



**HAL**  
open science

# Composés macrocycliques bioactifs : synthèse et étude de leurs interactions avec des membranes biologiques modèles

Guillaume Sautrey

► **To cite this version:**

Guillaume Sautrey. Composés macrocycliques bioactifs : synthèse et étude de leurs interactions avec des membranes biologiques modèles. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT : 2011NAN10101 . tel-01746251

**HAL Id: tel-01746251**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746251v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

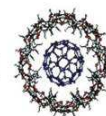
## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



**FACULTE DES SCIENCES & TECHNOLOGIES**  
**UFR Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés – Ecole Doctorale SESAMES**  
**Département de Formation Doctorale Chimie et Physico-chimie Moléculaires**

## **Thèse**

Présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I  
en Chimie et Physico-chimie Moléculaires

par **Guillaume SAUTREY**

**Composés macrocycliques bioactifs : synthèse et étude de leurs interactions avec des membranes biologiques modèles.**

Soutenue publiquement le 09 décembre 2011

### Rapporteurs

- M. Anthony COLEMAN, UMR 5615 CNRS, Lyon (Président du jury)
- M. Jean-François CAVALIER, UPR 9025 CNRS, Marseille

### Examineurs

- M. Jean-Bernard REGNOUF de VAINS, UMR 7525 Nancy Université CNRS, Nancy  
(Directeur de thèse)
- Mme Ewa ROGALSKA, UMR 7525 Nancy Université CNRS, Nancy  
(Co-directeur de thèse)



**Mots clés :** Calixarènes, Couches de Langmuir-Blodgett, Promédicaments, Phospholipides, Antiinfectieux, Modèles de Membrane, Films de Langmuir, PM-IRRAS.

**Résumé :** Le travail suivant est consacré d'une part à l'emploi du calix[4]arène comme une plate-forme organisatrice de principes actifs pour la conception de nouvelles prodrogues. Ce concept a été développé avec des substances antibactériennes ou antivirales, choisies comme modèles. Les conjugués calixarène – anti-infectieux ainsi synthétisés sont amphiphiles et insolubles dans l'eau. Leur comportement interfacial a été étudié *via* l'interface eau-air, mima d'une interface hydrophile-hydrophobe physiologique, à l'aide de la technique des films monomoléculaires de Langmuir. Nos résultats indiquent que ces prodrogues étalées à l'interface eau-air peuvent libérer leurs principes actifs dans la sous-phase. La méthodologie développée pour ces études de réactivité interfaciale pourrait à l'avenir être appliquée à d'autres prodrogues à base de calix[4]arène.

Un second projet a concerné le trifluoroacétate de tétra-*p*-(guanidinoéthyl)-calix[4]arène (CX1). Ce composé présente des propriétés antibactériennes à large spectre, couplées à une faible toxicité cellulaire. Nos travaux ont visé à mieux comprendre son mode d'action, lié à une perturbation des parois bactériennes, par une approche physico-chimique. La technique de Langmuir a donc été employée afin d'étudier les interactions entre le CX1 et des films monomoléculaires de phospholipides étalés à l'interface eau-air, utilisés comme modèles de membrane bactérienne. Nos résultats nous ont permis de proposer un mode d'organisation des membranes bactériennes sous l'influence du CX1. Nous avons ainsi apporté des précisions sur son mécanisme d'action qui pourraient être utiles dans le développement de nouveaux calixarènes antibactériens.



**Key words:** Calixarenes, Langmuir Monolayers, Prodrugs, Phospholipids, Antiinfectious, Membrane Models, PM-IRRAS.

**Abstract:** This work begins with utilization of the calix[4]arene macrocycle as organizing platform of anti-infectious molecules for prodrug applications. The concept has been explored using antibacterial (nalidixic acid) and antiviral (aciclovir, ganciclovir) molecules, chosen as models. The calixarene – anti-infectious conjugates synthesized have amphiphilic structure and are insoluble in aqueous media. Their interfacial behavior was studied *via* the air-water interface, considered as mimic of biological hydrophilic-hydrophobic interfaces, using Langmuir monolayers technique. Our results indicate that calixarene-based prodrugs spread at the air-water interface are able to release anti-infectious molecules into the subphase. The original methodology employed for interfacial reactivity studies could be applied to further calixarene-based prodrugs.

A second project concerns the tetra-*p*-(guanidinoethyl)-calix[4]arene trifluoroacetic salt (CX1). It has been shown that CX1 is active against various Gram-positive and Gram-negative bacteria, with low eukaryotic cell toxicity. The aim of our work was to get more insight in the mechanism of action of CX1, involving bacterial wall disruption, by a physico-chemical approach. The Langmuir monolayers technique was employed in order to study interactions between CX1 and phospholipid monolayers spread at the air-water interface, used as models of bacterial membranes. On the basis of our results, we proposed a reorganization mode of bacterial membranes upon interactions with CX1. This proposal gives more understanding in the mechanism of biological activity of CX1, and could be helpful in developing new antibacterial calixarene derivatives.





*A mon père*



## *Remerciements*

Ces travaux de recherche en vue de l'obtention d'un doctorat ont été réalisés au sein de l'équipe GEVSM intégrée dans l'Unité Mixte de Recherche SRSMC 7565 Nancy Université CNRS, sous la direction des Professeurs Jean-Bernard Regnouf de Vains et Ewa Rogalska. Cette thèse a pu être effectuée grâce au financement concerté du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (Bourse MRT), du CNRS et de la Région Lorraine.

Je commencerai par témoigner toute ma gratitude au Professeur Jean-Bernard Regnouf de Vains pour m'avoir accordé sa confiance et m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche. Son encadrement dans le domaine de la Chimie Organique m'a été grandement profitable et riche d'enseignements. L'enthousiasme, la passion pour la Science qu'il dégage ainsi que ses encouragements m'ont permis de travailler avec énergie sur un thème de recherche fascinant, situé entre différents domaines de la Chimie bien trop souvent indépendants en apportant ainsi une dimension pluridisciplinaire à mes compétences acquises.

Je suis de même extrêmement reconnaissant envers le Professeur Ewa Rogalska pour avoir encadré mes travaux dans le domaine de la Physico-chimie, me donnant accès à des technologies fines et peu communes. Ses conseils et ses enseignements m'ont permis de développer chez moi un esprit critique et rigoureux essentiel pour devenir chercheur. Elle m'a également permis d'améliorer mon langage anglais en me faisant participer à une conférence internationale et en me faisant collaborer avec des chercheurs et doctorants étrangers.

Le Docteur Igor Clarot tiens aussi une place importante, m'ayant donné accès au matériel CLHP et m'ayant transmis une part de ses compétences dans le domaine de la Chimie Analytique. Je tiens à le remercier pour sa disponibilité et sa bonne humeur toujours de mise.

Je remercie d'autant les membres du jury, Docteur Anthony Coleman (Lyon) et Docteur Jean-François Cavalier (Marseille), qui m'ont fait l'honneur d'accepter de participer à l'évaluation de mon mémoire et de ma soutenance de thèse. Je leur suis extrêmement reconnaissant d'avoir consacré une part de leur emploi du temps pour juger mon travail reporté dans ce mémoire, ainsi que pour s'être déplacés jusqu'à Nancy et assister à la soutenance de ces travaux.

Sont également adressés mes remerciements les plus sincères aux personnes ayant collaborées de près ou de loin avec moi : le Dr. Maxime Mourer pour ses conseils en chimie de synthèse, notamment du calixarène nommé CX1, et le Dr. Hugues Massimba-Dibama pour son aide lors du développement des méthodes chromatographiques. Les Dr. Beata et Jacek Korchowicz, Dr. Katarzyna Czapla et M<sup>elle</sup> Monika Orlof de l'Université de Jagiellonian (Krakow, Pologne) pour leurs contributions fructueuses à mes projets en rapports avec les films de Langmuir. Les Dr. Brigitte Fernette, Sandrine Adach et François Dupire de l'Université Nancy I pour leur amabilité et leurs analyses en RMN, analyse élémentaire, et spectrométrie de masse. Enfin, M<sup>r</sup> Francis Hoffmann pour son support technique en informatique.

Bien-sûr l'ambiance de travail est un élément essentiel dans la réussite. Pour cela, je tiens vivement à remercier tous ceux que j'ai côtoyé et avec qui j'ai eu le plaisir de discuter de Science et d'autre au cours de ces trois années : Pr. Alain Marsura et son dynamisme ; Dr. Florence Dumarçay-Charbonnier pour son sourire ; Dr. Yannick de Gaetano pour ses conseils et ses encouragements ; M<sup>r</sup> Guillaume Poisson, futur docteur. Sans oublier évidemment M<sup>r</sup> Eric Dubs et M<sup>me</sup> Brigitte Bonin, dont je n'oublierai jamais la bonne humeur, leurs encouragements et leur bienveillance. Dr. Raphaël Duval ainsi que M<sup>r</sup> Stéphane Fontanay, les microbiologistes de l'équipe, pour m'avoir fourni certain matériel (boîte de Pétri) et m'avoir soutenu. Enfin, tous les étudiants et chercheurs de passage que j'ai pu également côtoyer durant ma thèse.

Enfin, je tiens à adresser de profonds remerciements à ma famille de sang et à ma famille de cœur, qui m'ont soutenu, encouragé, et ont parfois supporté mes absences dues à mon engagement pour ma thèse.

Je dédie ce mémoire à mon père, qui aurait sûrement été fier de moi, et à la petite Cléa, qui un jour peut être se passionnera aussi pour la Science.

*" Ouvres les yeux,  
et tu verras."*

*" On ne force pas la curiosité, on l'éveille."*

*Daniel Pennac*



# Table des matières

## Liste des abréviations

<b><u>Avant-propos</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>Introduction et objectifs</u></b> .....	<b>3</b>

## **PREMIERE PARTIE** **Généralités et bibliographie**

<b>Chapitre I : La Chimie des Calix[4]arènes</b> .....	<b>15</b>
<b>I.1. Historique</b> .....	16
<b>I.2. Synthèse et fonctionnalisation de calix[4]arènes</b> .....	17
<b>I.2.1. Synthèse du tétra-<i>para</i>-(<i>tert</i>-butyl)-calix[4]arène</b> .....	17
<b>I.2.2. Conformations du <i>t</i>Bu[4]OH et identification par RMN</b> .....	18
<b>I.2.3. Généralités sur la fonctionnalisation du calix[4]arène</b> .....	20
<b>I.3. Applications des calixarènes en thérapeutique</b> .....	22
<b>I.3.1. Calixarènes bioactifs</b> .....	22
<b>I.3.2. Calixarènes amphiphiles en formulation de principes actifs</b> .....	26
<b>I.3.3. Conclusion et perspectives</b> .....	28
<b>Chapitre II : La Technique des Films de Langmuir</b> .....	<b>29</b>
<b>II.1. Historique</b> .....	29
<b>II.2. Préparation de films de Langmuir</b> .....	30
<b>II.3. Caractérisation et étude des propriétés d'un film de Langmuir</b> .....	31
<b>II.3.1. Isotherme de compression <math>\Pi</math>-A</b> .....	32
<b>II.3.2. Isotherme de compression <math>\Delta V</math>-A</b> .....	36
<b>II.3.3. Microscopie à angle de Brewster</b> .....	39
<b>II.3.4. Spectroscopie de réflexion-absorption infrarouge à modulation de polarisation</b> ..	41
<b>II.4. Application à l'étude de membranes biologiques modèles</b> .....	44

<b>II.5.</b> Etudes interfaciales de calix[4]arènes amphiphiles hydro-insolubles .....	46
<b>II.5.1.</b> Généralités sur les prodrogues amphiphiles : concept.....	46
<b>II.5.2.</b> Pourquoi le calix[4]arène ? .....	50
<b>II.5.3.</b> Calix[4]arènes et membranes biologiques modèles : études de miscibilité .....	51
<b>II.5.4.</b> Conclusion et perspectives .....	53

## **Chapitre III : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues**

<b>d'antibactériens .....</b>	<b>57</b>
<b>III.1.</b> Rappel sur le mécanisme d'action des quinolones .....	59
<b>III.2.</b> Synthèse de conjugués calix[4]arène-quinolone .....	60
<b>III.2.1.</b> Analyse rétrosynthétique et stratégie de synthèse .....	61
<b>III.2.2.</b> Synthèse de bromopropylnalidixate (BPN) .....	62
<b>III.2.3.</b> Synthèse des conjugués calixarène-quinolone .....	63
<b>III.2.4.</b> Purification des conjugués calixarène-quinolone .....	65
<b>III.3.</b> Etude comportementale à l'interface eau-air .....	67
<b>III.3.1.</b> Isothermes de compression.....	68
<b>III.3.2.</b> Microscopie à angle de Brewster .....	74
<b>III.3.3.</b> Spectroscopie infrarouge PM-IRRAS .....	75
<b>III.3.4.</b> Stabilité relative des films.....	79
<b>III.4.</b> Réactivité interfaciale des prodrogues.....	84
<b>III.4.1.</b> Objectif.....	84
<b>III.4.2.</b> Protocole expérimental.....	86
<b>III.4.3.</b> Comment détecter et doser l'acide nalidixique libéré ? .....	88
<b>III.4.4.</b> Procédure de concentration des échantillons.....	89
<b>III.4.5.</b> Validation de la méthode SOP-CLHP .....	91
<b>III.4.6.</b> Résultats et discussions .....	94
<b>III.5.</b> Conclusion du chapitre .....	100

## **Chapitre IV : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues**

<b>d'antiviraux.....</b>	<b>105</b>
<b>IV.1.</b> Introduction .....	105
<b>IV.1.1.</b> Les nucléosides et leurs analogues anti-infectieux .....	105
<b>IV.1.2.</b> Mécanisme d'action des analogues nucléosidiques antiviraux .....	108



<b>IV.2.</b>	Stratégie de synthèse .....	109
<b>IV.2.1.</b>	Choix du <i>spacer</i> .....	109
<b>IV.2.2.</b>	Choix du <i>linker</i> .....	109
<b>IV.2.3.</b>	Couplage calixarène - antiviral .....	112
<b>IV.3.</b>	Synthèse des synthons clés.....	115
<b>IV.3.1.</b>	Synthons <i>t</i> Bu[4]OH <i>O</i> -(3-hydroxy-propyle) .....	115
<b>IV.3.2.</b>	Synthons d'aciclovir et de ganciclovir .....	122
<b>IV.4.</b>	Synthèse des conjugués calixarène-antiviral .....	125
<b>IV.4.1.</b>	Couplage par le <i>N,N'</i> -carbonyldiimidazole .....	125
<b>IV.4.2.</b>	Conjugué calixarène-mono-aciclovir <i>N</i> -tritylé.....	128
<b>IV.4.3.</b>	Conjugué calixarène-bis-aciclovir <i>N</i> -tritylé.....	131
<b>IV.4.4.</b>	Conjugué calixarène-tétra-aciclovir <i>N</i> -tritylé.....	134
<b>IV.4.5.</b>	Conjugué calixarène-bis-ganciclovir <i>N,O</i> -tritylé.....	136
<b>IV.4.6.</b>	Réaction parasite .....	138
<b>IV.4.7.</b>	Cleavage des groupes protecteurs .....	143
<b>IV.5.</b>	Conjugués d'aciclovir à l'interface eau-air .....	151
<b>IV.5.1.</b>	Films de Langmuir étalés sur eau pure.....	151
<b>IV.5.2.</b>	Films de Langmuir étalés sur le tampon pH 10 .....	153
<b>IV.6.</b>	Réactivité interfaciale des prodrogues.....	154
<b>IV.6.1.</b>	Validation de la méthode.....	155
<b>IV.6.2.</b>	Résultats et discussions .....	157
<b>IV.7.</b>	Conclusion du chapitre .....	159
 <b>Chapitre V : Calix[4]arène hydrophile antibactérien .....</b>		<b>165</b>
<b>V.1.</b>	Introduction.....	166
<b>V.1.1.</b>	Bibliographie du CX1 .....	167
<b>V.1.2.</b>	Objectifs .....	168
<b>V.1.3.</b>	Synthèse du CX1.....	168
<b>V.1.4.</b>	Synthèse du mCX1 .....	170
<b>V.2.</b>	CX1 et membranes modèles : introduction.....	171
<b>V.3.</b>	CX1 et membranes modèles : résultats et discussions .....	174
<b>V.3.1.</b>	Isothermes de compression $\Delta V$ -A .....	175
<b>V.3.2.</b>	Isothermes de compression $\Pi$ -A .....	178

V.3.3. Fluidité des films.....	181
V.4. Comparaison entre CX1 et mCX1 .....	182
V.4.1. Isothermes de compression.....	183
V.4.2. Cinétiques d'adsorption à l'interface eau-lipide .....	186
V.4.3. Microscopie à angle de Brewster.....	190
V.5. Spectroscopie IR de réflexion-absorption à modulation de polarisation .....	193
V.5.1. Films lipidiques étalés sur une sous-phase d'eau pure .....	195
V.5.2. Films lipidiques étalés sur une sous-phase de CX1.....	198
V.5.3. Films lipidiques étalés sur une sous-phase de mCX1 .....	202
V.6. Conclusion du chapitre .....	204
<b><u>Conclusion générale</u></b> .....	<b>209</b>
<b><u>Conclusion générale</u></b> .....	<b>213</b>
Section Analytique .....	215
Section Synthèse Organique.....	217
Section Films de Langmuir .....	241
<b><u>Références bibliographiques</u></b> .....	<b>245</b>
<b><u>Publications, communications, et formations complémentaires</u></b> .....	<b>260</b>

## Liste des abréviations

$\mu_{\text{eff}}$  : Moment dipolaire effectif

**A** : Aire moléculaire

**AA** : Acide acétique

**Aci** : Aciclovir

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AFM** : Microscopie à force atomique  
(Atomic Force Microscopy)

**Ar** : Aryle

**ARN** : Acide ribonucléique

**BAM** : Microscopie à l'angle de Brewster  
(Brewster Angle Microscopy)

**Boc** : (*tert*-butyl)-oxycarbone

**BPN** : 3-bromo-propyl-nalidixate

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CDI** : *N,N'*-carbonyldiimidazole

**CLHP** : Chromatographie liquide haute  
performance

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

$C_s^{-1}$  : Module de compressibilité

**CV** : Coefficient de variation

**CX1** : trifluoroacétate de tétra-*p*-  
(guanidinoéthyl)-calix[4]arène

**DCA** : Acide dichloroacétique

**DCM** : Dichlorométhane

**DMAP** : *N,N*-diméthylaminopyridine

**DMF** : *N,N*-diméthylformamide

**DMPC** : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-  
phosphocholine  
(DiMyristoylPhosphatidylCholine)

**DMPE** : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-  
phosphoethanolamine  
(DiMyristoylPhosphatidyléthanolamine)

**DMPG** : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-  
phospho-*rac*-(1-glycérol), sel de sodium  
(DiMyristoylPhosphatidylGlycérol)

**DMPS** : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-  
phospho-*L*-sérine, sel de sodium  
(DiMyristoylPhosphatidylSérine)

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DMPC** : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-  
phosphocholine  
(DiPalmitoylPhosphatidylCholine)

$E_a$  : Energie d'activation

**éq.** : Equivalent

**ESI** : Ionisation électro-spray (Electro  
Spray Ionization)

**Et<sub>2</sub>O** : Diéthyléther

**EtOH** : Ethanol

**G** : Phase gaz

**Ganci** : Ganciclovir

**G/LE** : Transition de phase gaz / liquide-  
expansé

**H[4]OH** : Calix[4]arène

**HSV** : Herpès Simplex Virus

**Im** : Imidazole

**IR** : Infrarouge (**FT-IR** : Infrarouge à  
transformé de Fourier)

**IRRAS** : Spectroscopie infrarouge de  
réflexion-absorption (InfraRed Reflexion  
Absorption Spectroscopy)

**LC** : Phase liquide-condensé  
**LE** : Phase liquide-expansé  
**LE/LC** : Transition de phase liquide-expansé / liquide-condensé  
**LOD** : Limite de détection (Limit Of Detection)  
**LOQ** : Limite de quantification (Limit Of Quantification)  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
*m* : méta  
**mCX1** : trifluoroacétate de *p*-(guanidinoéthyl)-phénol  
**MeCN** : Acétonitrile  
**MeOH** : Méthanol  
**MS-ESI** : Spectrométrie de masse à ionisation par électro-spray (Mass spectrometry, Electro-Spray Ionisation)  
**MTrt** : Méthoxytrityle (*p*-anisyl)diphénylméthane)  
**Nal** : Nalidixate  
**NEt<sub>3</sub>** : Triéthylamine  
**NOESY** : Spectroscopie RMN par effet Overhauser nucléaire (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)  
*o* : ortho  
*p* : para  
**PC** : Phosphatidylcholine  
**PE** : Phosphatidyléthanolamine  
**PG** : Phosphatidylglycérol  
**Ph** : Phényle  
**PM-IRRAS** : Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de polarisation  
**ppm** : Partie par million  
**Pr** : Propyle  
**PS** : Phosphatidyl-L-sérine  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire (spectroscopie)  
**RSD** : Déviation standard relative (Relative Standard Deviation)  
**S/B** : Rapport Signal / Bruit  
**SE<sub>Ar</sub>** : Substitution électrophile aromatique  
**SN<sub>2</sub>** : Substitution nucléophile d'ordre 2  
**SOP** : Procédure de préparation d'échantillon (Standard Operating Procedure)  
**t.a.** : Température ambiante  
**tBu** : *tert*-butyle  
**tBu[4]OH** : tétra-*para*-(*tert*-butyle)-calix[4]arène  
**T<sub>eb</sub>** : Température d'ébullition (1 atmosphère)  
**TES** : Triéthylsilane  
**TFA** : Acide trifluoroacétique  
**THF** : Tétrahydrofurane  
**TIS** : Triisopropylsilane  
**TMG** : 1,1,3,3-tétraméthylguanidine  
**t<sub>r</sub>** : Temps de rétention  
**Trt** : Trityle (triphénylméthane)  
**UV** : Ultra-violet  
*Vs* : *Versus*  
**ΔV** : Potentiel de surface  
*ν* : Vibration d'élongation (*stretching*)  
*ν<sub>as</sub>* : Vibration d'élongation antisymétrique  
*ν<sub>s</sub>* : Vibration d'élongation symétrique  
**Π** : Pression de surface

---

## Avant-propos

Par le développement de la chimie supramoléculaire, impliquant les interactions faibles telles que les liaisons hydrogène, les forces électrostatiques ou de van der Waals, les scientifiques sont aujourd'hui en mesure d'élaborer des systèmes moléculaires intelligents capables de reconnaissance moléculaire et d'auto-assemblage.

Dans le domaine des sciences de la vie, la compréhension des relations structure/fonction de certains systèmes biologiques complexes, principalement régis par ces interactions faibles, ont amené les chercheurs à exploiter et à mimer toujours plus fidèlement ces systèmes biologiques. L'un d'eux est la matrice des membranes cellulaires, soit la bicouche phospholipidique. Ainsi, les connaissances actuelles concernant les parois cellulaires doivent permettre d'identifier et de combattre sélectivement des cellules indésirables, telles que les bactéries. En effet, face à l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques usuels, et donc à la nécessité de découvrir de nouveaux agents antibactériens, la possibilité de cibler la paroi bactérienne est aujourd'hui reconnue prometteuse.

Les travaux de thèse qui vont être présentés ici concernent cette recherche d'entités chimiques bioactives, destinées à interagir avec les membranes biologiques. Ces entités ont été élaborées sur la base du calix[4]arène, molécule macrocyclique constituée de quatre motifs phénoliques unis les uns aux autres en position *ortho* par des groupes méthylènes. Nous verrons qu'une membrane biologique peut être étudiée en utilisant comme modèles des couches monomoléculaires étalées à l'interface eau-air. Ces systèmes ont été élaborés en utilisant la technique des films de Langmuir.

C'est ainsi que plusieurs dérivés du calix[4]arène, bioactif ou prodrogue, ont été synthétisés. Ces composés ont été étudiés à l'interface eau-air, ainsi que leurs interactions avec des modèles de membrane biologique.



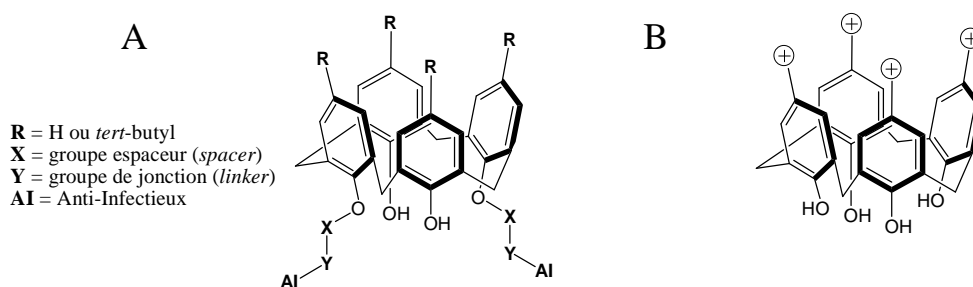
---

## Introduction et objectifs

Certaines recherches menées au GEVSM concernent l'exploitation des propriétés d'organisation du calix[4]arène pour la conception d'entités à visée thérapeutique. Nous allons voir que les travaux présentés dans ce mémoire se sont inscrits dans la suite logique de divers sujets initiés antérieurement au laboratoire. C'est ainsi que plusieurs objectifs ont été fixés dans trois domaines distincts, que sont la chimie organique de synthèse, la physico-chimie des films de Langmuir, et la chimie analytique. Ces trois disciplines ont ainsi été fortement imbriquées tout au long de ce travail. De par cet aspect pluridisciplinaire, ces travaux de recherche ont été conduits par périodes alternées consacrées notamment à la synthèse organique, ainsi qu'aux expérimentations physico-chimiques ou analytiques.

Les calix[4]arènes à visée thérapeutique abordés aux cours de ce mémoire peuvent être divisés en deux catégories :

- Des calixarènes porteurs de principes actifs connus et ainsi conçus comme des prodrogues à caractère amphiphile (Figure 1, A).
- Des calixarènes polycationiques conçus pour cibler et perturber les parois bactériennes (Figure 1, B).



**Figure 1.** Structures générales des deux types de dérivés du calix[4]arène faisant l'objet de ce travail. Calix[4]arènes prodrogues d'anti-infectieux (A). Calix[4]arènes polycationiques antibactériens (B).

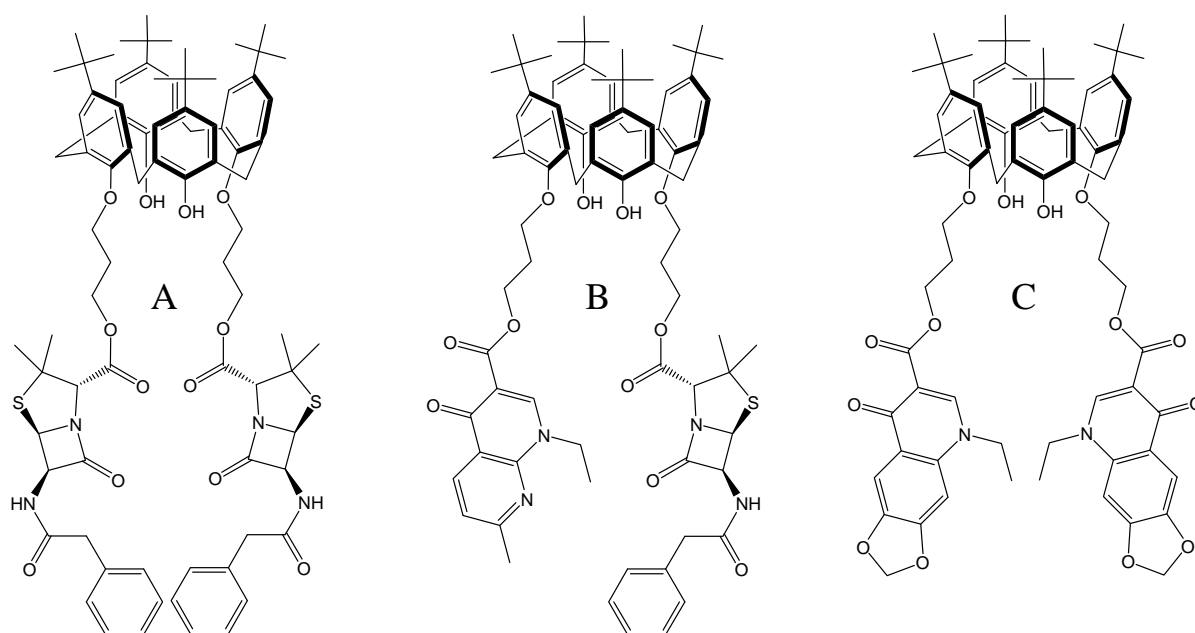
Nos objectifs se sont alors inscrits dans chacun de ces deux thèmes afin d'approfondir nos connaissances sur ces composés.

---

# 1. Calix[4]arènes prodrogues d'anti-infectieux

## ❖ Prodrogues d'antibactériens.

Les travaux réalisés par Adel Ben Salem<sup>1</sup> ont conduit à l'obtention de nombreux dérivés du tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène (*t*Bu[4]OH), porteurs d'espèces antibiotiques connues telles que des quinolones ou des pénicillines.<sup>2, 3</sup> Les résidus antibactériens ont été greffés sur la partie basse d'un *t*Bu[4]OH via un *spacer* propylique ou éthylique, et un *linker* de type ester ou amide selon l'espèce greffée (Figure 2). Il a alors été synthétisé un large éventail de dérivés du *t*Bu[4]OH, porteurs de une ou plusieurs quinolones ou pénicillines, identiques ou différentes, ainsi que de *t*Bu[4]OH mixtes porteurs à la fois d'une quinolone et d'une pénicilline.

