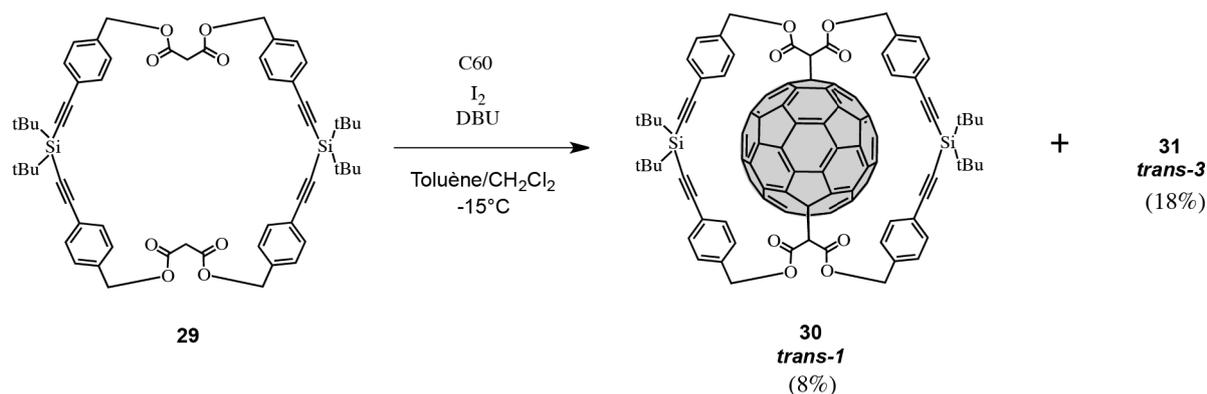


Figure 5.11: Réaction de cyclisation du produit **29** sur le  $C_{60}$ .

Une chiralité inhérente au mode d'addition *trans-3* fait que le composé **31** a été obtenu sous forme d'un mélange racémique (Figure 5.12).

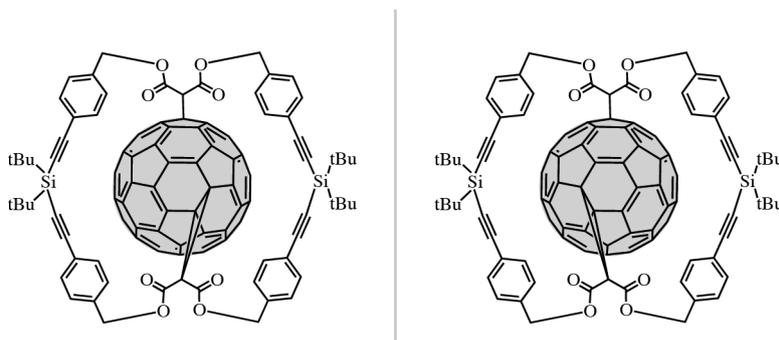


Figure 5.12: Composé **31** obtenu sous forme d'un mélange racémique, à cause d'une chiralité inhérente à l'addition *trans*-3.

La structure de ces composés a été déterminée par RMN, UV, IR, spectrométrie de masse (MALDI-TOF). L'analyse du spectre RMN carbone montre une symétrie pour le composé *trans*-1 (D<sub>2h</sub>) où sept signaux correspondants aux carbones sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub> sont visibles entre 148 et 138 ppm. Le composé *trans*-3 montre une perte de symétrie avec la présence de 27 signaux dans cette région. L'analyse RMN proton confirme ces observations (Figure 5.13). La symétrie du macrocycle est conservée pour le dérivé *trans*-1. Tous les protons en position benzyliques restent équivalents et correspondent à un seul singulet. Les protons aromatiques sont représentés par un set de deux doublets. Pour le composé **31**, la perte de symétrie est visible notamment au niveau des protons benzyliques. Ceux-ci ne sont plus équivalents et les huit protons se présentent sous la forme de quatre doublets comptant pour deux protons. Les protons sont devenus diastéréoisotopiques, à cause de l'influence de la sphère de carbone.

Le profil du spectre UV/Visible dans la région de 400 nm à 700 nm est tout à fait spécifique de chaque bis-adduit et a permis de déterminer sans aucun doute l'addition *trans*-3 et l'addition *trans*-1 (Figure 5.25).

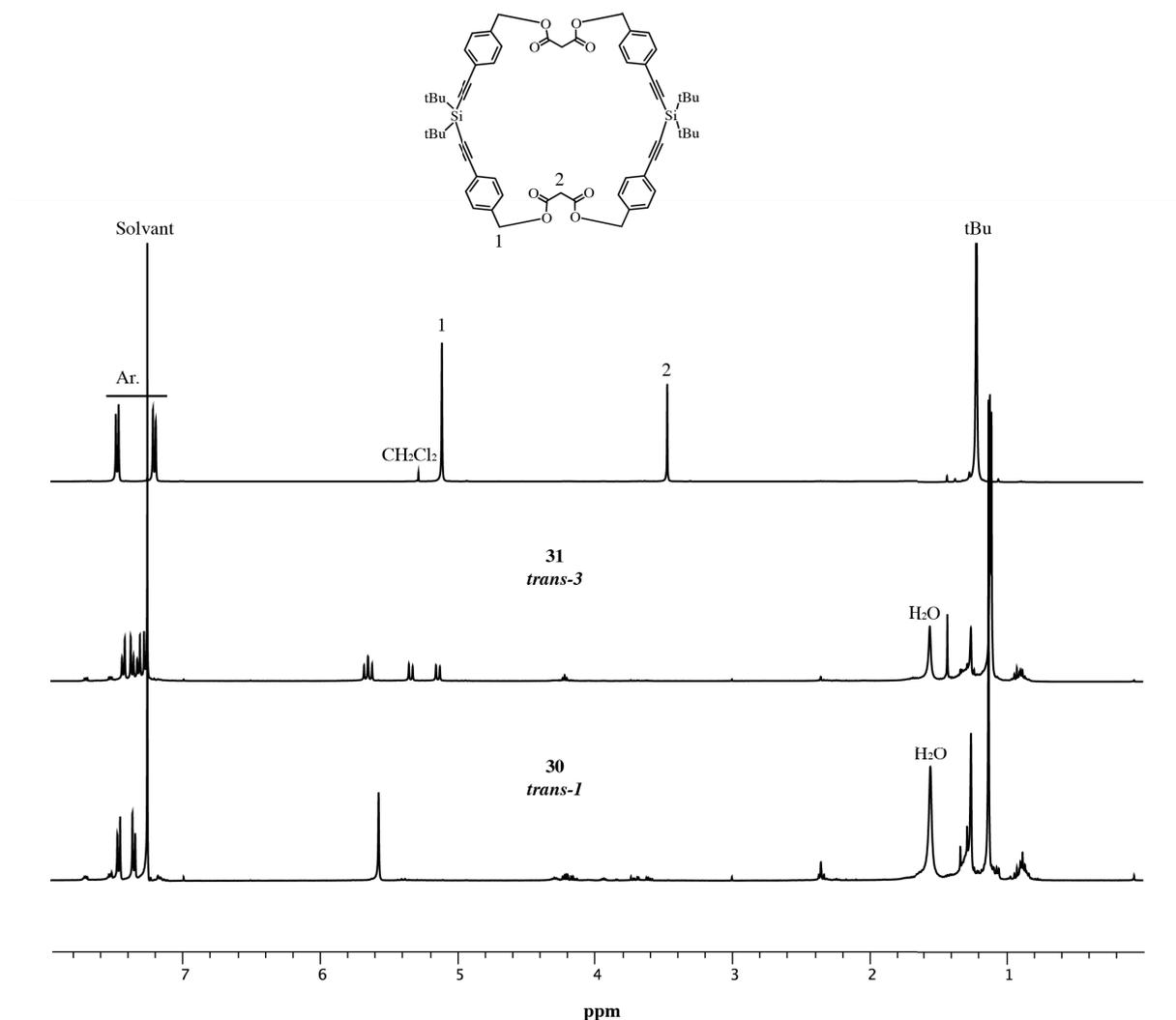


Figure 5.13: Spectres RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 Mhz) du macrocyclique **29** et des composés **30** et **31**.

Le dérivé **30** est peu soluble dans la plupart des solvants organiques et a une forte tendance à s'agréger. Ainsi, une lente évaporation d'une solution de **30** dans un mélange  $\text{CS}_2/\text{CHCl}_3$  permet la formation de cristaux, analysables aux rayons X (Figure 5.14). A l'état solide, le macrocycle subit une tension pour faire des interactions de type  $\pi$ -stacking, entre les cycles aromatiques et la sphère de carbone. Cette tension de cycle pourrait expliquer le faible rendement obtenu pour le composé *trans-1*.

Par la suite, nous avons voulu effectuer directement des réactions de cycloaddition catalysées au cuivre avec les fonctions alcynes. Différents essais de déprotection des fonctions alcynes ont été testés (TBAF, CsF, AgF, HF.pyridine,  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ , HCl gazeux, TFA...) sans succès. Le groupement silylé est trop encombré pour être déprotégé comme le montre la structure RX. Alors qu'avant addition sur le  $\text{C}_{60}$ , le macrocycle se dégradait probablement par une addition nucléophile du carbanion formé en  $\square$  des malonates sur le

silicium, celui-ci est maintenant totalement protégé par les *ter*-butyles d'un côté et par le C<sub>60</sub> de l'autre côté.

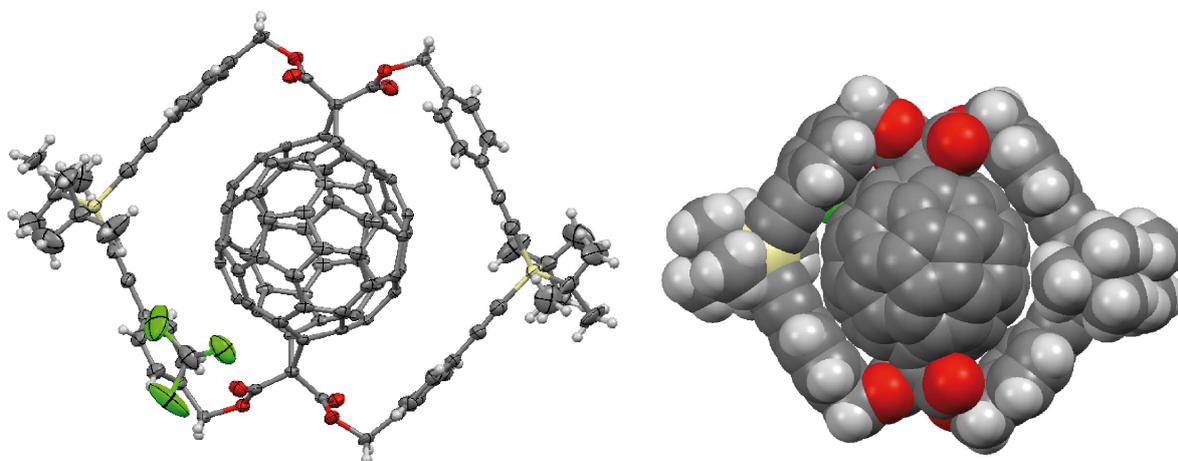


Figure 5.14: Différentes vues de la structure RX du composé **30**, qui cristallise en présence d'une molécule de CHCl<sub>3</sub>. A gauche: représentation ORTEP. Les ellipsoïdes représentent 50% de probabilité de densité électronique. Les hydrogènes ont été représentés avec un rayon fixé à 0,2 Å. A droite: représentation *spacefill*.

Néanmoins ce composé reste intéressant, car deux pôles sont encore fonctionnalisables. Il serait donc théoriquement possible d'avoir une di-fonctionnalisation régiosélective originale avec ce composé. A cause des faibles quantités de matériel disponible, la di-fonctionnalisation séquentielle n'a pas été envisagée et les deux positions ont été fonctionnalisées avec le même malonate en une seule étape.

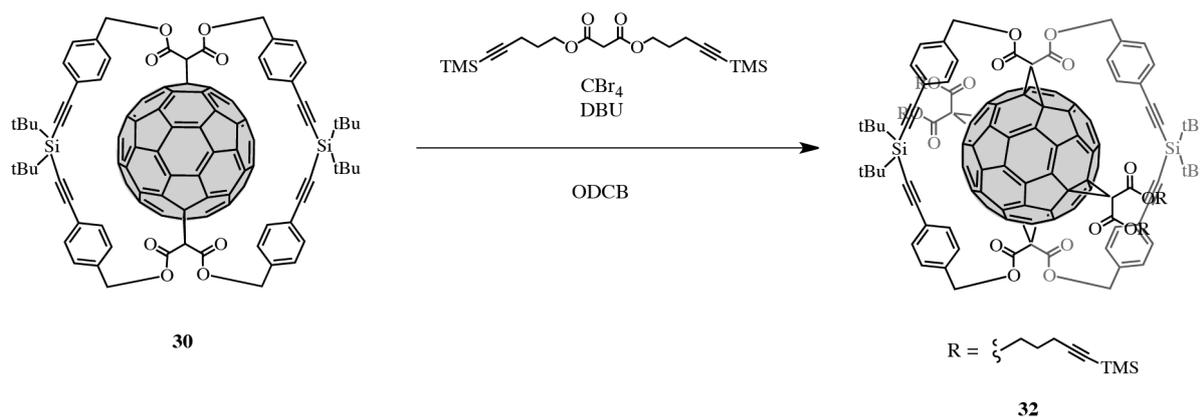


Figure 5.15: Formation du composé **32**.

Un malonate avec deux fonctions alcynes a été mis en réaction en présence du composé **30** dans les conditions classiques de formation d'un hexa-adduit (large excès de malonate, CBr<sub>4</sub> et DBU) (Figure 5.15). Ainsi, après deux jours d'agitation la couleur du milieu

réactionnel passe de marron-vert à orange-marron, (couleur caractéristique d'un tétra-adduit *all-trans*<sup>7</sup>). Le produit a été difficilement purifié par plusieurs colonnes de chromatographie sur silice puis par chromatographie d'exclusion pour donner le composé **32**. La présence d'impuretés pouvant être assignées à l'excès de malonate dibromés ne permet de donner qu'un rendement approximatif de 49%. Néanmoins, la formation d'un C<sub>60</sub> tétra-adduit est indiscutable. La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) montre que la masse observée correspond à un composé tétra-adduit. Le profil UV/Visible correspond aussi à un dérivé tétra-adduit<sup>7</sup> (Figure 5.25). La RMN <sup>13</sup>C montre que la symétrie de la molécule (D<sub>2h</sub>) a été conservée. En effet, sept signaux dont un de demi-intensité apparaissent pour les carbones sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub> comme l'équipe de *Diederich* l'a constaté précédemment<sup>7</sup> pour un composé tétra-adduit. Et finalement, une diffusion lente d'acétonitrile dans une solution de 1,2 dichloroéthane a fourni des cristaux de **32** de qualité moyenne, analysables aux rayons X (Figure 5.16).

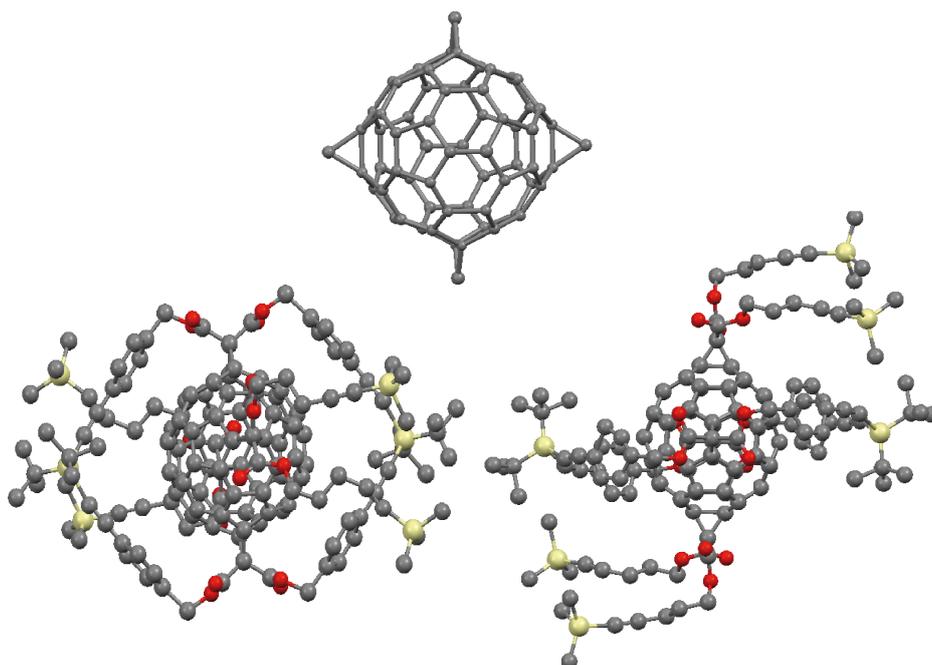


Figure 5.16: Différentes vues de la structure RX du composé **32**. La qualité des cristaux n'est pas suffisante pour avoir une représentation correcte des atomes périphériques, cependant le cœur C<sub>60</sub> est bien résolu et l'addition *all-trans* est claire.

Probablement à cause de la flexibilité des chaînes alkyles, une forte agitation des atomes périphériques au C<sub>60</sub> a été constatée rendant la qualité de la structure mauvaise (les atomes périphériques ont donc été représentés en isotrope). Cependant la sphère de carbone ainsi que les quatre cyclopropanes sont bien définis et permettent de conclure à une tétra-addition *all-trans* sans aucune ambiguïté.

L'approche macrocyclique fournit un dérivé bis-adduit *trans-1* et permet d'obtenir un produit tétra-adduit potentiellement post-fonctionnalisable de façon tout à fait originale. Malgré tout cette voie de synthèse souffre de deux points faibles aux niveaux des rendements de la formation du macrocycle et de la double réaction de *Bingel* sur le C<sub>60</sub>. En effet, bien que séduisante cette stratégie semble limitée pour utiliser le dérivé **30** comme précurseur en quantité préparative.

Dans un souci d'optimisation et dans l'espoir d'obtenir un précurseur bis-adduit *trans-1* facilement synthétisable en quantité conséquente, notre équipe a décidé d'apporter une légère modification au macrocycle **29**. En «ouvrant» le cycle (Figure 5.17) d'un côté, le mauvais rendement de la macrocyclisation est évité. Ce composé (**34**) garde l'angle et la rigidité nécessaire pour atteindre la position *trans-1* tout en évitant la tension de cycle qui aurait pu être la cause du faible rendement observé pour la formation du composé **30**. Les quatre cycles aromatiques permettent toujours une interaction par *stacking* sur la sphère de carbone. De plus, les extrémités de la molécule **34** comportent des fonctions alcynes-TMS, permettant une post-fonctionnalisation directe. Enfin, comme le groupe directeur proposé par le groupe de *Rubin* (Figure 5.7), si le composé **34** s'additionne en position *trans-1*, il offrira trois sites fonctionnalisables à souhait permettant d'aller à un composé C<sub>60</sub> multi-adduit.

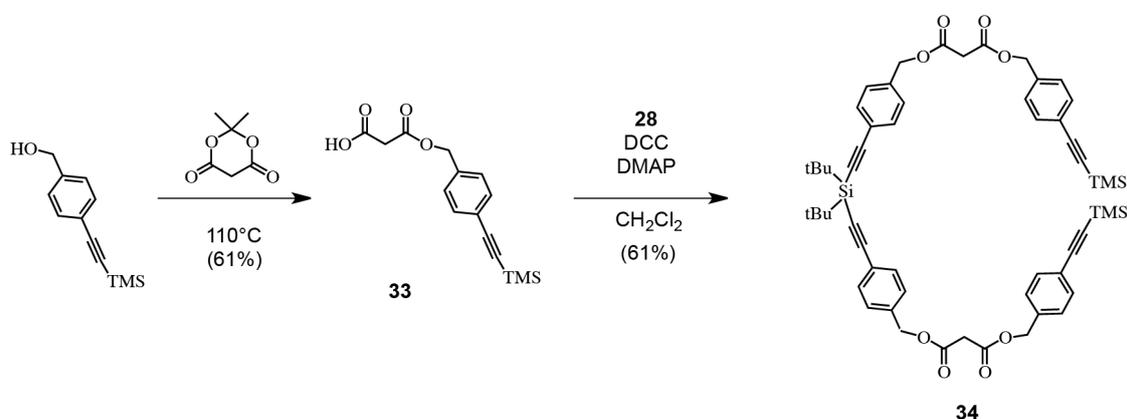


Figure 5.17: Synthèse du groupe directeur **34**.

La synthèse du composé **34** est similaire à celle du macrocycle **29** (Figure 5.17). Le diol **28** a été mis en réaction avec un léger excès de l'acide carboxylique **33** (obtenu par chauffage de l'acide de *Meldrum* avec l'alcool 4-triméthylsilyléthynyl benzylique commercial) dans les conditions standards (DCC/DMAP) pour fournir avec un rendement acceptable de 61% le composé **34**.

Celui-ci a ensuite été mis en réaction avec le C<sub>60</sub> (Figure 5.18). Comme pour la réaction de Bingel du macrocyclique sur le C<sub>60</sub>, la manipulation a été refroidie à -15°C, le malonate **34** se dégradant à température ambiante. Deux dérivés ont été isolés: le bis-adduit *trans-1* **35** et le bis-adduits *trans-3* **36** (sous forme d'un mélange racémique). Malheureusement, la réaction est toujours en faveur de la formation du dérivé *trans-3* avec un rendement de 20%.

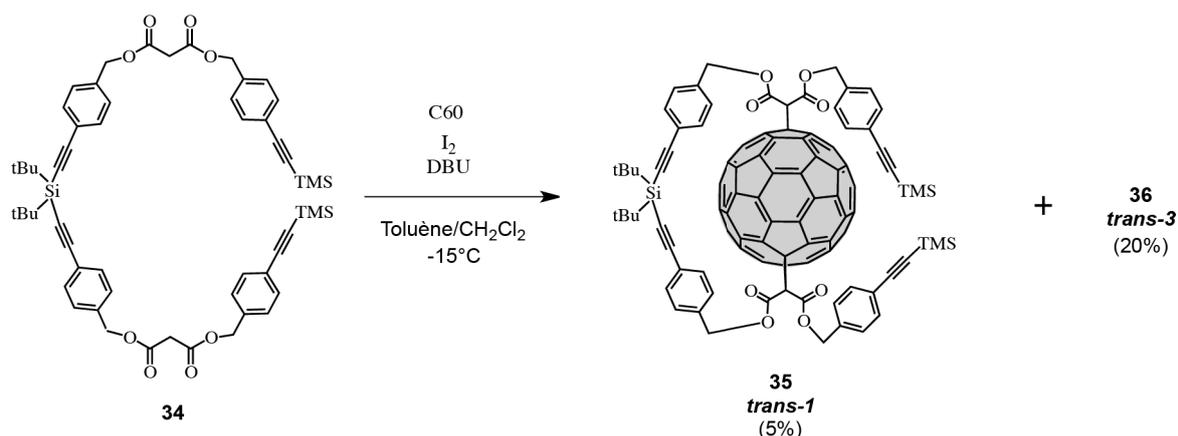
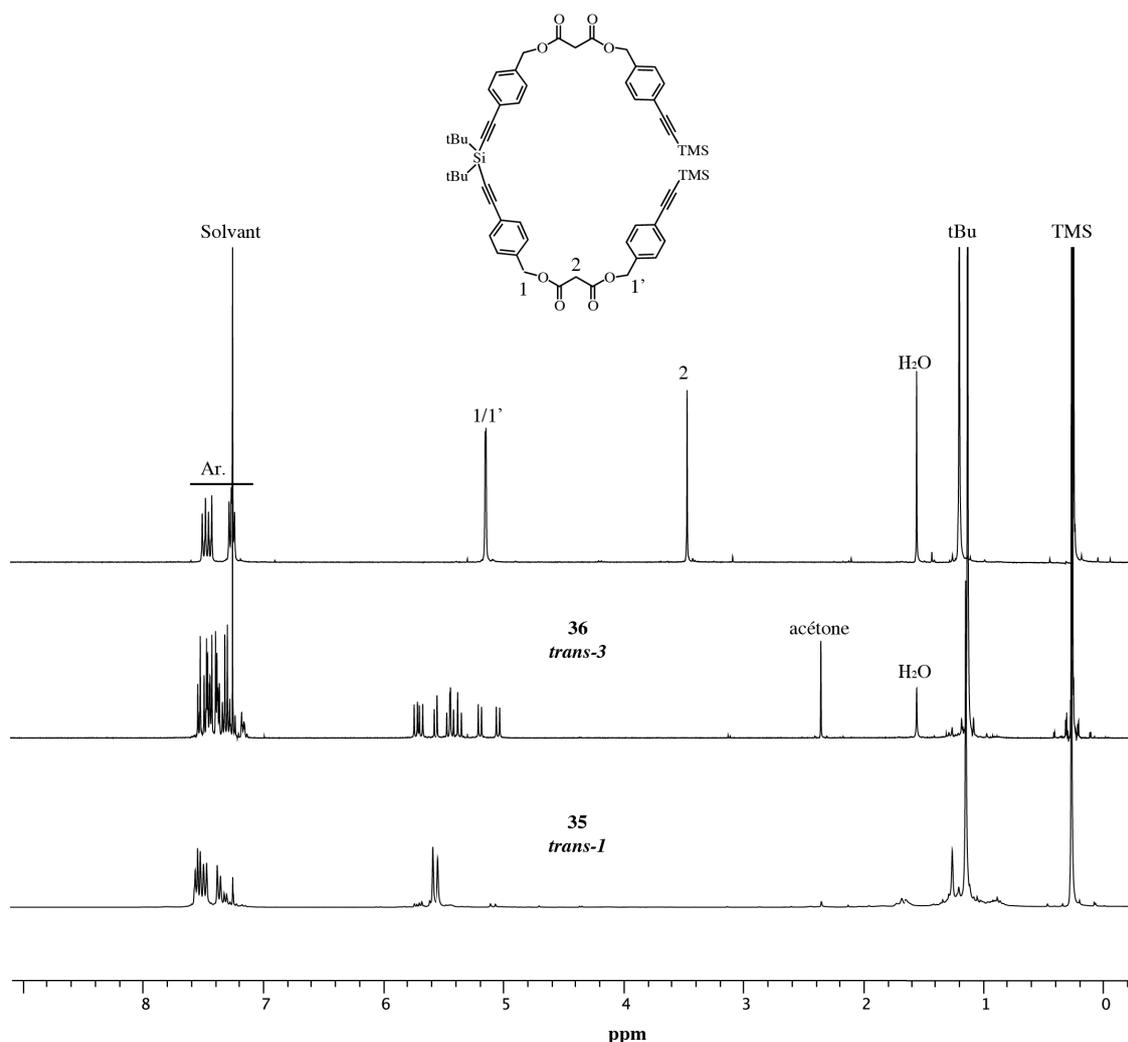


Figure 5.18: Réaction de cyclisation donnant le dérivé bis-adduit **35** et **36**.

Ces deux produits ont été caractérisés par RMN, UV, IR et spectrométrie de masse (MALDI-TOF). L'analyse de la RMN <sup>13</sup>C montre pour le composé *trans-1* une signature caractéristique d'un bis-adduit de symétrie C<sub>2v</sub> avec 15 signaux pour les carbones sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub> entre 146 et 140 ppm. La RMN <sup>13</sup>C du dérivé *trans-3* montre une perte de symétrie avec, par exemple, l'observation de 4 pics pour les 4 carbones maloniques entre 164 et 162 ppm, 4 pics pour les 4 carbones sp<sup>3</sup> du C<sub>60</sub> (assignés par DEPT) entre 72 et 70 ppm, 4 pics pour les 4 carbones benzyliques entre 69 et 68 ppm ou encore 2 pics pour les 2 carbones des cyclopropanes à 50,9 et 50,6 ppm. Les spectres RMN <sup>1</sup>H corroborent ces observations (Figure 5.19). Notamment au niveau des protons en positions benzyliques, le spectre du dérivé *trans-1* présente deux singulets correspondants chacun à 4 protons. Le dérivé *trans-3* présente 8 doublets correspondant à un proton benzylique chacun. Ainsi, plus aucun des protons benzyliques n'est équivalent, montrant la perte de symétrie de la molécule.

Figure 5.19: Spectres RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 Mhz) des composés **34**, **35** et **36**.

Enfin, la spectroscopie UV/Visible a permis de confirmer l'addition *trans-1* de la molécule **35** et l'addition *trans-3* de la molécule **36**.

Bien que le composé *trans-1* ait été obtenu avec un faible rendement de 5%, la facilité de préparation du groupe directeur **35** a permis d'obtenir suffisamment de matériel pour aller plus en avant dans la fonctionnalisation de la sphère de carbone. En effet, le composé **35** peut encore accepter trois malonates aux positions pouvant mener à un hexa-adduit octaédrique. Ce dérivé est donc potentiellement multi-fonctionnalisable et post-fonctionnalisable grâce aux fonctions alcynes.

Pour prouver ce concept, le composé **35** a été mis en réaction avec un large excès de malonate comportant des fonctions alcynes, de CBr<sub>4</sub> et de DBU, à température ambiante (Figure 5.20).

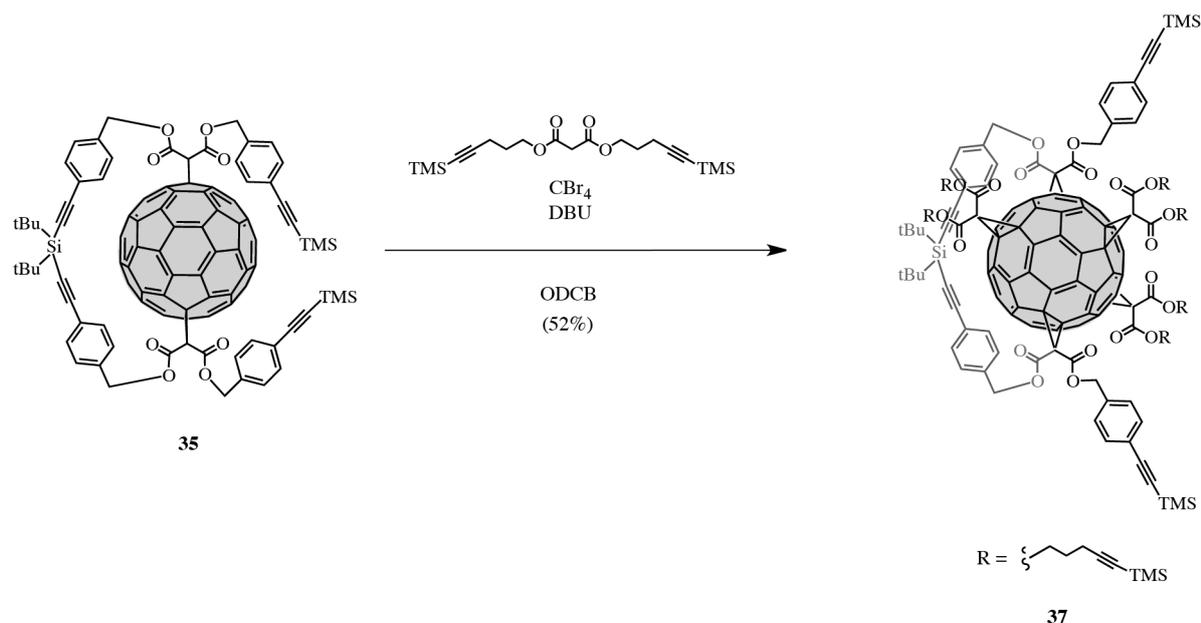


Figure 5.20: Synthèse du dérivé penta-adduit **37**.

Alors que le composé **34** se dégradait lors de la réaction de cyclisation sur le  $\text{C}_{60}$ , une fois celui-ci greffé sur la sphère de carbone, il n'est plus sensible aux additions nucléophiles, probablement pour les mêmes raisons que pour le composé **29**. Après trois jours d'agitation, le milieu réactionnel passe de vert-marron à orange. Après une colonne de chromatographie sur silice suivie d'une colonne d'exclusion stérique, le composé **37** est isolé avec un rendement relativement bon de 52% (80% par réaction).

Ce produit a été caractérisé par RMN, UV, IR et spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Le spectre de masse confirme la formation d'un  $\text{C}_{60}$  penta-adduit. L'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  apporte une preuve irréfutable du modèle d'addition penta-adduit de symétrie  $\text{C}_{2v}^{23}$  avec 13 résonances dont une de demi-intensité pour les 50 carbones  $\text{sp}^2$  du  $\text{C}_{60}$  entre 148 et 138 ppm (Figure 5.21). 5 résonances sont observables pour les 10 carbones maloniques entre 164 et 162 ppm. 8 résonances correspondant aux 24 carbones des cycles aromatiques sont observées entre 135 et 123 ppm. Les 14 carbones des fonctions alcynes présentent 8 résonances entre 106 et 85 ppm. Les 10 carbones  $\text{sp}^3$  apparaissent entre 70 et 69 ppm sous forme de 4 signaux dont un de double intensité. Les 5 carbones du pont malonate correspondent à 3 pics à 46,5, 45,5 et 44,2 ppm. L'analyse UV/Visible vient finalement conforter la formation d'un dérivé penta-adduit<sup>23</sup> (Figure 5.25).

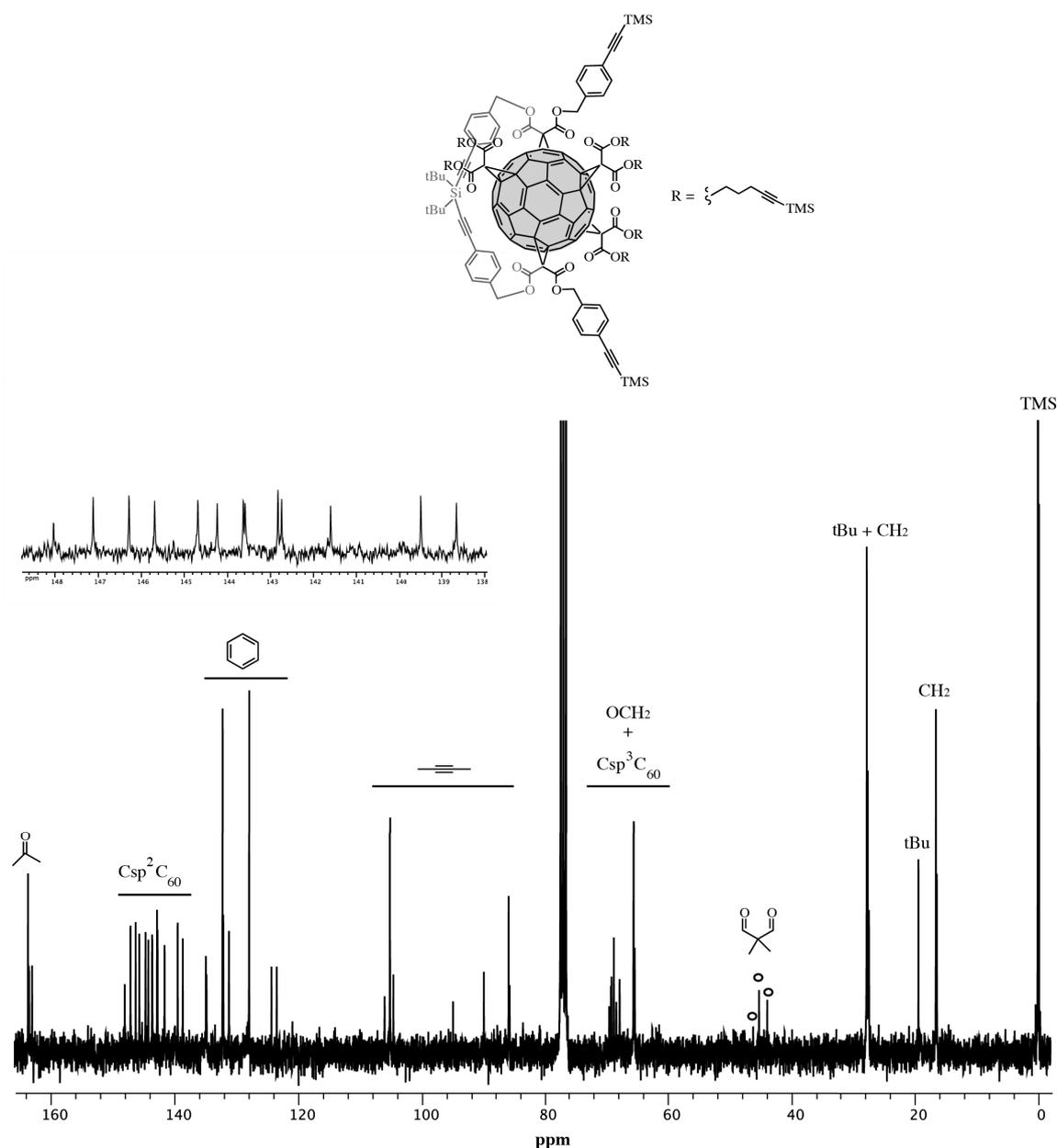


Figure 5.21: Spectre RMN <sup>13</sup>C ( 75 Mhz, CDCl<sub>3</sub>) du composé **37**. En insert, la zone de 150 à 138 ppm représentant les carbone sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub>.