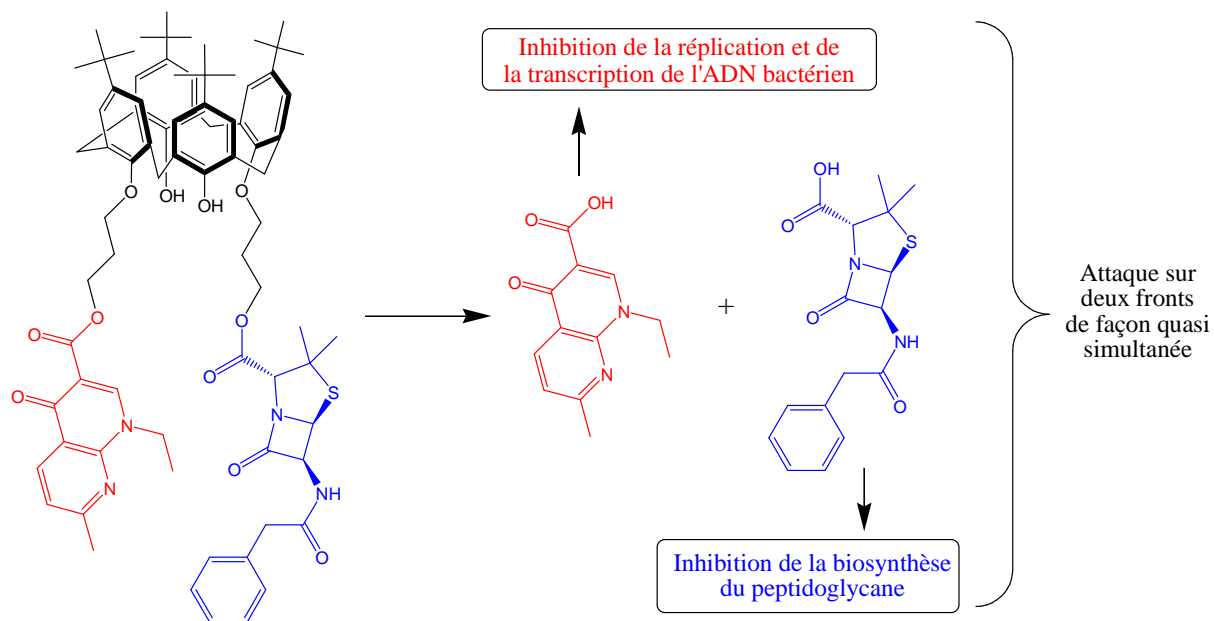


**Figure 2.** Exemples de molécules préparées par A. Ben Salem. Calixarène bis pénicilline G (A). Calixarène mixte quinolone-pénicilline G (B). Calixarène bis quinolone (C).

Ces molécules avaient été préparées dans le but d'obtenir des prodrogues à caractère amphiphile pour une action de transport et/ou de stockage au travers des milieux hydrophobes de l'organisme traité (membranes cellulaires ou tissus adipeux), visant un effet retard en délivrant de façon prolongée le principe actif. De plus, la possibilité de greffer plusieurs antibiotiques différents sur un même calixarène pourrait permettre de délivrer sur le même site ces antibiotiques attaquant chacun la bactérie selon un mécanisme qui lui est propre.



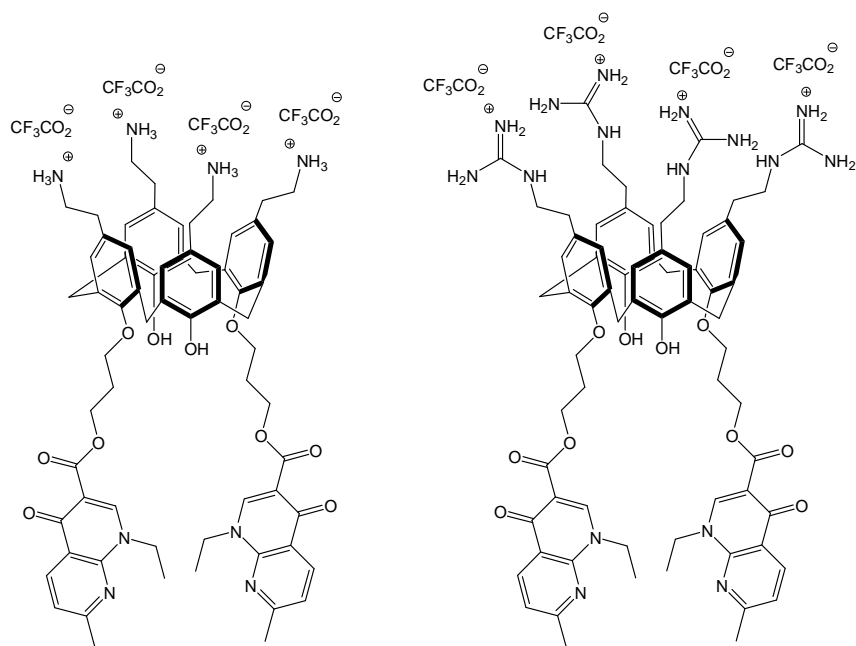
Comme illustré en Figure 3, il peut alors être envisagé d'obtenir un effet synergique avec des dérivés du calix[4]arène multi-prodrogues.



**Figure 3.** Calix[4]arène multi-prodrogue conduisant à un effet synergique présumé.

Une des propriétés physiques de ces conjugués calixarène-quinolone est leur insolubilité en milieu aqueux. Cette caractéristique, jugée nécessaire pour une administration par voie orale, s'est en revanche révélée être une contrainte rendant difficile d'étudier leur activité antibactérienne selon les méthodes standards de microbiologie.

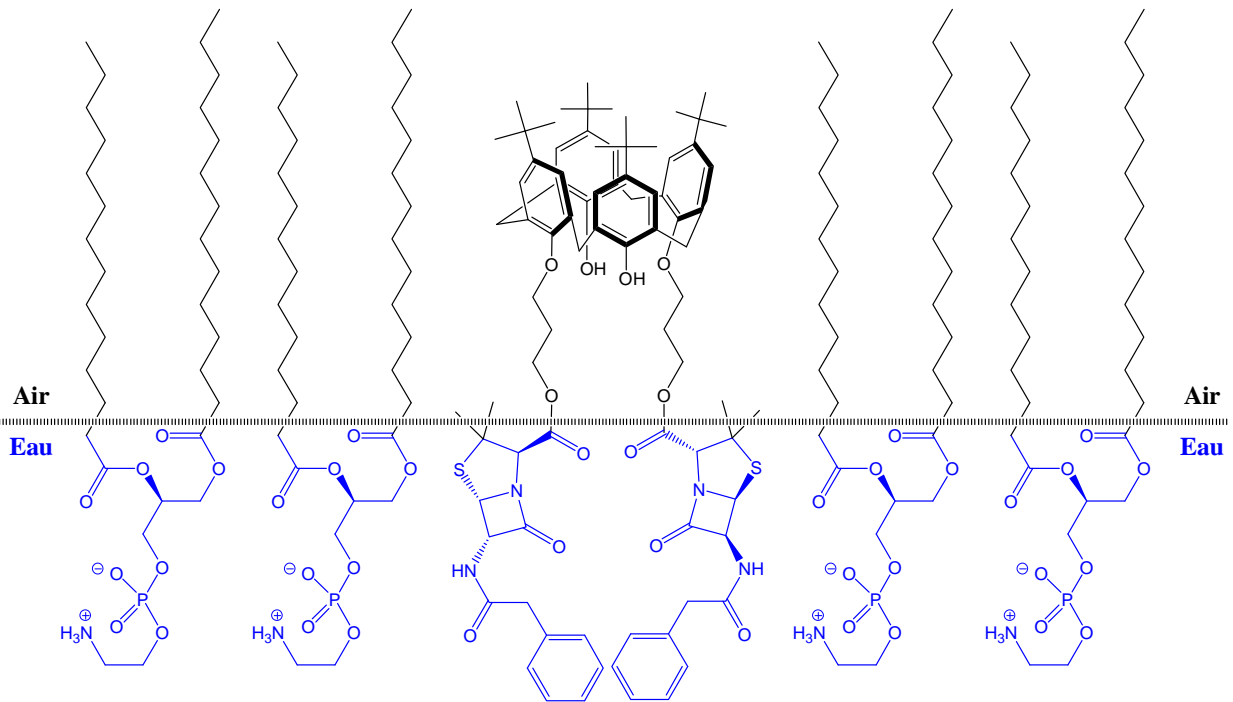
Les travaux conduits par Hugues Massimba-Dibama ont porté sur la synthèse d'analogues hydrosolubles des prodrogues d'acide nalidixique préparées par Ben Salem (Figure 4).<sup>4</sup> Le remplacement des groupes *tert*-butyles par des fonctions hydrophiles (cations ammonium et guanidinium) a permis d'entreprendre des études microbiologiques et physico-chimiques jusqu'alors impossibles. Ces nouveaux calixarènes prodrogues hydro-solubles ont alors montré d'intéressantes activités antibactériennes *in vitro*, et la cinétique de libération du principe actif en milieu biologique modèle (sérum de rat) a pu être déterminée.<sup>5</sup> La fonction prodrogue a ainsi été démontrée avec ces analogues hydrosolubles.



**Figure 4.** Exemples de molécules préparées par H. Massimba-Dibama.

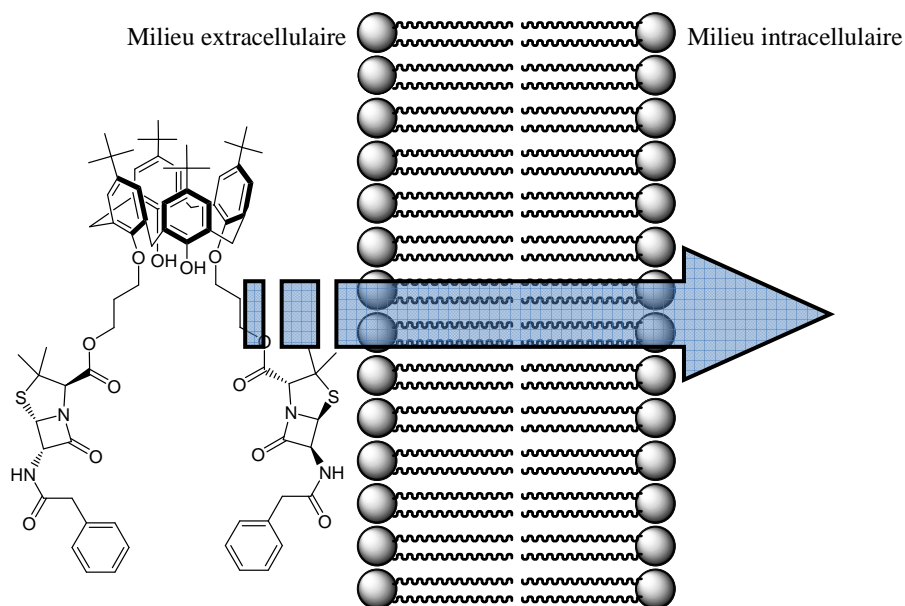
En milieu biologique, l'insolubilité aqueuse et le caractère amphiphile des calixarènes prodrogues préparés par A. Ben Salem laissent supposer une affinité de ces derniers pour les interfaces, telles que les tissus adipeux ou les membranes cellulaires. La technique des films de Langmuir permet d'étudier le comportement interfacial de molécules amphiphiles insolubles dans l'eau. Etalées à l'interface eau-air, de telles molécules forment un film monomoléculaire. Cette technique permet donc de créer un modèle de membrane biologique. Le comportement à l'interface eau-air ainsi qu'en environnement membranaire de certains calixarènes prodrogues de pénicilline a donc pu être étudié (Figure 5).<sup>6</sup> Ces études ont permis d'appréhender les relations entre structure et propriétés physico-chimiques de ces molécules, ainsi que leur impact sur les membranes lipidiques, orientant nos recherches.

Les résultats de miscibilité en milieu membranaire DMPE publiés par Rogalska et coll. suggèrent que ces conjugués peuvent s'insérer au sein d'une membrane biologique, voire pour l'un d'entre eux la traverser (Figure 6). Ces travaux ont un intérêt tout particulier puisque qu'ils constituent les premières avancées sur ce sujet, et traités dans ce mémoire. Les calixarènes étudiés ont été choisis en fonction de certains paramètres structuraux, soient la longueur du *spacer* et le type de pénicilline greffée. L'influence de ces paramètres sur la miscibilité de ces calixarènes avec le phospholipide DMPE à l'interface eau-air a pu être mise en évidence. Il a ainsi été observé qu'un calixarène formant à l'état pur un film peu condensé présente une meilleure miscibilité avec le phospholipide DMPE.



**Figure 5.** Film monomoléculaire étalé à l'interface eau-air (film de Langmuir). Cas d'un film mixte *t*Bu[4]OH porteur de deux résidus pécilline G, en mélange avec le dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE).

Il a été montré qu'un *spacer* propylique entre le calixarène et l'entité bioactive facilite les interactions avec DMPE, améliorant sa miscibilité par comparaison avec un *spacer* éthylique. Nous verrons plus loin qu'il a donc été choisi au cours de cette thèse d'utiliser exclusivement des *spacer* propyliques.

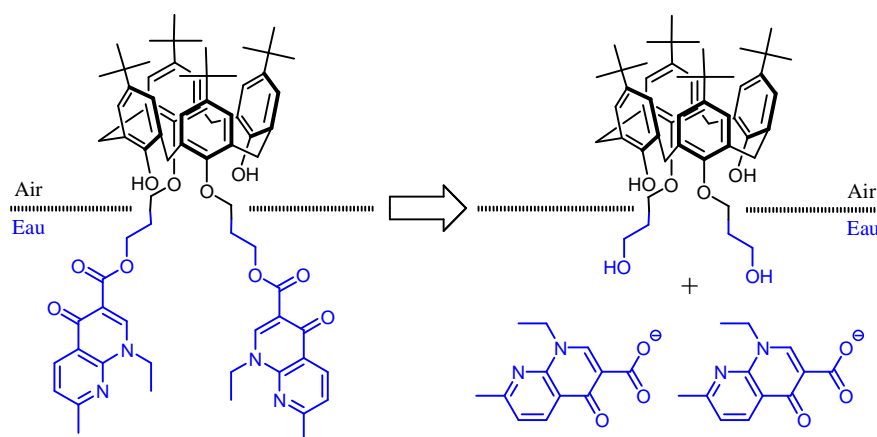


**Figure 6.** Conclusion suggérée par les résultats de Rogalska et coll. obtenus par l'approche des films de Langmuir employés comme modèle de membrane cellulaire.<sup>6</sup>

Parmi la chimiothèque de A. Ben Salem, nous avons sélectionné plusieurs conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone, en particulier ceux à base d'acide nalidixique, afin de répondre à certaines problématiques rencontrées lors de l'évaluation de leur activité antibactérienne. Notre objectif a donc été de réaliser des études complémentaires sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le comportement de telles prodrogues calixaréniques à l'interface eau-air.

Il fallait en premier lieu résoudre les contraintes rencontrées lors de la synthèse des conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone à base d'acide nalidixique. Cette famille de composés a ensuite été complétée par des analogues exempts de groupes *tert*-butyles. Ces dérivés se sont avérés utiles pour établir la méthodologie des études interfaciales, notamment dans le développement de l'analyse structurale par spectroscopie infrarouge (PM-IRRAS) de ce type de systèmes moléculaires à base de calix[4]arène. Par la suite, les dérivés synthétisés ont donc été étudiés à l'interface eau-air. Pour ce faire, les isothermes de compression, la microscopie BAM et la spectroscopie PM-IRRAS ont été employés.

L'ensemble de ces techniques nous a permis, outre une meilleure compréhension de la relation entre structure et propriétés physico-chimiques, l'étude de la réactivité de ces dérivés calixaréniques à l'interface eau-air (Figure 7). En effet, ces conjugués calixarène-quinolone comportent une ou plusieurs liaisons ester susceptibles de subir une hydrolyse en libérant la substance bioactive. Les résultats et la méthodologie établie concernant l'hydrolyse de ces prodrogues, en collaboration avec le Docteur Igor Clarot, pourraient permettre à l'avenir une pré-sélection des molécules les plus intéressantes.

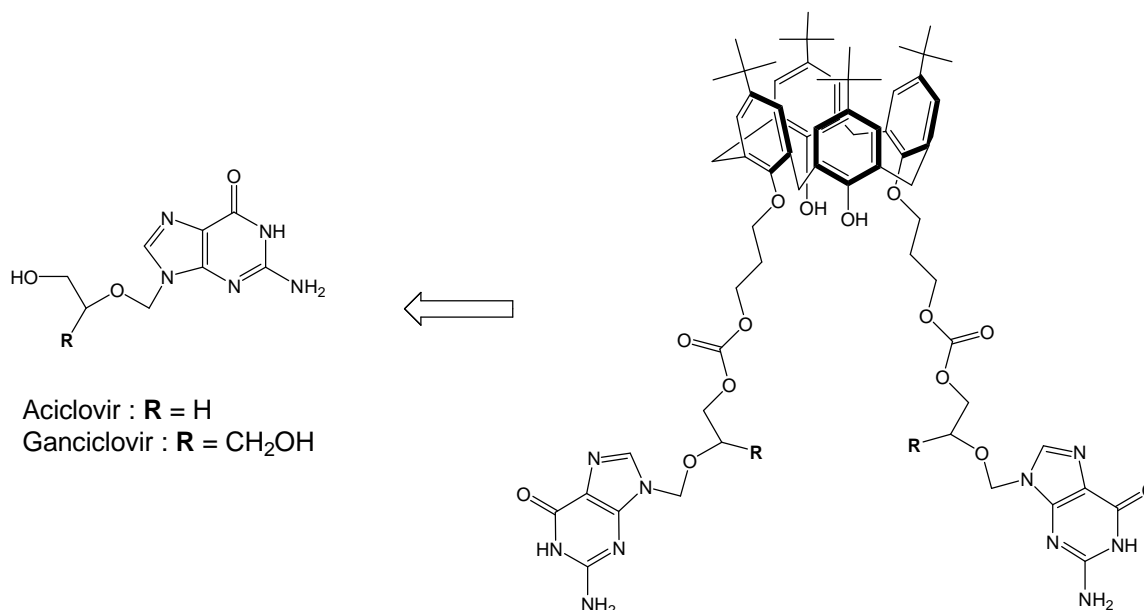


**Figure 7.** Conjugué *t*Bu[4]OH-bis-quinolone (acide nalidixique) à l'état de film monomoléculaire de Langmuir (interface eau-air). Réaction d'hydrolyse et libération de l'acide nalidixique dans la sous-phase.

---

## ❖ Prodrogues d'antiviraux.

A la suite de nos résultats obtenus avec les antibactériens, le concept d'une prodrogue amphiphile utilisant le *t*Bu[4]OH comme plate-forme organisatrice a été étendu aux antiviraux. Nous avons choisi comme composés modèles deux représentants de la famille des analogues nucléosidiques, l'aciclovir et le ganciclovir, et avons synthétisé leur prodrogue calixarénique (Figure 8). Ce projet a donc nécessité un travail complet de chimie organique, avec la mise au point des étapes de synthèse successives, et la caractérisation physico-chimique des nouveaux produits ainsi préparés.



**Figure 8.** Structure de l'aciclovir et du ganciclovir, antiviraux dérivés du nucléoside guanosine, et exemple d'un conjugué calixarène-antivirale.

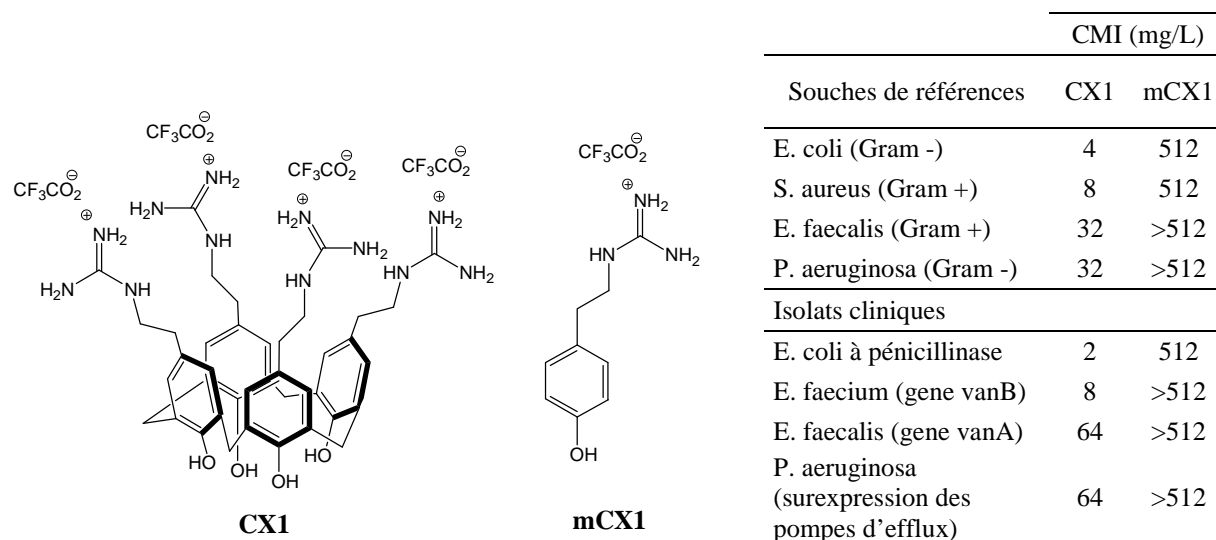
Le comportement à l'interface eau-air de ces nouveaux conjugués calixarène-antiviral a été étudié en utilisant la technique des films de Langmuir. La méthodologie développée avec les prodrogues d'antibactériens pour étudier leur réactivité interfaciale a été appliquée à ces nouvelles prodrogues d'aciclovir et de ganciclovir. Leurs cinétiques d'hydrolyses à l'interface eau-air ont donc été mesurées.

## **2. Calix[4]arène polycationique antibactérien**

Nous nous sommes en dernier lieu intéressé à un calix[4]arène antibactérien issu des travaux de Maxime Mourer,<sup>7</sup> le sel trifluoroacétique du tétra-*p*-(guanidinoéthyl)-

---

calix[4]arène, dénommé CX1 (Figure 9). Ce calixarène a été initialement conçu dans le but de perturber les parois bactériennes en s'adsorbant à sa surface.<sup>8, 9</sup> Des études microbiologiques ont montré que le CX1 est actif contre différentes souches bactériennes à Gram positif ou négatif, ainsi que contre des bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques actuels, et sans présenter de toxicité cellulaire importante.<sup>10, 11</sup>



**Figure 9.** Structure du CX1 et du mCX1, ainsi que leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) observées sur différentes souches bactériennes de référence ou issues d'isolats cliniques.

Il a été montré que le CX1 avait pour effet de modifier la structure de la paroi bactérienne, ainsi que la mobilité électrophorétique et la perméabilité de la membrane des bactéries traitées.<sup>12-14</sup> D'autre part, aux concentrations où le CX1 est actif, son équivalent monomérique, le sel trifluoroacétique du *p*-(guanidinoéthyl)-phénol et dénommé mCX1, s'est montré inactif. Ces résultats ont suggéré que le CX1 interagit avec la paroi bactérienne en modifiant ses propriétés avec un effet délétère.

Ainsi, notre objectif a été d'étudier la nature de ces interactions mises en jeu entre le CX1 et la membrane bactérienne, afin de mieux comprendre son mode d'action. La comparaison de ces interactions et de leurs conséquences avec celles du mCX1 nous a permis d'appréhender l'impact de l'organisation spatiale du CX1 induite par la structure calix[4]arène. Pour ce faire, la technique des films de Langmuir a été employée. La préparation à l'interface eau-air d'un film monomoléculaire constitué de phospholipides permet en effet de créer un modèle de membrane cellulaire.<sup>15-17</sup> Cette approche a déjà été utilisée pour mieux comprendre les interactions entre différentes molécules et les membranes

---

biologiques.<sup>6, 18-21</sup> Selon la nature des phospholipides employés, il est possible de constituer un modèle de membrane représentatif d'une cellule eucaryote ou procaryote.<sup>22, 23</sup>

Nous avons donc étudié d'une part l'impact du CX1 et du mCX1 sur les propriétés de films de Langmuir utilisés comme des modèles de membranes biologiques, et d'autre part s'il existait des corrélations entre les observations faites *in vitro* et nos résultats obtenus par cette approche physico-chimique.





# **PREMIERE PARTIE**

## **Généralités et bibliographie**

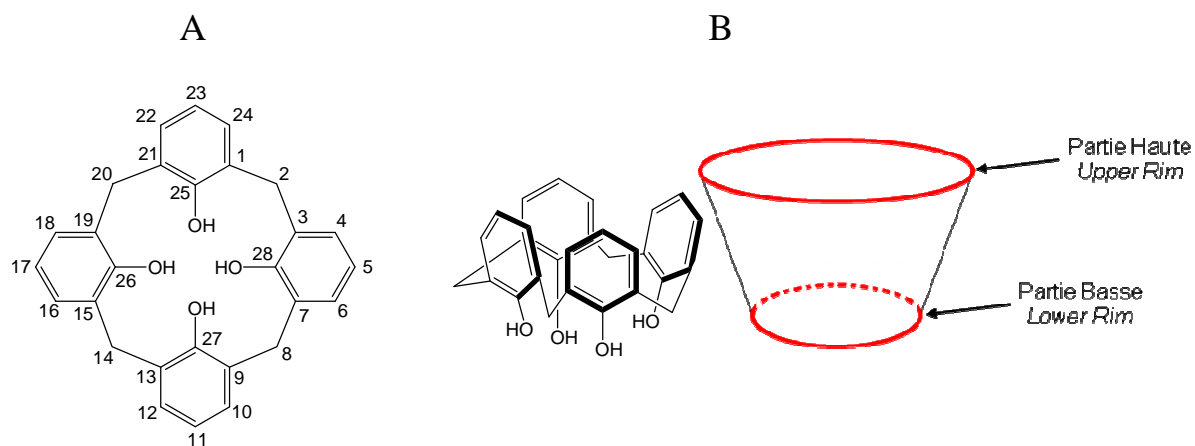
- Chapitre I : La Chimie des Calix[4]arènes
- Chapitre II : La Technique des Films de Langmuir



# Chapitre I

## La Chimie des Calix[4]arènes

Les calix[n]arènes sont une classe de macrocycles synthétisés par condensation entre du formaldéhyde et du phénol. Il est possible d'obtenir plusieurs types de calix[n]arène d'une taille croissante, où  $n$  représente le nombre d'unités phénoliques formant le macrocycle avec communément  $4 \leq n \leq 8$ . Au cours de ce mémoire, nous traiteront principalement du calix[4]arène, représenté ci-dessous en formule plane et dans l'espace en conformation dite cône.



**Figure 10.** Calix[4]arène et sa numérotation (A). Représentation dans l'espace d'un calix[4]arène en conformation cône (B).

Les calixarènes ont connu leur essor avec l'avènement de la chimie supramoléculaire dans les années 80. Outre le fait de posséder une cavité hydrophobe, ces composés présentent des propriétés d'organisation intéressantes pouvant ainsi servir de plate-forme pour l'élaboration d'édifices plus complexes et agencés dans l'espace de façon contrôlée. On peut distinguer chez ces molécules deux zones fonctionnalisables de façon indépendante. Par convention, la zone des hydroxyles est nommée « partie basse », tandis que la zone opposée en position *para* des unités phénoliques est nommée « partie haute » (Figure 10). C'est ce potentiel de fonctionnalisation et cette aptitude à orienter dans l'espace divers groupements fonctionnels qui rendent ces molécules si fascinantes. De nos jours, on retrouve des applications des calixarènes dans des domaines aussi variés que la catalyse (même d'enzyme), l'analytique (complexation sélective) ou encore les matériaux (nano-structures).<sup>24-29</sup>

## I.1. Historique

L'histoire de la découverte des calixarènes est passionnante mais longue. Ne pouvant tout détailler, seuls les événements majeurs seront relatés dans cette partie.

Tout a commencé en 1872 avec Adolph von Baeyer qui, lors du mélange de benzaldéhyde et de pyrogallol avec un acide fort, observa la formation d'une résine visqueuse.<sup>30</sup> C'est 30 ans plus tard que Leo Baekeland prépara une résine hautement réticulée à partir de phénol et de formaldéhyde connue sous le nom commercial de Bakelite®.<sup>31</sup> Puis en 1942, Alois Zinke et Erich Ziegler se sont intéressés au contrôle de la réticulation en utilisant des dérivés *para*-substitués du phénol en vue d'obtenir des polymères linéaires. Après deux années de recherche, la condensation entre le *para*-(*tert*-butyl)-phénol et le formaldéhyde leur a permis d'obtenir pour la première fois un solide cristallin de point de fusion supérieur à celui d'une résine.<sup>32</sup> Simultanément, Joseph Niederl et Heinz Vogel ont réalisé une réaction similaire avec le *para*-(*tert*-butyl)-résorcinol et ont par la suite été les premiers à postuler la formation d'un oligomère cyclique.<sup>33</sup>

John Cornforth et collaborateurs furent les premiers à confirmer dans les années 50 la structure de ces composés à l'aide de la cristallographie par diffraction de rayon X. C'est à ce moment qu'il y eut une prise de conscience par la communauté scientifique du potentiel des calixarènes comme analogue d'enzyme possédant une poche hydrophobe.

C'est plus de cent ans après les premières observations de von Baeyer que Gutsche, s'intéressant à l'époque aux composés biomimétiques, introduisit le terme de « calixarène » en raison de leur ressemblance à un vase de la Grèce antique, le calice, et de leur caractère aromatique, les arènes.<sup>34</sup> Les années 80 ont vu alors s'établir les bases de la chimie des calix[n]arènes, ainsi que ses spécialistes internationalement reconnus tels que D. Gutsche et R. Ungaro, ainsi que S. Shinkai et J. Vicens ou encore Z. Asfari et V. Böhmer.



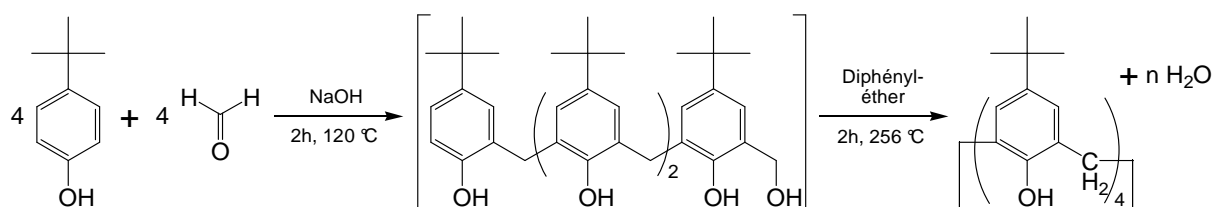
**Figure 11.** Photographies tirées d'un ouvrage de David C. Gutsche.<sup>35</sup> Tétra-*p*-phényl-calix[4]arène (à gauche), et analogie avec un calice de la Grèce antique (à droite).