Cette manipulation permet de conclure que le dérivé *trans-1* **35** est un bon candidat pour développer des dérivés de C<sub>60</sub> multi-adduits. De plus, l'introduction de fonctions alcynes pourrait permettre une post-fonctionnalisation. Pour valider cette hypothèse une réaction de *Huisgen* catalysée au cuivre avec de l'azoture de benzyle a été effectuée avec le C<sub>60</sub> penta-adduit **37**. En parallèle, le bis-adduit *trans-3* **36** a aussi été soumis à la même réaction (Figure 5.21).

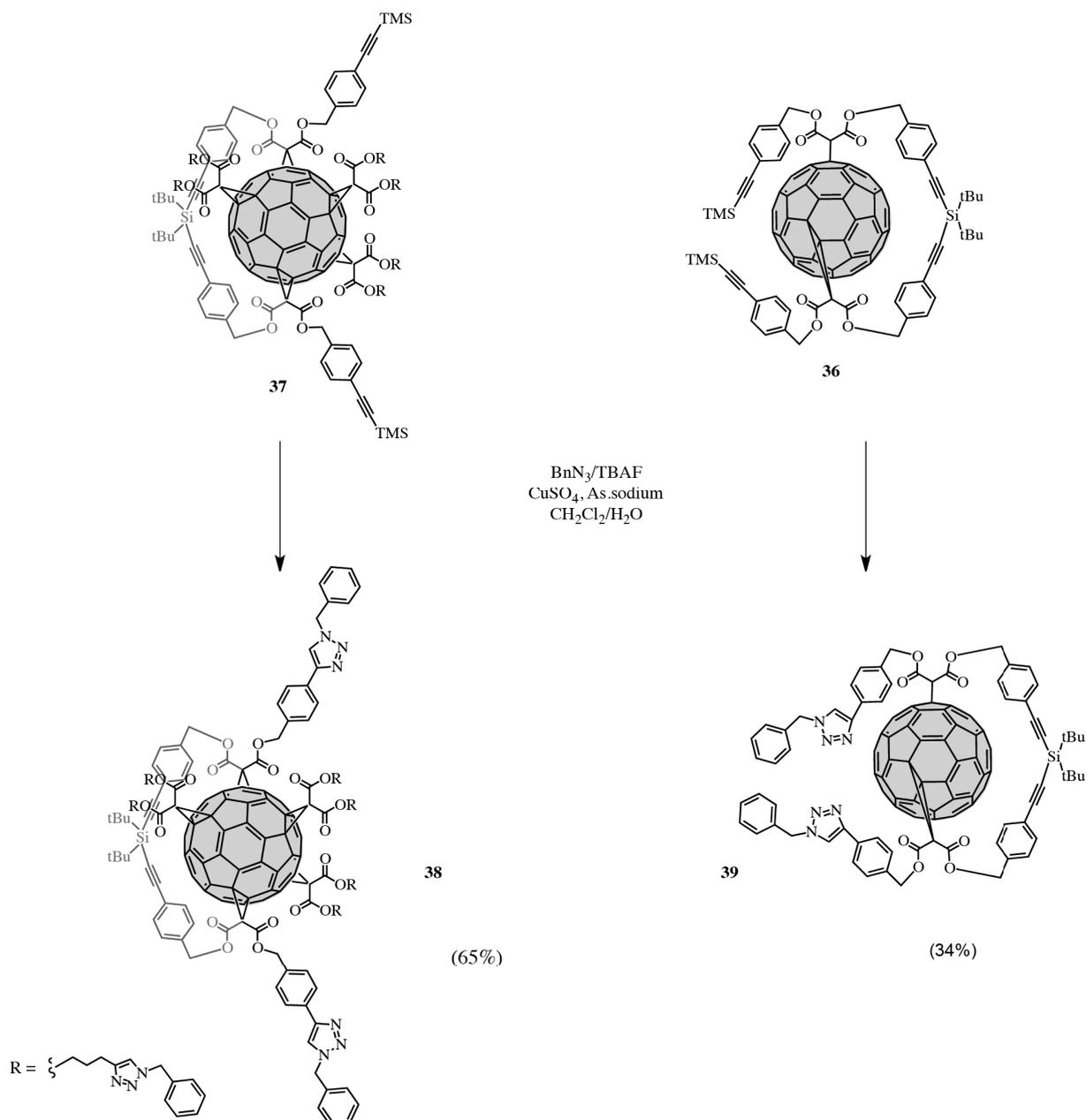


Figure 5.22: Schéma de synthèse des composés **38** et **39**.

Les deux composés ont été isolés avec un rendement de 65% pour le  $\text{C}_{60}$  penta-adduit **38** et de 34% pour le dérivé *trans*-3 **39**. Notre équipe a déjà constaté de faibles rendements pour des réactions de cycloaddition catalysée au cuivre sur des dérivés de  $\text{C}_{60}$  mono et bis-adduits<sup>24,25</sup>, probablement à cause d'une réaction parasite des azotures avec la sphère de carbone. Quand au dérivé **38**, le rendement est bon (95% par site réactionnel).

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  de **38** et **39** indiquent la disparition des TMS et la présence vers 7,80 ppm des protons des cycles triazoles. Les analyses  $^{13}\text{C}$  RMN, masse (MALDI-TOF), IR et UV/Visible viennent confirmer l'identité des deux produits.

En conclusion à cette voie de synthèse, le dérivé *trans-1* **35** permet effectivement de créer un dérivé de C<sub>60</sub> penta-adduit post-fonctionnalisable. Ce composé original peut donc fournir une variété conséquente de produits grâce à une méthodologie de post-fonctionnalisation par *click* robuste et compatible avec un large nombre de fonctions chimiques.

Néanmoins, le faible rendement de formation du produit *trans-1* **35** n'apporte pas une totale satisfaction quant à la synthèse de précurseurs C<sub>60</sub> en quantité préparative. C'est pourquoi notre attention s'est tournée vers la formation d'un autre bis-adduit: le bis-adduit équatorial, *e*. Le groupe de *Hirsch* a montré que la position *e* est la plus favorisée pour une seconde addition sur le C<sub>60</sub>.<sup>2</sup> Ainsi, toujours en incorporant un groupement silylé pour une éventuelle post-fonctionnalisation, notre laboratoire s'est concentré sur la conception du composé **40** (Figure 5.23). D'après une modélisation moléculaire avec le logiciel Spartan<sup>®</sup>, ce bis-adduit devrait atteindre la position *e*. Avec ce motif, une di-fonctionnalisation vers un hexa-adduit octaédrique est envisageable.

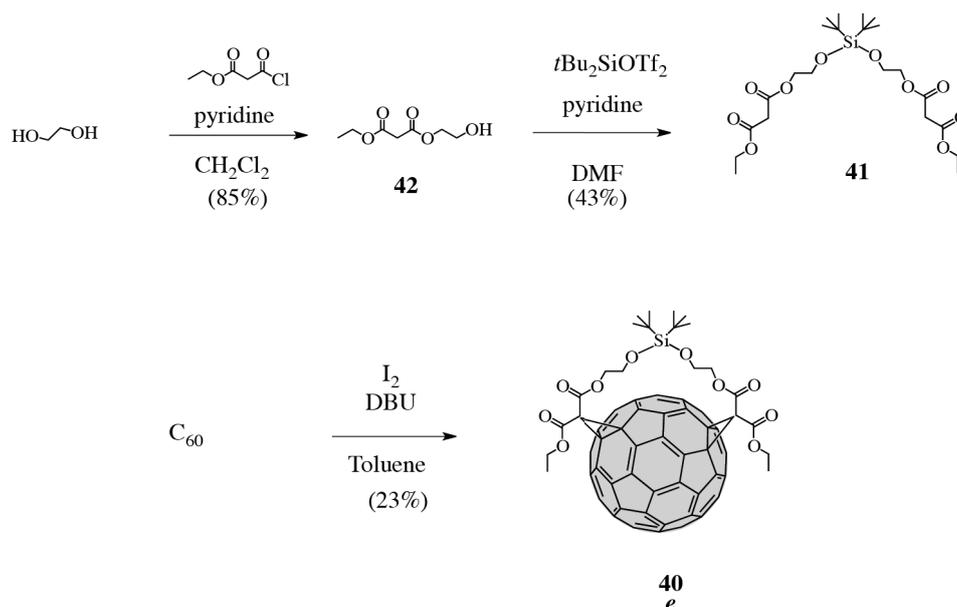


Figure 5.23: Schéma de synthèse du composé **40**.

Le composé bis-malonate **41** est rapidement et facilement accessible en deux étapes depuis les produits commerciaux. Du chlorure d'éthylmalonyle est ajouté au goutte à goutte sur de l'éthylène glycol pour fournir le malonate **42**. Puis **42** est mis en réaction avec du *t*-Bu<sub>2</sub>SiOTf<sub>2</sub> pour donner après une filtration sur silice le bis-malonate **41**. Finalement, **41** a été mis en réaction avec du C<sub>60</sub> pour produire avec un rendement acceptable de 23%, le bis-adduit **40** en position équatoriale, sous forme d'un racémique. Pour des raisons de distance entre l'espaceur et le silicium, le composé **40** est certainement obtenu uniquement sous la forme

*out-out*<sup>21</sup> (les deux OEt, à l'extérieur du macrocycle). La forme *in-out* (un OEt à l'intérieur du macrocycle, un OEt à l'extérieur du macrocycle) ne semble pas accessible pour des raisons d'encombrement stérique.

La formation d'un dérivé bis-adduit est confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). La spectroscopie RMN <sup>1</sup>H montre un éclatement des signaux du pont éthylène glycol, les protons sont devenus diastéréotopes. Cette analyse donne un premier indice sur une perte de symétrie. Le spectre RMN du carbone vient compléter cette observation (Figure 5.24). 52 résonances sont observées pour les carbones sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub>. 4 signaux sont observés pour les 4 carbones maloniques. 2 signaux dont un de triple intensité (assignés par DEPT) correspondent aux 4 carbones sp<sup>3</sup> du fullerène. 2 pics correspondant aux 2 carbones quaternaires des cyclopropanes sont visibles à 54 et 51 ppm. Les pics additionnels sont assignés aux carbones restants du bis-malonate.

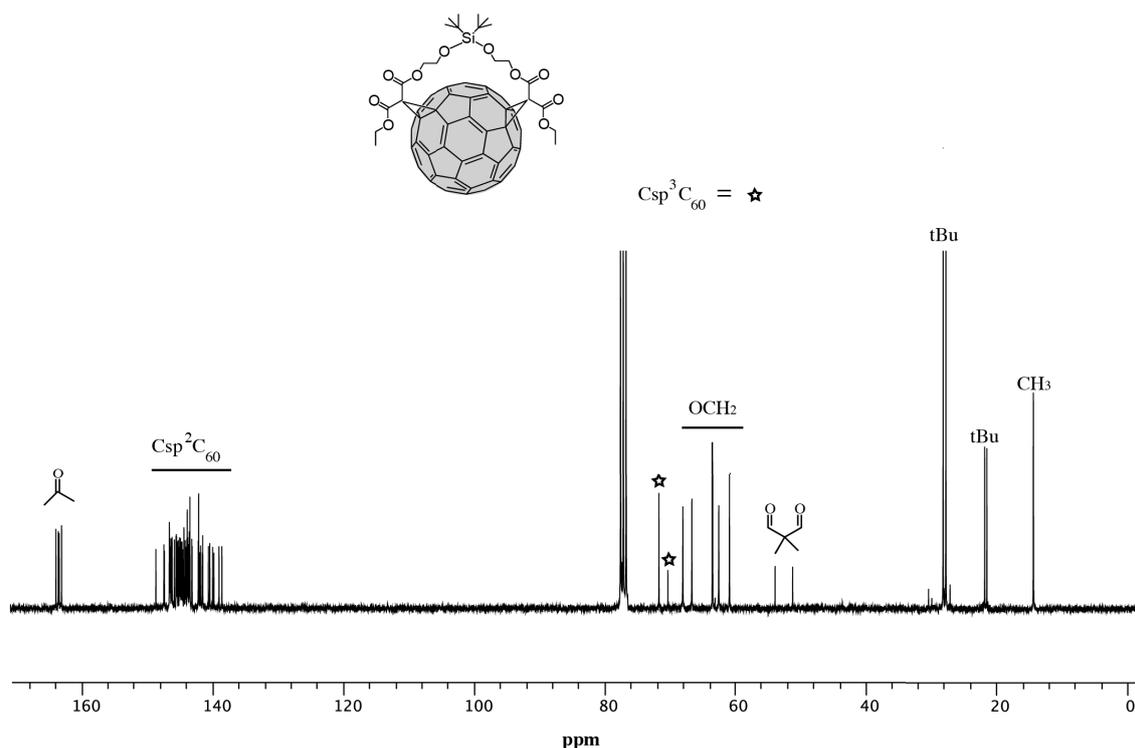


Figure 5.24: Spectre RMN <sup>13</sup>C (75 Mhz, CDCl<sub>3</sub>) du composé **40**.

Le profil UV du composé **40** a permis d'apporter la preuve d'une addition *e* (Figure 5.25). Chaque adduit de C<sub>60</sub> a une signature spécifique dans la région de 400 à 700 nm. Les différents motifs d'additions obtenus dans cette partie sont représentés dans la Figure 5.25.

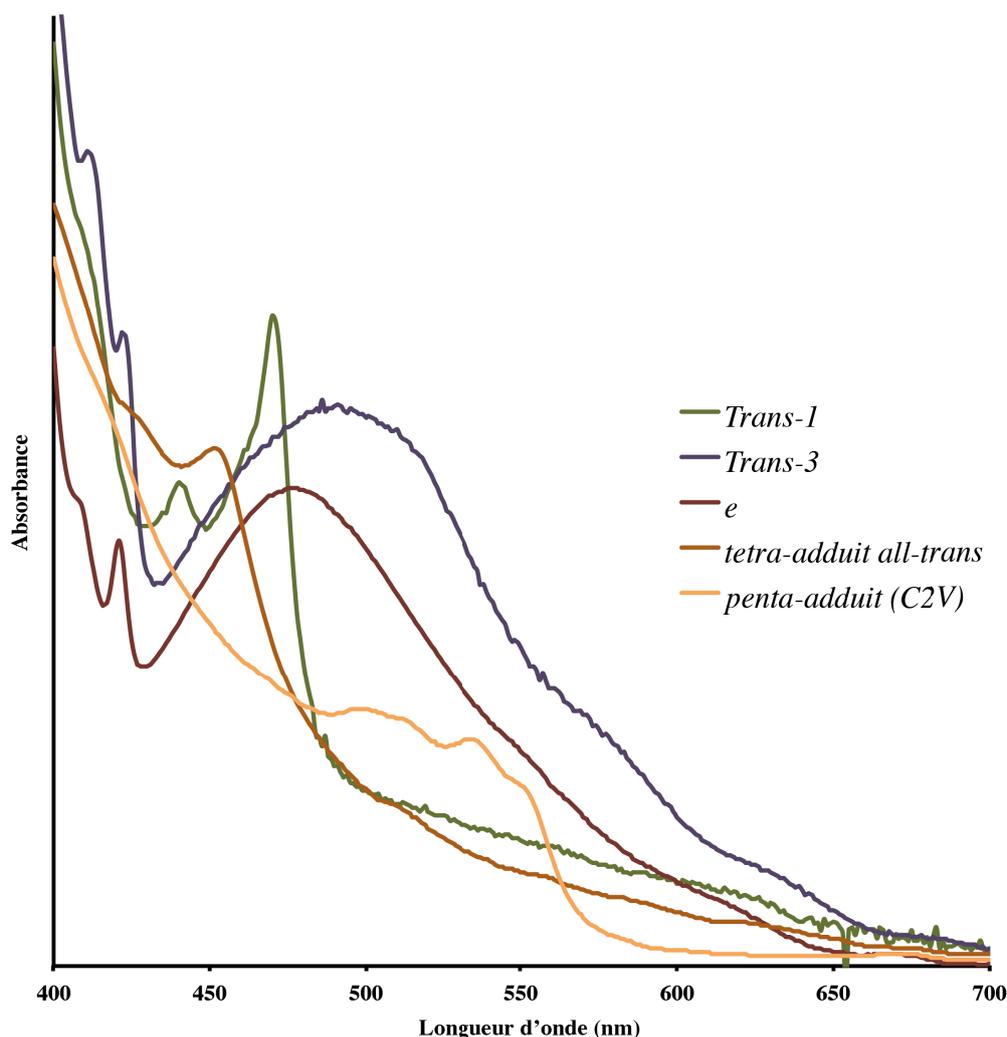


Figure 5.25: Traces UV/visibles spécifiques des différents adduits obtenus. Le motif *trans-1* est représenté par le composé **30**. Le motif *trans-3* est représenté par le composé **31**. Le motif *e* est représenté par le composé **40**. Le motif tetra-adduit *all-trans* est représenté par le composé **32**. Le motif penta-adduit (C<sub>2v</sub>) est représenté par le composé **37**.

Le produit **40** semble être un bon candidat pour obtenir un C<sub>60</sub> hexa-adduit avec deux zones topologiques différentes (Figure 5.26), une régio-sélectivité contrôlée et originale. De plus, le composé **40** est facilement synthétisable et le rendement de la cyclisation sur le C<sub>60</sub> suffisamment bon pour préparer des quantités conséquentes de ce produit. Dans le futur, des manipulations devront confirmer la possibilité de former un hexa-adduit. De plus les alcools pourraient être régénérés par action de HF.pyridine (voir prochaine partie), offrant des possibilités de post-fonctionnalisation.

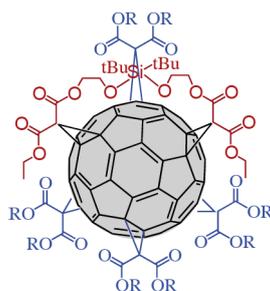


Figure 5.26: Répartition des fonctions en deux zones topologiques. Une troisième zone topologique peut être envisagée en remplaçant les éthyles par une autre fonctionnalité.

Dans la continuité de ce résultat préliminaire, l'élaboration d'un composé tris-adduit par l'aide d'un groupe directeur dérivé du composé **41** nous a semblé intéressante. En effet, un tris-adduit de  $C_{60}$  en position  $e, e, e$  peut permettre de créer des composés hexa-adduits multifonctionnels avec une répartition topologique originale. La prochaine partie développera donc la formation d'un dérivé tris-adduit et sa post-fonctionnalisation.

### III. Synthèse d'un dérivé tris-adduit de $C_{60}$ $e, e, e$ .

Suite aux résultats obtenus avec le  $C_{60}$  bis-adduit **40**, notre laboratoire s'est consacré au développement d'un  $C_{60}$  tris-adduit qui pourrait s'ajouter sur un modèle d'addition  $e, e, e$ . Ce modèle d'addition peut permettre potentiellement d'obtenir des  $C_{60}$  hexa-adduits avec une répartition topologique originale (Figure 5.27).

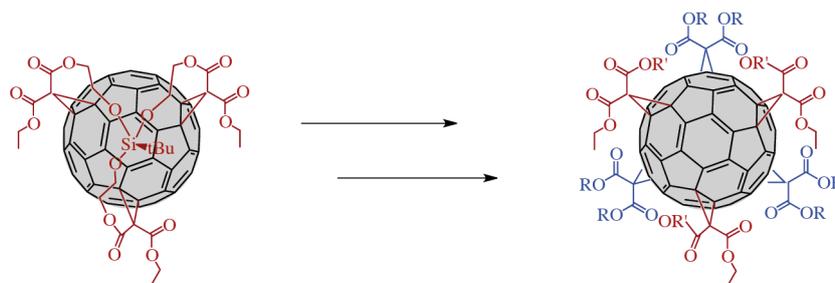


Figure 5.27: Groupe directeur permettant une répartition des fonctions en deux zones topologiques. Une troisième zone topologique peut être envisagée en remplaçant les éthyles par une autre fonctionnalité.

Le choix du groupe directeur repose sur une légère modification du composé **41**. En effet, le composé **41** permet d'avoir une addition équatoriale sur le  $C_{60}$ . Partant de ce constat et avec l'aide de la modélisation moléculaire, le composé **43**, semble être un bon candidat pour une addition  $e, e, e$  (Figure 5.28). Les alcools pourront être régénérés offrant une possibilité de post-fonctionnalisation.

Le produit **43** est donc obtenu en 2 étapes depuis les réactifs commerciaux. L'alcool **42** est en mis en réaction avec du *t*-BuSiCl<sub>3</sub> pour fournir le tripode **43** avec un rendement de 77%.

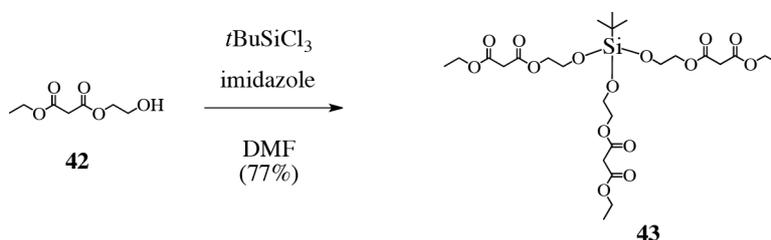


Figure 5.28: Synthèse du groupement directeur **43**.

Ce tripode a ensuite été mis en réaction avec du C<sub>60</sub>, à -15°C (le composé **43** se dégrade à température ambiante) (Figure 5.29). Deux composés ont été isolés: un de couleur rouge-cerise avec un rendement de 8% (**44**) et un autre de couleur marron avec un rendement de 20% (**45**), tous deux sous forme de mélange racémique.

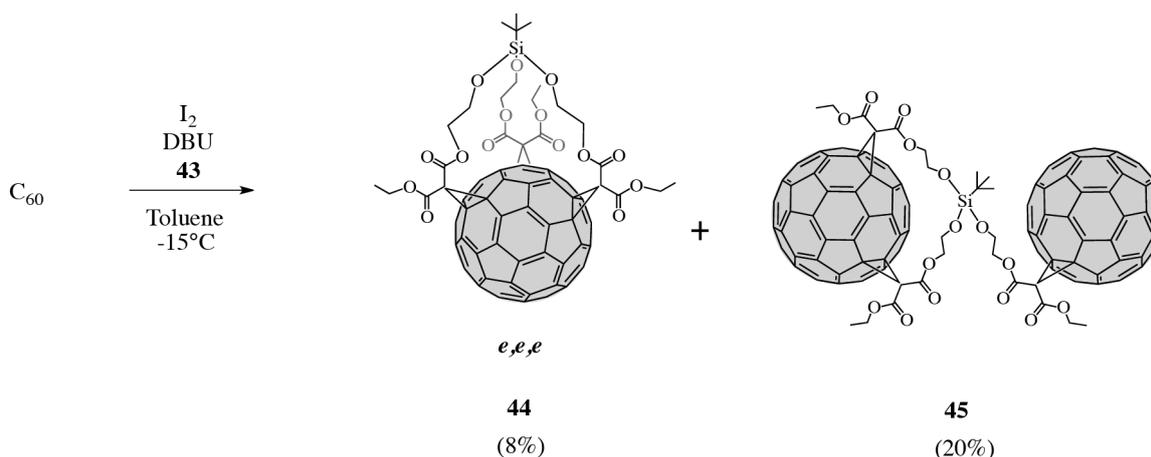


Figure 5.29: Synthèse des dérivés **44** et **45**.

Le composé **44** a été identifié comme étant un dérivé de C<sub>60</sub> tris-adduit d'addition *e, e, e*. La masse de l'ion moléculaire (MALDI-TOF) correspond à un dérivé tris-adduit. Ensuite, la symétrie C<sub>3</sub> de cette molécule est observée par RMN <sup>13</sup>C avec 18 signaux pour les carbones sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub>.<sup>26,27</sup> De plus, la couleur rouge-cerise est caractéristique d'un dérivé *e, e, e* (trace UV/visible spécifique). Finalement, des cristaux ont été obtenus par diffusion lente de *n*-pentane dans une solution de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> du composé **44** (Figure 5.30).

La structure RX de **44** confirme le modèle d'addition. Une chiralité inhérente à ce modèle d'addition fournit **44** sous forme d'un racémate. La maille de la structure étant centrosymétrique, les deux énantiomères y sont visibles.

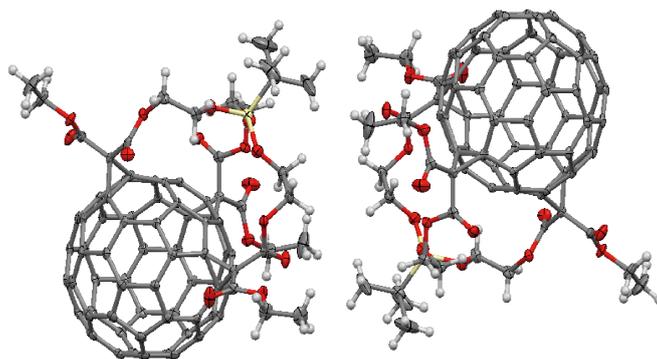


Figure 5.30: Représentation de la maille de la structure RX du composé **44**. Représentation ORTEP. Les ellipsoïdes représentent 50% de probabilité de densité électronique. Les hydrogènes ont été représentés avec un rayon fixé à 0,2 Å.

L'identité du composé **45** a dans un premier temps été établie par l'analyse du spectre de masse (MALDI-TOF) où le pic observé correspond à deux  $C_{60}$  et un tripode. Les mesures RMN n'ont cependant pas permis de déterminer la nature de la bis-addition à cause du recouvrement des signaux. Mais par analogie au composé **44**, l'addition *e* semble plausible et sera confirmée par la suite en post-fonctionnalisant cette molécule.

L'obtention de ces deux produits explique la sélectivité de la réaction. La seconde addition d'un malonate du tripode sur le  $C_{60}$  est déterminante pour la formation du composé **44** ou **45** (Figure 5.31). En effet, cette deuxième cyclopropanation fournit quatre diastéréoisomères avec un centre stéréogène sur le silicium et une chiralité non-inhérente au mode d'addition. Si le troisième malonate est orienté vers le  $C_{60}$ , alors l'addition de celui-ci sera intramoléculaire et donnera le composé **44**. Si le troisième malonate est orienté vers l'extérieur de la structure, l'addition sera intermoléculaire, les sites réactifs du premier  $C_{60}$  n'étant plus accessibles et le composé **45** sera obtenu.

Malheureusement la réaction favorise le produit **45**. Peut-être parce que la formation des intermédiaires réactionnels bis-adduits avec le groupe *t*-Butyle dirigé vers le  $C_{60}$  est favorisée par une interaction hydrophobe entre le *t*-Butyle et la sphère de carbone.

Pour confirmer l'addition équatoriale du  $C_{60}$  bis-adduit de **45**, les alcools ont été déprotégés avec HF.pyridine. Une CCM montre la formation de deux produits, cependant la solubilité de ceux-ci est trop faible pour obtenir une bonne caractérisation. En parallèle, le  $C_{60}$  tris-adduit **44** a aussi été déprotégé par action de HF.pyridine et totalement caractérisé (voir partie expérimentale).

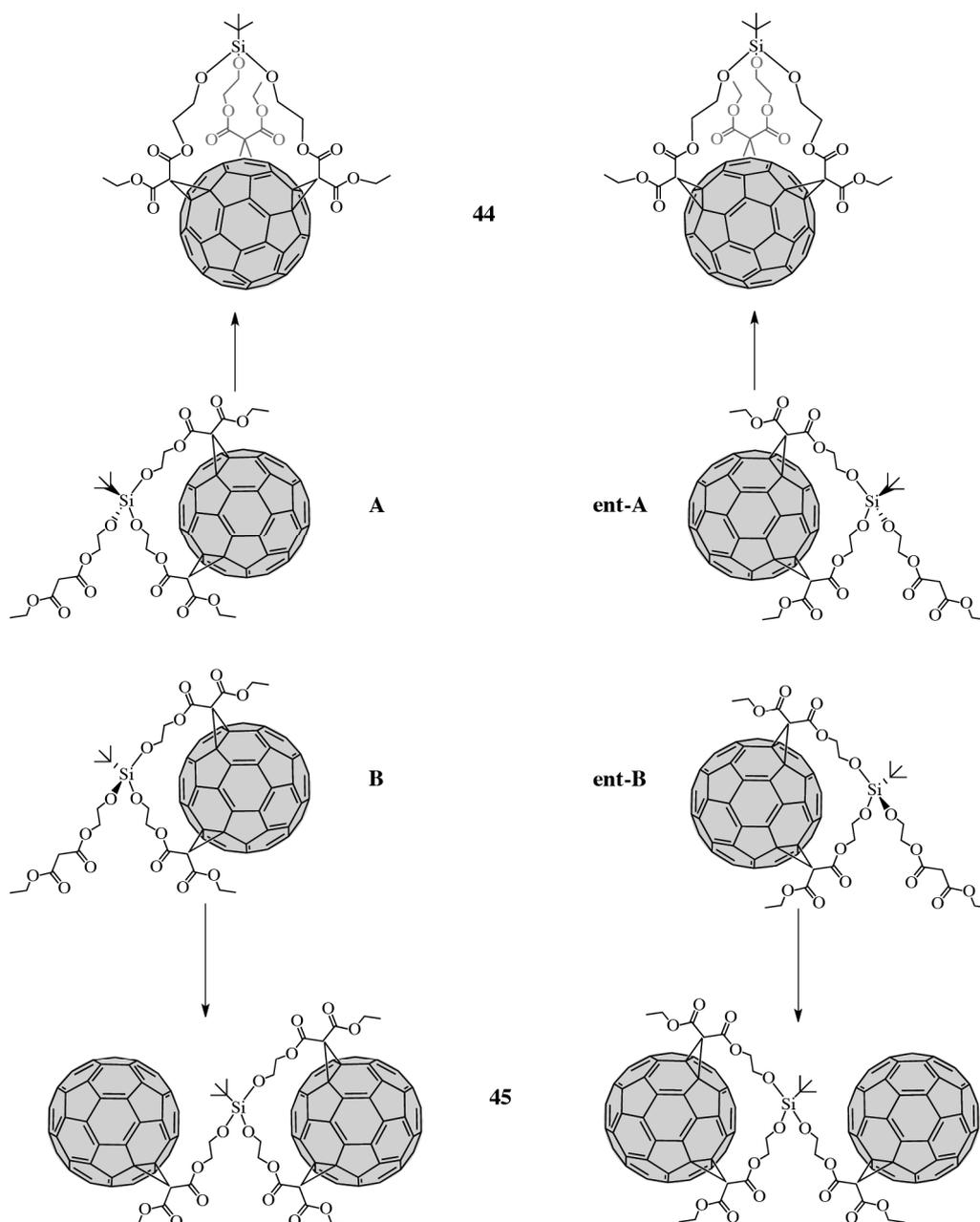


Figure 5.31: Schéma représentant les 4 diastéréoisomères intermédiaires qui conduisent à la formation des composés **44** et **45**, sous forme de racémates.

Ainsi, les alcools peuvent être engagés dans une post-fonctionnalisation par estérification, par exemple. Pour prouver ce concept, les composés **44** et **45** ont été déprotégés par HF.pyridine, filtrés sur silice puis directement mis en réaction avec du chlorure de 4-(dodecyloxy) benzoyle (Figure 5.32), la longue chaîne alkyle de ce réactif permettra de fournir une bonne solubilité aux produits. Ainsi, le tris-adduit **44** a été tri-estérifié pour donner la molécule **48**, sous forme d'un mélange racémique, avec un rendement de 55% sur les deux étapes (91% par réaction). Le composé **45** a fourni deux composés: mono-adduit **46** (55%) et bis-adduit **47** (66%, 90% par réaction), sous forme d'un mélange racémique.

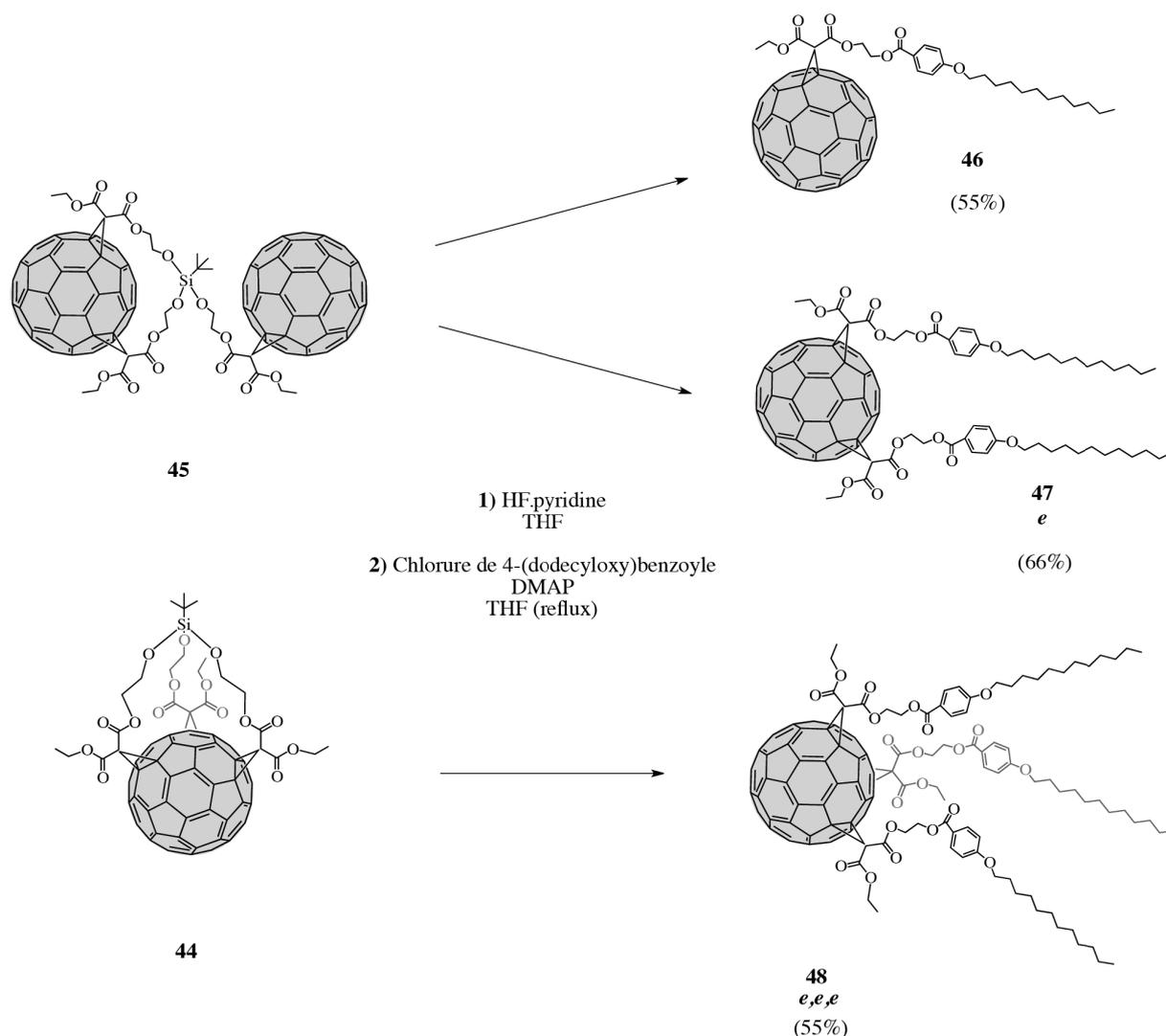
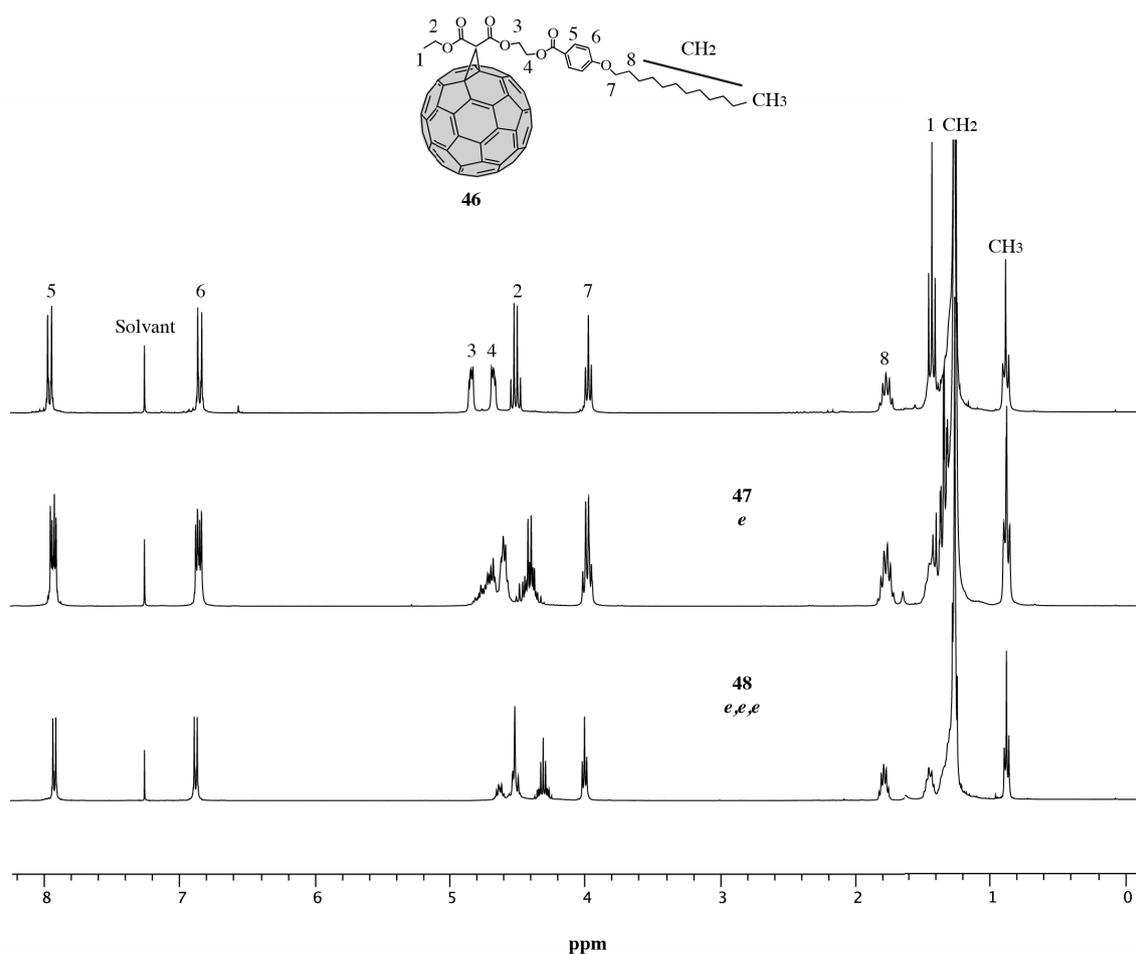
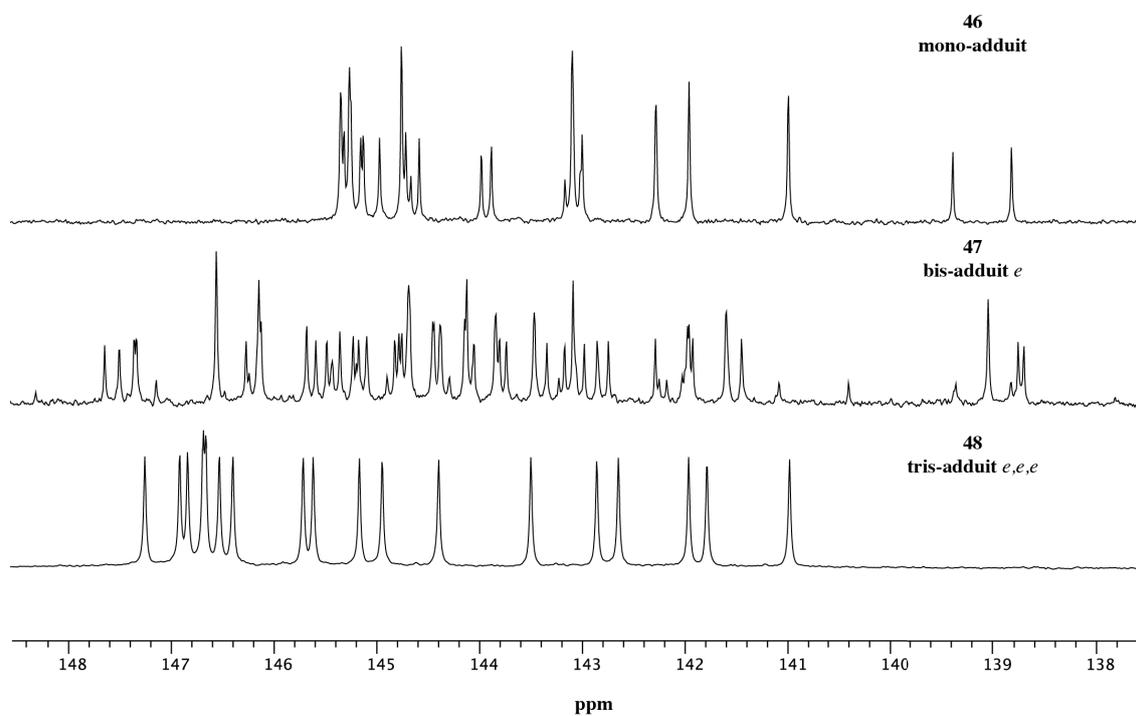