## I.2. Synthèse et fonctionnalisation de calix[4]arènes

La chimie et les propriétés physico-chimiques des calix[4]arènes sont de nos jours bien connues et parfaitement décrites dans la littérature. Les généralités concernant la préparation et la fonctionnalisation de ces macrocycles, ainsi que certaines propriétés spectroscopiques, notamment en RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , ne seront donc que brièvement exposées au cours de ce mémoire. L'ensemble de ces connaissances de base sont disponibles dans de nombreux ouvrages tels que *Calixarenes revisited* de D. C. Gutsche,<sup>24</sup> *Calixarenes 2001* de Z. Asfari,<sup>25</sup> ou plus récemment *Calixarenes and Resorcinarenes* de W. Sliwa et C. Kozłowski.<sup>26</sup>

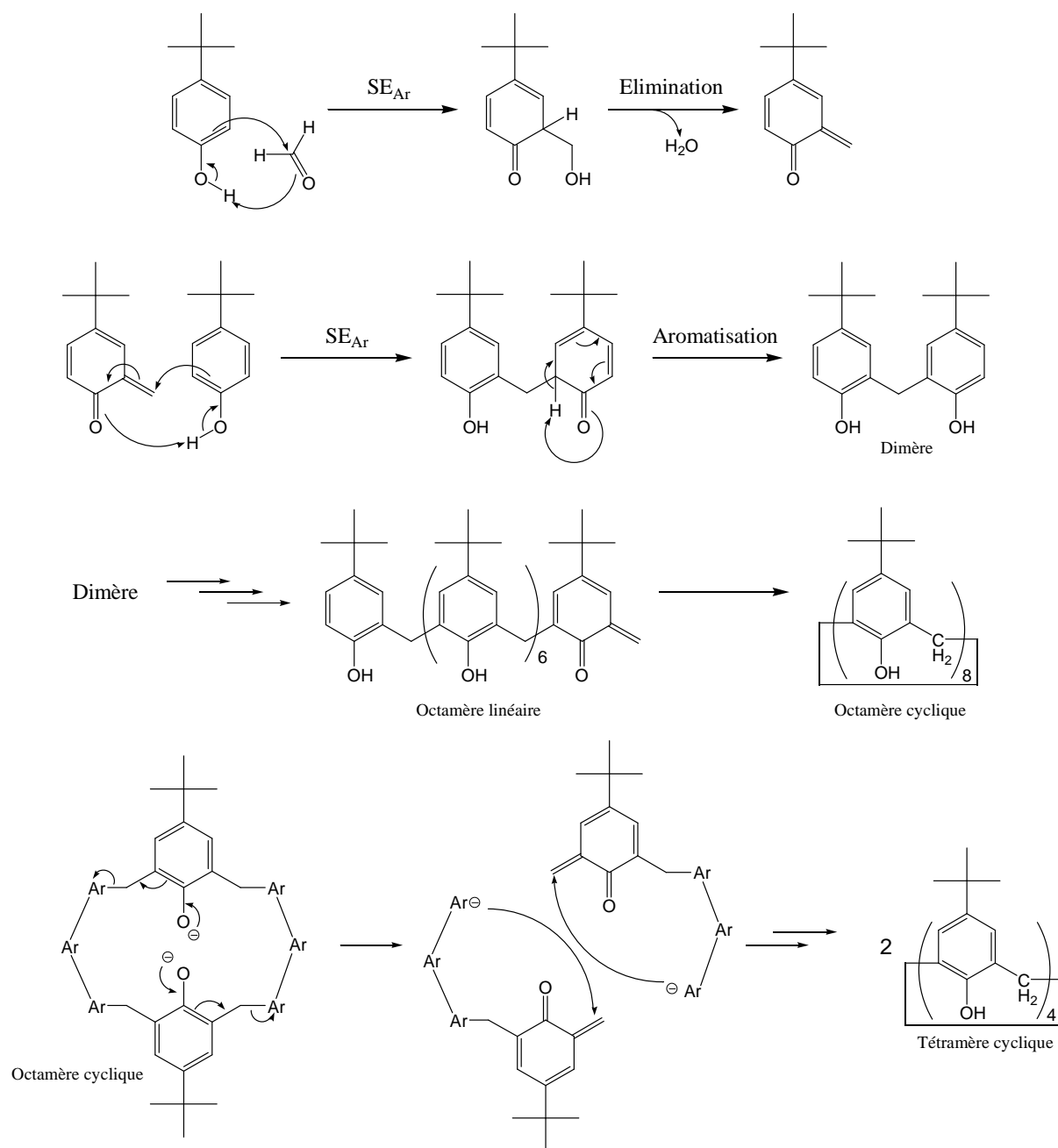
### I.2.1. Synthèse du tétra-*para*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène

La synthèse de calix[4]arènes peut s'avérer difficile en raison de la possibilité de former toute sorte d'oligomères linéaires ou cycliques. Des conditions opératoires bien adaptées sont donc essentielles pour favoriser la formation de l'oligomère cyclique (Figure 12). Classiquement, le *t*Bu[4]OH s'obtient à partir du *p*-(*tert*-butyl)-phénol et de formaldéhyde, en condition basique.



**Figure 12.** Schémas de synthèse du tétra-*para*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène développée par C. Gutsche.<sup>35</sup>

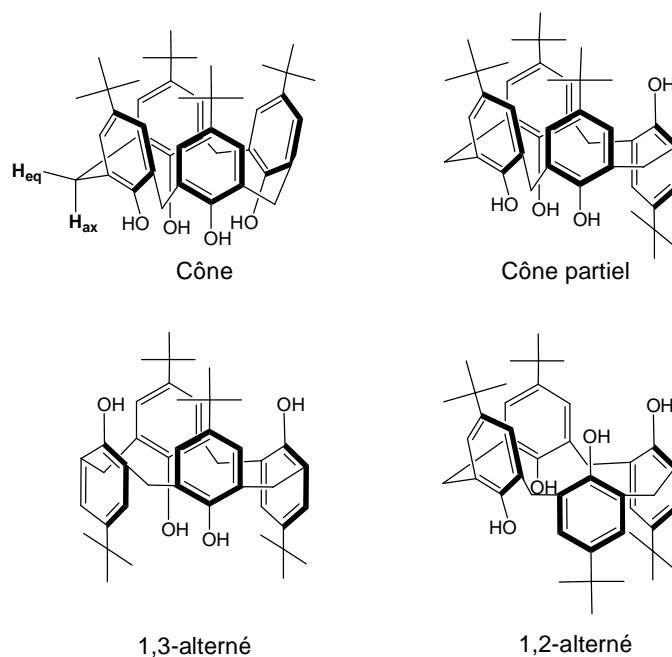
La réaction passe par une substitution électrophile aromatique ( $\text{SE}_{\text{Ar}}$ ) du phénol sur le formaldéhyde, suivie d'une déshydratation par  $\beta$ -élimination. Un deuxième équivalent du phénol entre en action pour une nouvelle  $\text{SE}_{\text{Ar}}$ , et un retour à l'aromatisation abouti à la formation d'un premier dimère. Dans les conditions décrites par D. Gutsche, la réaction s'enchaîne alors selon le même mécanisme en passant par un octamère linéaire jusqu'à la formation d'un octamère cyclique. D. Gutsche a montré que c'est à partir de ce calix[8]arène que se forme le calix[4]arène selon un processus appelé « mitose moléculaire ». Ce mécanisme réactionnel conduisant au calix[4]arène est ainsi résumé en Figure 13.<sup>36, 37</sup>



**Figure 13.** Mécanisme réactionnel généralement admis conduisant à la formation du tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène.<sup>35</sup>

## I.2.2. Conformations du *t*Bu[4]OH et identification par RMN

En observant un *t*Bu[4]OH dans l'espace (voir Figure 10), on remarque que différentes conformations du macrocycle peuvent être envisagées, selon l'orientation des unités phénoliques les unes par rapport aux autres. Il existe en effet principalement quatre entités différentes désignées sous le même nom, comme indiqué ci-dessous en Figure 14.



**Figure 14.** Représentation des quatre conformations limites d'un tétra-*p-tert*-butyl-calix[4]arène.

Ces quatre conformations sont discernables à l'aide de la spectroscopie RMN du proton et du carbone 13, en observant les valeurs de déplacement chimique et l'allure des signaux correspondant aux groupes méthylènes pontants Ar-CH<sub>2</sub>-Ar.<sup>38,39</sup>

Typiquement, en conformation cône, les protons Ar-CH<sub>2</sub>-Ar apparaissent en RMN <sup>1</sup>H sous la forme d'une paire de doublets (système AB) en raison de la non-équivalence des protons pseudo équatoriaux H<sub>eq</sub> orientés vers la partie haute et des protons pseudo axiaux H<sub>ax</sub> orientés vers la partie basse (voir Figure 14, cône). Ces protons H<sub>eq</sub> et H<sub>ax</sub> sont généralement situés autour de 3,2 et 4,3 ppm respectivement. D'autre part, les carbones pontants étant identiques, ils apparaissent en RMN <sup>13</sup>C sous la forme d'un signal unique caractérisé par un déplacement chimique autour de 31-32 ppm.

La perte d'éléments de symétrie dans les conformations cône partiel et 1,2-alterné complique les spectres avec l'apparition en RMN <sup>1</sup>H d'un système AB et d'un singulet, ainsi que de deux pics en RMN<sup>13</sup>C. L'intégration des pics en RMN <sup>1</sup>H permet de différencier ces deux conformations.

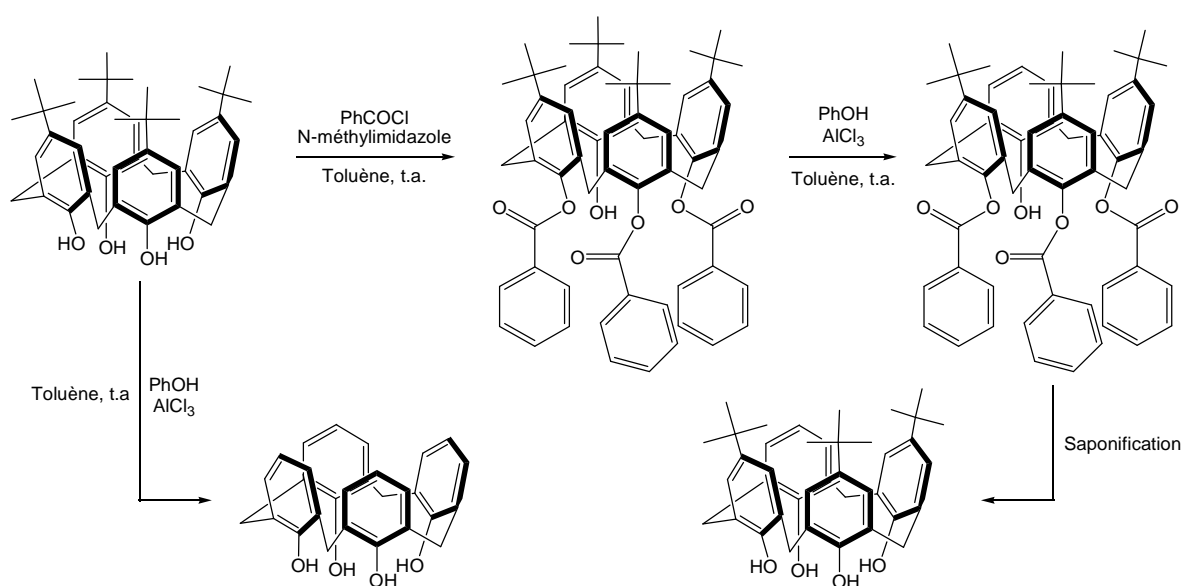
Enfin, l'alternance régulière des unités phénoliques de la conformation 1,3-alterné rend identiques les protons et carbones des méthylènes pontants. Ils apparaissent donc sous la forme d'un seul signal dans leur séquence RMN respective.

Notons que l'intégralité des dérivés du calix[4]arène décrits au cours de ce mémoire ont été obtenus en conformation cône, au regard des signaux RMN correspondant aux groupes méthylènes pontants Ar-CH<sub>2</sub>-Ar (Cf. *Partie Expérimentale*).

### I.2.3. Généralités sur la fonctionnalisation du calix[4]arène

Il est essentiel de garder à l'esprit que d'autres conformations que la conformation cône peuvent servir de plate-forme pour la synthèse de molécules à haut degré d'organisation. Nous avons pu voir précédemment (Cf. *Introduction et objectifs*) que les travaux reportés dans ce mémoire ne concernent que des dérivés du calix[4]arène en conformation cône. C'est pourquoi seule cette conformation sera abordée au cours de ce sous-chapitre.

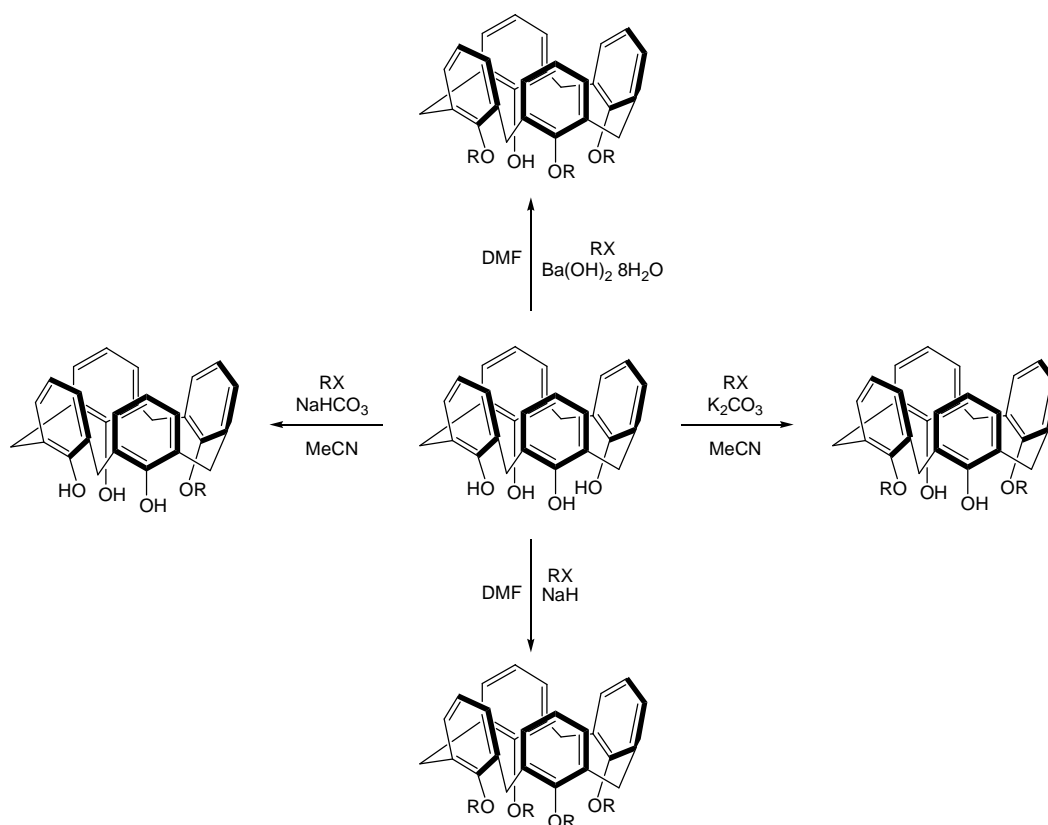
Généralement, les fonctionnalisations d'un calix[4]arène ont lieu sur la partie basse et/ou sur la partie haute, par des réactions régiosélectives. Le synthon commercial le plus abordable étant le *t*Bu[4]OH, la fonctionnalisation de la partie haute commence généralement par une réaction de rétro Friedel-Craft à l'aide de phénol et de chlorure d'aluminium dans le toluène.<sup>35</sup> Le calix[4]arène nu obtenu peut ensuite être engagé dans diverses réactions S<sub>E</sub>Ar pour introduire les groupements désirés. Il est possible de contrôler à la fois la régiosélectivité pour fonctionnaliser la partie haute, ainsi que le degré de substitution pour l'introduction du nombre de groupement voulu. Pour ce faire, l'introduction en partie basse de groupes benzoates par *O*-acylation permet d'éliminer uniquement les groupes *t*Bu portés par les unités phénoliques substituées.



**Figure 15.** Exemples de détertbutylation totales ou partielles *via* la formation d'un dérivé benzoate.



La fonctionnalisation de la partie basse *via* les groupements hydroxyles peut facilement s'effectuer par des réactions de *O*-alkylation ou de *O*-acylation passant par des mécanismes de substitution nucléophile en milieu basique (Figure 16). Les réactions de *O*-alkylation mettent généralement en jeu les agents alkylant classiques de la chimie organique tels que les halogénures d'alcoyles ou encore les tosylates. Le degré de substitution (bis- vs tétra-alkylé par exemple) ainsi que la régiosélectivité (1,3-bis- vs 1,2-bis-alkylé par exemple) peuvent être contrôlés en fonction des conditions opératoires comme la base utilisée, le solvant et la stœchiométrie. Les réactions de *O*-acylation font généralement intervenir des chlorures d'acide ou d'autres types d'acide carboxylique activé, en vue d'obtenir un ester. La régiosélectivité et le degré de substitution peuvent également être relativement contrôlés en fonction des conditions opératoires.



**Figure 16.** Conditions opératoires couramment employées selon le degré de substitution voulu.

Ces diverses méthodes de fonctionnalisation de la partie basse et de la partie haute d'un calix[4]arène sont décrites en détail dans les ouvrages de D. Gutsche et dans celui plus récent de Z. Asfari.<sup>24, 25, 35</sup>

### I.3. Applications des calixarènes en thérapeutique

#### I.3.1. Calixarènes bioactifs

Historiquement, le premier usage d'une entité calixarénique à des fins thérapeutiques fut le Macrocydon décrit par D'Arcy Hart et Conforth (Figure 17).<sup>40, 41</sup> Ce dérivé du calix[8]arène s'est avéré efficace dans la lutte contre la tuberculose pulmonaire causée par le bacille de Koch.<sup>42, 43</sup> Depuis la découverte de ce composé dans les années 50, les calixarènes n'ont pas suscité d'intérêt particulier dans le domaine des molécules anti-infectieuses. C'est dans les années 90 que cet intérêt est réanimé avec le dépôt de plusieurs brevets.<sup>44-47</sup>

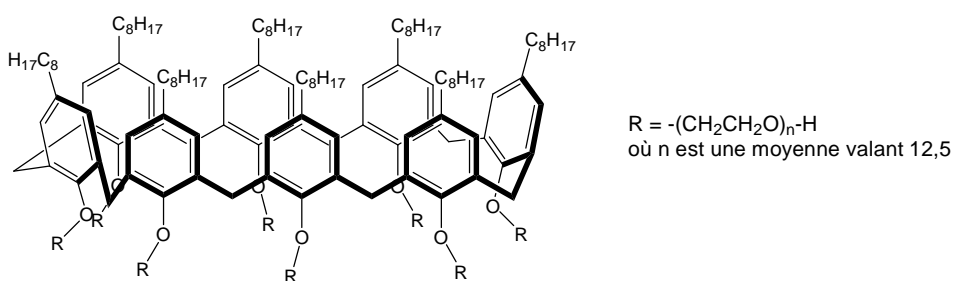


Figure 17. Structure du Macrocydon, dérivé du calix[8]arène à propriété anti-tuberculeuse.

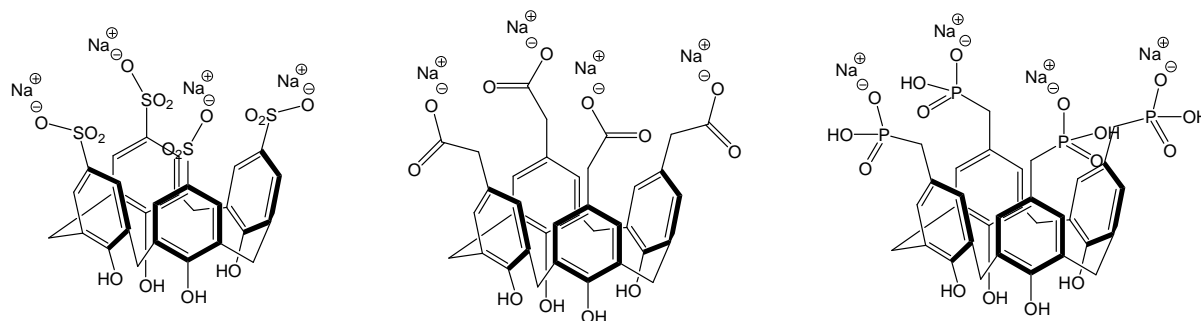
Les avancés dans le domaine des calixarènes anti-infectieux ont récemment été résumés dans plusieurs revues publiées par de Fatima,<sup>48</sup> Rodik,<sup>49</sup> ainsi que par Coleman.<sup>50, 51</sup>

Citons les travaux thèse de M. Mourer, ayant conduit entre autres à la synthèse de calix[4]arènes polycationiques présentant des propriétés antibactériennes parfois remarquables.<sup>7</sup> Parmi ces dérivés, le cas du trifluoroacétate de tétra-*p*-(guanidinoéthyl)-calix[4]arène (CX1) a été évoqué en Introduction de ce mémoire.

Ce type de molécule antibactérienne, dont le mécanisme d'action passe par une perturbation de l'intégrité et des fonctions de la membrane bactérienne (*membrane-active agents*), suscite actuellement un intérêt particulier comme le montre une récente revue publiée par Julian G. Hurdle.<sup>52</sup> Le CX1 fera l'objet d'un chapitre dans ce mémoire visant à mieux comprendre son mode d'action.

Doivent également être cités les travaux initiés par N. Psychogios et poursuivis par M. Mourer portant sur des dérivés du calix[4]arène porteurs sur la partie haute de groupements

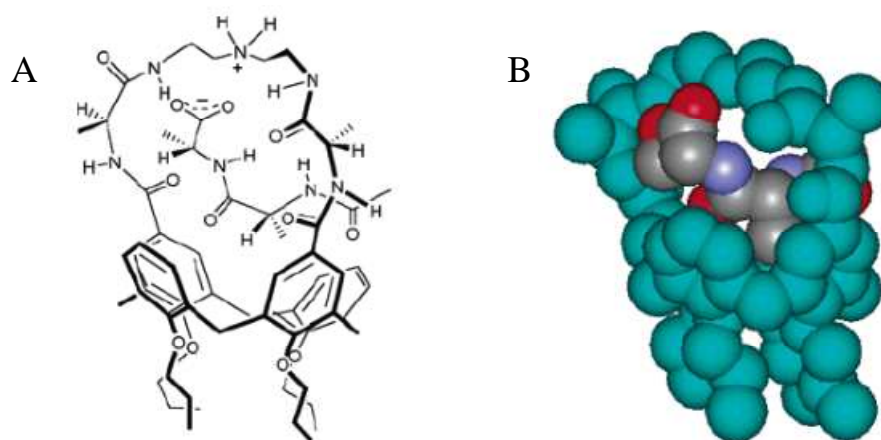
anioniques sulfonates, carboxylates ou phosphonates (Figure 18). Ces calixarènes polyanioniques présentent d'intéressantes activités anti-HIV, virus responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).<sup>53</sup>



**Figure 18.** Exemples de calix[4]arènes polyanioniques à propriété anti-HIV.

La capacité d'organisation du calix[4]arène peut se révéler un formidable atout dans la conception de nouveaux principes actifs. Une disposition spatiale spécifique de différents groupes fonctionnels peut être essentielle pour générer une activité antimicrobienne.

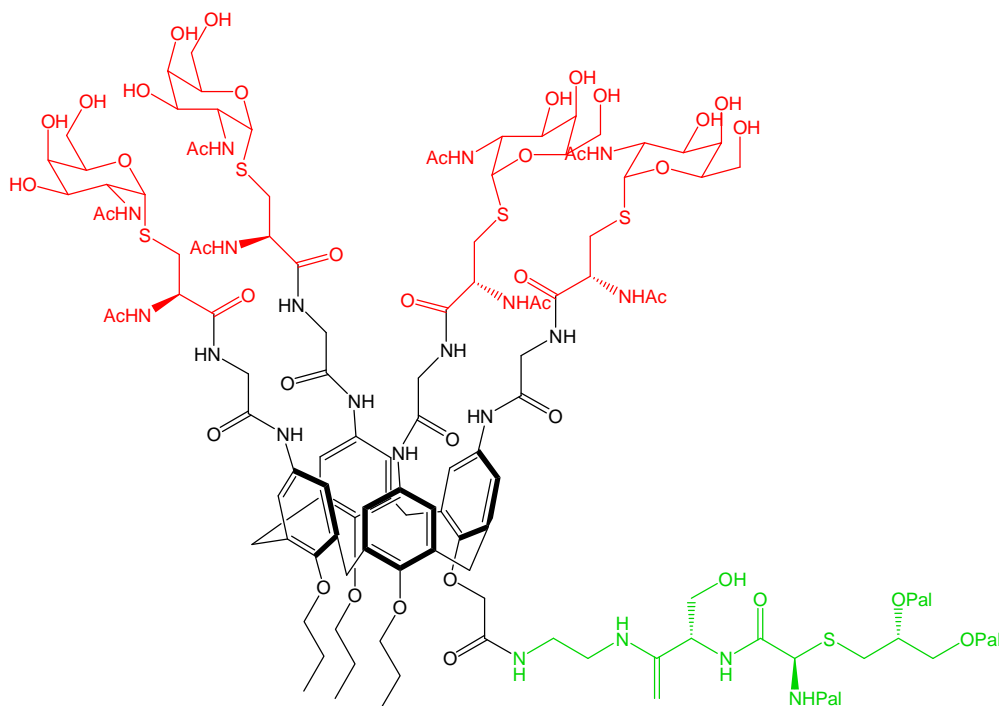
On peut citer le cas de la vancomycine, un glyco-peptide antibactérien produit par un microorganisme (*Amycolatopsis orientalis*).<sup>54</sup> Cet antibactérien est connu pour interagir avec certain peptides précurseurs de la paroi bactérienne, inhibant ainsi la biosynthèse de cette dernière. En reproduisant l'architecture de la vancomycine, plus particulièrement la partie se fixant aux peptides précurseurs, il est envisageable de produire de nouvelles molécules antibactériennes. Casnati et coll. ont mis à profit la structure restreinte du calix[4]arène en incorporant un pont pseudopeptidique sur la partie haute de ce dernier, ainsi capable de fixer les peptides précurseurs cibles (Figure 19).<sup>55, 56</sup> Les auteurs ont alors observés des activités antibactériennes comparables à celles de la vancomycine.



**Figure 19.** Peptide *N*-acétyl-D-Ala-D-Ala, un des précurseurs de paroi bactérienne, complexé par un peptido-calix[4]arène développé par Casnati et coll. (A).<sup>56</sup> Modèle révélant la complémentarité substrat-récepteur (B).

D'autres dérivés du calix[4]arène décrits par Motornaya et coll. présentent des activités antivirales intéressantes. Les auteurs font état d'un calix[4]arène porteur en partie haute du macrocycle de quatre motifs ammonium d'adamantane, présentant une activité contre certains virus de l'herpes (HSV-2).<sup>57</sup> Remarquons qu'il s'agit du seul cas de calixarène antiviral porteur de groupements cationiques.

Récemment, Geraci et coll. ont utilisé le calix[4]arène comme plate-forme de conjugaison entre un antigène glycomimétique spécifique aux cellules cancéreuses et un immunoadjuvant peptidique non spécifique (Figure 20).<sup>58</sup> Leurs études menées *in vivo* chez la souris et *in vitro* par test ELISA ont montré que ce dérivé calixarénique stimule la production de certains anticorps spécifiques aux cellules malignes, laissant envisager l'emploi de ce type de composé comme vaccin anti-cancéreux.



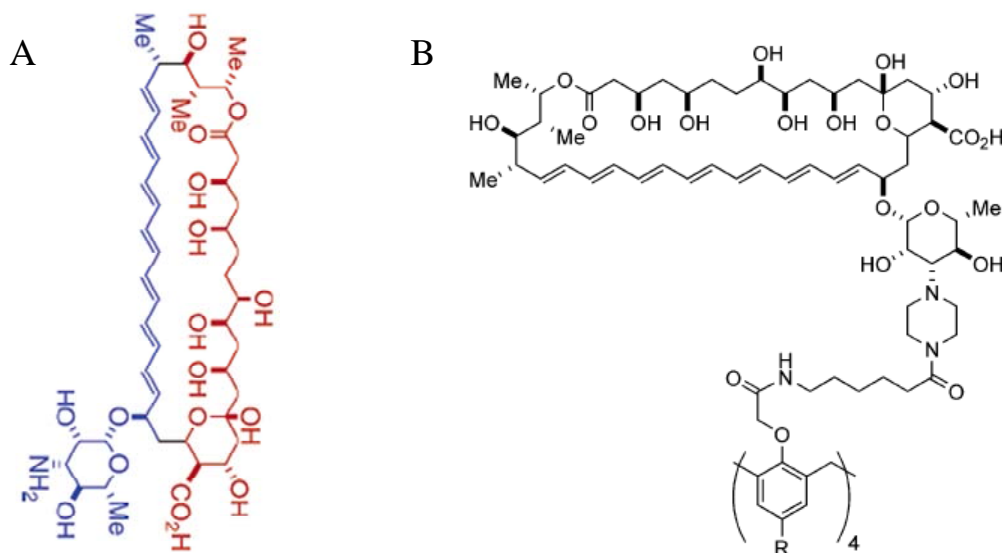
**Figure 20.** Calix[4]arène utilisé par Geraci et coll. comme plate-forme de conjugaison entre un antigène glycosidique (rouge) et un immunoadjuvant peptidique (vert).<sup>58</sup>

Les mêmes auteurs ont décrit plusieurs *t*Bu[4]OH porteurs en partie basse de quatre unités nucléotidiques d'origines naturelles.<sup>59</sup> Ils ont montré d'une part que ces composés amphiphiles et hydrosolubles étaient capable d'auto-assemblage en milieu aqueux.<sup>60, 61</sup> D'autre part, une première étude *in vitro* a démontré leur capacité d'inhibition de la réplication d'ADN chez *Penicillium digitatum*, laissant entrevoir de possibles applications thérapeutiques.<sup>62</sup>

Ces auteurs ont également démontré les propriétés anti-oxydantes d'un calix[4]arène porteur en partie haute de quatre motifs acide caféique ou acide sinapique.<sup>63</sup>

Vovk et coll. ont reportés la capacité d'inhibition par plusieurs calixarènes phosphonates de la tyrosine phosphatase (PTP), enzyme essentiel au métabolisme d'une bactérie de la famille des *Yersinia*.<sup>64</sup> Cette activité, de l'ordre du micromolaire, a été déterminée *in vitro* par suivi de la vitesse d'hydrolyse du *p*-nitrophénylphosphate utilisé comme substrat par cet enzyme PTP. Le mode de liaison de ces dérivés calixaréniques dans le site actif de l'enzyme a été étudié par une approche de docking moléculaire.