Figure 5.32: Schéma de synthèse des composés **46**, **47** et **48**. Le rendement est donné sur les deux étapes (déprotection/estérification).

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a confirmé la mono, bis et tri-addition de chacun des produits. L'analyse UV/visible a permis de déterminer avec certitude l'addition *e* du composé **47** et par déduction l'addition également *e* du composé **45**. La RMN  $^1\text{H}$  confirme la symétrie de la molécule tris-adduite **48** et la perte de symétrie de la molécule bis-adduite **47** (Figure 5.33). Ainsi, tous les protons aromatiques *ortho* et *mé*ta du composé **48** sortent sous la forme de deux doublets et tous les protons des carbones en position phénoliques se présentent sous la forme d'un triplet. Pour le bis-adduit **47**, les deux cycles aromatiques ne sont plus équivalents et cela se traduit par la présence de quatre doublets pour les hydrogènes aromatiques. Le même diagnostic est fait pour les protons des deux carbones en position phénolique qui se présentent sous la forme de deux triplets.


 Figure 5.33: Spectres RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) des composés **46**, **47** (300 Mhz) et **48** (400 Mhz).

 Figure 5.34: Carbones sp<sup>2</sup> du C<sub>60</sub> des composés **46**, **47** et **48** (RMN <sup>13</sup>C, CDCl<sub>3</sub>, 75 Mhz et 100 Mhz pour **48**).

Enfin, l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  conforte ces observations. Notamment la région de 138 à 148 ppm indique la présence des 56 signaux des carbones  $\text{sp}^2$  du  $\text{C}_{60}$  du dérivé bis-adduit **47** prouvant une perte de symétrie (Figure 5.34). En opposition, le dérivé tris-adduit **48** conserve les 18 résonances caractéristiques d'un motif *e, e, e*.

En définitive, cette partie a démontré la possibilité d'obtenir trois composés à partir d'un tripode unique, dont deux avec des additions contrôlées sur le  $\text{C}_{60}$  où une synthèse par étape ne pourrait pas procurer ces produits. La possibilité de moduler les produits obtenus notamment au niveau des alcools peut permettre de fournir une diversité de composés rapidement et simplement.

De plus les dérivés bis et tris-adduits d'addition *e, e, e* peuvent permettre d'aller plus en avant dans la fonctionnalisation du  $\text{C}_{60}$  et donc fournir des dérivés hexa-adduits multifonctionnels avec une répartition topologique inédite (Figure 5.27). Le développement de composés complexes dérivés du  $\text{C}_{60}$ , à partir de ces résultats est actuellement en cours au laboratoire.

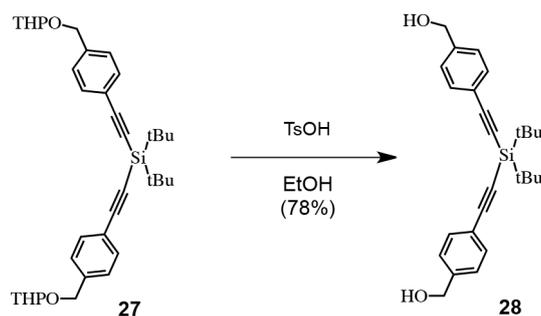
## IV. Conclusion

Ce chapitre a été consacré au développement de méthodologie pouvant former de manière sélective des régio-isomères du  $\text{C}_{60}$ . Dans un premier temps, le bis-adduit *trans-1* a été ciblé. Ce bis-adduit a permis d'obtenir des composés multi-adduits régio-sélectivement. Cependant cet isomère n'est pas le plus simple à obtenir et notre attention s'est alors tournée vers l'obtention du régio-isomère *e* dont la réaction semble être plus favorable. Ainsi, un régio-isomère *e* a pu être obtenu facilement avec un bon rendement, ouvrant la voie au développement de composés originaux à partir de ce précurseur. Dans la même philosophie, un composé tris-adduit *e, e, e* a été synthétisé et peut permettre aussi de créer des composés originaux.

Ainsi, les stratégies de synthèse développées dans ce chapitre pavent la voie aux développements de nouveaux groupes directeurs à base de silicium pouvant cibler d'autres positions sélectivement ou encore à la formation de dérivés de  $\text{C}_{60}$  multi-adduits, polyfonctionnalisables.

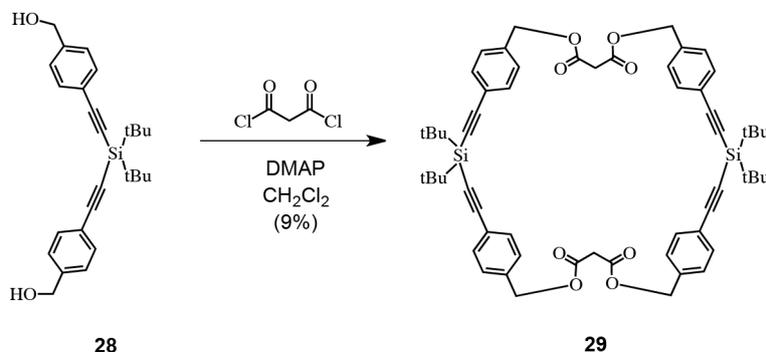


## Preparation of compound **28**



A mixture of **27** (2.056 g, 3.92 mmol) and *p*TsOH (372 mg, 1.96 mmol) in EtOH (600 mL) was stirred overnight. Then the pH of the mixture was neutralized with NaHCO<sub>3</sub>, filtered through a short plug of Celite and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 8:2) gave **28** (1.241 g, 78%). White solid. IR (neat): 3309 (OH), 2151 (C≡C). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.50 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.30 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 4.68 (s, 4H), 1.20 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 141.6, 132.5, 126.8, 122.4, 106.8, 88.7, 65.0, 28.0, 19.9.

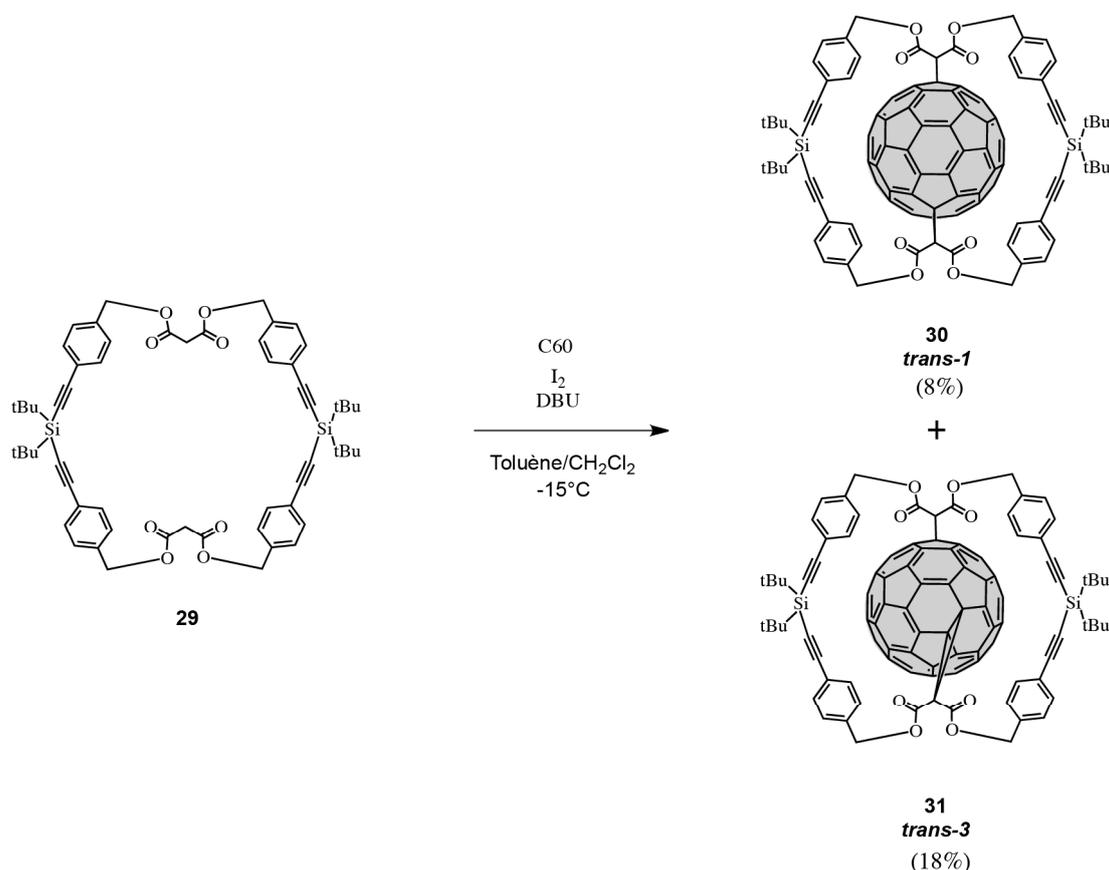
## Preparation of compound macrocycle **29**



A solution of DMAP (490 mg, 4.01 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90 mL) was added dropwise to a stirred solution of **28** (610 mg, 1.51 mmol) and malonyl chloride (0.16 mL, 1.64 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (750 mL) at room temperature. After 12 h, the mixture was filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:8) gave **29** (135 mg, 9%). Colorless solid. Crystals suitable for X-ray crystal-structure analysis were obtained by slow diffusion of *n*-pentane into a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution of **29**. IR (neat): 2164 (C≡C), 1733 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.48 (d, *J* = 8 Hz, 8H), 7.21 (d, *J* = 8 Hz, 8H), 5.12 (s, 8H), 3.47 (s, 4H), 1.22 (s, 36). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.0, 135.8, 132.4, 128.2, 123.3, 106.4, 89.4, 66.8, 41.9, 28.0, 19.9. MS (MALDI-TOF): 945.5 (100%,

[M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>58</sub>H<sub>64</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub>: 945.3), 887.5 (63%, [M-*t*Bu]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>54</sub>H<sub>55</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub>: 888.2), 841.6 (23%, [M-C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-2H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>55</sub>H<sub>60</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>: 841.2), 805.4 (6%, [M-Si(*t*Bu)<sub>2</sub>+2H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>50</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>1</sub>: 805.0).

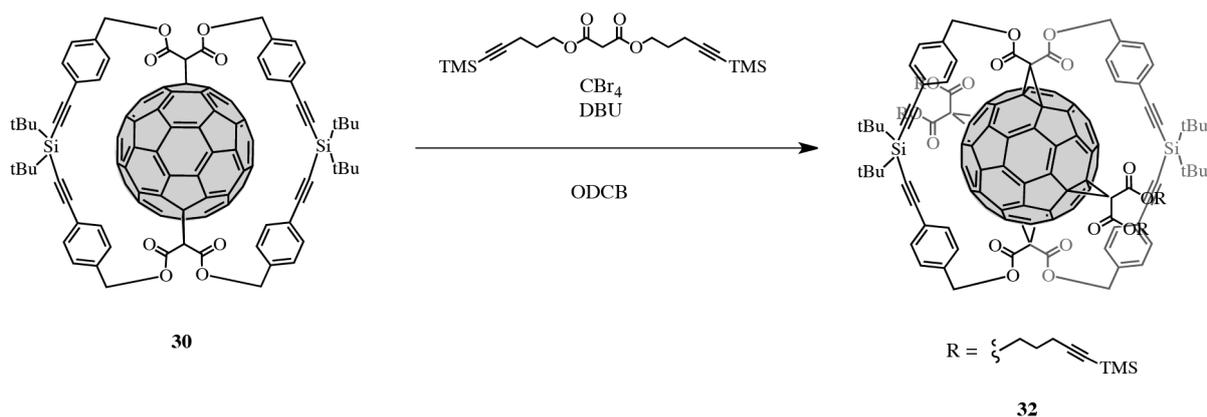
### Preparation of compounds *trans-1* **30** and *trans-3* **31**



DBU (0.16 mL, 1.06 mmol) was added to a stirred solution of C<sub>60</sub> (156 mg, 0.22 mmol), I<sub>2</sub> (138 mg, 0.54 mmol) and **29** (205 mg, 0.22 mmol) in a mixture of toluene (312 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) at -15°C. The resulting solution was stirred for 1 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, toluene/cyclohexane 6:4) gave *trans-1* **30** (30 mg, 8%) and *trans-3* **31** (66 mg, 18%) (racemic mixture). **Trans-1 30**: Green-brown solid. Crystals suitable for X-ray crystal-structure analysis were obtained by slow evaporation of a CS<sub>2</sub>/CHCl<sub>3</sub> solution of *trans-1 30*. IR (neat): 2160 (C≡C), 1732 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 246 (100500), 256 (105900), 327 (24000), 410 (sh, 2800), 442 (1900), 471 (2500). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.47 (d, *J* = 8 Hz, 8H), 7.36 (d, *J* = 8 Hz, 8H), 5.58 (s, 8H), 1.13 (s, 36). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.7, 144.7, 144.2, 144.1, 143.3, 142.2, 140.9, 138.2, 134.9, 132.5, 131.3, 125.0, 106.0, 90.3, 69.7, 69.3, 43.6, 28.1, 27.9, 20.0. MS (MALDI-TOF): 1661.4 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>118</sub>H<sub>60</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub>: 1661.9).

**Trans-3 31:** Brown solid. IR (neat): 2160 (C≡C), 1727 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 252 (155700), 272 (sh, 97400), 320 (sh, 30400), 380 (7900), 411 (3400), 422 (2700), 488 (2400), 580 (sh, 800), 638 (sh, 300), 688 (200). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.44 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.37 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.33 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.27 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 5.60 (d, *J* = 11 Hz, 2H), 5.57 (d, *J* = 11 Hz, 2H), 5.34 (d, *J* = 11 Hz, 2H), 5.15 (d, *J* = 11 Hz, 2H), 1.12 (s, 18H), 1.11 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.0, 162.7, 146.6, 146.4 (two peaks), 146.2, 145.8, 145.7, 145.5, 145.2, 145.0, 144.6, 144.4, 144.3, 144.2, 144.1, 143.6, 143.2 (two peaks), 143.1, 143.0, 142.3, 142.0, 141.7, 141.4, 141.1, 139.9, 138.3, 136.8, 134.9, 134.7, 132.4, 132.0, 130.8, 130.6, 124.7, 124.5, 106.4 (two peaks), 90.7, 90.4, 71.3, 70.9, 69.2, 69.1, 51.9, 28.0, 27.9, 19.3. MS (MALDI-TOF): 1660.4 (100%, [M-H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>118</sub>H<sub>59</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub>: 1660.9).