Paquet et coll. ont greffé sur la partie basse d'un calix[4]arène quatre résidus d'amphotéricine B, un antifongique à large spectre (Figure 21). La molécule obtenue a été utilisée comme outil afin de mieux comprendre le mode d'action de l'amphotéricine B, faisant probablement intervenir la formation de canaux ioniques dans la membrane fongique.<sup>65</sup> Par ailleurs, ce conjugué calixarène-amphotéricine B s'est révélé plus actif que l'amphotéricine B natif, démontrant que les capacités d'organisation du calix[4]arène peuvent exalter l'activité de certains principes actifs.



**Figure 21.** A) Amphotéricine B constitué d'une partie hydrophile (rouge) et d'une partie hydrophobe (bleu). B) Conjugué calix[4]arène-tétra-amphotéricine B.<sup>65</sup>

D'autres applications potentielles des calixarènes en tant qu'agent antivirale, ou anticancéreux, ainsi qu'antithrombotique ou antifibrotique sont décrites dans divers brevets parus entre 1995 et 2005.<sup>44-47, 66-70</sup>

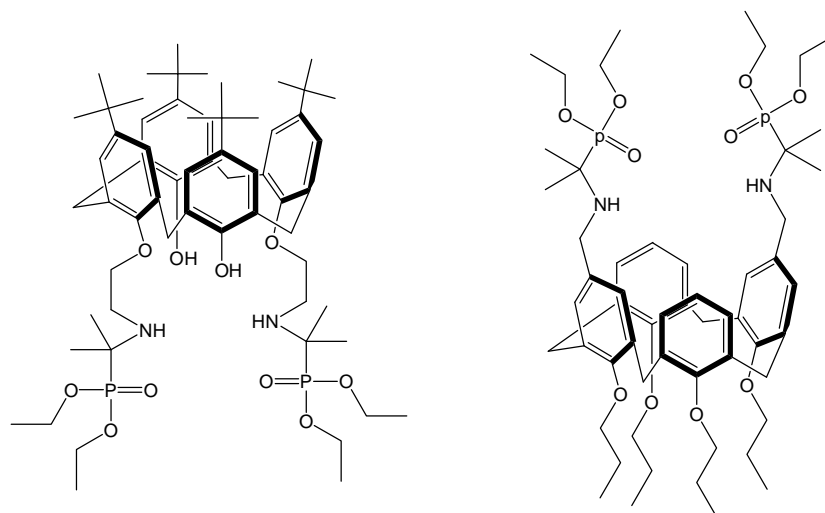
### I.3.2. Calixarènes amphiphiles en formulation de principes actifs

D'autres applications du calix[4]arène dans le domaine médical concerne l'emploi de dérivés amphiphiles en formulation pour le transport de molécules d'intérêt biologique. Ces dernières peuvent être encapsulées *via* la formation de structures supramoléculaires auto-assemblées comme des vésicules. Ainsi, une revue publiée en 2008 par Mutihac résume brièvement les applications potentielles de calix[n]arènes fonctionnalisés pour le transport, en particulier trans-membranaire, de molécules bioactives.<sup>71</sup> Helttunen et coll. ont quant-à eux résumé en 2010 le développement de la chimie des calixarènes amphiphiles, en mettant l'accent sur les voies synthétiques généralement utilisées pour leur production, ainsi que sur leurs propriétés d'auto-assemblage en milieu aqueux.<sup>72</sup>

L'utilisation de tels systèmes de transport peut permettre d'outrepasser certaines limitations quant-à l'emploi d'agents thérapeutiques, comme des problèmes de solubilité (eau ou membrane) ou encore de fragilité dans certaines conditions physiologiques, améliorant ainsi leur biodisponibilité. On peut alors distinguer deux principales applications de cette méthode :

- le calixarène est utilisé afin de solubiliser/protéger des composés peu polaires et/ou peu solubles dans l'eau.
- le calixarène est utilisé pour encapsuler une espèce polaire et la rendre temporairement lipophile afin de traverser une membrane lipidique par exemple.

Une étude réalisée par Stoikov et coll. a montré que des biomolécules hydrophiles, comme les acides aminés, peuvent être efficacement transportées au travers d'une membrane lipidique par l'intermédiaire de dérivés  $\alpha$ -aminophosphonate calix[4]arène amphiphiles.<sup>73</sup> Ils ont comparé la capacité de transporteur de deux dérivés, munis d'une partie basse polaire et d'une partie haute apolaire pour le premier, et inversement pour le second (Figure 22). Ils ont de plus démontré que les aminoacides aromatiques étaient sélectivement transportés, impliquant un rôle de reconnaissance de la cavité lipophile du calixarène.



**Figure 22.** Dérivés aminophosphonates du calix[4]arène étudiés par Stoikov et coll.<sup>73</sup>

Citons également les travaux de Fernandes et coll. ayant publié une étude concernant la formation de complexe d'inclusion entre un calix[6]arène hexa-sulfonate et la tétracaine, un anesthésique local.<sup>74</sup> Les auteurs expliquent comment cette formulation peut permettre de limiter certains effets indésirables tout en améliorant l'hydro-solubilité et donc la biodisponibilité de la tétracaine.

Récemment, Nault et coll. ont reporté la préparation et l'utilisation de nanoparticules formées par la superposition de couches auto-assemblées d'un tétra-*p*-aminocalix[4]arène porteur en partie basse de chaînes dodécylalkyles.<sup>75</sup> Les auteurs ont montré que ces nanoparticules pouvaient être recouvertes de brins d'ADN, et les transporter au travers de la membrane cellulaire (transfection d'ADN). Ce procédé pourrait être appliqué dans le cadre de la thérapie génique.

Dans une même optique de transfection d'acide nucléique, Rodik et coll. ont publié la synthèse de calix[4]arènes amphiphiles porteurs de groupes cationiques sur la partie haute (ammonium ou imidazolium) et de chaînes alkyles en partie basse (de C3 à C8).<sup>76</sup> Les auteurs ont montré que ces molécules peuvent s'auto-assembler en micelles puis, en présence d'ADN, s'agréger en nanoparticules de taille comparable à celle d'un virus soit environ 50 nm (Figure 23). Les études sur culture cellulaire ont montré que la transfection de gène par ce système à base de calixarène est possible. De plus, Rodik et coll. ont montré que ces dérivés calixaréniques présentent une faible cytotoxicité.

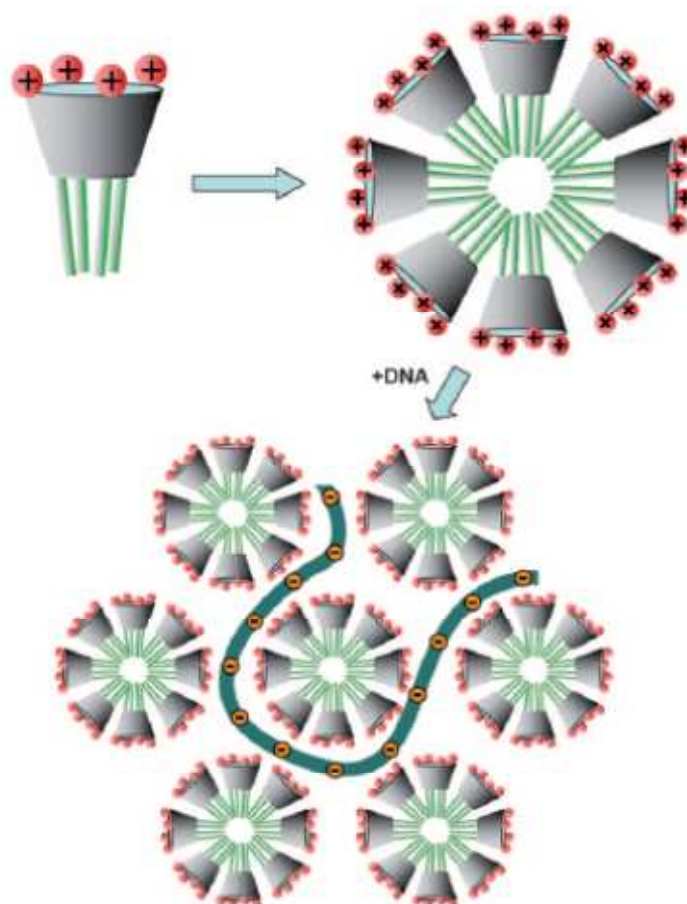


Figure 23. Auto-assemblage de nanoparticules à base de dérivés calixaréniques amphiphiles et d'ADN.<sup>76</sup>

### I.3.3. Conclusion et perspectives

Au cours de cet état des lieux bibliographique, nous avons pu apercevoir comment le calix[4]arène en conformation cône peut être utilisé pour concevoir des molécules à haut degré d'organisation. La faculté de ce macrocycle à orienter dans l'espace et à combiner divers groupements fonctionnels permet en effet de mimer et d'interagir avec les composants biologiques, générant ainsi une activité. Par exemple, en fonctionnalisant les parties haute et basse à façon, plusieurs propriétés peuvent être associées, permettant un ciblage puis l'apport d'une substance ou analogue sur son site d'action.

D'autre part, l'intérêt des calixarènes dans le domaine de la formulation pour le transport de molécules thérapeutiques est aujourd'hui reconnu, faisant généralement intervenir des entités amphiphiles. Ces molécules sont capables de s'auto-assembler en structure supramoléculaire permettant d'encapsuler divers agents thérapeutiques, allant de



brins d'acide nucléique aux aminoacides. Certains de ces calixarènes présentent une faible cytotoxicité, laissant donc envisager leur application par exemple en thérapie génique (transfection de gène) ou dans l'optimisation de la biodisponibilité de molécules bioactives.

Cependant, l'utilisation de calixarène comme prodrogue de principes actifs est encore peu répendue, représentant un champ d'investigation presque inexploré. Ce thème de recherche sera donc approfondi au cours de ce mémoire. Nous aborderons d'une part l'étude du comportement à l'interface eau-air de calix[4]arènes déjà synthétisés au laboratoire et conçus comme prodrogues amphiphiles d'antibactériens. Cette famille de composé sera ensuite enrichie par la synthèse de nouvelles prodrogues calixaréniques d'analogues de nucléoside à propriété antivirale.







## Chapitre II

# La technique des films de Langmuir

Une grande part des travaux décrits dans ce mémoire ont été réalisés à l'aide de la technique des films de Langmuir, soit par l'étude de films monomoléculaires adsorbés à l'interface eau-air ainsi considérés comme des modèles de membrane biologique.

### II.1. Historique

Irving Langmuir (1881-1957),<sup>77, 78</sup> chimiste et physicien américain, a posé les bases de plusieurs domaines en chimie et en physique, avec par exemple l'invention des lampes à incandescence sous atmosphère gazeuse ou la technique de soudure à l'hydrogène. C'est en 1932 qu'il reçut le Prix Nobel pour ses recherches en chimie des interfaces.

En partenariat avec Katharine B. Blodgett (1898-1979), il a étudié les films ultraminces et les phénomènes d'adsorption interfaciaux.<sup>79, 80</sup> Ensemble, ils ont introduits le concept de film monomoléculaire (film épais d'une entité moléculaire) à la surface d'un liquide (film de Langmuir) ou d'un solide (film de Langmuir-Blodgett), ainsi que les bases de la physique bidimensionnelle décrivant ces systèmes. Dans notre cas, nous verrons exclusivement les films monomoléculaires de Langmuir constitués de molécules insolubles dans l'eau et généralement amphiphiles, étendues à la surface d'un liquide le plus souvent aqueux et appelé sous-phase.

De nos jours, cette technique permet d'étudier des modèles de membrane cellulaire à partir de phospholipides, constituants majeurs des bicouches lipidiques (Figure 24). En effet, à l'interface eau-air, ces molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe s'organisent de façon à orienter la partie polaire dans l'eau et la partie hydrophobe dans l'air. Le film monomoléculaire ainsi obtenu peut être alors assimilé à une "demi" membrane lipidique permettant d'étudier les interactions membrane/molécule.<sup>15, 16</sup>

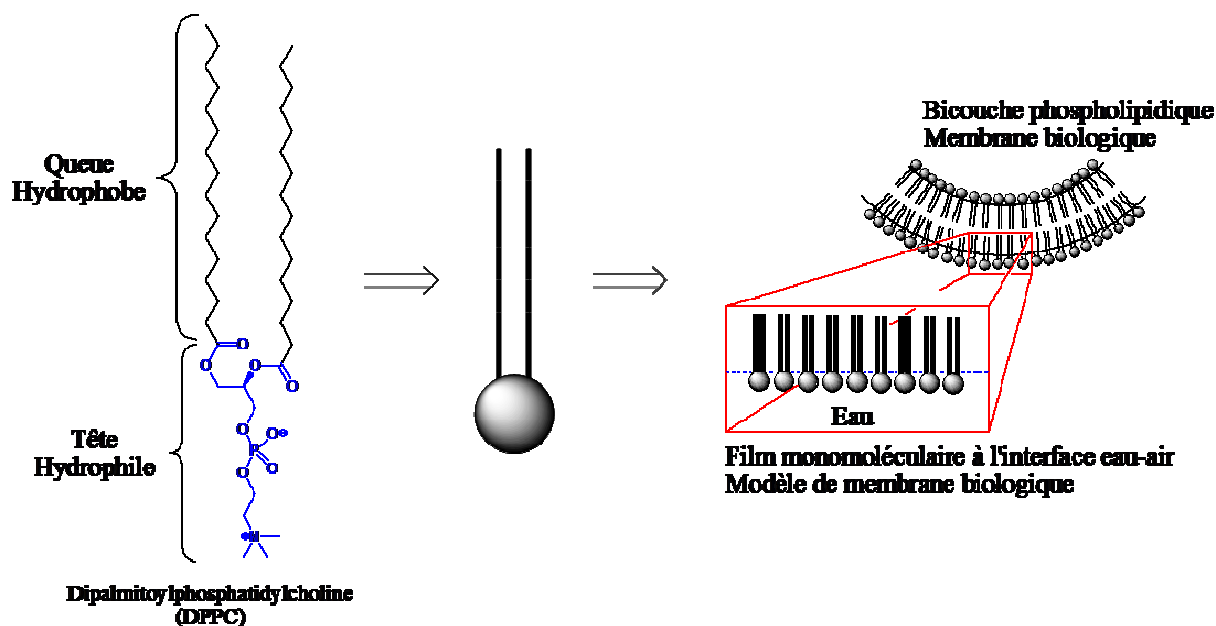


Figure 24. Phospholipide (DPPC) constitué d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe, symbolisés respectivement par une sphère et deux bâtonnets. Schématisation d'un film monomoléculaire de DPPC à l'interface eau-air, modèle d'une membrane lipidique.

## II.2. Préparation de films de Langmuir

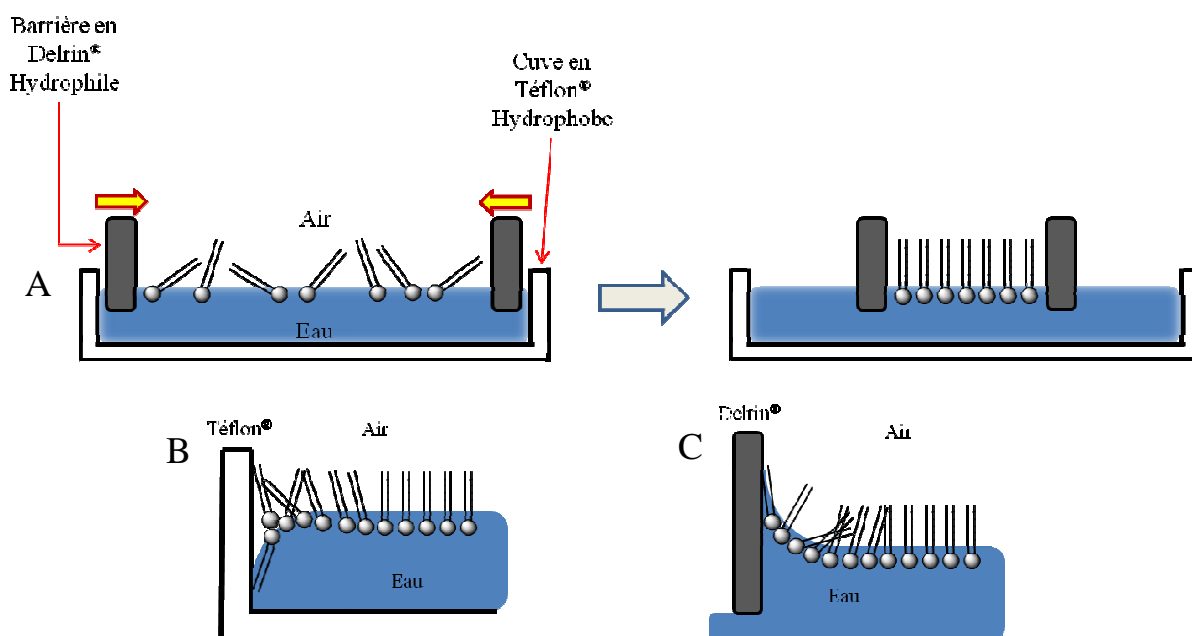
L'avantage principal de cette technique est la simplicité de préparation d'un film monomoléculaire de Langmuir, comparé à d'autres modèles de membrane tels que les liposomes. De plus, outre le capital investi pour acquérir le matériel, ce domaine de recherche est relativement peu coûteux nécessitant peu de substances.

La molécule d'intérêt est tout d'abord solubilisée dans un solvant organique volatil et non miscible à l'eau, généralement  $\text{CHCl}_3$ . Dans certains cas, l'ajout de MeOH peut être requis pour une solubilisation totale, comme par exemple avec certains phospholipides comme DMPE ou DMPG. Pour ce faire, la substance est pesée sur une balance de précision dans une fiole jaugée de faible volume (généralement 5 mL) afin d'obtenir une solution de concentration précise. La solution ainsi préparée doit avoir une concentration suffisamment importante pour permettre un volume de dépôt à la surface de l'eau peu important, mais suffisamment faible pour que ce volume soit prélevé précisément et éviter des phénomènes d'agrégation en solution. Le volume utilisé habituellement est compris entre 15 et 100  $\mu\text{L}$  pour une concentration d'environ  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  de substance.

Cette solution est alors déposée goutte-à-goutte à la surface de la sous-phase. Bien que le  $\text{CHCl}_3$  soit plus dense que l'eau, sa volatilité et sa faible tension superficielle permette aux gouttelettes de se disperser rapidement à la surface de la sous-phase sans couler au fond. Un délai d'au moins 15 minutes est nécessaire afin de laisser le temps au système de s'équilibrer. Les molécules amphiphiles et hydro-insolubles ainsi déposées à la surface d'une sous-phase aqueuse s'auto-organisent à l'interface eau-air comme décrit précédemment (voir Figure 24).

### II.3. Caractérisation et étude des propriétés d'un film de Langmuir

Le film monomoléculaire ainsi formé est assimilé à un système bidimensionnel dont l'état physique (gazeux, liquide ou solide) peut être modifié en fonction de sa compression.<sup>81</sup> En effet, la réduction progressive de l'espace disponible, à savoir l'aire de la cuve, permet de resserrer les molécules adsorbées à l'interface et d'augmenter la pression afin de passer d'un état gazeux (absence d'interactions intermoléculaires) à liquide puis solide (Figure 25, A). Au-delà, lorsque l'espace disponible pour chaque molécule devient insuffisant, il y a rupture du film monomoléculaire avec formation d'agrégats tridimensionnels.



**Figure 25.** Cuve de Langmuir remplie d'eau recouverte d'un film monomoléculaire. Compression du film et passage de gauche à droite d'un état gazeux à un état solide (A). Bord de la cuve, interface négligeable par rapport à l'interface eau-air (B). Bord d'une barrière, interface également négligeable (C).

Les modifications physiques d'un film monomoléculaire étalé à l'interface eau-air, au fur et à mesure de sa compression, peuvent être mesurées par diverses méthodes. A température constante, le suivi de certaines grandeurs comme la pression de surface  $\Pi$  ou le potentiel de surface  $\Delta V$ , permet de tracer des isothermes de compression. Connaissant la quantité de molécules déposées et la surface de la cuve d'eau, ces isothermes sont données en fonction de l'aire moléculaire moyenne, notée  $A$  et généralement exprimée en  $\text{Å}^2 \text{molécule}^{-1}$ , représentant l'aire moyenne qu'occupent chaque molécule à l'interface.

Il est important de remarquer que l'emploi d'une cuve aux dimensions suffisamment grandes (respectivement plusieurs dizaines et unités de centimètres en longueur et en largeur) permet d'annuler les effets de bord (Figure 25, B et C). Des dimensions de cuve suffisantes rendent l'interface eau-air beaucoup plus importante en termes d'unité de surface comparée aux interfaces eau-bord ou eau-barrière. Ces dernières sont donc négligeables.

### II.3.1. Isothermes de compression $\Pi$ - $A$

Le processus d'adsorption après étalement de molécules amphiphiles à la surface d'une sous-phase aqueuse entraîne une diminution de la tension superficielle de cette dernière. En faisant varier l'aire de la sous-phase, la tension superficielle est modifiée. Celle-ci évolue en fonction de la diminution de l'aire et de la nature des molécules étalées sur la sous-phase selon l'Equation n° 1. La tension superficielle  $\gamma$  peut donc servir de sonde pour mesurer les propriétés de surface d'un film de Langmuir en fonction de sa compression.

$$\vec{\gamma} = \vec{F} \int_0^x dx$$

**Equation n° 1.**

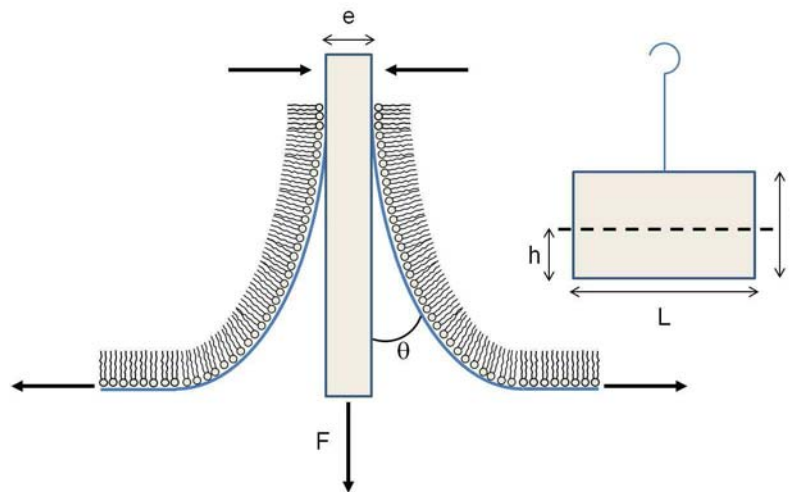
La technique de mesure couramment utilisée est celle de la lame de Wilhelmy (Figure 26). Ce dernier démontra au XIX<sup>e</sup> siècle que la force exercée au centre de gravité d'une lame de longueur  $L$  et d'épaisseur  $e$  définies, lorsqu'elle est placée à l'interface eau-air, est directement liée à la tension superficielle  $\gamma$  selon la relation suivante :

$$F = (\delta_w \cdot g \cdot l \cdot L \cdot e) + [2 \cdot \gamma (e + L) \cos \theta] - (\delta_e \cdot g \cdot e \cdot L \cdot h)$$

où  $\delta_w$  et  $\delta_e$  sont la densité de la lame de Wilhelmy et de l'eau, respectivement, et  $g$  la constante gravitationnelle.

**Equation n° 2.**





**Figure 26.** lame de Wilhelmy à l'interface eau-air, en vue transversale.

Expérimentalement, l'utilisation d'une fine lame de dimensions connues rend constants le premier et le dernier terme de l'Equation n° 2. Ainsi, la mesure de  $F$  ne rend compte que de la variation de la tension superficielle  $\gamma$ . De plus, la finesse de la lame rend son épaisseur  $e$  négligeable devant sa longueur  $L$ . On obtient alors une équation simplifiée, dont la force  $F$  exercée sur la lame n'est liée à la tension superficielle  $\gamma$  que par l'angle de mouillabilité  $\theta$  :

$$F = 2 \cdot \gamma \cdot L \cdot \cos \theta$$

**Equation n° 3.**

Dans nos études, nous avons utilisé une lame de platine qui, en contact avec l'eau, est totalement mouillée ( $\theta \sim 0$ ). Le terme  $\cos \theta$  est donc égal à 1. Ainsi, l'Equation n° 3 peut être simplifiée comme suivant :

$$\gamma = \frac{F}{2 \cdot L}$$

**Equation n° 4.**

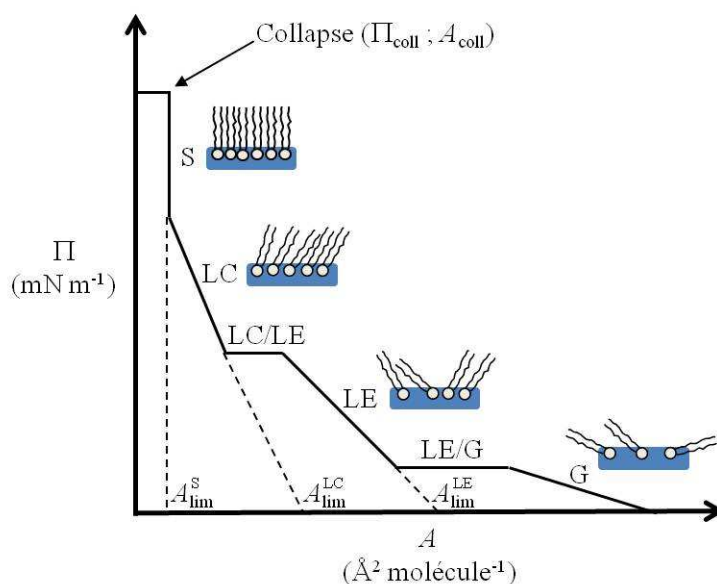
Ainsi, avec une lame de longueur  $L$  connue, la mesure par une simple balance de la force verticale  $F$  exercée sur cette lame placée à l'interface eau-air donne directement accès à la tension superficielle  $\gamma$ .

La pression de surface  $\Pi$  est définie comme étant la différence entre la tension superficielle de l'eau pure  $\gamma_0$  et celle de cette eau recouverte d'un film monomoléculaire  $\gamma$ , traduit par l'équation suivante :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma$$

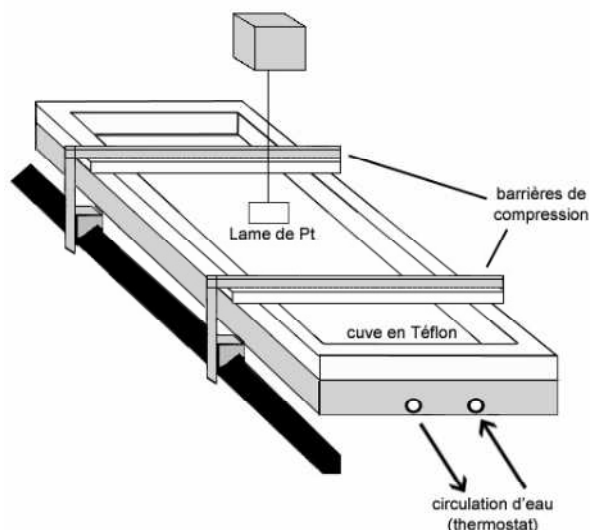
**Equation n° 5.**

La tension superficielle de l'eau pure à 20 °C étant de 72,8 mN m<sup>-1</sup>, la méthode de Wilhelmy associée à une balance de Langmuir permet de suivre l'évolution de la pression de surface  $\Pi$  en fonction de l'aire moléculaire  $A$ . Une isotherme de compression  $\Pi$ - $A$ , dont une représentation idéalisée est donnée en Figure 27, s'apparente alors un diagramme de phase donnant des informations sur l'état physique du film considéré.



**Figure 27.** Isotherme de compression  $\Pi$ - $A$  idéalisée. Indication des divers états physiques d'un film de Langmuir au cours de sa compression, ainsi que les paramètres caractéristiques s'y rapportant. G : phase gazeuse. LE : phase liquide-expansé. LC : phase liquide-condensé. S : phase solide.  $A_{coll}$  et  $\Pi_{coll}$  : aire moléculaire et pression de surface au point de collapse.  $A_{lim}$  : aire moléculaire limite de chaque phase.

La balance de Langmuir permettant la mesure d'une isotherme de compression  $\Pi$ - $A$  est constituée d'une cuve en Téflon<sup>®</sup> hydrophobe, surmontée de deux barrières mobiles en Delrin<sup>®</sup> hydrophile (Figure 28). La combinaison de ces deux matériaux permet de contenir la sous-phase dans la cuve et de constituer à l'aide des barrières un espace fermé de dimensions définies. Le rapprochement simultané des barrières permet de connaître à chaque instant l'aire moléculaire  $A$ . La lame de Wilhelmy placée à l'interface eau-air entre ces barrières permet de mesurer à chacun instant la pression de surface  $\Pi$  du film considéré, selon l'Equation n° 5.



**Figure 28.** Schémas de principe d'une cuve de Langmuir équipée de deux barrières (compression symétrique) et d'une lame de Wilhelmy comme capteur de pression de surface.<sup>82</sup>

L'isotherme de compression  $\Pi$ - $A$  ainsi mesurée caractérise le composé étudié dans des conditions données (température, composition de la sous-phase, etc). Elle révèle l'évolution et/ou les transitions entre chaque phase lors de la réduction de l'aire moléculaire  $A$ , et permet de déterminer certains paramètres propres au composé étudié tels que l'aire limite ( $A_{\text{lim}}$ ), l'aire et la pression au point de collapse ( $A_{\text{coll}}$  et  $\Pi_{\text{coll}}$ , respectivement), ainsi que le module de compressibilité ( $C_s^{-1}$ ).

L'aire moléculaire limite  $A_{\text{lim}}$  est déterminée par extrapolation à  $\Pi = 0 \text{ mN m}^{-1}$  de la zone linéaire de l'isotherme correspondant à une phase donnée. Celle-ci donne une approximation des dimensions (en vue de dessus) de l'entité moléculaire étudiée. Par comparaison avec d'autres aires moléculaires caractéristiques, ce paramètre peut également apporter des informations dynamiques.

Le collapse d'un film de Langmuir a lieu lorsque l'aire disponible pour chaque molécule devient plus faible que l'aire occupée par ces dernières. La rupture du film monomoléculaire entraîne ainsi la formation d'agrégats tridimensionnels ou de multicouches. La pression de surface au point de collapse reflète alors la stabilité du film, et l'aire moléculaire au point de collapse correspond à l'aire minimum occupée par le composé étudié sur le plan d'eau.

Le module de compressibilité,  $C_s^{-1}$ ,<sup>83</sup> reflète la rigidité du film (état physique plus ou moins solide ou liquide) et se calcule selon l'équation suivante :

$$C_s^{-1} = -A \cdot \left( \frac{dA}{d\Pi} \right)$$

**Equation n° 6.**

Comme la pression de surface, le module de compressibilité augmente lors de la compression, traduisant le compactage des molécules adsorbées à l'interface eau-air. Ainsi, la valeur maximale du module de compressibilité correspond à l'état le plus condensé du film. Cette valeur peut donc permettre dans certains cas de déterminer précisément le point de collapse. La valeur de  $C_s^{-1}$  peut aussi être employée pour comparer l'état de compactage entre deux films de composition différente, ou d'un même film en fonction des conditions expérimentales.

### II.3.2. Isothermes de compression $\Delta V$ -A

La mesure du potentiel de surface  $\Delta V$  au cours de la compression d'un film monomoléculaire étalée à l'interface eau-air permet de tracer l'isotherme de compression  $\Delta V$ -A de ce dernier. Cette isotherme, en relation avec le(s) dipôle(s) du film, donne accès à des informations concernant l'orientation des molécules le constituant. On peut mettre en évidence des transitions de phase qui ne seraient pas perceptibles par la seule mesure de la pression de surface.

Le potentiel de surface  $\Delta V$  est défini comme étant la différence entre le potentiel électrique  $V_M$  à la surface de la sous-phase recouverte d'un film monomoléculaire, et le potentiel électrique  $V_0$  à la surface de l'eau pure.

$$\Delta V = V_M - V_0$$

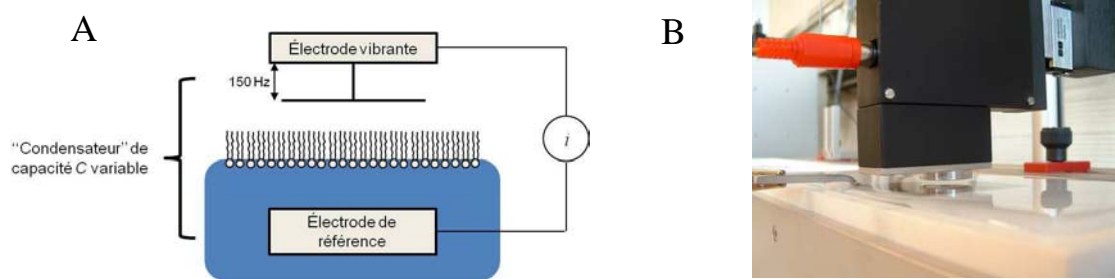
**Equation n° 7.**

La technique de mesure la plus couramment utilisée est celle de la sonde vibrante de Kelvin, initialement développée au début du XX<sup>e</sup> siècle afin de mesurer la différence de potentiel électrique de contact entre des matériaux conducteurs.<sup>84</sup> A l'interface eau-air, cette technique consiste à placer une électrode vibrante juste au dessus de la sous-phase (~2 mm) dans laquelle est plongée une contre-électrode (Figure 29). Ces deux électrodes forment alors

l'équivalent d'un condensateur électrique caractérisé par sa capacité  $C$ , qui est fonction de l'état du film monomoléculaire à la surface de la sous-phase, et donc du potentiel  $V_M$ . On peut donc relier la valeur de  $C$  à celle du potentiel de surface  $\Delta V$ . L'électrode vibrante va permettre de moduler la distance entre les deux armatures du condensateur, donc la valeur de sa capacité  $C$ , en générant un courant alternatif  $i$  donnant ainsi accès au potentiel de surface  $\Delta V$  selon l'Equation n° 8. C'est la mesure de ce courant induit  $i$  qui donne accès à la valeur du potentiel de surface.<sup>85</sup>

$$i = \Delta V \cdot \frac{dC}{dt}$$

**Equation n° 8.**



**Figure 29.** Schéma de principe d'une sonde vibrante de Kelvin appliquée à la mesure du potentiel de surface  $\Delta V$  d'un film de Langmuir (A), photographie du montage expérimental (B).<sup>82</sup>

Selon la théorie de Helmholtz, un film monomoléculaire peut être assimilé à un assemblage de dipôles moléculaires, chacun contribuant à la polarisation du film. Ainsi, entre les armatures parallèles de notre condensateur formé par la combinaison de l'électrode vibrante en surface et de la contre-électrode immergée, le potentiel de surface  $\Delta V$  est lié à l'aire moléculaire  $A$  par la relation suivante :

$$\Delta V = \frac{\mu_{eff}}{\epsilon_0 \cdot A}$$

où  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide.

**Equation n° 9.**

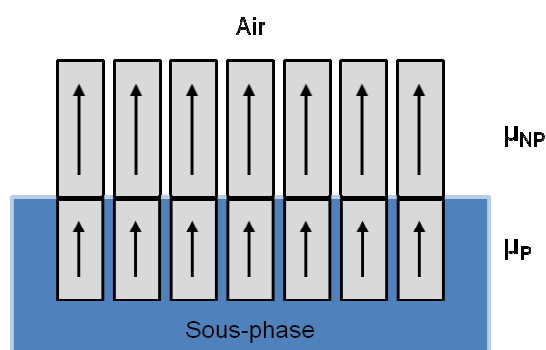
On peut remarquer d'après l'Equation n° 9 que la diminution de l'aire moléculaire  $A$  lors de la compression, ainsi que l'augmentation du moment dipolaire effectif noté  $\mu_{eff}$ , entraînent l'augmentation du potentiel de surface  $\Delta V$ . Par conséquent, l'augmentation brutale de  $\Delta V$  sur une isotherme obtenue à compression constante indique une réorientation des

dipôles constituant le film. Cette technique permet donc d'étudier l'orientation des molécules étalées à l'interface eau-air possédant un moment dipolaire non nul.

D'après le modèle de la double couche de Vogel-Möbius (Figure 30),<sup>86, 87</sup> la somme du moment dipolaire des parties polaires  $\mu_P$  et non-polaires  $\mu_{NP}$  donne la valeur de  $\mu_{eff}$  :

$$\mu_{eff} = \mu_P + \mu_{NP}$$

**Equation n° 10.**



**Figure 30.** Modèle de la double couche de Vogel-Möbius relatif à un film monomoléculaire de Langmuir.<sup>82</sup>

Outre l'acquisition de l'isotherme de compression  $\Delta V-A$ , le potentiel de surface donne donc accès à la valeur de  $\mu_{eff}$ , un autre paramètre caractéristique. En pratique, celui-ci se calcule selon une équation empirique :

$$\mu_{eff} = \frac{A \cdot \Delta V}{37,7}$$

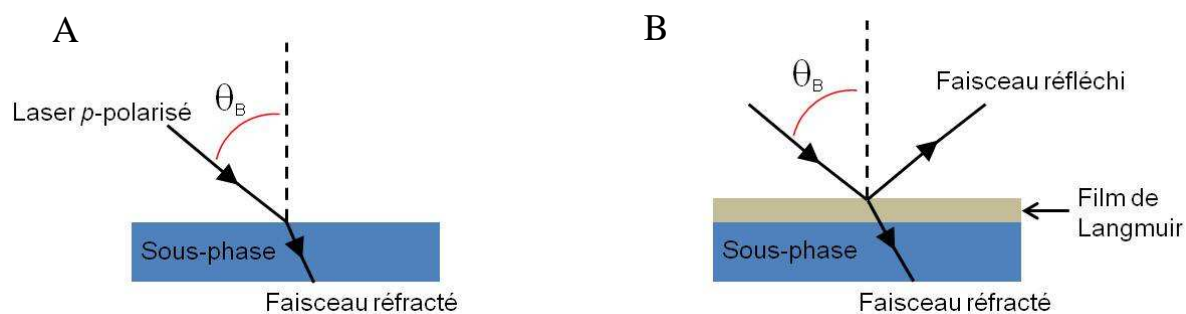
**Equation n° 11.**

Ce paramètre apporte des informations complémentaires au potentiel de surface. Il permet de rendre compte de l'orientation des molécules par rapport au plan d'eau. D'autre part, la comparaison de cette valeur entre deux entités peut mettre en évidence leur amphiphilie relative. Cependant, le calcul de  $\mu_{eff}$  selon l'Equation n° 11 ne prend en compte que les dipôles neutres, formellement ou zwitterioniques, ne pouvant donc pas être appliqué à des molécules chargées comme les phosphatidylglycérols (phospholipides anioniques). Ce cas de figure complique énormément l'Equation n° 9, qui ne peut par conséquent pas être utilisée pour calculer  $\mu_{eff}$  dans le cas d'un film de Langmuir formé avec des molécules possédant une charge nette.

### II.3.3. Microscopie à angle de Brewster

Au cours de la compression d'un film monomoléculaire étalé à l'interface eau-air, certaines transitions de phase (par exemple liquide-expansé / liquide-condensé ; LE/LC) peuvent être directement observées. A l'instar d'une transition de phase liquide/solide d'un système tridimensionnel se déroulant à température constante (par exemple la congélation d'un volume d'eau pure), la transition de phase LE/LC d'un film monomoléculaire se déroule également à énergie constante, donc théoriquement à pression de surface constante. En pratique, une transition de phase LE/LC est caractérisée sur une isotherme  $\Pi$ -A par un arrêt de l'élévation de la pression de surface, parfois même un plateau, suivie d'une augmentation plus importante qu'avant la transition signalant le passage à une phase plus condensée. La microscopie à l'angle de Brewster (BAM) rend alors possible de visualiser *in situ* l'apparition de domaines condensés au sein d'une phase moins condensée.

La microscopie BAM, développée indépendamment par l'équipe de Jacques Meunier<sup>88, 89</sup> et celle de Dietmar Möbius,<sup>90</sup> est basée sur le principe de réfringence à l'interface eau-air d'un faisceau monochromatique polarisé dans le plan d'incidence (polarisation dite *p*).



**Figure 31.** Principe de réfringence à l'interface eau-air. Conditions de Brewster sans film de Langmuir : totale réfraction du faisceau incident (A). Conditions de Brewster modifiées par la présence d'un film de Langmuir : réflexion partielle du faisceau incident (B).

Sous un angle d'incidence particulier  $\theta_B$ , appelé angle de Brewster, la lumière *p*-polarisée n'est pas réfléchiée par une interface homogène et propre (Figure 31, A). Dans le cas de l'interface eau-air, cet angle a pour valeur  $\theta_B = 53^\circ$ . Cependant, des entités diélectriques telles que les molécules amphiphiles adsorbées à cette interface modifient la condition de Brewster, entraînant une réflexion partielle du faisceau incident (Figure 31, B). On sait qu'à

l'angle de Brewster, l'intensité relative du faisceau réfléchi  $I$  est proportionnelle au carré de l'épaisseur du film  $d$ , selon l'équation suivante :

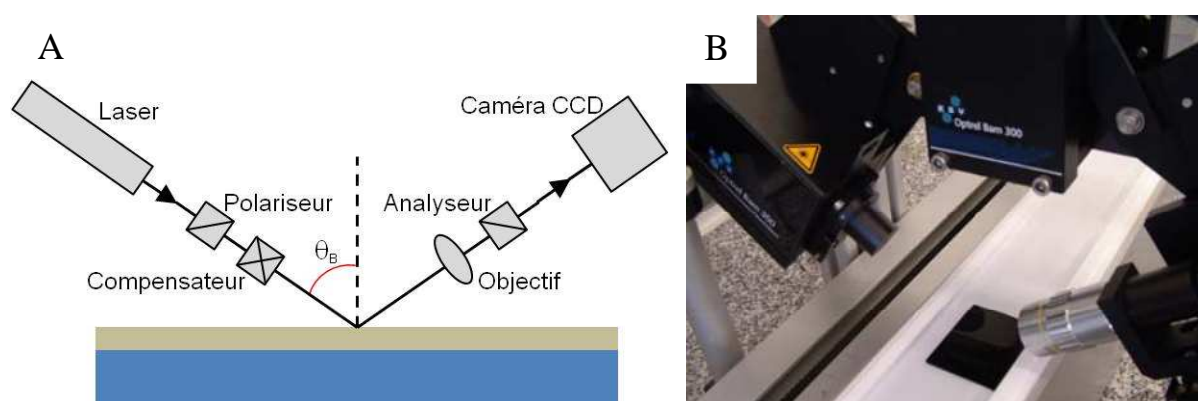
$$I = |R_p|^2 = \alpha \cdot d^2$$

où  $R_p$  est la composante dans le plan d'incidence de la lumière réfléchie, et  $\alpha$  est une constante de proportionnalité.

#### Equation n° 12.

Typiquement, l'intensité du faisceau réfléchi correspond au millionième de l'intensité incidente. Un dispositif à transfert de charges (caméra CCD), sensible à l'intensité de la lumière réfléchie, enregistre des charges électriques proportionnelles à la quantité de lumière reçue (Figure 32, A). Ces charges sont traduites en code monochrome. Ainsi, les différences de densité moléculaire locale, comme lors d'une transition de phase, induisent des variations locales d'indice de réfraction pouvant être mises en évidence en imagerie BAM par des différences de contraste. Une pièce de verre noire disposée au fond de la cuve au point de rencontre du laser avec l'interface permet d'absorber le faisceau réfracté (Figure 32, B).

Ainsi, cette technique couplée à une balance de Langmuir permet, grâce aux images BAM obtenues, de mettre en évidence les changements de morphologie d'un film monomoléculaire à l'interface eau-air au cours de sa compression, ou encore au cours de sa dégradation lors de réactions chimiques par exemple.<sup>91</sup>



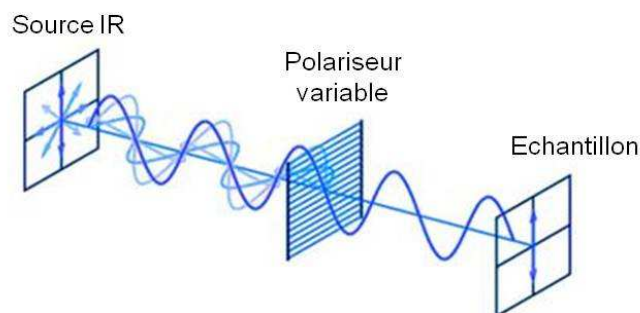
**Figure 32.** Schéma de principe d'un microscope à angle de Brewster (A), et photographie de l'appareillage expérimental fixé sur goniomètre (B).<sup>82</sup>



### II.3.4. Spectroscopie de réflexion-absorption infrarouge à modulation de polarisation

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est une technique d'analyse permettant de déterminer l'énergie de liaisons atomiques. En effet, les liaisons interatomiques, assimilées à des ressorts, vibrent à des fréquences variables en fonction de la nature de la liaison et de son environnement. De nos jours de nombreuses techniques de FT-IR existent et permettent d'étudier la plupart des échantillons quel que soit leur état physique ou de surface. En revanche la technique atteint ses limites de sensibilité avec les films ultra minces.

Dans ce cas, la spectroscopie de réflexion-absorption infrarouge (IRRAS) a été développée afin d'exalter les absorptions de surface et ainsi augmenter considérablement la sensibilité. Cette technique est basée sur la différence de réflectivité d'une interface entre deux faisceaux à incidence quasi-rasante *p*-polarisé (parallèle au plan d'incidence) et *s*-polarisé (perpendiculaire au plan d'incidence).



**Figure 33.** Sélection d'un faisceau infrarouge polarisé à partir d'une source non polarisée par passage au travers d'un polariseur variable.<sup>92</sup>

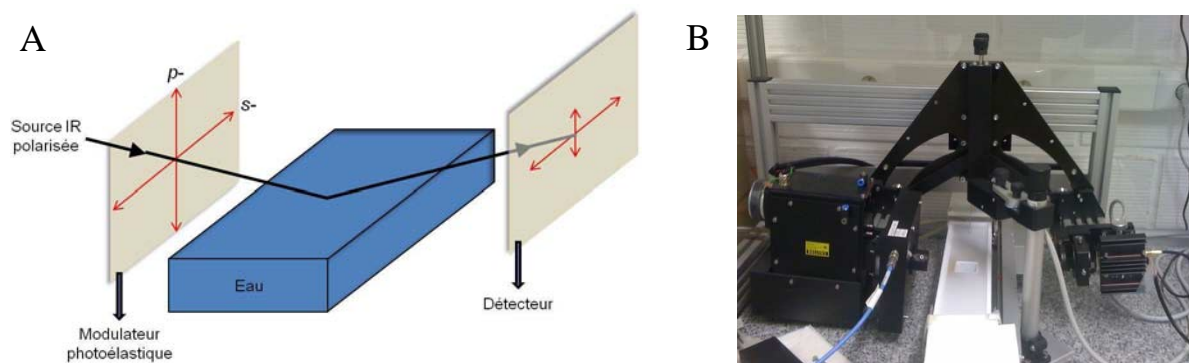
A une interface, le faisceau *p*-polarisé est préférentiellement absorbé lors de la réflexion, tandis que le faisceau *s*-polarisé est reflété presque totalement. Ainsi, une différence d'absorption mesurée entre ces deux faisceaux *p*- et *s*-polarisés peut être attribuée à une absorption spécifique à l'interface. On obtient alors un spectre différentiel (*S*) à partir des signaux *p*-polarisé ( $R_p$ ) et *s*-polarisé ( $R_s$ ) selon l'Equation n° 13.

$$S = \frac{\Delta R}{R} = \frac{(R_p - R_s)}{(R_p + R_s)}$$

**Equation n° 13.**

Cependant, cette méthode IRRAS nécessite l'enregistrement de quatre spectres, les deux spectres  $p$ - et  $s$ -polarisés pour la mesure du blanc et celle de l'échantillon, favorisant les interférences dues aux facteurs exogènes changeants tels que la vapeur d'eau, le  $\text{CO}_2$ , ou encore le bruit instrumental. La moindre variation de ces facteurs au cours de l'enregistrement des différents spectres peut lourdement affecter la résolution et masquer les signaux recherchés. De plus, la faible réflectivité de l'eau requiert des temps d'acquisition relativement long, soit une dizaine de minutes pour un spectre. Ces diverses contraintes rendent la technique IRRAS difficilement applicable à l'étude de films de Langmuir à l'interface eau-air.

La dernière innovation apportée par Blaudez et coll. au début des années 90 fut d'introduire une modulation à haute fréquence de la polarisation du faisceau incident au moyen d'un modulateur photoélastique (PM), donnant naissance à la spectroscopie de réflexion-absorption infrarouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS). Cette rapide modulation du plan polarisation du faisceau IR incident permet d'enregistrer simultanément la collection de spectres en une seule expérience (Figure 34, A). Ainsi, les interférences environnementales sont fortement diminuées, et il devient alors possible d'acquérir les spectres infrarouges de films monomoléculaires adsorbés à l'interface eau-air.<sup>93-95</sup>



**Figure 34.** Schéma de principe de l'appareillage PM-IRRAS exploitant la réflexion différentielle à l'interface eau-air de deux faisceaux IR  $s$ - et  $p$ -polarisés à incidence quasi-rasante (A). Photographie du montage expérimental PM-IRRAS fixé sur goniomètre au dessus d'une cuve de Langmuir (B).

A l'instar de la technique BAM, l'appareillage PM-IRRAS est monté sur un goniomètre sur lequel sont fixés d'un côté la source infrarouge ainsi que l'unité PM, et le détecteur de l'autre côté (Figure 34, B). De cette façon, l'angle d'incidence au niveau de la cuve d'eau placée au milieu du goniomètre peut être ajusté de sorte à optimiser la détection.

Une fois l'appareillage parfaitement ajusté, un premier spectre de la sous-phase pure ( $S_w$ ) peut être enregistré. Au moins 6000 scans sont généralement nécessaires, collectés à raison de 600 scans par seconde (10 minutes d'acquisition), et le film monomoléculaire peut être étalé à l'interface. Une deuxième acquisition ( $S_f$ ) peut alors être collectée pour obtenir le spectre normalisé du film étudié ( $S_n$ ) selon l'Equation n° 14.

$$S_n = \frac{\Delta S}{S_w} = \frac{(S_f - S_w)}{S_w}$$

**Equation n° 14.**

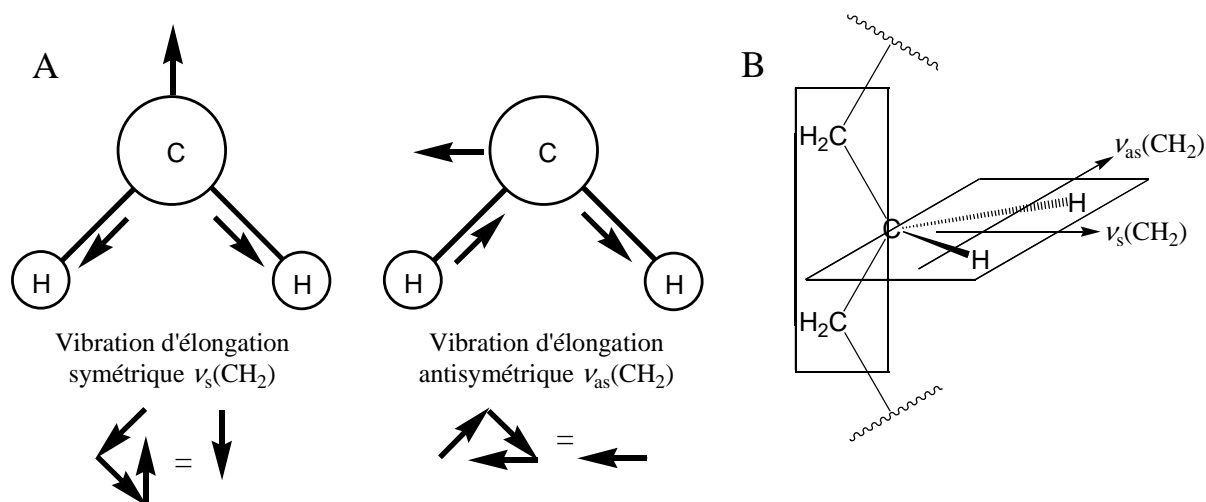
Il est alors possible de suivre l'évolution de certaines bandes d'absorption caractéristiques du produit étudié en fonction des conditions opératoires, et ainsi d'en tirer des informations structurales et environnementales sur la substance à l'interface. Ces informations peuvent être utiles pour mieux comprendre le type d'interactions intra et/ou intermoléculaires ayant lieu au sein du film étudié.

Dans le cas de phospholipides, les bandes d'absorption les plus couramment analysées sont les vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique caractéristiques du groupe méthylène  $\text{CH}_2$ , notées  $\nu_s(\text{CH}_2)$  et  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ , respectivement. Ces bandes, observables vers 2850 et 2920  $\text{cm}^{-1}$ , respectivement, vont en effet apporter des informations concernant les chaînes hydrocarbonées telles que leur état d'organisation et de compactage.<sup>96,97</sup>

La vibration d'élongation des groupes carbonyle  $\text{C}=\text{O}$  et la vibration d'élongation antisymétrique des groupes phosphodiester  $\text{PO}_2^-$ , notées  $\nu(\text{C}=\text{O})$  et  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ , respectivement vers 1730 et 1220  $\text{cm}^{-1}$ , sont également souvent analysées. Ces bandes donnent des informations concernant la partie polaire du film et son état d'hydratation, ainsi que sur la conformation de l'ossature glycérol.<sup>98-100</sup>

D'autres groupements fonctionnels peuvent évidemment être étudiés selon la nature de la molécule étalée à l'interface eau-air, à condition d'être intenses et que le film en question soit suffisamment condensé (grande concentration par unité de surface). Nous verrons plus loin que des espèces amphiphiles à base de  $t\text{Bu}[4]\text{OH}$  ont pu être analysées en suivant les bandes d'absorptions  $\nu_s(\text{CH}_3)$  et  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ , respectivement vers 2880 et 2960  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristiques des groupes  $\text{CH}_3$  constituant les groupements *tert*-butyle sur la partie haute de ces calixarènes.

Comme illustré en Figure 35, chaque mode de vibration est caractérisé par son moment dipolaire de transition, qui est la somme des vecteurs représentant le mouvement vibratoire (Figure 35, A). Blaudez et coll. ont montré que l'intensité d'un pic d'absorption PM-IRRAS est dépendante de l'orientation du moment dipolaire de transition du groupement considéré par rapport au plan formé par l'interface eau-air.<sup>95</sup> Cette règle de sélection est la conséquence de l'utilisation de faisceaux *s*- et *p*-polarisés. Ainsi, la spectroscopie PM-IRRAS est une technique d'analyse principalement qualitative, difficilement utilisable comme méthode de mesure quantitative.



**Figure 35.** Vibration d'élongation symétrique  $\nu_s$  et antisymétrique  $\nu_{as}$  du groupement CH<sub>2</sub>, et sommes des vecteurs vibratoires dont découle leur moment dipolaire de transition respectif (A). Indication dans une chaîne hydrocarbonée du moment dipolaire de transition relatif à chaque mode vibratoire (B).<sup>82, 95</sup>

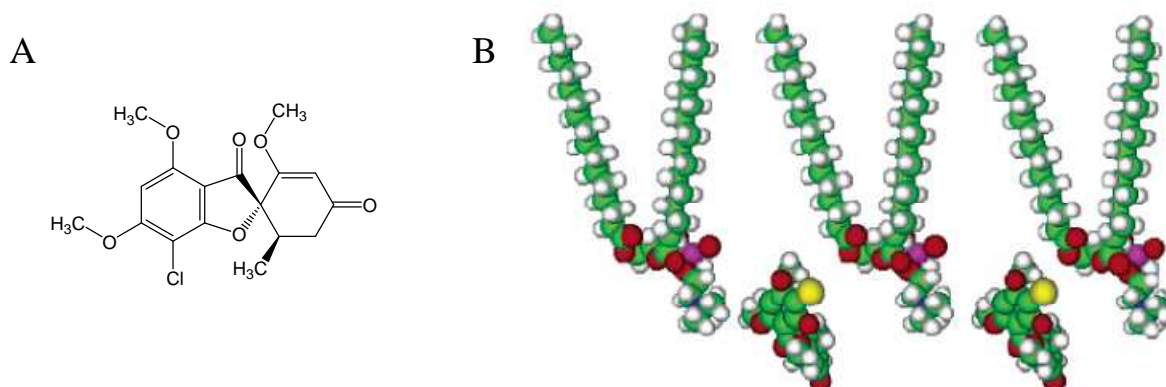
## II.4. Application à l'étude de membranes biologiques modèles

La technique des films monomoléculaires de Langmuir, et les méthodes d'investigation qui y sont associées, est un outil de choix pour l'étude de phénomènes interfaciaux. Plus particulièrement, cette technique permet de décrire les interactions intermoléculaires se déroulant aux interfaces hydrophile/hydrophobe, dans des domaines aussi variés que les matériaux ou la biochimie.

En ce qui nous concerne, nous porterons un intérêt particulier à l'utilisation de cette technique dans les domaines liés à la biologie et aux membranes cellulaires. Par exemple, l'impact de molécules thérapeutiques sur les propriétés d'une membrane lipidique biologique peut apporter des informations sur la pharmacocinétique de ce composé ou encore sur son mode d'action.

D'une façon générale, les études concernant les films de Langmuir dans le domaine de la biophysico-chimie suivent deux types de raisonnement :

- Analyser l'impact d'une substance, naturelle ou synthétique, dissoute dans la sous-phase sur les propriétés d'un film de Langmuir constitué de phospholipides naturels modélisant une membrane cellulaire. Il peut être cité en exemple les travaux publiés par Corvis et coll., portant sur l'étude des interactions entre un antifongique (Griséofulvine) et différents films de Langmuir constitués de phospholipides (Figure 36).<sup>18</sup> Leurs résultats ont permis de mieux comprendre ces interactions, et pourraient permettre la mise au point d'une formulation augmentant la biodisponibilité de la griséofulvine.



**Figure 36.** Structure chimique de la griséofulvine (A). Insertion de la griséofulvine présente dans la sous-phase au sein d'un film de Langmuir constitué du phospholipide DPPC (B).<sup>18</sup>

- Etudier les interactions entre une molécule amphiphile d'origine synthétique et une molécule d'intérêt biologique. Citons les travaux de Castano et coll. qui ont étudié un dérivé cationique du cholestérol (BGTC) ayant démontré *in vitro* et *in vivo* un intérêt dans le domaine de la transfection d'ADN.<sup>101</sup> Les auteurs ont utilisé la technique des films de Langmuir pour mieux comprendre les mécanismes de formation de complexes supramoléculaires ADN-BGTC (Figure 37).