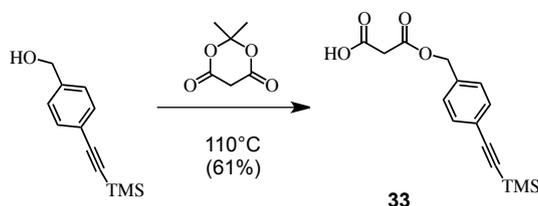
### Preparation of compounds *all-trans* 32



DBU (0.1 mL, 0.66 mmol) was added to a stirred solution of **30** (28 mg, 17  $\mu$ mol), CBr<sub>4</sub> (518 mg, 1.56 mmol) and **dialkynylTMS malonate** (96 mg, 0.25 mmol) in ODCB (7 mL) at room temperature. The resulting solution was stirred for 72 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and evaporated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:8) gave **32** (20 mg, 49%). Bronze solid. Crystals suitable for X-ray crystal-structure analysis were obtained by slow diffusion of acetonitrile into a 1,2 DCE solution of **32**. IR (neat) 2167 (C≡C), 1742 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 251 (99000), 274 (sh, 57600), 292 (sh, 29500), 319 (23700), 357 (sh, 10900), 409 (sh, 2500), 428 (sh, 2000), 451 (2000), 626 (100). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.25 (d, *J* = 8 Hz, 8H), 7.11 (d, *J* = 8 Hz, 8H), 5.40 (s, 8H), 4.55 (t, *J* = 7 Hz, 8H), 2.45 (t, *J* = 7 Hz, 8H), 7.07 (m, 8H), 1.03 (s, 36H), 0.18 (s, 36H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.1, 163.8, 144.8, 144.0, 143.4, 142.1, 141.8, 141.0, 140.6, 134.7, 132.2, 131.2, 124.4, 105.9, 105.1, 90.0, 86.0, 71.1, 69.4, 69.1, 65.9, 46.6, 44.0, 27.9, 27.5, 19.5, 16.5,

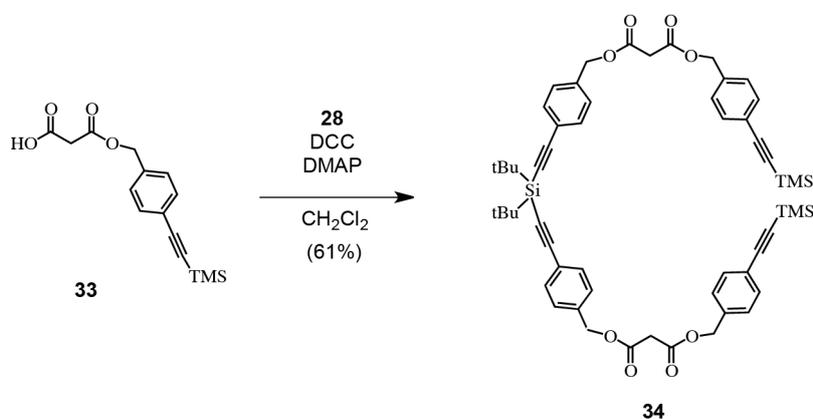
0.2. MS (MALDI-TOF): 2435.5 (59%, [M+OH]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>156</sub>H<sub>121</sub>O<sub>17</sub>Si<sub>6</sub>: 2436.1), 2418.5 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>156</sub>H<sub>120</sub>O<sub>16</sub>Si<sub>6</sub>: 2419.1).

### Preparation of compounds **33**



A mixture of 4-(trimethylsilylethynyl)benzyl alcohol (3.673 g, 17.97 mmol) and *Meldrum's acid* (3.886 g, 26.96 mmol) was heated at 110°C for 2 h. After cooling, SiO<sub>2</sub> was added and the mixture was dried under vacuum. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/AcOEt/AcOH 80/20/1) gave **33** (3.162 g, 61%). Waxy yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.46 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 5.18 (s, 2H), 3.48 (s, 2H), 0.25 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 171.4, 166.5, 135.3, 132.3, 128.2, 123.6, 104.6, 95.1, 67.2, 41.0, 0.1.

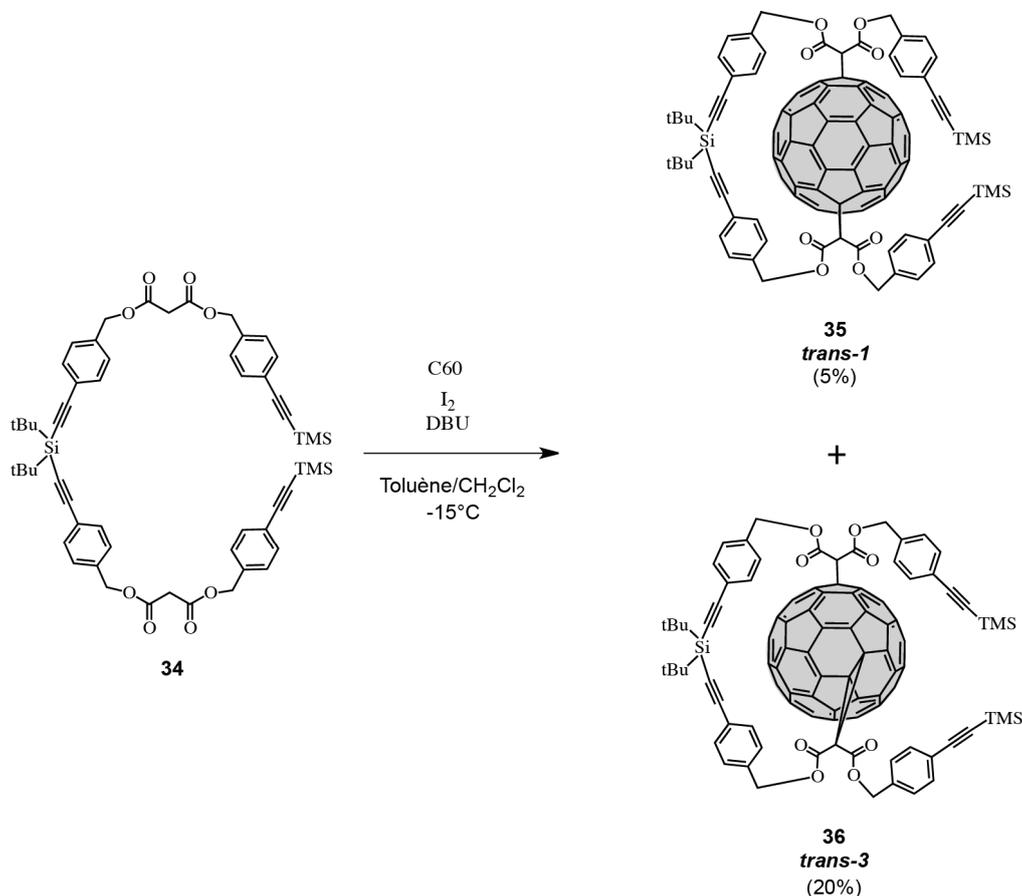
### Preparation of compounds **34**



DCC (858 mg, 4.16 mmol) was added to a stirred solution of **33** (1.2 g, 4.15 mmol), **28** (561 mg, 1.39 mmol) and DMAP (508 mg, 4.15 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) at 0°C. After 1 h, the mixture was allowed to slowly warm to room temperature (within 1 h), then stirred for 12 h, filtered and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:8) yielded **34** (1.68 g, 76 %). Waxy colorless solid. IR (neat): 2158 (C≡C), 1750 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.50 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.45 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.29-7.24 (m, 8H), 5.15 (s, 4H), 5.14 (s, 4H), 3.47 (s, 4H), 1.20 (s, 18H), 0.25 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz,

CDCl<sub>3</sub>): 166.2, 135.9, 135.6, 132.5, 132.3, 128.2 (two peaks), 123.5, 123.4, 106.5, 104.7, 95.1, 89.3, 67.0, 66.9, 41.6, 28.0, 19.9, 0.1.

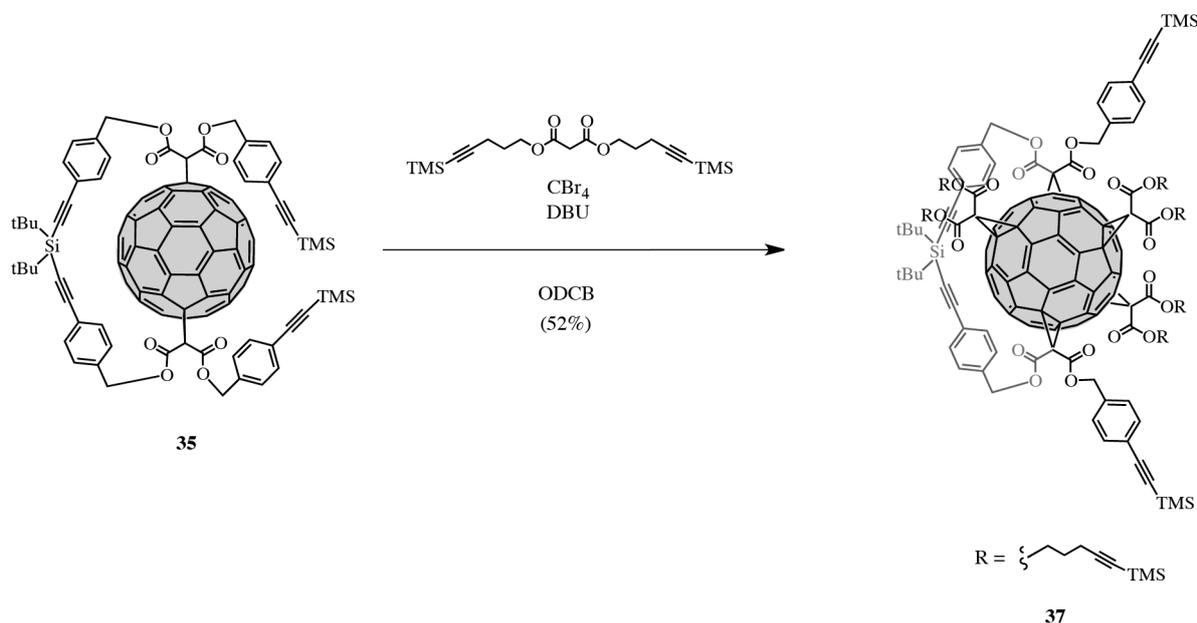
### Preparation of compounds *trans-1* **35** and *trans-3* **36**



DBU (0.39 mL, 2.57 mmol) was added to a stirred solution of C<sub>60</sub> (510 mg, 0.71 mmol), I<sub>2</sub> (138 mg, 1.27 mmol) and **34** (484 mg, 0.51 mmol) in toluene (1 L) at -15°C. The resulting solution was stirred for 1 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, toluene/cyclohexane 7:3) gave *trans-1* **35** (50 mg, 5%) and *trans-3* **36** (239 mg, 20%) (racemic mixture). **Trans-1 35**: Green-brown solid. IR (neat): 2160 (C≡C), 1749 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 253 (127200), 265 (sh, 101900), 415 (sh, 2700), 429 (1600), 439 (1500), 469 (2600). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.56 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.52 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.49 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.37 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 5.60 (s, 4H), 5.55 (s, 4H), 1.14 (s, 18H), 0.27 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.0, 163.7, 145.4, 145.3, 145.0, 144.9, 144.6, 144.4, 143.7 (two peaks), 143.5, 143.4, 142.9, 142.2, 141.2, 141.0, 140.4, 137.6, 135.1 (two peaks), 132.5, 132.4, 132.2, 131.4, 128.8, 128.5, 128.4, 124.8, 123.9, 106.0, 104.6, 95.4, 90.2, 70.0, 69.0, 68.6, 45.1, 27.9, 19.6, 0.1. MS (MALDI-TOF): 1729.2 (37%, [M+2 O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>116</sub>H<sub>60</sub>O<sub>12</sub>Si<sub>3</sub>: 1730.0), 1665.3 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for

C<sub>116</sub>H<sub>60</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>3</sub>: 1666.0). **Trans-3 36**: Brown solid. IR (neat): 2160 (C≡C), 1749 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 253 (198500), 265 (sh, 156400), 411 (4000), 422 (3000), 488 (2600), 580 (1100), 630 (500), 690 (100). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.56-7.14 (m, 16H), 5.74 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.70 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 5.46 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.04 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 1.13 (s, 18H), 0.26 (s, 9H), 0.25 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.3, 163.1, 163.0, 162.7, 147.2, 147.0, 146.6, 146.4, 146.3, 146.2, 146.1, 146.0, 145.6, 145.3, 145.2, 145.1, 145.0, 144.8, 144.7 (two peaks), 144.6, 144.3, 144.1, 144.0, 143.6, 143.4 (two peaks), 143.3, 143.2, 143.1, 143.0 (two peaks), 142.7, 142.3 (two peaks), 141.7 (two peaks), 141.5, 141.4 (two peaks), 140.3, 140.0, 139.5, 137.9, 136.2, 134.9 (three peaks), 134.8, 132.3, 132.2, 131.9, 131.0, 130.5, 129.1, 128.3 (three peaks), 125.3, 124.6, 124.4, 123.7 (two peaks), 106.3 (two peaks), 104.5, 95.3, 95.2, 90.5, 90.3, 71.4, 71.0, 70.9, 70.6, 68.8, 68.5, 68.3, 68.2, 50.9, 50.6, 28.0, 27.9, 19.2, 0.1. MS (MALDI-TOF): 1729.2 (5%, [M+2 O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>116</sub>H<sub>60</sub>O<sub>12</sub>Si<sub>3</sub>: 1730.0), 1665.3 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>116</sub>H<sub>60</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>3</sub>: 1666.0).

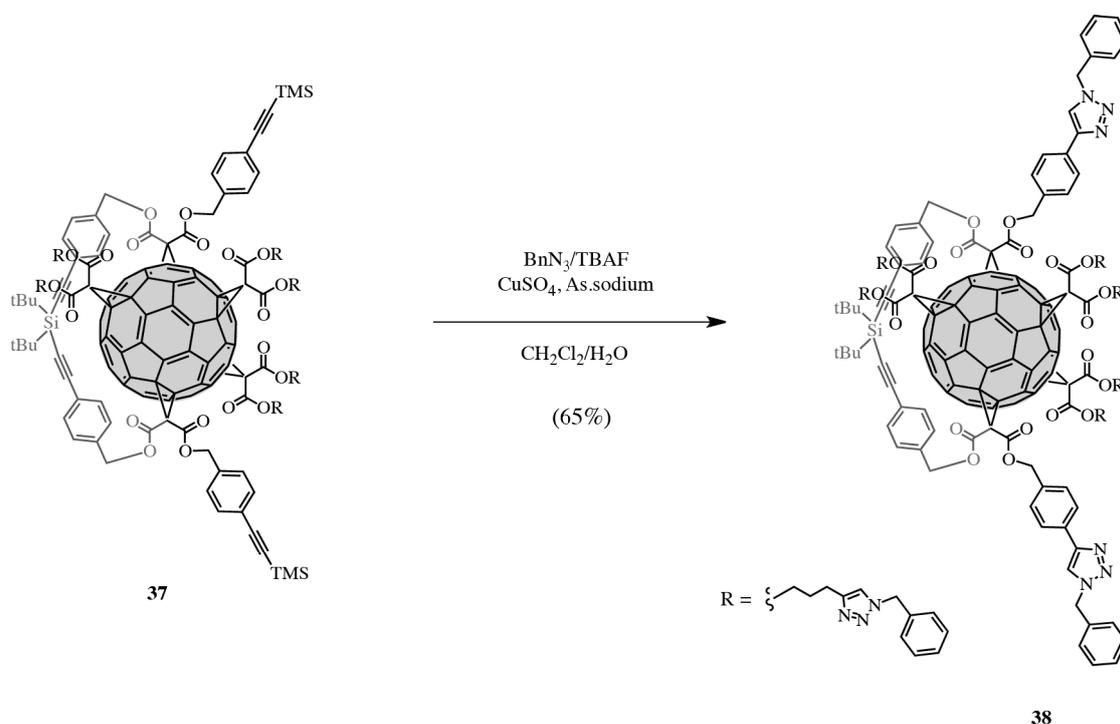
### Preparation of compound penta-adduct 37



DBU (0.14 mL, 0.56 mmol) was added to a stirred solution of **35** (47 mg, 28  $\mu$ mol), CBr<sub>4</sub> (933 mg, 2.82 mmol) and **dialkynylTMS malonate** (107 mg, 0.28 mmol) in ODCB (6 mL) at room temperature. The resulting solution was stirred for 72 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **37** (41 mg, 52%). Orange glassy product. IR (neat) 2175 (C≡C), 1747 (C=O). UV/Vis

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 254 (171600), 264 (143700), 327 (sh, 37000), 500 (1700), 514 (sh, 1600), 535 (1500), 550 (sh, 1200). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.50 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.35 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.30 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 7.27 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 5.32 (s, 4H), 5.30 (s, 4H), 4.42 (m, 8H), 4.27 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 2.37 (t, *J* = 7 Hz, 8H), 2.25 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 1.97 (m, 8H), 1.83 (m, 4H), 1.13 (s, 18H), 0.26 (s, 18H), 0.16 (s, 36H), 0.12 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.8 (two peaks), 163.7 (two peaks), 163.2, 148.2, 147.3, 146.4, 145.8, 144.8, 144.4, 143.8, 143.0, 142.9 (two peaks), 141.8, 139.6, 138.8, 135.1, 135.0, 132.4, 132.3 (two peaks), 131.3, 128.1, 124.5, 123.6, 106.2, 105.4, 105.3 (two peaks), 104.8, 95.1, 90.1, 86.0, 85.8, 69.7, 69.5, 69.3, 69.0, 68.6, 68.0, 65.8, 65.6, 46.5, 45.5, 44.2, 28.0, 27.8, 27.6, 19.6, 16.8, 16.6, 0.3, 0.2, 0.1. (MALDI-TOF): 2801.6 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>173</sub>H<sub>150</sub>O<sub>20</sub>Si<sub>9</sub>: 2801.8).