**Figure 37.** Film de Langmuir constitué de BGTC en interaction avec un double brin d'ADN dissout dans la sous-phase.<sup>101</sup>

Les isothermes de compression décrivant les molécules de manière individuelle par l'aire moléculaire, la technique des films de Langmuir se caractérise par une grande sensibilité. Il est possible de détecter d'infimes modifications comportementales, mettant ainsi en évidence des phénomènes relativement discrets. Cette sensibilité peut être mise à profit pour étudier des mécanismes de reconnaissance moléculaire, ou tout type d'interactions supramoléculaires ayant un faible impact sur les propriétés des protagonistes. Par exemple, il est envisageable de modifier une molécule pour la rendre suffisamment hydrophobe et amphiphile (ex : ajout de chaînes alkyles), afin d'en préparer un film de Langmuir et ainsi d'étudier ses interactions avec d'autres molécules présentes dans la sous-phase.

## **II.5. Etudes interfaciales de calix[4]arènes amphiphiles hydro-insolubles**

### **II.5.1. Généralités sur les prodrogues amphiphiles : concept**

Le concept de prodrogue amphiphile s'est nettement développé à partir de la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle, et les premières molécules conçues comme telles ont vu le jour dans les années 70.<sup>102, 103</sup>

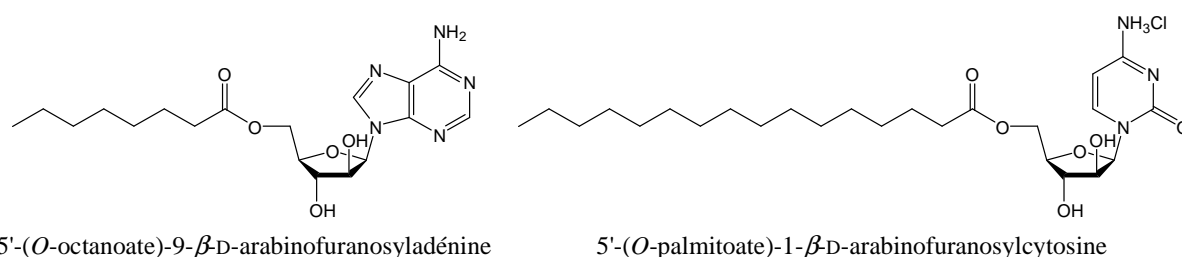
Ces prodrogues, analogues de glycérides ou d'acides gras naturels, ont été imaginées au départ afin d'outrepasser des contraintes d'ordre pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique comme par exemple :

- ✓ faciliter le passage d'un principe actif hautement polaire au travers des barrières hydrophobes de l'organisme (peau, membrane cellulaire, etc.).<sup>104</sup>
- ✓ protéger le principe actif contre certaines métabolisations entraînant une baisse voire une perte d'activité.<sup>105, 106</sup>
- ✓ Localiser la prodrogue dans les tissus adipeux ou au niveau du site d'administration pour diffuser progressivement dans l'organisme le principe actif (action prolongée).<sup>105, 107, 108</sup>

Le concept de prodrogue amphiphile a suscité un fort engouement au début des années 70 dans le domaine des analogues nucléosidiques. Citons les travaux de Baker et coll. concernant des dérivés 5'-O-acyl du 9-β-D-arabinofuranosyladenine (Figure 38).<sup>104</sup> Ce

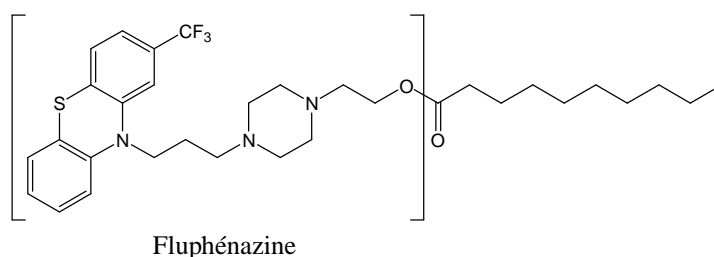
nucléoside antiviral, actif contre des virus à ADN comme ceux de l'herpès (HSV), était difficilement administrable de façon topic en raison de sa faible diffusion au travers de la peau. Le greffage d'une chaîne acylalkyle en position 5' a permis d'augmenter sa biodisponibilité après une application topic.

A la même époque, Wechter et coll. ainsi que Hamamura et coll. se sont intéressés au nucléoside 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine présentant une activité anti-leucémique. *In vivo*, la déamination enzymatique de la nucléobase entraîne une perte d'activité et une rapide élimination (temps de demi-vie de 12 min).<sup>105, 106</sup> Le greffage d'une chaîne alkyle hydrophobe en position 5'-O (Figure 38) a permis de conserver une excellente activité lors d'une administration par voie orale (souris).



**Figure 38.** Exemple de prodrogues amphiphiles de nucléoside anti-infectieux.

Le principe de médicament à action prolongée a été appliqué relativement tôt dans le domaine des neuroleptiques. Un exemple concret est celui de la fluphénazine décanoate employée dans le traitement de la schizophrénie chronique (Figure 39).<sup>107, 108</sup> Sous forme native, la fluphénazine est rapidement éliminée de l'organisme et doit être administrée de façon journalière. L'ajout d'une chaîne décanoate permet une localisation de la prodrogue dans les tissus environnant la zone d'injection. La diffusion progressive de la fluphénazine libre permet de réduire la fréquence d'administration, de l'ordre de la semaine, avec une concentration dans l'organisme relativement constante stabilisant ainsi l'état psychotique du patient.



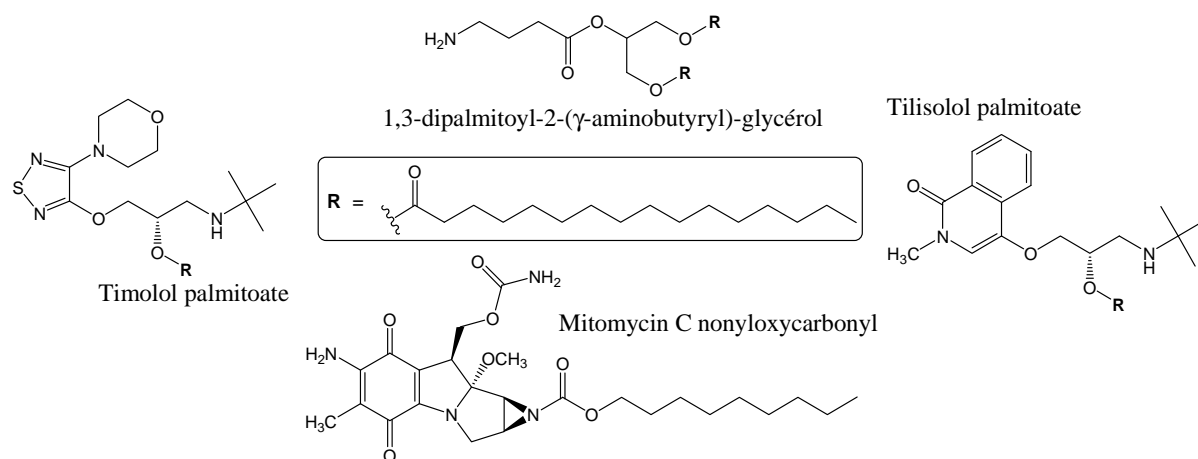
**Figure 39.** Fluphénazine décanoate, prodrogue de la fluphénazine. Neuroleptique à action prolongée.

A partir des années 80, on a vu apparaître les prodrogues amphiphiles de toutes sortes d'agents thérapeutiques (Figure 40) :

On peut citer les recherches de Sasaki et coll. portant sur une prodrogue amphiphile de mitomycin C (antitumeur et antibiotique d'origine naturelle), obtenue par couplage d'une chaîne nonylalkyle.<sup>109</sup>

En 1991, Deverre et coll. ont publié la synthèse d'un ester de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (neurotransmetteur GABA) et de 1,3-dipalmitoyl-2-glycérol.<sup>110</sup> Ils ont également étudié la faculté de cette prodrogue à former diverses structures supramoléculaires propre à ce type de composé (vésicules, micelles, etc.).

Afin d'améliorer la biodisponibilité du timolol en facilitant son passage à travers la cornée (bétabloquant utilisé entre autre dans le traitement de glaucome), Pech et coll. ont synthétisé et étudié diverses prodrogues amphiphiles de ce composé.<sup>111</sup> Celles-ci ont été obtenues par estérification avec des acides gras, dont principalement l'acide palmitique (C<sub>16</sub>). La conception de prodrogues à base d'acide palmitique pour des applications oculaires a par la suite été étendue à d'autres agents thérapeutiques, comme avec le tilisolol en 2001.<sup>112</sup>



**Figure 40.** Diverses prodrogues amphiphiles à base d'acide gras ou de diglycéride.

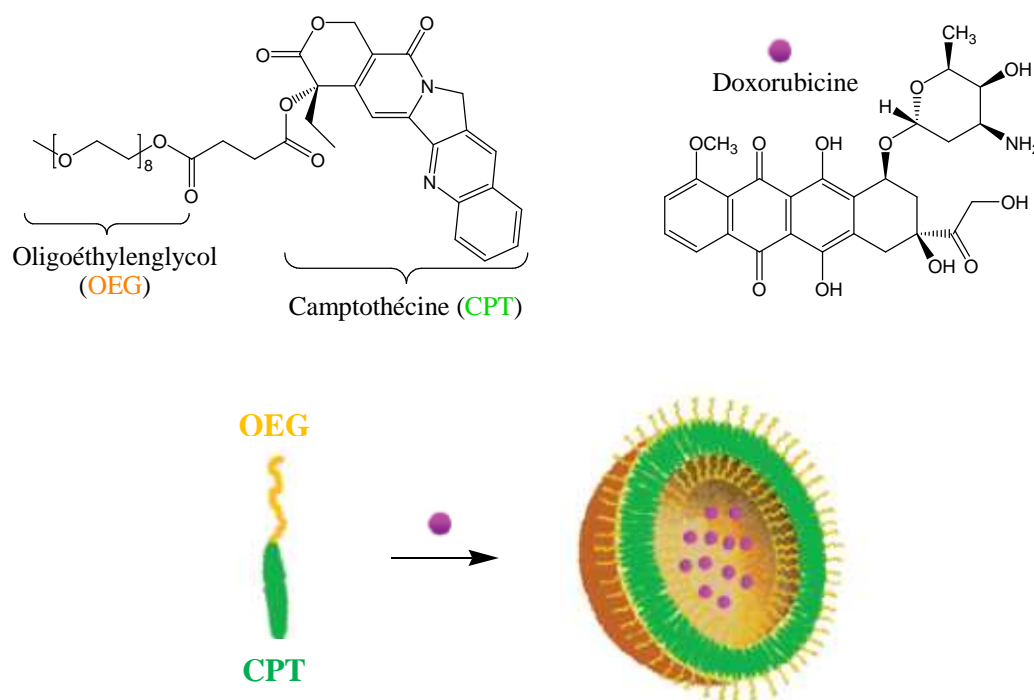
Les années 2000 ont vu croître de façon exponentielle le nombre de publications portant sur des prodrogues amphiphiles de principes actifs connus.

On peut citer l'important travail réalisé par Jin et coll. qui, au cours de cette décennie, ont décrit un grand nombre de systèmes auto-assemblés prodrogues d'antiviraux ou d'anticancéreux tels que l'aciclovir,<sup>113, 114</sup> la didanosine,<sup>114-116</sup> ou la zidovudine.<sup>114, 116-118</sup>



Le développement de toute une panoplie de méthodes physico-chimiques nous permet aujourd'hui d'étudier des systèmes à délivrance de principe actif de plus en plus complexes (*Drug Delivery Systems*). C'est ainsi qu'une grande diversité de composés bioactifs ont vu naître leur prodrogue amphiphile respective.<sup>119-122</sup> Depuis quelques années, on voit apparaître des systèmes multi-drogue, constitués d'une prodrogue amphiphile auto-assemblée en un système supramoléculaire (micelle, vésicule, etc.), encapsulant un autre principe actif complémentaire. Dans ce sens, on peut citer les récents travaux de Shen et coll. (Figure 41) et de Vemula et coll. (Figure 42).<sup>123, 124</sup>

Les premiers ont décrits le couplage d'une chaîne oligoéthylglycol hydrophile (OEG) avec un anticancéreux hydrophobe, la camptothécine (CPT). La prodrogue amphiphile OEG-CPT ainsi obtenue est capable de s'auto-assembler en liposome en encapsulant un autre agent anticancéreux hydrosoluble, la doxorubicine (Figure 41). Il a été montré qu'il en résulte un effet cytotoxique synergique, les deux principes actifs étant libérés simultanément.



**Figure 41.** Système multi-drogue développé par Shen et coll.<sup>123</sup>

Selon un concept similaire, Vemula et coll. ont préparé une prodrogue amphiphile d'acétaminophène (analgésique et antipyrétique hydrophile) par greffage d'une chaîne dodécanoyle. Les auteurs ont montré que cette prodrogue amphiphile peut englober un autre principe actif hydrophobe et complémentaire, la curcumine (anti-inflammatoire), selon un

auto-assemblage en hydrogel (Figure 42). Des études *in vitro* ont montré que les deux agents thérapeutiques peuvent être libérés simultanément suite à une dégradation enzymatique de la prodrogue, donc du système supramoléculaire hydrogel.

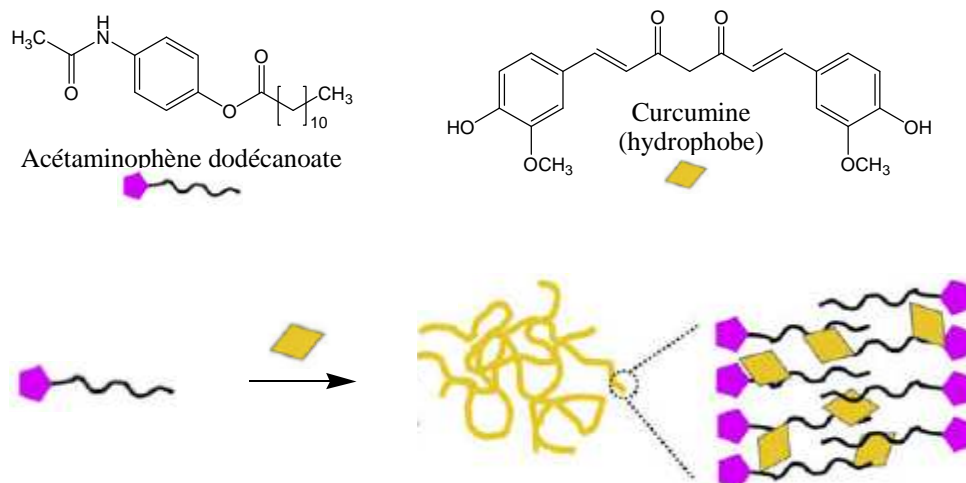


Figure 42. Système multi-drogue développé par Vemula et coll.<sup>124</sup>

### II.5.2. Pourquoi le calix[4]arène ?

De part sa remarquable capacité à organiser dans l'espace divers groupements chimiques, le calix[4]arène est une molécule idéale pour la conception d'entités amphiphiles avec un fort potentiel de reconnaissance moléculaire<sup>125, 126</sup> et d'auto-assemblage.<sup>127-129</sup> En effet, nous avons pu entrevoir au Chapitre I le large panel de possibilités quant-à la fonctionnalisation de cette plate-forme macrocyclique. Le calix[4]arène représente donc un bon point de départ pour élaborer des molécules complexes hautement organisées dans l'espace. Une récente revue, publiée en 2010 par K. Helttunen et P. Shahgaldian, récence la chimie et certaines applications des calixarènes amphiphiles.<sup>72</sup>

D'autre part, les calix[4]arènes amphiphiles et hydro-insolubles ont connu ces quinze dernières années un intérêt tout particulier dans le domaine de la physico-chimie des films de Langmuir, en raison de leur aptitude à former des films monomoléculaires stables à l'interface eau-air.<sup>126, 130-132</sup> L'utilisation de la balance de Langmuir et des autres techniques qui y sont associées ne donnent pas seulement accès aux propriétés amphiphiles, mais permet aussi d'étudier les interactions de ces calixarènes avec toute sorte de substances présentes dans la sous-phase aqueuse.<sup>133-138</sup>

Plus particulièrement, il peut être constaté dans la littérature que les calix[4]arènes amphiphiles peuvent trouver des applications comme adjuvant supramoléculaire (formulation), transportant des molécules d'intérêt biologique *via* des nanostructures auto-assemblées.<sup>50, 139, 140</sup>

Cependant, l'utilisation d'un calix[4]arène comme plate-forme organisatrice de principes actifs (prodrogue) en vue d'une action de transport (trans-membranaire par exemple) n'est que peu décrite. C'est pourquoi nous avons entrepris d'explorer ce champ d'application.<sup>1-3, 5</sup> Le calix[4]arène présente en effet un certain nombre d'avantages en vue d'une application dans le domaine pharmaceutique :

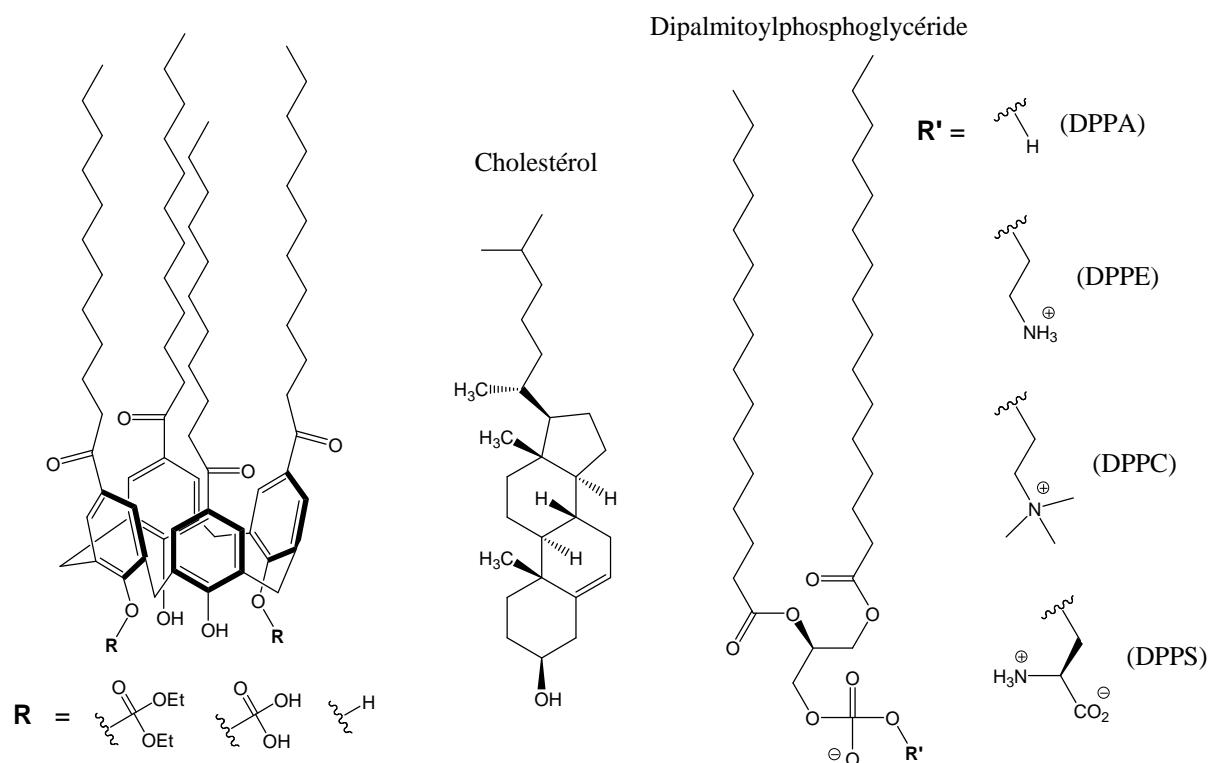
- ✓ Plusieurs données spécifiques de la littérature font état d'une faible cytotoxicité et d'une faible réponse immunitaire induites par des dérivés du calix[4]arène.<sup>8, 10, 53, 69, 134</sup> Ces études sont encore trop peu nombreuses pour être généralisables, étant au cas par cas. Mais il est encourageant qu'aucune toxicité importante n'ait jamais été mentionnée, que ce soit à l'échelle cellulaire ou animale.
- ✓ La possibilité d'y greffer plusieurs principes actifs différents et complémentaires peut permettre d'élaborer des transporteurs multi-drogue en vue d'une synergie d'action.<sup>1</sup>
- ✓ En conformation cône, la présence de deux zones fonctionnalisables à façon (partie haute et partie basse) offre de nombreuses possibilités pour ajuster les propriétés physico-chimiques d'un dérivé calixarénique en fonction des applications visées. Selon le caractère hydrophile ou hydrophobe des anti-infectieux greffés sur un côté de la couronne macrocyclique, le caractère amphiphile du conjugué peut être modulée en fonction de la nature de la partie opposée.<sup>5</sup>

### **II.5.3. Calix[4]arènes et modèles de membranes biologiques : étude de miscibilité**

Que ce soit en tant que transporteur supramoléculaire (vésicule, micelle, etc.), ou, comme dans notre cas, en tant que transporteur covalent (prodrogue), les calix[4]arènes à

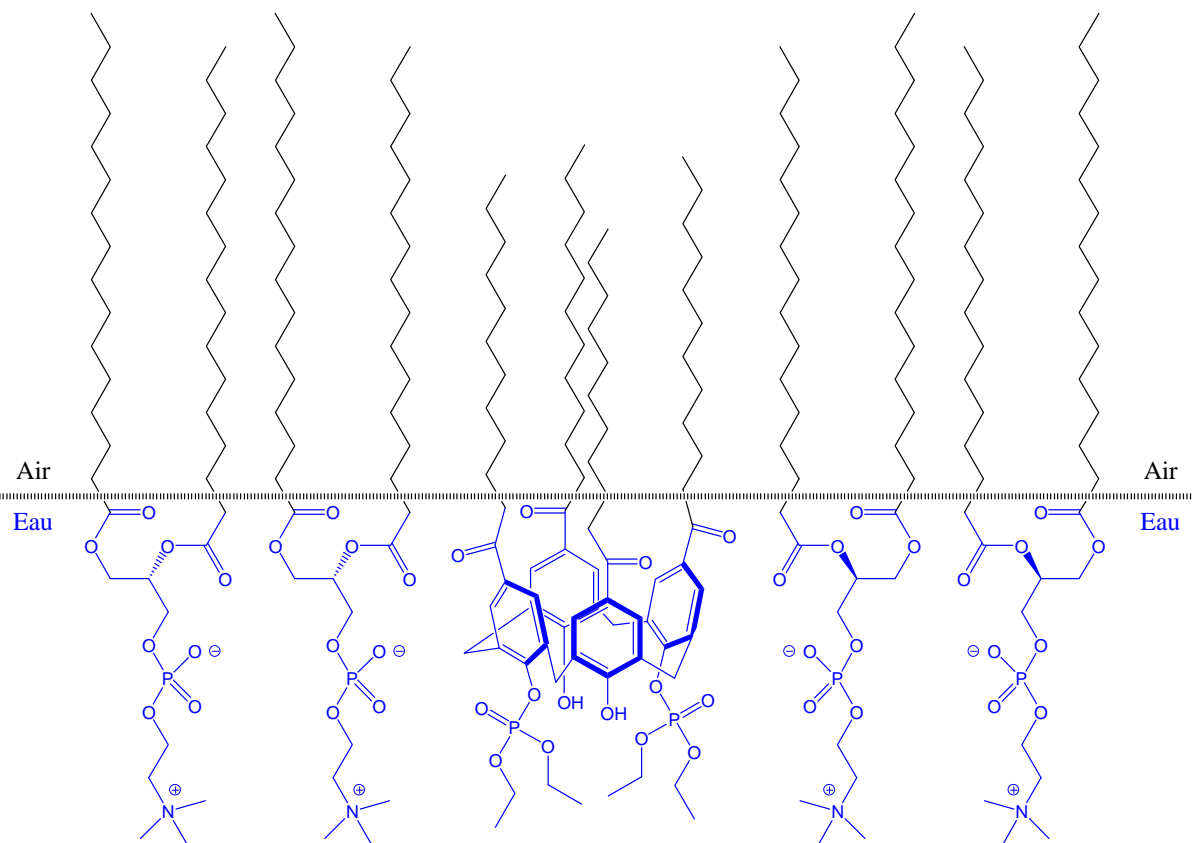
visée thérapeutique sont amenés à interagir, voire traverser les membranes cellulaires. L'étude de films de Langmuir mixtes, constitués en proportion variée du calixarène considéré et d'un composant membranaire (lipide principalement), permet d'étudier la miscibilité de ce calixarène dans un environnement membranaire modèle. Selon le type de lipide utilisé, la nature de la membrane modélisée peut être apparentée plutôt à une cellule eucaryote ou procaryote (*vide infra* Chapitre V). Un nombre restreint d'études selon cette méthode de miscibilité en milieu membranaire de dérivés du calix[4]arène sont décrites dans la littérature :

Deux articles publiés par Shagaldian et coll. en 2002 et 2003 concernent des calix[4]arènes amphiphiles destinés à la préparation de systèmes colloïdaux pour le transport supramoléculaire de molécules d'intérêt biologique (Figure 43). Les études de miscibilité de leurs composés avec du cholestérol<sup>141</sup> ou plusieurs phospholipides<sup>142</sup> ont montré une plus grande affinité pour ces derniers.



**Figure 43.** Calix[4]arènes et constituants membranaires étudiés par Shahgaldian et coll.

D'une façon générale, les auteurs ont montré que les dérivés calixaréniques phosphorylés sont miscibles en toute proportion avec ces différents constituants membranaires (Figure 44).



**Figure 44.** Organisation hypothétique d'un dérivé du calix[4]arène inséré dans un film de Langmuir constitué de DPPC, un modèle de membrane cellulaire eucaryote..

Selon la même approche, trois conjugués *t*Bu[4]OH-pénicilline,<sup>2</sup> synthétisés durant la thèse de A. Ben Salem,<sup>1</sup> ont été étudiés au laboratoire (films mixtes calixarène/DMPE).<sup>6</sup>

### II.5.4. Conclusion et perspectives

Nous avons pu voir au cours de cette revue bibliographique que les calix[4]arènes sont d'excellents candidats pour la conception de dérivés amphiphiles. Ces molécules peuvent s'auto-assembler, ou, prise individuellement, associer sur une plate-forme unique plusieurs principes actifs différents en vue d'effets synergiques.

Une grande variété de calix[4]arènes amphiphiles forment des films de Langmuir stables. Cette propriété peut être exploitée afin d'étudier les interactions dans un milieu interfacial de ces composés avec diverses molécules d'intérêt biologique. Leur faculté à s'insérer et à traverser les membranes biologiques peut être étudiée à l'aide de films de Langmuir utilisés comme modèles de membrane.

Les résultats actuels indiquent que les dérivés amphiphiles du calix[4]arène sont susceptibles de traverser les membranes cellulaires, soutenant le fait de les employer pour concevoir de nouvelles prodrogues ou multi-prodrogues d'anti-infectieux connus.

# **DEUXIEME PARTIE**

## **Résultats et discussions**

- **Chapitre III : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues d'antibactériens**
- **Chapitre IV : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues d'antiviraux**
- **Chapitre V : Calix[4]arène hydrophile antibactérien**

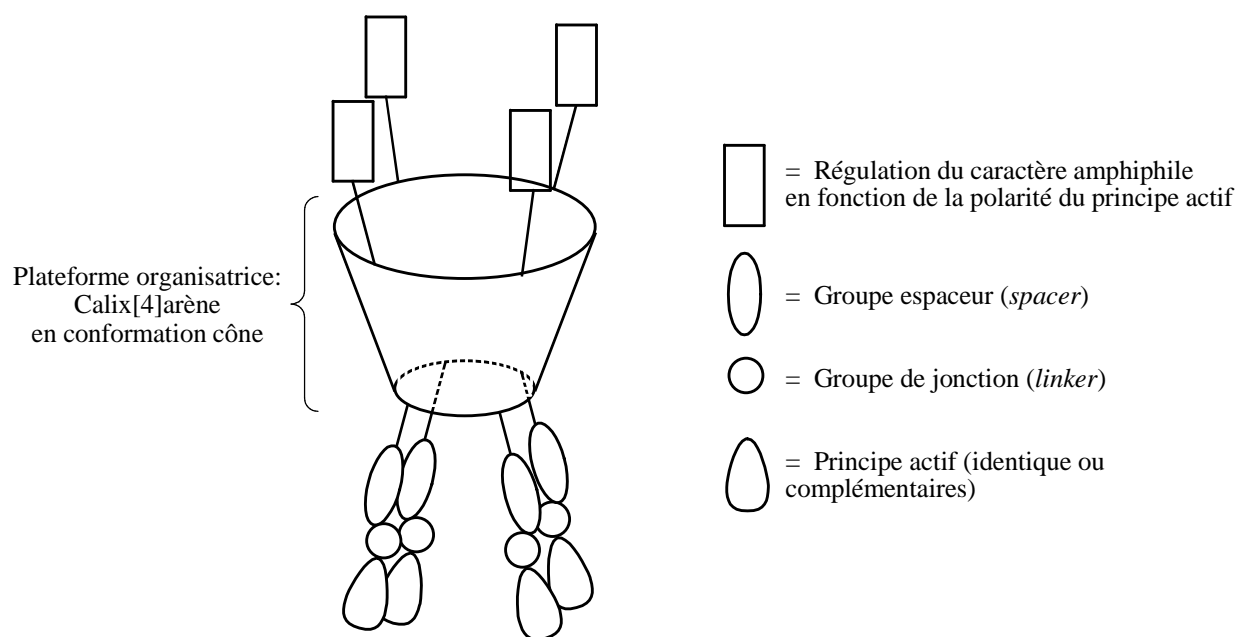




### Chapitre III

## Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues d'antibactériens

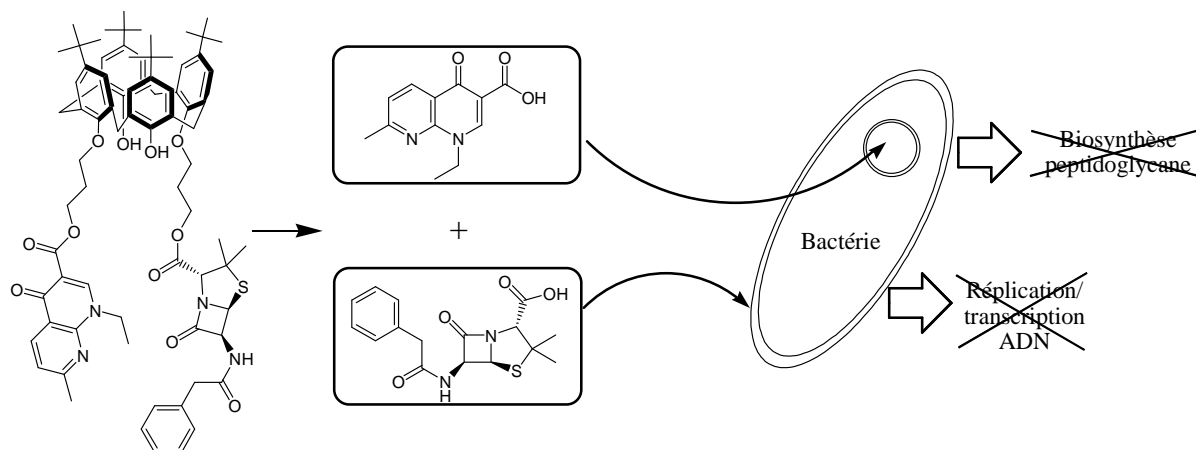
Les premières recherches sur ce thème ont été engagées au laboratoire lors de la thèse de Adel Ben Salem.<sup>1</sup> Le principe repose sur l'utilisation du calix[4]arène comme plate-forme organisatrice de plusieurs principes actifs identiques ou différents, dans une optique de transport et de stockage (Figure 45). De plus, dans le cas de calixarènes porteurs de plusieurs anti-infectieux de mode d'action différents, une synergie d'action peut être envisagée. Ces recherches ont jusqu'à aujourd'hui principalement utilisé des antibiotiques de la famille des quinolones et des pénicillines.



**Figure 45.** Schéma de principe d'un dérivé amphiphile de calix[4]arène organisateur de principes actifs.

Ainsi, les travaux de A. Ben Salem ont porté sur la synthèse de dérivés du *t*Bu[4]OH porteurs de une ou deux quinolones et/ou pénicillines.<sup>1-3</sup> Ces composés ont été conçus comme des prodrogues par l'utilisation de groupes de jonction (*linker*) entre le calixarène et le principe actif qui soient potentiellement labiles *in vivo*, telle que la fonction ester.

Après libération d'antibactériens aux modes d'action complémentaires, il peut être envisagé une synergie d'action de ces composés, avec attaque de la bactérie sur plusieurs fronts simultanément (Figure 46). En effet, les pénicillines sont connues pour inhiber la synthèse et la réticulation du peptidoglycane constituant en partie la paroi bactérienne. Les quinolones, quant à elles, bloquent les mécanismes de réplication/transcription de l'ADN bactérien.



**Figure 46.** Attaque d'une bactérie sur deux fronts simultanément à l'aide d'un calixarène porteur d'une quinolone et d'une pénicilline.

Un autre aspect essentiel de ces dérivés calixaréniques est la présence des groupes *tert*-butyles sur la partie haute, accentuant son caractère lipophile. L'association de cette lipophilie de la partie haute à la polarité relative des principes actifs greffés en partie basse (hétérocycles) confère un caractère amphiphile à ces conjugués *t*Bu[4]OH-antibactérien. Cette propriété peut être mise à profit dans une action de transport à travers les membranes biologiques, et de stockage (dans les tissus adipeux par exemple) en vue d'une libération progressive des principes actifs.

Une fois ces calixarènes prodrogues synthétisés, A. Ben Salem s'est trouvé confronté à une problématique. En effet, l'insolubilité en milieu aqueux de ces molécules n'a à ce jour pas permis de tester efficacement leur activité antibactérienne par les méthodes standard en phase liquide ou solide employées en microbiologie. C'est cette problématique qui a amené Hugues Massimba-Dibama à développer plusieurs analogues hydrosolubles des prodrogues de Ben Salem, en remplaçant les groupes *t*Bu sur la partie haute du calixarène par des groupes cationiques éthylammonium ou éthylguanidinium.<sup>4</sup> Ces dérivés ont alors présenté une

réactivité hydrolytique en milieu physiologique modèle ainsi qu'une activité antibactérienne, révélant un effet prodrogue encourageant.<sup>5</sup>

Pour contourner le problème de solubilité aqueuse des conjugués *t*Bu[4]OH-antibactérien de Ben Salem, nous avons envisagé d'étudier leur fonction de prodrogue par une approche physico-chimique. Le caractère hydro-insoluble et amphiphile de ces composés les rendent filmogènes à l'interface eau-air.<sup>6</sup> La préparation de films de Langmuir à partir de telles substances permet d'étudier leur comportement dans un environnement mimant les interfaces hydrophile/hydrophobe rencontrées dans les organismes vivants (membrane cellulaire, tractus gastro-intestinal, etc.). Il est alors possible de déterminer les cinétiques de dégradation à l'interface eau-air de ces prodrogues, en quantifiant le principe actif ainsi libéré dans la sous-phase.

Au cours de ce chapitre, les efforts ont été concentrés sur l'étude des conjugués *t*Bu[4]OH-antibactérien à base d'acide nalidixique, leader historique de la famille des quinolones.

### III.1. Rappel sur le mécanisme d'action des quinolones

D'une façon générale, les quinolones ont pour effet de bloquer les phénomènes de réplication et de transcription de l'ADN bactérien par inhibition de principalement deux enzymes topoisomères de type II impliqués dans ces processus, l'ADN-gyrase et la topoisomérase IV.<sup>143</sup> Ces enzymes sont en effet essentiels lors des phases de dépliement ou de repliement de l'ADN bactérien. La formation irréversible de complexe quinolone-gyrase entraîne des erreurs pouvant aller jusqu'à la rupture de la chaîne ADN (effet clastogène). Cette classe d'antibactérien s'avère efficace contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif. Par ailleurs, l'absence d'ADN-gyrase chez les cellules eucaryotes contribue à la faible toxicité des quinolones.

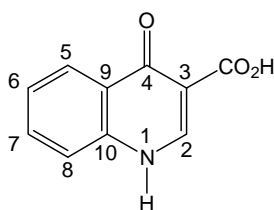


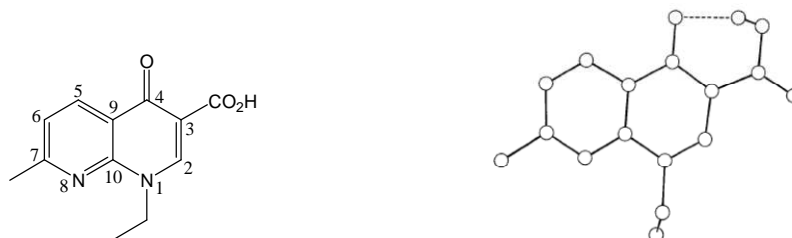
Figure 47. Structure de base commune à toutes les quinolones.

Depuis la commercialisation de l'acide nalidixique dans les années 60, l'activité antibactérienne et le spectre d'application des quinolones n'ont cessés d'être optimisés.<sup>144</sup> On compte aujourd'hui principalement 4 générations de quinolones. L'apport de certains groupements, tels qu'un atome de fluor en position 6 ou un hétérocycle pipérazine en position 7, ont fait gagner plusieurs unités logarithmiques en terme de concentration minimale inhibitrice (CMI).

### III.2. Synthèse de conjugués calix[4]arène-quinolone

Les travaux de Ben Salem et coll. ont portés sur plusieurs quinolones de générations différentes. Notre objectif n'a pas été d'agrandir la gamme de conjugués calixarène-quinolone, dont la faisabilité d'un point de vue synthétique a été démontrée, mais d'en sélectionner certains en vue d'étudier leurs propriétés amphiphiles et leur stabilité chimique à l'interface eau-air. L'acide nalidixique, chef de file des quinolones, a été choisi pour ces études (Figure 48).

Nous avons donc synthétisé les conjugués tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène-quinolone, porteurs de un ou deux résidus acide nalidixique. Leurs analogues exempts de groupes *tert*-butyles en partie haute ont été synthétisés afin d'appréhender l'impact des groupements *tert*-butyles hydrophobes sur les propriétés amphiphiles de ces composés. Ces analogues ont également été utiles pour l'analyse structurale par PM-IRRAS des dérivés *tert*-butylés. D'autre part, la préparation systématique de dérivés mono- et bis-nalidixate a été entreprise dans le but d'examiner ces mêmes propriétés amphiphiles en fonction de la nature de la partie polaire.

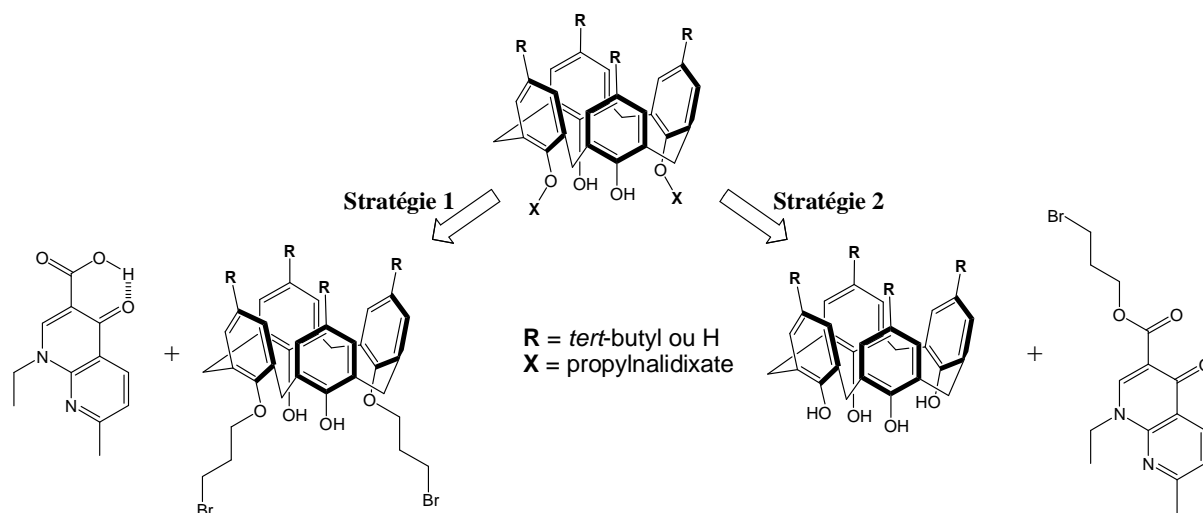


**Figure 48.** Structure et numérotation systématique de l'acide nalidixique. Existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire démontrée par Achari et coll.<sup>145, 146</sup>

### III.2.1. Analyse rétrosynthétique et stratégie de synthèse

A l'époque où Ben Salem et coll. ont entrepris les premières synthèses de conjugués calixarène-quinolone, plusieurs stratégies avaient été envisagées (Figure 49). Il s'est avéré que la plus appropriée des méthodes consistait en la préparation d'un synthon d'acide nalidixique déjà porteur d'un groupe espaceur (*spacer*) de type propylique ou éthylique (Figure 49, stratégie 2). Cette méthode tire également avantage du fait qu'à partir d'un synthon unique, le bromopropynalidixate (BPN), il est possible de greffer par substitution nucléophile l'acide nalidixique sur une grande variété de plateformes organisatrices, calixarénique ou autre.

Le groupe propyle avait été mis en avant, principalement en raison de sa faible incidence stérique sur la partie calixarène, et de ses signaux facilement reconnaissables en spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (2 triplets et 1 multiplet). Nous choisis de conserver ce *spacer* propylique suite aux travaux de Rogalska et coll., ayant démontré que celui-ci contribuait à la miscibilité de conjugués *t*Bu[4]OH-pénicilline avec un modèle de membrane biologique, ceci comparé à un *spacer* de type éthylique.<sup>6</sup>

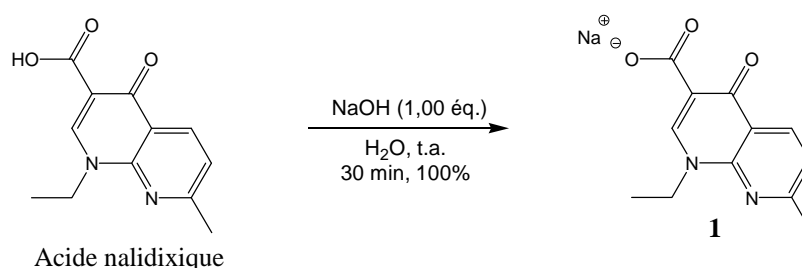


**Figure 49.** Schéma rétrosynthétique. Exemple d'un conjugué 1,3-bis-nalidixate faisant figurer les deux stratégies de couplage entre l'acide nalidixique et un calix[4]arène.

Nous verrons plus loin que l'obtention sélective d'un dérivé mono- ou bi-substitué en partie basse du macrocycle peut être pilotée en fonction des conditions opératoires.

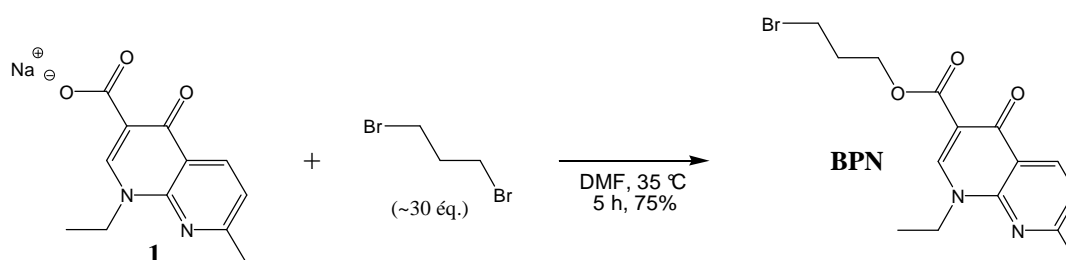
### III.2.2. Synthon bromopropynalidixate (BPN)

Le sel de sodium de l'acide nalidixique **1** est dans un premier temps préparé à partir d'une suspension d'acide nalidixique dans l'eau à laquelle on ajoute un équivalent de NaOH aqueuse (Figure 50). Au terme d'une trentaine de minutes, la solubilisation complète indique l'obtention du sel de sodium correspondant. La solution aqueuse est alors lyophilisée pour obtenir le nalidixate de sodium **1** sous forme d'une poudre blanche avec un rendement quantitatif.



**Figure 50.** Schéma de synthèse du nalidixate de sodium **1**.

Le bromopropyl ester **BPN** correspondant est ensuite obtenu par une réaction de substitution nucléophile du carboxylate **1** sur le 1,3-dibromopropane, selon un mécanisme de type  $S_N2$  (Figure 51). Cette ancienne voie d'accès à un ester est possible en utilisant un solvant aprotique polaire et dissociant, tel que le *N,N*-diméthylformamide (DMF). Pour cela, il est nécessaire d'avoir un DMF anhydre en le distillant à basse température sur  $CaH_2$ , et sous vide poussé en raison de son haut point d'ébullition (153 °C, 1 atm.).



**Figure 51.** Schéma de synthèse du bromopropylnalidixate **BPN** à partir du nalidixate de sodium **1** et de 1,3-dibromopropane.

A une solution de 1,3-dibromopropane dans le DMF est ajouté le nalidixate de sodium **1** à l'état solide, et le milieu réactionnel est maintenu sous argon à 35 °C durant 5 heures. Le dérivé bromé est présent en large excès (~30 éq.) afin de favoriser sa mono-substitution et d'éviter la formation du dimère 1,3-propyl-bis-nalidixate. En fin de réaction, le DMF est

éaporé sous vide poussé à 35 °C, et le brut réactionnel est d'abord pré-purifié par précipitation en évaporant à froid une solution DCM/heptane. On obtient un solide déjà lavé du bromure d'alkyle en excès. La purification finale passe par une colonne de chromatographie sur gel de silice, en utilisant un mélange d'élution DCM/MeCN.

L'emploi de MeOH comme co-solvant d'élution est proscrit en raison de la sensibilité de la fonction ester vis-à-vis des nucléophiles en présence de silice. En effet, Ben Salem avait observé l'apparition d'un nouveau produit absent dans le brut en sortie de colonne éluée par un mélange DCM/MeOH. L'analyse RMN <sup>1</sup>H de ce composé inconnu avait montré qu'il s'agissait de l'ester méthylique de l'acide nalidixique, vraisemblablement formé dans la colonne par trans-estérification catalysée par la silice.

### III.2.3. Synthèse des conjugués calixarène-quinolone

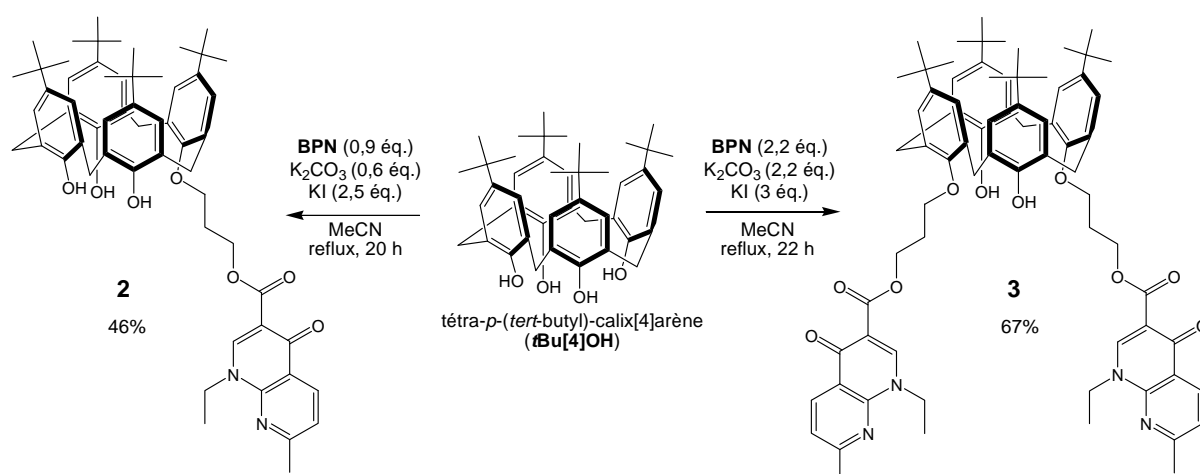
La méthode d'obtention des différents conjugués est relativement identique dans chaque cas. La fonctionnalisation de la partie basse des calix[4]arènes par *O*-alkylation (réaction de substitution nucléophile de type SN<sub>2</sub>) a généralement lieu dans MeCN en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ou de NaHCO<sub>3</sub>. Les dérivés mono- ou bi-substitués sont préférentiellement obtenus par ajustement des conditions opératoires, notamment en jouant sur la nature de la base et sa stœchiométrie par rapport au calixarène, ainsi que sur la concentration de ce dernier. La double substitution 1,3-alternée est favorisée en utilisant au moins 2 équivalents de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans MeCN chauffé à reflux, tandis que la mono substitution s'opère généralement avec 1 équivalent de NaHCO<sub>3</sub> ou 0,6 équivalent de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, mais à des concentrations plus faibles.

Les protocoles de synthèse des deux dérivés *t*Bu[4]OH porteurs de un ou deux résidus nalidixate avaient déjà été développés au laboratoire avec des rendements peu satisfaisants,<sup>1</sup> probablement en raison des problèmes de purification par chromatographie évoqués plus haut dans le cas du **BPN**. Ainsi, notre tâche ici était de développer de nouveaux systèmes chromatographiques exempt de solvants nucléophiles comme le MeOH.

Le dérivé bis-nalidixate **3** était originellement préparé par réaction du *t*Bu[4]OH avec 2 équivalents de **BPN** dans MeCN, en présence de 4 équivalents de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, avec un rendement de 35%.<sup>3</sup> L'optimisation de la procédure, impliquant l'emploi de 2,2 équivalents de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et l'ajout d'un léger excès d'iodure de potassium KI (3 éq.), a permis dans un

premier temps d'améliorer le taux d'avancement de la réaction (Figure 52). L'addition de KI au milieu réactionnel permet de favoriser la réaction de substitution nucléophile  $S_N2$  des phénolates sur le **BPN**, par formation *in situ* du dérivé iodé de ce dernier.

Il restait en second lieu à rechercher une méthode de purification par chromatographie sans utiliser MeOH comme co-éluant polaire. Cette phase d'optimisation de la procédure de purification sera décrite au cours du sous-chapitre suivant. Le rendement d'obtention du conjugué *t*Bu[4]OH-bis-nalidixate **3** après purification a ainsi été significativement amélioré, atteignant 67%.

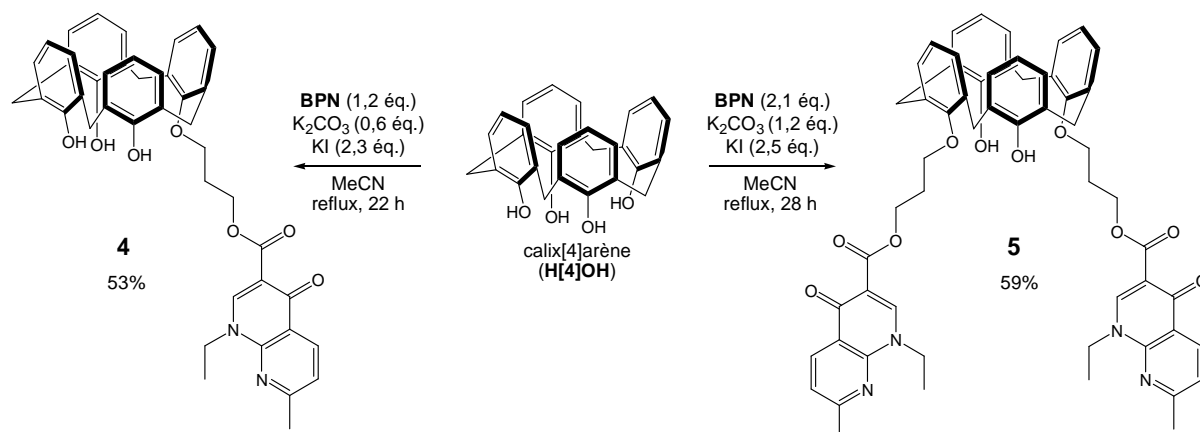


**Figure 52.** Schéma de synthèse des deux conjugués *t*Bu[4]OH-mono- (**2**) et bis-nalidixate (**3**) par *O*-alkylation du calixarène correspondant à partir du synthon **BPN**.

Le dérivé mono-nalidixate **2** était quant-à lui initialement préparé en employant 0,9 équivalent de **BPN** et 1,3 équivalents de  $NaHCO_3$  en présence de KI, avec un rendement de 42%.<sup>1</sup> Les modifications que nous avons apporté, comme le remplacement de  $NaHCO_3$  par 0,6 équivalent de  $K_2CO_3$ , n'ont pas permis d'augmenter significativement le rendement (Figure 52).

La préparation des nouveaux conjugués **4** et **5** (Figure 53), sans groupes *tert*-butyles en partie haute du calixarène, n'a pas posé de problèmes particuliers. Les premières conditions opératoires testées, similaires à celles appliquées pour les conjugués *tert*-butylés, se sont révélées efficaces.

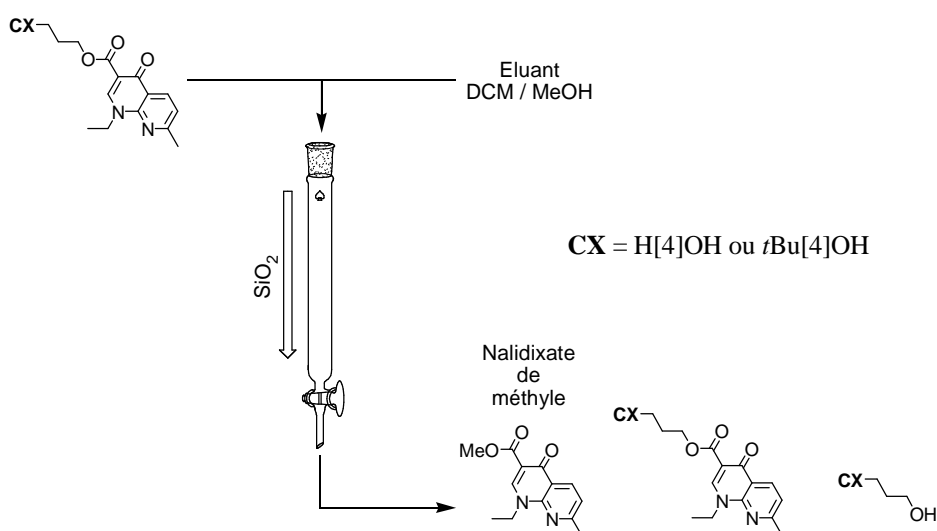




**Figure 53.** Sch\u00e9ma de synth\u00e8se des deux conjugu\u00e9s calix[4]ar\u00e8ne-mono- (**4**) et bis-nalidixate (**5**) par *O*-alkylation du calixar\u00e8ne correspondant \u00e0 partir du synton BPN.

### III.2.4. Purification des conjugu\u00e9s calixar\u00e8ne-quinolone

Deux exigences \u00e9taient inscrites dans le cahier des charges que nous nous \u00e9tions fix\u00e9. L'une pour l'obtention d'un lot unique de chaque compos\u00e9 avec une grande puret\u00e9. L'autre pour l'obtention de ces lots sous une forme manipulable, afin de faciliter la pr\u00e9paration des solutions n\u00e9cessaires \u00e0 la formation de films de Langmuir. Nous avons donc fait le choix de sacrifier une partie des substances dans diverses \u00e9tapes de purification, afin de correspondre \u00e0 ce cahier des charges que nous nous \u00e9tions fix\u00e9.



**Figure 54.** Sch\u00e9matisation d'une chromatographie des conjugu\u00e9s calixr\u00e8ne-quinolone, \u00e9lu\u00e9e par un m\u00e9lange DCM/MeOH au travers d'une colonne de gel de silice.

Il a été évoqué précédemment la sensibilité de la liaison ester vis-à-vis d'un alcool simple tel que MeOH dans les conditions classiques de purification par chromatographie sur gel de silice (Figure 54). Nous avons donc envisagé de remplacer MeOH par MeCN, ce dernier n'étant pas nucléophile. D'autre part, la tâche a été compliquée par la complexité des bruts réactionnels en fin de réaction. Il a donc été nécessaire d'adapter nos conditions chromatographiques à ces contraintes.

❖ Dérivés mono-nalidixate 2 et 4 :

La relativement faible polarité générale des dérivés mono-substitués, comparé aux bi-substitués, a permis de les purifier sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un mélange DCM/MeCN 8 : 2 (v/v). L'emploi de MeCN comme composante polaire du mélange d'éluion a permis d'éviter la dégradation par trans-estérification évoquée plus haut. Les composés *t*Bu[4]OH mono-nalidixate **2** et H[4]OH mono-nalidixate **4** ont ainsi été obtenus avec un rendement de 46% et 53%, respectivement. Cependant, les produits purifiés ont été obtenus sous forme amorphe et vitreuse. Cette aspect ne permet pas de les manipuler facilement en vue d'une pesée de précision, et complique donc la préparation des solutions nécessaires à la formation de films monomoléculaires.

Le conjugué **2** a pu être obtenu sous forme d'une poudre par cristallisation dans MeCN. La reprise dans MeCN du produit vitreux après chromatographie conduit dans un premier temps à sa solubilisation, rapidement suivie par une cristallisation avec un rendement de 73%. En revanche, le conjugué **4** s'est avéré parfaitement soluble dans ce solvant, aucune cristallisation n'ayant été observée. C'est par ajout d'un excès d'Et<sub>2</sub>O à une solution saturée dans le DCM que le produit **4** a pu être précipité avec un rendement de 84%.

❖ Dérivés bis-nalidixate 3 et 5 :

Dans le cas des dérivés bi-substitués, le pouvoir d'éluion de MeCN s'est avéré insuffisant pour entraîner le produit d'intérêt. Ainsi donc, ne pouvant plus efficacement jouer sur la phase mobile, nous avons modifié la phase stationnaire en neutralisant la silice par la triéthylamine. La base est ajoutée à la silice en suspension dans le DCM puis, après l'avoir tassé dans la colonne appropriée, le gel est lavé par éluion de DCM afin d'éliminer l'excès de

---

NEt<sub>3</sub>. Le pH de l'éluant en sortie de colonne est contrôlé (papier pH) pour s'assurer de la totale élimination de NEt<sub>3</sub>. Cette méthode a permis d'augmenter le pouvoir éluatif de la phase mobile mais au détriment de la résolution, constaté par l'élargissement des taches observées en CCM.

Un dernier ajustement consistait donc à rechercher un troisième co-solvant d'éluion, ici le diéthyléther, afin de résoudre ce problème. Cette méthode de chromatographie sur gel de silice neutralisée, impliquant un éluant ternaire DCM/Et<sub>2</sub>O/MeCN 4 : 4 : 2 (v/v/v) pour le composé **3** et 1 : 4 : 5 (v/v/v) pour le composé **5** a permis de diminuer significativement leur rétention sur la silice et d'atteindre un rendement final de 67% pour **3** et 59% pour **5**.

Ces conjugués bi-substitués sont obtenus sous forme vitreuse après chromatographie. Dans un premier temps, l'ajout d'Et<sub>2</sub>O à une solution concentrée de **3** dans le DCM n'a aucun effet immédiat. Mais après quelques minutes, une cristallisation est amorcée, conduisant après filtration à un produit sous forme d'une poudre cristalline avec un rendement de 56%.

D'autre part, le dérivé **5** se montrant peu soluble dans MeCN, nous pensions facilement exploiter cette caractéristique. Pourtant, les diverses méthodes décrites plus haut, à savoir reprise puis cristallisation, ou ajout d'un excès du non-solvant à une solution saturée n'ont données aucun résultat satisfaisant (obtention de gomme ou de poudre avec un très faible rendement). Une autre méthode était encore à tester. La lente évaporation du solvant volatile, ici le DCM (T<sub>eb</sub> = 40 °C, 1 atm), sans apport direct d'énergie entraîne un important refroidissement du milieu. Ce phénomène couplé à l'accroissement de la proportion en non-solvant moins volatile, ici le MeCN (T<sub>eb</sub> = 82 °C, 1 atm), a pour conséquence de faire précipiter et parfois même cristalliser le produit recherché. C'est donc finalement en évaporant à froid une solution de **5** dans un mélange DCM/MeCN que ce dernier a pu être obtenu sous une forme solide cristalline avec un rendement de 83%.