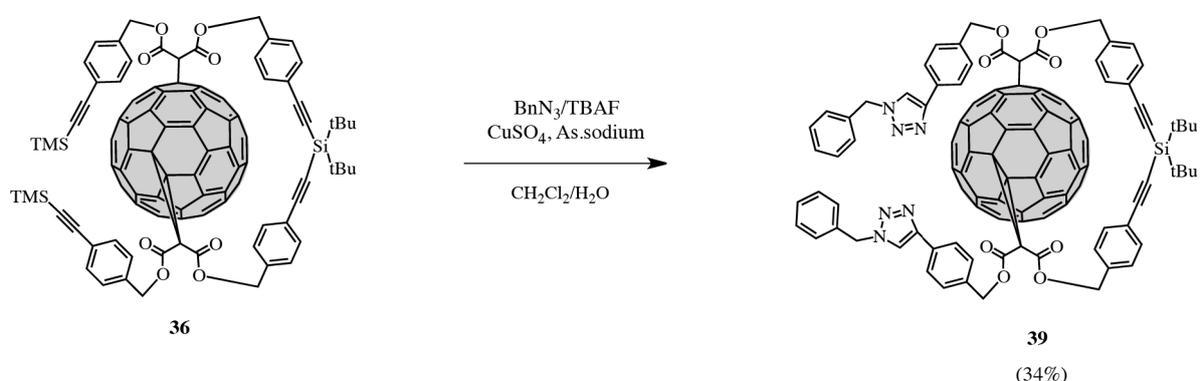
### Preparation of compound **38**



A 1.0 M solution of TBAF in THF (0.16 mL, 0.16 mmol) was added to a vigorously stirred mixture of **37** (38 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ), benzyl azide (20  $\mu\text{L}$ , 168  $\mu\text{mol}$ ), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 mg, 6  $\mu\text{mol}$ ) and sodium ascorbate (3 mg, 15  $\mu\text{mol}$ ) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (4 mL, 1:1) at room temperature. After 2 days, the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with water, dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **38** (30 mg, 65%). Orange glassy product. IR (neat) 2154 (C≡C), 1734 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 254 (112200), 327 (sh, 25300), 500 (1200), 514 (sh, 1100), 535 (1100), 550 (sh,

800). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.79 (s, 8H), 7.32 (m, 56H), 5.48 (m, 16H), 5.27 (m, 8H), 4.35 (m, 8H), 4.21 (m, 4H), 2.80 (m, 12H), 2.12 (m, 12H), 1.12 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.9, 163.8, 163.7, 163.6, 163.2, 148.2, 147.8, 147.1, 147.0, 146.9, 146.4, 145.7, 144.8, 144.2, 143.8 (two peaks), 143.0, 142.9, 141.7, 139.7, 139.0, 135.1, 134.9, 134.8, 134.4, 132.2, 131.3, 131.1, 129.4, 129.2, 129.0, 128.9, 128.8, 128.4, 128.3, 126.2, 124.4, 122.5, 120.7, 106.1, 90.1, 69.8, 69.5, 69.4, 69.0, 68.7, 68.5, 66.7, 54.8, 54.2, 53.6, 45.7, 44.4, 29.8, 28.6, 27.9, 27.6, 22.7, 19.6. (MALDI-TOF): 3290.0 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>205</sub>H<sub>142</sub>N<sub>24</sub>O<sub>20</sub>Si<sub>1</sub>: 3289.6).

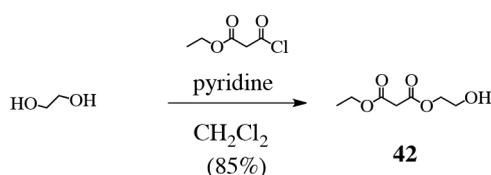
### Preparation of compound **39**



A 1.0 M solution of TBAF in THF (0.08 mL, 0.08 mmol) was added to a vigorously stirred mixture of **36** (67 mg, 36 μmol), benzyl azide (12 μL, 72 μmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1 mg, 6 μmol) and sodium ascorbate (3 mg, 15 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (4 mL, 1:1) at room temperature. After 2 days, the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with water, dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98.5:1.5) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **39** (24 mg, 34%) (racemic mixture). Brown glassy product. IR (neat): 2161 (C≡C), 1746 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 252 (129300), 320 (sh, 27100), 412 (2500), 422 (2100), 488 (1700), 580 (sh, 700), 630 (sh, 300), 690 (100). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.86 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.45-7.28 (m, 18H), 5.73 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.70 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.59 (s, 2H), 5.57 (s, 2H), 5.57 (d, *J* = 12 Hz, 1H, overlap), 5.48 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.39 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.05 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 1.13 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.5 (two peaks), 163.4, 163.0, 147.9 (two peaks), 147.4, 147.3, 147.1, 147.0, 146.8, 146.6, 146.5 (three peaks), 146.4 (two peaks), 146.3, 145.8 (two peaks), 145.5, 145.4, 145.3, 145.2, 145.1 (two peaks), 145.0 (three peaks), 144.9, 144.8 (two peaks), 144.5, 144.4 (two

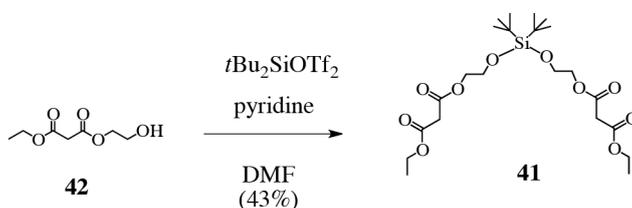
peaks), 14.1, 143.9, 143.8, 143.6, 143.5 (three peaks), 143.4 (two peaks), 143.3, 143.2 (three peaks), 142.9, 142.6, 142.5, 141.9 (two peaks), 141.7, 141.6, 141.5, 140.6, 140.2, 140.1 (two peaks), 139.6, 138.1, 135.1, 135.0, 134.8 (two peaks), 134.7, 132.5, 132.1, 131.4 (two peaks), 131.2, 130.7, 129.5, 129.4, 129.1, 128.3, 126.3, 126.2, 124.8, 124.6, 120.0 (two peaks), 106.5 (two peaks), 90.8, 90.6, 71.7, 71.2 (two peaks), 70.9, 69.0, 68.8 (two peaks), 68.7, 54.5, 51.4, 51.0, 29.9, 28.1, 28.0, 19.5. MS (MALDI-TOF): 1789.4 (100%,  $[M+H]^+$ , calcd for  $C_{124}H_{58}N_6O_8Si_1$ : 1788.9).

### Preparation of compound **42**



Ethyl malonyl chloride (4.20 mL, 33.2 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80 mL) was added dropwise to a stirred solution of ethylene glycol (41 g, 661 mmol) and pyridine (3.28 mL, 40.6 mmol) at  $0^\circ\text{C}$ . After 1 h, the mixture was allowed to slowly warm to room temperature (within 1 h), then stirred for 12 h and evaporated. Column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  8:2) yielded **42** (5 g, 85%). Colorless oil. IR (neat): 3447 (OH), 1746 (C=O).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.29 (t,  $J = 5$  Hz, 2H), 4.20 (q,  $J = 7$  Hz, 2H), 3.82 (q,  $J = 5$  Hz, 2H), 3.42 (s, 2H), 2.43 (t,  $J = 5$  Hz, 1H), 1.27 (t,  $J = 7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 166.8, 166.6, 66.8, 61.7, 60.5, 41.3, 13.9.

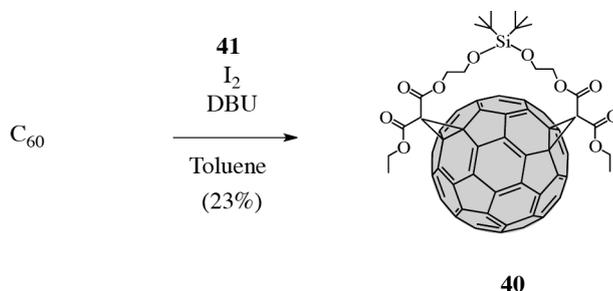
### Preparation of compound **41**



Di-*tert*-butylsilyl bis(trifluoromethanesulfonate) (0.8 mL, 2.47 mmol) was added to a stirred solution of **42** (1.136 g, 6.45 mmol) and pyridine (0.52 mL, 6.44 mmol) in anhydrous DMF (5 mL), at room temperature. The mixture was stirred for 12 h and concentrated. Column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  9:1) yielded **41** (529 mg, 43%). Colorless oil. IR (neat): 1733 (C=O).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.27 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 4.20 (q,  $J = 7$  Hz,

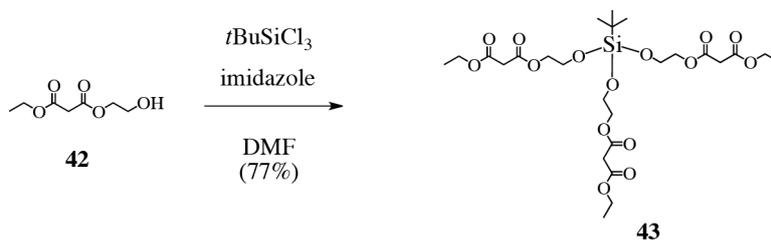
4H), 4.04 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 3.38 (s, 4H), 1.28 (t,  $J = 7$  Hz, 6H), 1.00 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.7, 166.5, 66.7, 61.8, 61.7, 60.5, 41.6, 27.8, 21.3, 14.2.

### Preparation of compound 40



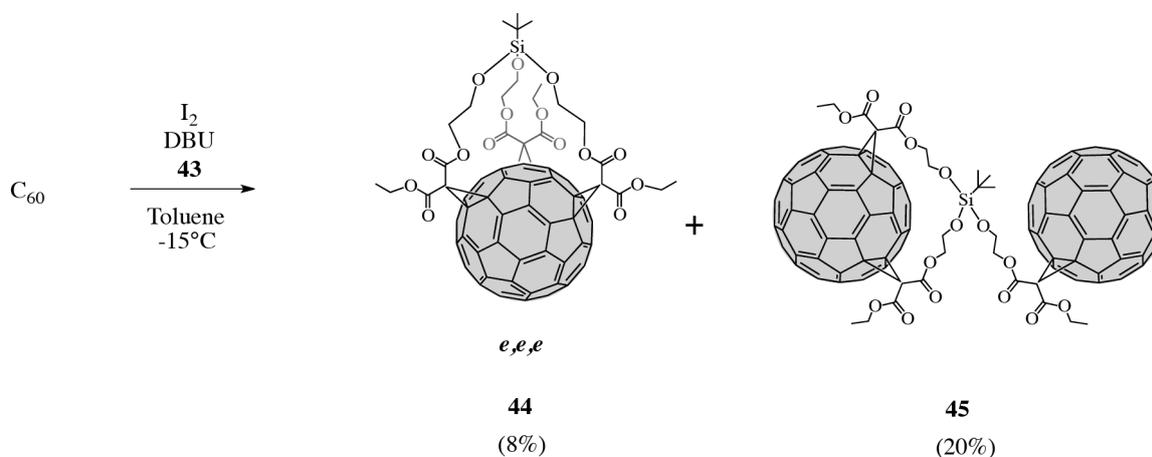
DBU (0.27 mL, 1.08 mmol) was added to a stirred solution of C<sub>60</sub> (155 mg, 0.22 mmol), I<sub>2</sub> (137 mg, 0.54 mmol) and **41** (106 mg, 0.22 mmol) in toluene (310 mL) at room temperature. The resulting solution was stirred for 1 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (toluene) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, cyclohexane/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:6) gave **40** (59 mg, 23%) (racemic mixture). Dark brown solid. IR (neat): 1744 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 251 (89000), 310 (sh, 34800), 368 (sh, 9900), 398 (sh, 3900), 410 (sh, 2500), 421 (2400), 479 (2700). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.77 (m, 1H), 4.58-3.99 (m, 10H), 3.89 (m, 1H), 1.44 (t,  $J = 7$  Hz, 6H), 1.09 (s, 9H), 0.94 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.0, 163.6, 163.5, 163.1, 148.7, 147.4 (two peaks), 146.6 (two peaks), 146.5, 146.4, 146.3, 146.2 (two peaks), 145.8, 145.6 (two peaks), 145.5, 145.4 (two peaks), 145.3, 145.1 (two peaks), 145.0, 144.9, 144.8 (two peaks), 144.7 (two peaks), 144.6, 144.4 (two peaks), 144.2, 144.1 (two peaks), 143.9 (two peaks), 143.8, 143.7, 143.6 (two peaks), 143.5, 143.2, 143.1, 142.2, 142.1, 142.0, 141.8, 141.6, 141.5, 140.6, 140.4, 140.0, 139.8, 139.0, 138.6, 71.7, 70.4, 68.1, 66.7, 63.6, 63.5, 62.4, 60.8, 53.8, 51.2, 28.1, 27.7, 21.8, 21.4, 14.3 (two peaks). MS (MALDI-TOF): 1243.2 (8%, [M+O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>82</sub>H<sub>37</sub>O<sub>12</sub>Si: 1242.3), 1226.2 (26%, [M+O]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>82</sub>H<sub>37</sub>O<sub>11</sub>Si: 1226.3), 1210.2 (100%, [M+H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>82</sub>H<sub>37</sub>O<sub>10</sub>Si: 1210.3), 1164.7 (21%, [M-OEt]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>80</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub>Si: 1165.2).

### Preparation of compound 43



*Tert*-butyl trichlorosilane (621 mg, 3.24 mmol) was added to a stirred solution of **42** (2 g, 11.35 mmol) and imidazole (772 mg, 11.34 mmol) in anhydrous DMF (10 mL), at room temperature. The mixture was stirred for 12 h and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 95:5) yielded **43** (1.524 g, 77%). Colorless oil. IR (neat): 1731 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.26 (t, *J* = 5 Hz, 6H), 4.20 (q, *J* = 7 Hz, 6H), 3.99 (t, *J* = 5 Hz, 6H), 3.39 (s, 6H), 1.28 (t, *J* = 7 Hz, 6H), 0.96 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.7, 166.5, 66.3, 61.7, 61.3, 41.6, 26.1, 17.8, 14.2.

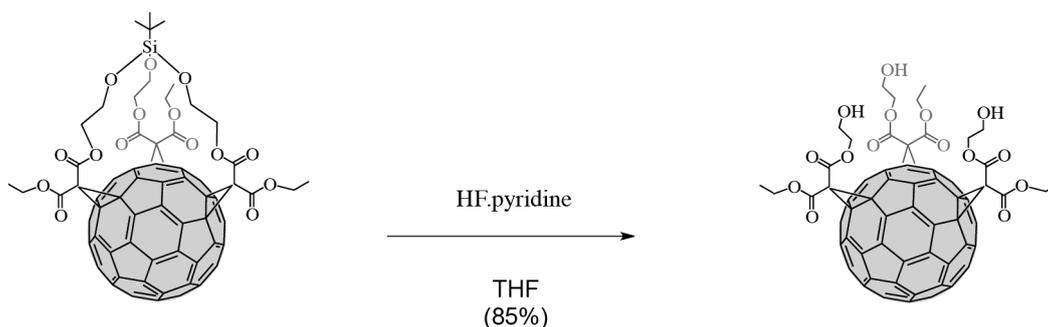
### Preparation of compound *e, e, e* **44** and **45**



DBU (0.87 mL, 5.74 mmol) was added to a stirred solution of C<sub>60</sub> (828 mg, 1.15 mmol), I<sub>2</sub> (681 mg, 2.68 mmol) and **43** (468 mg, 0.77 mmol) in toluene (1.65 L) at -15°C. The resulting solution was stirred for 1 h, then filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and concentrated. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave *e, e, e* **44** (83 mg, 8%) (racemic mixture) and **45** (320 mg, 20%) (racemic mixture). *e, e, e* **44**: cherry-red solid. Crystals suitable for X-ray crystal-structure analysis were obtained by slow diffusion of *n*-pentane into a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution of *e, e, e* **44**. IR (neat): 1742 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 229 (98800) 252 (sh, 75800), 280 (53700), 305 (sh, 42700), 381 (4700), 485 (4000), 565 (sh, 1800). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.97 (m, 3H), 4.41 (q, *J* = 7 Hz, 6H), 3.95 (m, 6H), 3.84 (m, 3H), 1.40 (t, *J* = 7 Hz, 9H), 0.97 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.6, 163.4, 147.5, 147.2, 147.0, 146.7, 146.5, 146.4 (two peaks), 146.2, 145.9, 144.4, 144.3, 143.8, 143.7, 143.3 (two peaks), 141.8, 141.6, 140.8, 71.1, 70.3, 67.2, 63.4, 62.9, 52.7, 27.2, 19.8, 14.3. MS (MALDI-TOF): 1326.2 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>85</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>Si: 1325.3), 1281.1 (39%, [M-OEt]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>83</sub>H<sub>31</sub>O<sub>14</sub>Si: 1280.2). **45**: brown solid. IR (neat): 1743 (C=O). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.85 (m, 1H), 4.72-4.01 (m, 17H), 1.45 (m, 9H), 0.88 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.1, 163.6 (two peaks), 163.4, 163.3, 163.0, 148.4-138.5 (several peaks), 71.8, 71.7 (two peaks), 71.6

(two peaks), 70.4, 68.0, 67.5, 63.6, 53.7, 52.2, 51.3, 26.3, 17.9, 14.5, 14.4. MS (MALDI-TOF): 2045.1 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>145</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>Si: 2045.9).

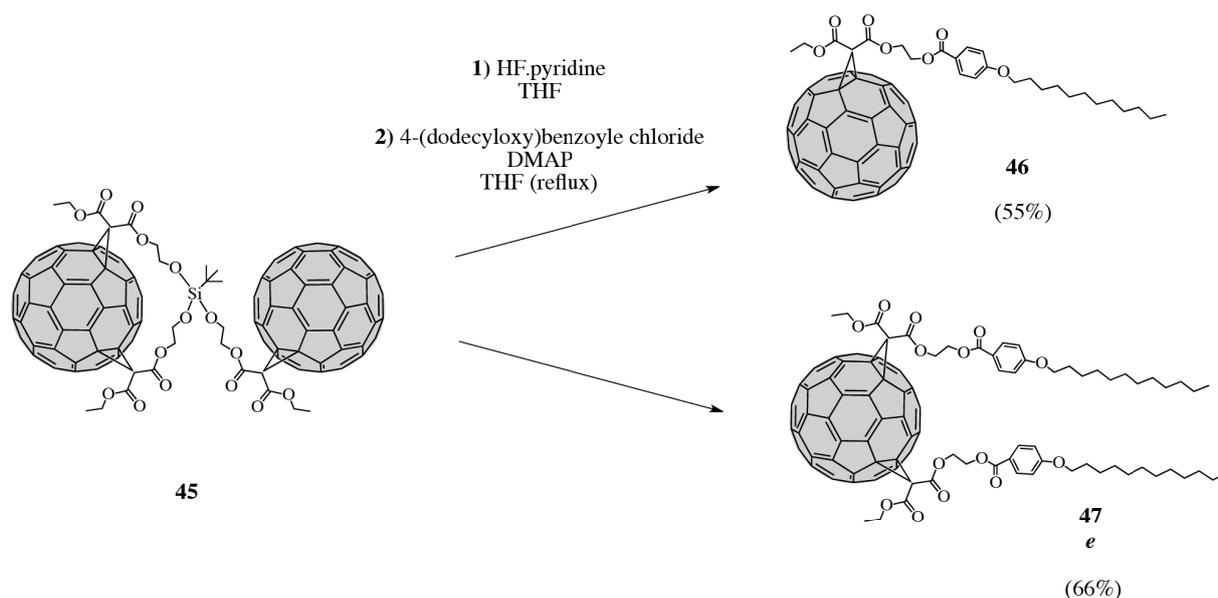
### Preparation of triol C<sub>60</sub> from compound *e, e, e* **44**



**44**

A 70% HF in pyridine solution (0.15 mL, 5.77 mmol) was added to a stirred solution of **44** (158 mg, 0.24 mmol) in anhydrous THF (10 mL), at room temperature. After 1 h, SiO<sub>2</sub> was added and the mixture was dried under reduced pressure. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, THF) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and recrystallization (THF/*n*-hexane) yielded **triol** (131 mg, 85%) (racemic mixture). Cherry-red solid. IR (neat): 3413 (OH), 1736 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 251 (183000), 282 (sh, 163000), 305 (51000), 380 (41000), 480 (5000), 565 (2000). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.51 (m, 3H), 4.42 (q, J = 7Hz, 6H), 4.32 (m, 3H), 3.85 (t, J = 5Hz, 6H), 1.39 (t, J = 7Hz, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 163.6, 163.5, 147.0, 146.9, 146.8, 146.6 (two peaks), 146.5, 146.2, 145.9, 144.5 (two peaks), 144.4, 143.5, 143.0, 142.6, 142.4, 142.1, 141.1, 70.9, 70.1, 68.3, 63.6, 60.8, 52.9, 14.3.

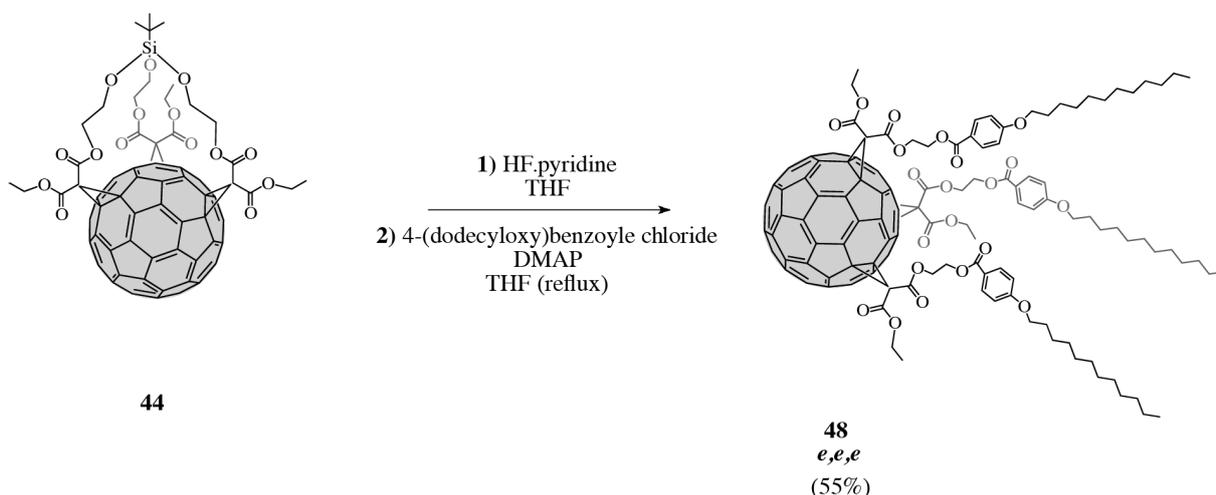
## Preparation of compounds **46** and **47**



A 70% HF in pyridine solution (0.15 mL, 5.77 mmol) was added to a stirred solution of **45** (186 mg, 91  $\mu$ mol) in anhydrous THF (5 mL), at room temperature. After 1 h, SiO<sub>2</sub> was added and the mixture was filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (THF) and the solvent removed under reduced pressure. Then, a solution of the crude, **4-(dodecyloxy)benzoyl chloride** (900 mg, 2.77 mmol) and DMAP (400 mg, 3.28 mmol) in anhydrous THF (30 mL) was heated under reflux for 6 h. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **46** (59 mg, 55%). Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) followed by gel permeation chromatography (Biobeads SX-1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **47** (racemic mixture) (99 mg, 66%). **46**: Brown glassy solid. IR (neat): 1746 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 257 (112200), 326 (32400), 426 (2900), 477 (1800), 673 (300). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.96 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 4.84 (m, 2H), 4.68 (m, 2H), 4.51 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 3.97 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.43 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 1.26 (m, 18), 0.88 (t, *J* = 7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.1, 163.7, 163.5, 163.4, 145.4, 145.3 (two peaks), 145.2, 145.1, 145.0, 144.0, 143.9, 143.2, 143.1, 143.0, 142.3, 142.0, 141.0, 139.4, 138.8, 132.0, 121.8, 114.3, 71.6, 68.4, 65.0, 63.6, 62.2, 52.1, 32.0, 29.8 (two peaks), 29.7 (two peaks), 29.5, 29.2, 26.2, 22.8, 14.3 (two peaks). MS (MALDI-TOF): 1200.4 (10%, [M+OH]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>86</sub>H<sub>39</sub>O<sub>8</sub>: 1200.2), 1183.4 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>86</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>: 1183.2). **47**: Brown glassy solid. IR (neat): 1745 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 254 (133900), 310 (sh, 42200), 368 (sh, 12900), 398 (sh, 4100), 410 (sh, 2600), 421 (2300), 476 (2700). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.94 (m, 4H), 6.86 (m, 4H), 4.71 (m, 4H), 4.60 (m, 4H), 4.39 (m, 4H), 3.99 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 3.97 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 1.78 (m, 4H), 1.25 (m, 42), 0.87 (t, *J* = 7 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.1, 166.0, 163.5, 163.4, 163.3 (two peaks),

147.6, 147.5, 147.4, 147.3, 147.1, 146.6, 146.3, 146.2 (two peaks), 146.1, 145.7, 145.6, 145.5, 145.4 (two peaks), 145.2 (two peaks), 145.1, 144.9, 144.8 (three peaks), 144.7, 144.5, 144.4, 144.3, 144.1 (three peaks), 143.8, 143.7, 143.6, 143.5, 143.3, 143.2 (two peaks), 143.1, 143.0, 142.8, 142.7, 142.3, 142.2 (two peaks), 142.0 (three peaks), 141.9, 141.6, 141.5, 141.1, 140.4, 139.4, 139.0, 138.8 (two peaks), 138.7, 132.0, 131.9, 131.8, 121.8, 121.7 (two peaks), 114.3 (two peaks), 71.6 (two peaks), 71.2, 70.8, 70.4, 68.4 (two peaks), 64.9, 64.8, 63.5 (two peaks), 63.4, 62.1 (two peaks), 62.0, 53.3, 51.2, 50.1, 32.0, 29.8 (two peaks), 29.7 (three peaks), 29.5 (three peaks), 29.2 (two peaks), 26.1 (two peaks), 22.8, 14.2. MS (MALDI-TOF): 1662.7 (10%, [M+OH]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>112</sub>H<sub>77</sub>O<sub>15</sub>: 1662.8), 1645.7 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>86</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>: 1645.8), 1182.4 (7%, [M-malonate]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>86</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>: 1183.2).

### Preparation of compounds **48**



A 70% HF in pyridine solution (0.15 mL, 5.77 mmol) was added to a stirred solution of **44** (86 mg, 65  $\mu$ mol) in anhydrous THF (5 mL), at room temperature. After 1 h, SiO<sub>2</sub> was added and the mixture was filtered through a short plug of SiO<sub>2</sub> (THF) and the solvent removed under reduced pressure. Then, a solution of the crude, **4-(dodecyloxy)benzoyl chloride** (900 mg, 2.77 mmol) and DMAP (679 mg, 5.56 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was heated under reflux for 2 h. Column chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **48** (75 mg, 55%) (racemic mixture). Cherry-red glassy solid. IR (neat): 1745 (C=O). UV/Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 254 (144300), 275 (sh, 92000), 305 (sh, 53000), 381 (6900), 485 (4900), 570 (sh, 1200). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.92 (d, *J* = 9 Hz, 6H), 6.88 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 4.63 (m, 3H), 4.52 (m, 9H), 4.31 (m, 6H), 4.00 (t, *J* = 7 Hz, 6H), 1.79 (m, 6H), 1.45 (m, 9H), 1.26 (m, 54H), 0.88 (t, *J* = 7 Hz, 9H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 166.1, 163.4, 163.3, 163.2, 147.3, 146.9, 146.8, 146.7, 146.5, 146.4, 145.7, 145.6, 145.2, 145.0, 144.4, 143.5, 142.9, 142.7, 142.0,

141.8, 141.0, 131.9, 121.7, 114.3, 70.9, 70.1, 68.4, 64.7, 63.3, 62.0, 52.7, 32.0, 29.8 (two peaks), 29.7 (two peaks), 29.5 (two peaks), 29.3, 26.1, 22.8, 14.3, 14.2. MS (MALDI-TOF): 2125.0 (13%, [M+OH]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>138</sub>H<sub>115</sub>O<sub>22</sub>: 2125.4), 2108.0 (100%, [M]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>138</sub>H<sub>114</sub>O<sub>21</sub>: 2108.4), 1645.6 (17%, [M-malonate]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>112</sub>H<sub>76</sub>O<sub>14</sub>: 1645.8).

## VI. Bibliographie

- (1) Bingel, C. *Chemische Berichte* **1993**, *126*, 1957.
- (2) Hirsch, A.; Lamparth, I.; Groesser, T.; Karfunkel, H. R. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 9385.
- (3) Hirsch, A.; Lamparth, I.; Karfunkel, H. R. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1994**, *33*, 437.
- (4) Thilgen, C.; Sergeyeve, S.; Diederich, F.; Schalley, C. A., Vögtle, F., Dötz, K. H., Eds.; Springer Berlin / Heidelberg: 2004; Vol. 248, p 273.
- (5) Isaacs, L.; Haldimann, R. F.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1994**, *33*, 2339.
- (6) Isaacs, L.; Seiler, P.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34*, 1466.
- (7) Cardullo, F.; Seiler, P.; Isaacs, L.; Nierengarten, J.-F.; Haldimann, R. F.; Diederich, F.; Mordasini-Denti, T.; Thiel, W.; Boudon, C.; Gisselhrcht, J.-P.; Gross, M. *Helvetica Chimica Acta* **1997**, *80*, 343.
- (8) Sergeyeve, S.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 1738.
- (9) Bourgeois, J.-P.; Diederich, F.; Echegoyen, L.; Nierengarten, J.-F. *Helvetica Chimica Acta* **1998**, *81*, 1835.
- (10) Dietel, E.; Hirsch, A.; Eichhorn, E.; Rieker, A.; Hackbarth, S.; Roder, B. *Chemical Communications* **1998**, 1981.
- (11) Nierengarten, J.-F.; Habicher, T.; Kessinger, R.; Cardullo, F.; Diederich, F.; Gramlich, V.; Gisselbrecht, J.-P.; Boudon, C.; Gross, M. *Helvetica Chimica Acta* **1997**, *80*, 2238.
- (12) Bourgeois, J.-P.; Echegoyen, L.; Fibbioli, M.; Pretsch, E.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2118.
- (13) Woods, C. R.; Bourgeois, J.-P.; Seiler, P.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 3813.
- (14) Bourgeois, J.-P.; Woods, C. R.; Cardullo, F.; Habicher, T.; Nierengarten, J.-F.; Gehrig, R.; Diederich, F. *Helvetica Chimica Acta* **2001**, *84*, 1207.
- (15) Reuther, U.; Brandmüller, T.; Donaubaue, W.; Hampel, F.; Hirsch, A. *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8*, 2261.
- (16) Chronakis, N.; Hirsch, A. *Comptes Rendus Chimie* **2006**, *9*, 862.
- (17) Qian, W.; Rubin, Y. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 2356.
- (18) Qian, W.; Rubin, Y. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 3133.
- (19) Kräutler, B.; Müller, T.; Maynollo, J.; Gruber, K.; Kratky, C.; Ochsenbein, P.; Schwarzenbach, D.; Bürgi, H.-B. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 1204.
- (20) Schwenninger, R.; Müller, T.; Kräutler, B. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 9317.

- (21) Thilgen, C.; Diederich, F. o. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 5049.
- (22) Moszynski, J. M.; Fyles, T. M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 5139.
- (23) Hörmann, F.; Donaubauer, W.; Hampel, F.; Hirsch, A. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 3329.
- (24) Iehl, J.; de Freitas, R. P.; Nierengarten, J.-F. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 4063.
- (25) Pereira de Freitas, R.; Iehl, J.; Delavaux-Nicot, B. a.; Nierengarten, J.-F. o. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11409.
- (26) Beuerle, F.; Chronakis, N.; Hirsch, A. *Chemical Communications* **2005**, 3676.
- (27) Beuerle, F.; Hirsch, A. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 7434.



*Chapitre 6 :*  
*Conclusion générale*



Dans un premier temps, le travail de cette thèse a été d'utiliser la méthodologie de post-fonctionnalisation de  $C_{60}$  hexa-adduit développée précédemment au laboratoire pour produire des dérivés biologiquement actifs.

Dans cet optique, une série dendritique de  $C_{60}$  hexa-adduits polycationiques a été développée. Ces produits ont montré une activité de transfection remarquable. Les dendrons polycationiques synthétisés pour cette étude ont été utilisés pour la synthèse de dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits amphiphiles. Ces amphiphiles ont montré la capacité de s'auto-organiser dans des milieux aqueux, sous forme micellaire. Finalement, l'incorporation d'un groupement pyrène dans la structure d'un  $C_{60}$  hexa-adduit, a permis d'effectuer des analyses photophysiques validant la formation d'agrégats.

L'idée de former des auto-assemblages de  $C_{60}$  hexa-adduits a conduit notre équipe à utiliser cette propriété pour obtenir des dérivés de  $C_{60}$  avec des mannoses, sous forme micellaire. Ainsi, les édifices supramoléculaires obtenus présentent une multivalence de sucres conséquente.

En parallèle, une méthodologie a été développée pour créer une construction de 12  $C_{60}$  autour d'un  $C_{60}$ . Cette approche dendritique a permis de créer un dérivé multivalent de mannose contenant théoriquement 120 mannoses.

L'effet multivalent des sucres dans les phénomènes biologiques (reconnaissance cellulaire, réponse immunitaire, par exemple) nous pousse à croire que ces composés pourraient être relativement intéressants, par exemple, en tant qu'agent anti-inflammatoire (atténuation de la réponse immunitaire en «monopolisant» les défenses immunitaires).

Finalement, le travail de notre équipe sur l'utilisation du  $C_{60}$ , comme support tridimensionnelle unique pour la formation d'hexa-adduits complexes, a ouvert une nouvelle voie à l'emploi du  $C_{60}$  dans la biologie.

Dans un second temps, notre laboratoire a trouvé nécessaire de développer de nouvelles voies de synthèse régio-sélectives du  $C_{60}$  pour augmenter la puissance de notre méthodologie de post-fonctionnalisation, basée sur la chimie *click*.

Dans ce but, l'obtention de dérivés bis-adduits *trans-1*, quoique difficile, a permis de multi-fonctionnaliser le  $C_{60}$ . Un dérivé penta-adduit a notamment été obtenu et post-fonctionnalisé de façon originale. Pour augmenter la simplicité d'obtention du précurseur bis-adduit, notre attention s'est tournée vers la synthèse facile d'un dérivé *e*. Ce dérivé a la capacité de former des  $C_{60}$  hexa-adduits originaux.

Enfin, une autre approche a été basée sur la création d'un dérivé tris-adduits de  $C_{60}$  de régio-chimie  $e, e, e$ . La synthèse de ce composé a révélé qu'un autre produit (tripode avec deux  $C_{60}$ ) intéressant était obtenu, un dérivé bis-adduit  $e$ . Cette synthèse permet donc d'obtenir deux produits avec une régio-sélectivité intéressante et grâce aux choix du groupe directeur, ces deux produits sont post-fonctionnalisables.







## Conception, synthèse et étude de dérivés de $C_{60}$ fonctionnalisés: applications biologiques et développement méthodologique.

### Résumé

Notre équipe a récemment développé une méthode polyvalente permettant de préparer des dérivés complexes de  $C_{60}$  hexa-adduits fonctionnalisés. Cette méthodologie permet d'obtenir des produits aux caractéristiques originales. Le  $C_{60}$  central agit comme un support central peu réactif, autour duquel des fonctionnalités sont réparties dans un espace octaédrique parfaitement défini. La première partie de ce travail de thèse a consisté à exploiter cette méthodologie pour créer des  $C_{60}$  hexa-adduits polycationiques aux propriétés de transfection remarquables. Dans un second temps, les dendrons polyamines synthétisés ont été mis à profit pour créer des structures supramoléculaires de  $C_{60}$  hexa-adduits, sous forme micellaire. Par la suite, l'étude de ces assemblages a orienté nos investigations vers l'élaboration de dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits mannosylés multivalents résultant d'un assemblage supramoléculaire, dont leurs possibles applications biologiques sont actuellement à l'étude. En parallèle une synthèse covalente a permis d'obtenir un «équivalent dendritique» de  $C_{60}$  hexa-adduit multimannosylé. Partant du constat que notre méthodologie est efficace principalement pour des dérivés de  $C_{60}$  hexa-adduits qui ont une régio-sélectivité particulière, la dernière partie a été consacrée au développement de nouvelles voies de synthèses qui pourront permettre de créer des dérivés de  $C_{60}$  avec un contrôle régio-sélectif original.

**Mots-Clefs:**  $C_{60}$ , dendrimères, amphiphiles, micelles, polydiacétylènes, transfection, auto-assemblages

### Abstract

Our team has recently built a polyvalent method that gives complex functionalized  $C_{60}$  hexa-adducts. This methodology permits to obtain products with original features.  $C_{60}$  acts as an inert scaffold, around which functionalities are distributed in a well-defined octahedral space. The first part of this thesis describes exploitation of this methodology to create polycationics  $C_{60}$  hexa-adducts, which have shown remarkable gene delivery capabilities. Next, the synthesized polyamine dendrons were used to build supramolecular structure of  $C_{60}$  hexa-adducts, as micellar forms. The study of these self-assembled structures has guided us to design micelles of mannosylated  $C_{60}$  hexa-adducts, which biological applications are under investigation. In parallel a covalent synthesis has furnished a dendrimers-like multimannosylated  $C_{60}$  hexa-adduct. Based on the observation that our methodology to create  $C_{60}$  hexa-adduct is efficient only for a specific regio-selectivity, the last part of this thesis was devoted to the development of new synthetic routes to obtain  $C_{60}$  derivatives with an original regio-selective control.

**Keywords:**  $C_{60}$ , dendrimers, amphiphiles, micelles, polydiacetylenes, transfection, self-assembling