### **III.3. Etude comportementale à l'interface eau-air**

Les conjugués calixarène-quinolone faisant l'objet de cette thèse ont été conçus comme prodrogues amphiphiles et hydro-insolubles. Ces composés sont donc susceptibles d'interagir en milieu physiologique avec les membranes biologiques. En 2007, une première étude à l'interface eau-air concernant la miscibilité de conjugués *t*Bu[4]OH-pénicilline avec un modèle de membrane bactérienne a montré que ce type de calixarène pourrait

---

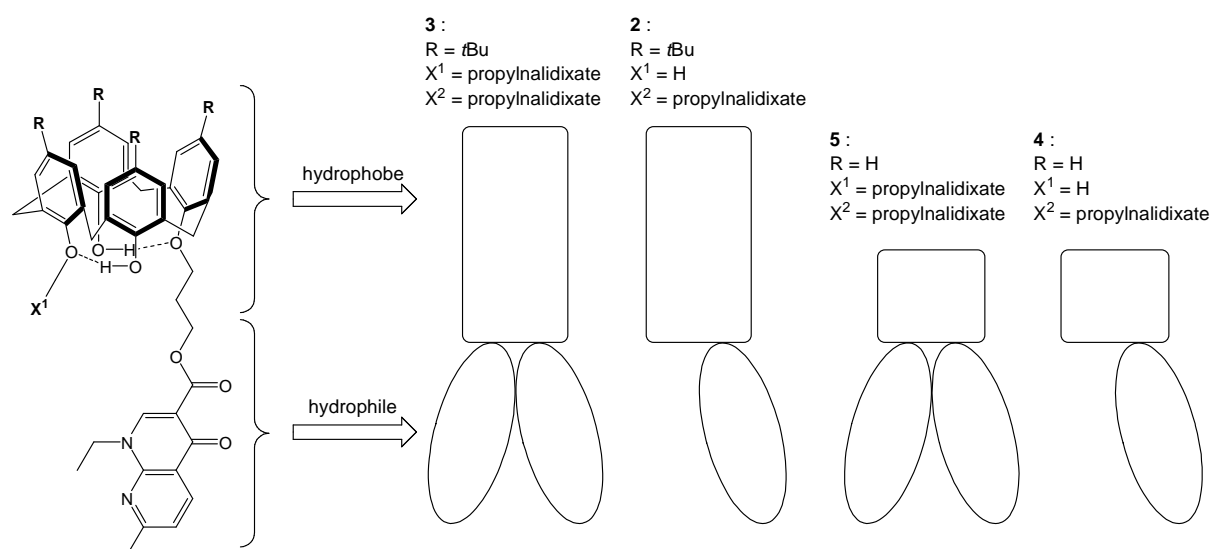
probablement s'insérer dans une bicouche lipidique.<sup>6</sup> Cependant, que ce soit pour des conjugués *t*Bu[4]OH-pénicilline ou -quinolone, la libération du principe actif dans un environnement interfacial n'a pas encore été étudiée.

il est essentiel dans un premier temps de caractériser les propriétés amphiphiles et le comportement de nos conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone dans un système modèle simple, à savoir un film monomoléculaire étalé à l'interface eau-air.

La technique des films de Langmuir est parfaitement adaptée pour ce type d'investigation.<sup>126, 130</sup> En effet, la mesure des isothermes de compression, pression de surface – aire moléculaire ( $\Pi$ -A) et potentiel de surface – aire moléculaire ( $\Delta V$ -A), ainsi que l'emploi de la spectroscopie PM-IRRAS et de la microscopie BAM, doit permettre d'étudier le comportement des dérivés calixaréniques **2-5** à l'interface eau-air.<sup>132</sup>

### III.3.1. Isothermes de compression

Les solutions calibrées de chaque composé **2**, **3**, **4** et **5** ont été préparées par pesée des substances dans une fiole jaugée de 5 mL, et solubilisées dans le chloroforme. On obtient ainsi des solutions de concentration précisément connue qui permettra de calculer l'aire moléculaire A.



**Figure 55.** Schématisation de l'amphiphilie relative de chaque conjugué calixarène-quinolone.

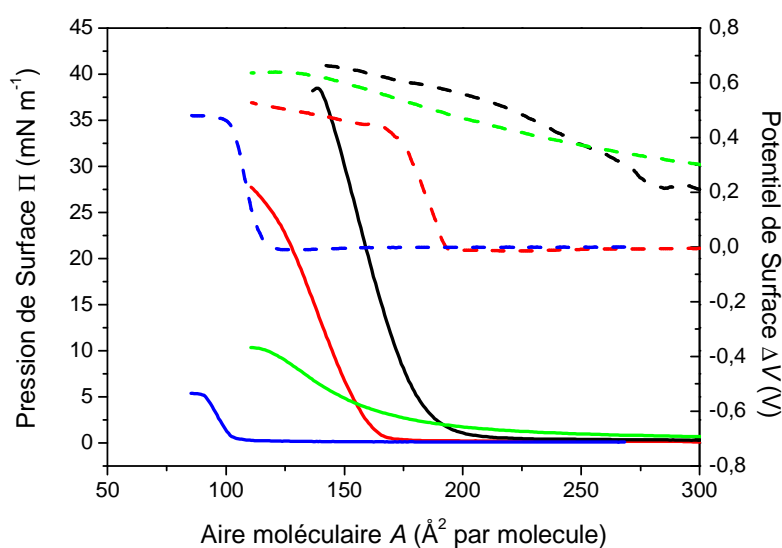
Les conjugués calixarène-quinolone **2-5** ont une structure amphiphile, où la couronne macrocyclique et sa partie haute sont hydrophobes comparé aux résidus nalidixates sur sa partie basse. A l'interface eau-air, ces composés vont donc s'organiser en orientant leur partie hydrophobe dans l'air et leur partie hydrophile dans l'eau. Il est connu que les groupes -OH d'un calix[4]arène en conformation cône sont hydrophobes, en raison de la formation d'un réseau intra-moléculaire de liaisons hydrogènes.<sup>24</sup> On peut donc suspecter chez nos conjugués calixarène-quinolone la création d'un même réseau de liaisons H entre les groupes -OH phénoliques libres et substitués, les rendant relativement hydrophobes. Par conséquent, selon la nature de la partie haute (présence de groupes *t*Bu ou non) et de la partie basse (mono- ou bis-nalidixate), le caractère amphiphile de chaque composé est variable (Figure 55). Ceci peut être quantifié par les valeurs de moment dipolaire effectif ( $\mu_{\text{eff}}$ ),<sup>86, 87</sup> données en Tableau 1.

Les isothermes de compression  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A des films de Langmuir formés avec les conjugués **2-5** à la surface d'eau pure (pH 5,6 ; 20 °C) sont reportées en Figure 56. Leurs paramètres caractéristiques relevés au point de collapse (coll), à savoir la pression de surface  $\Pi_{\text{coll}}$  et l'aire moléculaire  $A_{\text{coll}}$ , ainsi que les valeurs du potentiel de surface  $\Delta V_{\text{coll}}$  et du moment dipolaire effectif  $\mu_{\text{eff}}$  sont reportés dans le Tableau 1. La valeur maximale du module de compressibilité  $C_s^{-1}$  est également reportée, ainsi que l'aire moléculaire limite  $A_{\text{lim}}$  relative à la phase la plus condensée. Rappelons que ce dernier paramètre  $A_{\text{lim}}$  s'obtient par extrapolation à  $\Pi = 0 \text{ mN m}^{-1}$  de la partie linéaire la plus condensé de l'isotherme, donc juste avant le collapse, et donne une valeur d'aire moléculaire théoriquement représentative de l'état liquide le moins condensé, par opposition avec l'aire  $A_{\text{coll}}$  représentative de l'état liquide le plus condensé.

❖ Isothermes de compression  $\Pi$ -A.

On peut constater que chaque isotherme  $\Pi$ -A est caractéristique de chaque composé (Figure 56, lignes continues). Les dérivés **2** et **3** porteurs de groupements *t*Bu sont clairement discernables des deux autres dérivés **4** et **5**. Afin de faciliter les discussions à venir, ces quatre composés ont été classés en deux groupes distincts.<sup>132</sup> Le groupe **A**, comprenant les deux dérivés du tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène **2** et **3**, et le groupe **B** comprenant les deux dérivés du tétra-*p*-H-calix[4]arène **4** et **5**.

D'après l'allure des isothermes, on observe que les dérivés du groupe **B** sont peu filmogènes. La compression de leur film monomoléculaire conduit à de faibles pressions de surface. Ceci peut être chiffré à l'aide des paramètres reportés en Tableau 1. Les films formés avec les composés du groupe **A** sont plus stables et ont un caractère plus solide comparés aux films formés avec les composés du groupe **B**, comme l'indiquent les valeurs supérieures de  $\Pi_{\text{coll}}$  et  $C_s^{-1}_{\text{max}}$  des composés **2** et **3** (Tableau 1).



**Figure 56.** Isothermes de compression  $\Pi$ - $A$  (lignes continues) et  $\Delta V$ - $A$  (lignes discontinues) des films monomoléculaires constitués du conjugué calixarène-quinolone **2** (rouge), **3** (noir), **4** (bleu) et **5** (vert) étalés sur eau pure (pH 5,6 ; 20 °C). Vitesse de compression : 5 mm min<sup>-1</sup>.

**Tableau 1.** Paramètres caractéristiques des isothermes de compression en Figure 56.

Groupe	Composé	$\Pi_{\text{coll}}$ ( $\text{mN m}^{-1}$ )	$A_{\text{coll}}$ ( $\text{\AA}^2$ )	$C_s^{-1}_{\text{max}}$ ( $\text{mN m}^{-1}$ )	$A_{\text{lim}}$ ( $\text{\AA}^2$ )	$\Delta V_{\text{coll}}$ (V)	$\mu_{\text{eff}}$ (D)
<b>A</b>	<b>3</b>	35,3	145	159	182	0,66	2,54
	<b>2</b>	19,8	130	98	160	0,50	1,71
<b>B</b>	<b>5</b>	9,3	123	24	178	0,64	2,09
	<b>4</b>	4,8	92	46	103	0,48	1,17

Au sein du groupe **A**, le film formé avec le dérivé bis-nalidixate **3** est plus stable avec un caractère plus solide que son analogue mono-nalidixate **2**. De la même manière dans le groupe **B**, le dérivé bis-nalidixate **5** forme également un film plus stable que son analogue mono-nalidixate **4**. Cependant, le film de **5** présente un caractère plus liquide que son analogue **4**.

La présence de groupements *t*Bu sur la partie haute du macrocycle, et/ou d'un second résidu nalidixate sur sa partie basse, sont des facteurs stabilisants. Cependant, l'écart de  $\Pi_{\text{coll}}$  entre les deux dérivés mono-nalidixate **2** et **4** (19,8 et 4,8 mN m<sup>-1</sup>, respectivement), ou les deux dérivés bis-nalidixate **3** et **5** (35,3 et 9,3 mN m<sup>-1</sup>, respectivement) est plus important qu'en comparant les dérivés du groupe **A** (35,3 et 19,8 mN m<sup>-1</sup>) ou **B** (9,3 et 4,8 mN m<sup>-1</sup>). Ces résultats montrent que la présence de groupements *t*Bu est le facteur stabilisant prédominant comparé à l'introduction d'un second résidu nalidixate.

L'analyse des valeurs  $A_{\text{coll}}$  et  $A_{\text{lim}}$  nous a permis de comparer l'évolution de la conformation de nos composés calixaréniques au cours de la compression des films à l'interface eau-air.

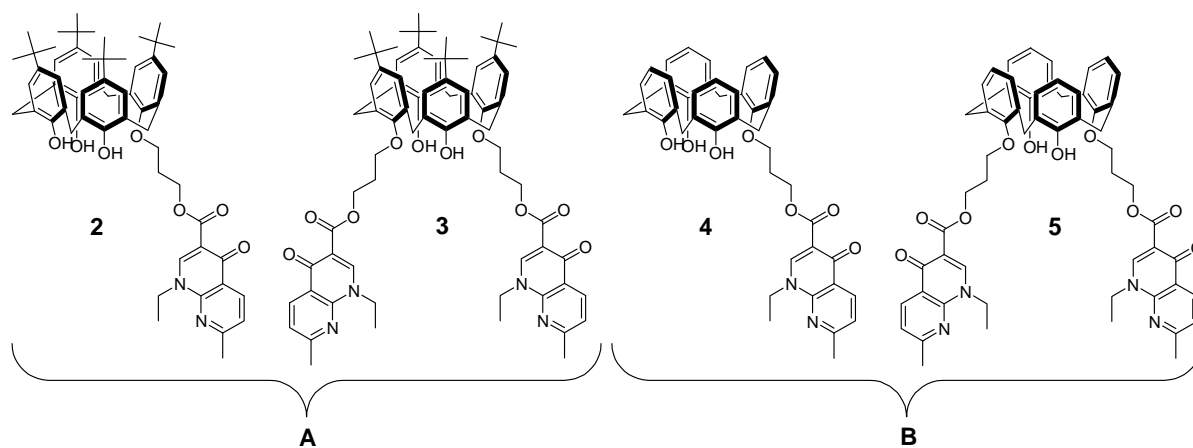
Les dimensions par projection sur le plan de la sous-phase des dérivés augmentent à partir du composé **4** vers les composés **5**, **2** et **3**, comme indiqué par l'augmentation des valeurs  $A_{\text{coll}}$  selon le même ordre (Tableau 1). Les valeurs  $A_{\text{lim}}$  évoluent selon la même tendance.

On peut constater que la différence entre les valeurs  $A_{\text{coll}}$  des dérivés du groupe **A** ( $\Delta A_{\text{coll}}(\mathbf{A}) = 15 \text{ \AA}^2$ ) est plus faible que dans le groupe **B** ( $\Delta A_{\text{coll}}(\mathbf{B}) = 31 \text{ \AA}^2$ ). Ceci est d'autant plus prononcé dans le cas des valeurs  $A_{\text{lim}}$ , où l'on peut relever les différentiels  $\Delta A_{\text{lim}}(\mathbf{A}) = 22 \text{ \AA}^2$  et  $\Delta A_{\text{lim}}(\mathbf{B}) = 75 \text{ \AA}^2$ . Ces différentiels indiquent que les changements conformationnels au cours de la compression des dérivés du groupe **B** (**4** et **5**) à l'interface eau-air sont plus influencés par le degré de substitution en partie basse, comparé aux dérivés du groupe **A**.

En considérant des molécules rigides, nous aurions du constater des différentiels similaires dans chaque groupe. Or, il a été montré par Van der Heyden et coll. que la conformation de dérivés du calix[4]arène adsorbés à l'interface eau-air pouvait varier en fonction de leur état de compression.<sup>132</sup> Nous suggérons que les groupes *t*Bu, stériquement encombrant, limitent les changements conformationnels du macrocycle au cours de la compression. La présence de ces groupements *t*Bu domine donc le comportement interfacial des conjugués du groupe **A**.

❖ Isothermes de compression  $\Delta V$ -A.

Il peut être constaté que les isothermes de compression  $\Delta V$ -A (Figure 56, lignes discontinues) sont caractéristiques du degré de substitution en partie basse du macrocycle.



**Figure 57.** Rappel de la structure des composés étudiés.

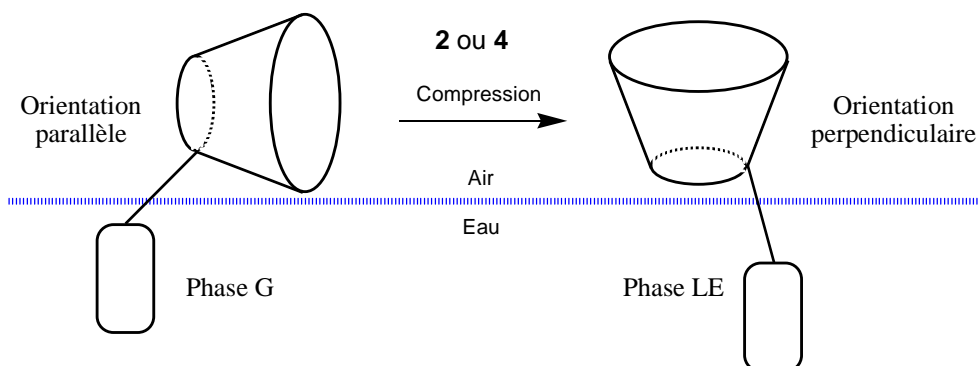
Dans le cas des calixarènes mono-nalidixates, on observe un saut de potentiel débutant vers 200 et 130 Å<sup>2</sup> pour **2** et **4**, respectivement. Ce saut se termine vers 175 et 100 Å<sup>2</sup>, respectivement, correspondant au point de décollage de  $\Pi$ . L'élévation de  $\Delta V$  sans variation significative de  $\Pi$  est révélatrice d'une transition de phase G/LE, et indique une brusque réorientation des molécules constituant le film. De façon opposée, l'augmentation régulière de  $\Delta V$  dans le cas des calixarènes bis-nalidixates **3** et **5** indique une orientation constante de ces molécules depuis la phase gaz jusqu'au collapse du film.

La partie basse de nos calixarènes étant hydrophile comparé à leur partie haute, nous postulons que les résidus nalidixates soient constamment immergés dans la sous-phase. Compte-tenu de ce postulat, l'unique partie de ces molécules pouvant s'orienter différemment par rapport à l'interface eau-air en fonction de la compression est la couronne macrocyclique. Il a été montré que des dérivés du calix[6]arène et du calix[8]arène à l'état de film de Langmuir peuvent, en fonction de la compression des films, s'orienter perpendiculairement ou parallèlement à l'interface eau-air.<sup>147, 148</sup> Il n'est pas à exclure que des dérivés du calix[4]arène adsorbés à l'interface eau-air puissent également s'orienter différemment par rapport à l'interface en fonction de la compression.

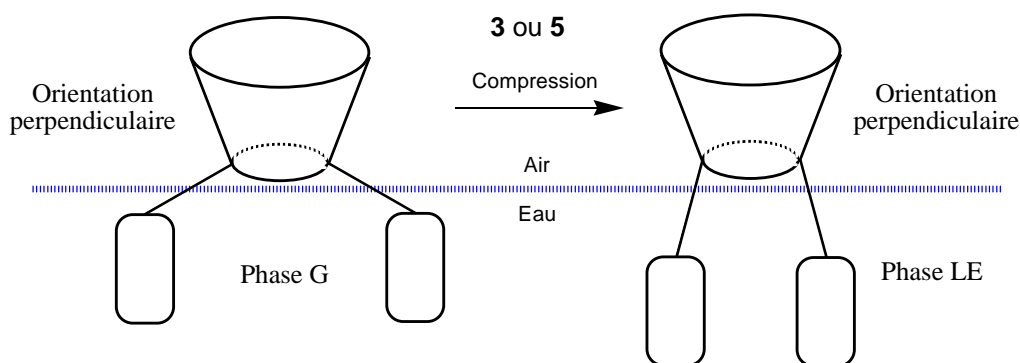
Transposé à notre situation, on constate que seule une mono-substitution en partie basse autorise un tel mouvement, comme proposé en Figure 58. Une bi-substitution, qui plus



est 1,3-alternée, doit bloquer la couronne macrocyclique selon une orientation perpendiculaire à l'interface quel que soit l'état de compression du film (Figure 59).



**Figure 58.** Organisation supposée des conjugués **2** et **4** à l'interface eau-air en phase gaz (gauche), puis en phase liquide (droite).



**Figure 59.** Organisation supposée des conjugués **3** et **5** à l'interface eau-air en phase gaz (gauche), puis en phase liquide (droite).

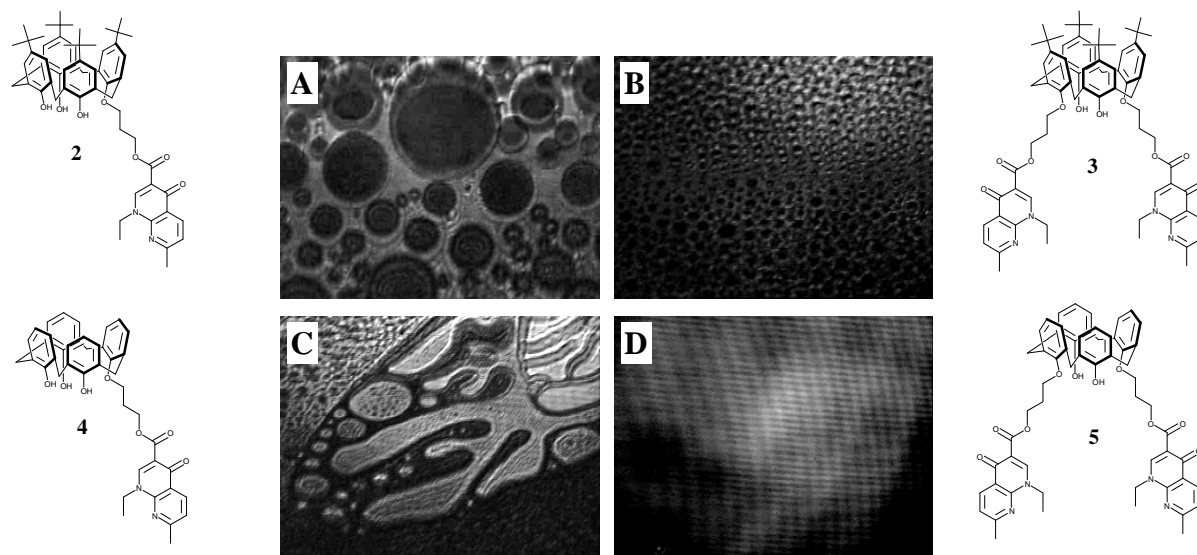
D'après nos résultats et ceux de la littérature,<sup>147, 148</sup> nous proposons donc que le macrocycle des dérivés calixaréniques **2** et **4** étalés à l'interface eau-air est orienté d'abord de façon parallèle à cette interface, puis, sous l'effet de la compression, se réoriente de façon perpendiculaire (Figure 58). Ce mouvement est indépendant de la présence ou non de groupes *t*Bu sur la partie haute du calixarène. La bi-substitution 1,3-alternée des dérivés **3** et **5** n'autorise pas ce mouvement, leur macrocycle étant constamment orienté de façon perpendiculaire (Figure 59). Les groupements -OH phénoliques ne favorisent donc pas l'orientation perpendiculaire des dérivés **2** et **4**. Ce fait supporte l'hypothèse de l'existence d'un réseau intramoléculaire de liaisons H entre ces hydroxyles phénoliques, leur conférant un caractère hydrophobe.

### III.3.2. Microscopie à angle de Brewster

Les images obtenues par microscopie BAM lors de l'élévation de  $\Pi$  des films de Langmuir formés avec les calixarènes **2-5** n'ont révélées aucuns domaines particuliers (images uniformes, non présentées). Cette isotropie des films de **2-5** indique l'existence d'une unique phase. Ceci est en accord avec les isothermes de compression  $\Pi$ -A correspondantes, ne montrant pas de transition de phase LE/LC. Or la microscopie BAM est utile lorsque que le film monomoléculaire étudié est anisotrope. La morphologie des domaines de phase condensée ou expansée du film donne des informations sur son organisation moléculaire.

Nous avons donc étudié les images prises lors de la transition de phase G/LE (voir Figure 60).<sup>17</sup> Cette analyse nous a apporté des informations complémentaires à celles obtenues à partir des isothermes de compression  $\Delta V$ -A, et nous a permis d'approfondir notre hypothèse concernant l'orientation du macrocycle des calix[4]arène **2-5** à l'interface eau-air.

Les photographies BAM présentées en Figure 60 ont ainsi été prises au début de la compression des films de Langmuir **2-5** ( $\Pi \approx 0 \text{ mN m}^{-1}$ ), aux aires moléculaires respectives de 200, 250, 125 et 300  $\text{\AA}^2$ . Pour les dérivés **2** et **4**, la valeur de A correspond au début du saut de  $\Delta V$  observé sur leur isotherme  $\Delta V$ -A respective.



**Figure 60.** Imagerie par microscopie BAM révélant la morphologie des films de Langmuir constitués de **2** (A), **3** (B), **4** (C), **5** (D) étalés sur eau pure (pH 5,6 ; 20 °C). Photographies prises lors des transitions de phase G/LE ( $\Pi \approx 0 \text{ mN m}^{-1}$ ), aux aires moléculaires de 200 (A), 250 (B), 125 (C) et 300  $\text{\AA}^2$  (D). Echelle : la largeur de chaque image correspond à 400  $\mu\text{m}$ .

La transition de phase G/LE est nettement plus visible dans le cas des composés mono-naldixate **2** et **4** (images A et C, respectivement). L'image B correspondantes au dérivé

bis-nalidixate **3** révèle peu d'anisotropie, tandis que l'image D correspondante au dérivé **5** montre une parfaite isotropie du film. Ces résultats indiquent une différenciation plus prononcée en terme de densité entre phases G et LE pour les dérivés **2** et **4**, comparé à leurs analogues **3** et **5**. Nous supposons que pour les films formés avec les composés **2** et **4**, l'anisotropie observée est révélatrice de la coexistence de molécules dont le calixarène est orienté soit perpendiculairement soit parallèlement par rapport à l'interface eau-air.

Ces observations faites par microscopie BAM confortent l'hypothèse émise à partir des isothermes  $\Delta V-A$  (voir Figures 58 et 59). Nous proposons que les calix[4]arènes mononalidixate **2** et **4** en phase gaz s'orientent parallèlement à l'interface eau-air. Sous l'effet de la compression, ces dérivés se redressent et adoptent une orientation perpendiculaire selon l'interface. La présence d'un second résidu nalidixate sur la partie basse des dérivés calixaréniques **3** et **5** stabilise le macrocycle selon une orientation perpendiculaire, quel que soit l'état de compression.

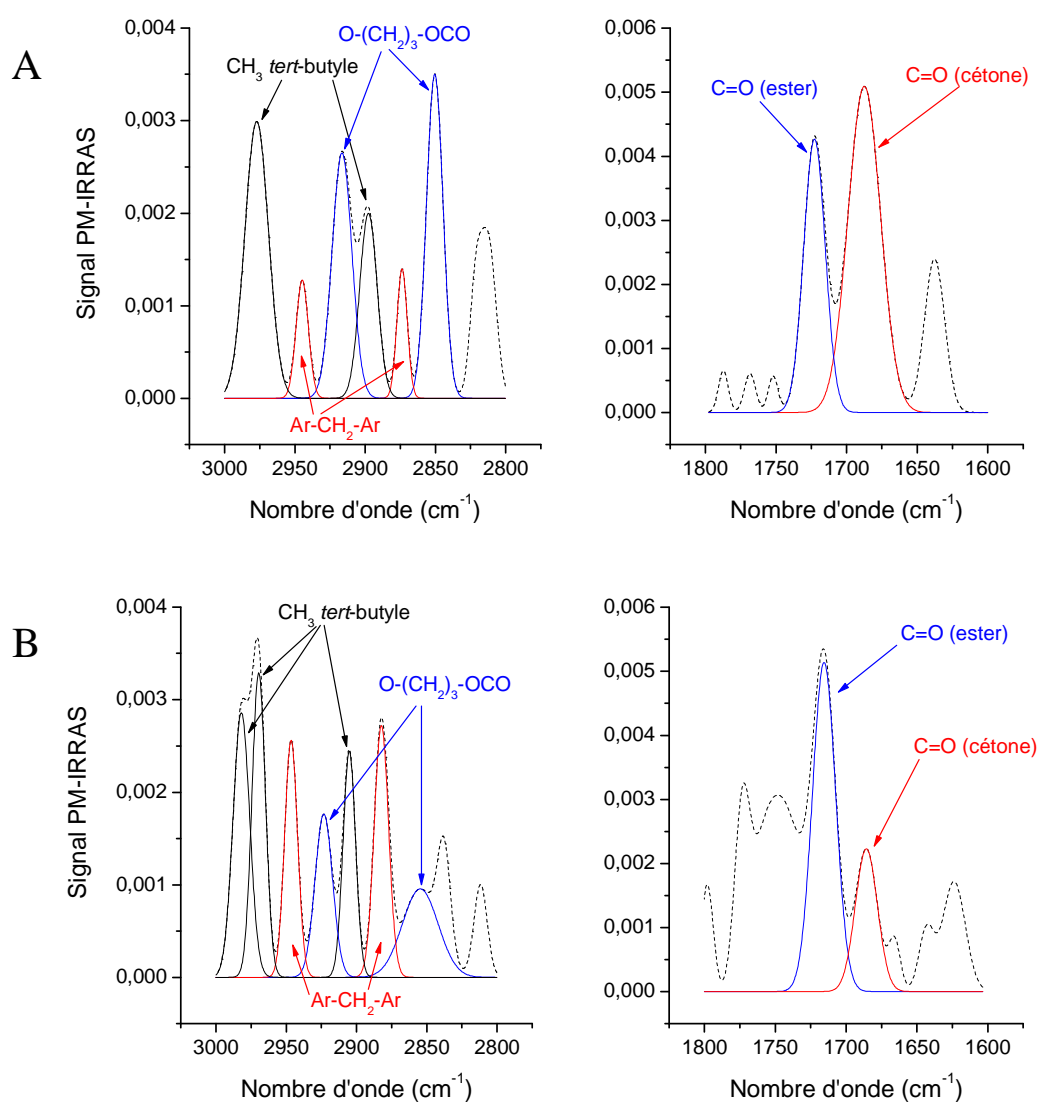
### III.3.3. Spectroscopie infrarouge PM-IRRAS

Les propriétés interfaciales de molécules d'origines naturelles, tels que les phospholipides ou les protéines, ont beaucoup été étudiées par PM-IRRAS ces dix dernières années.<sup>21, 149, 150</sup> Ces composés possèdent en effet d'excellentes sondes spectroscopiques IR, comme les chaînes alkyles chez les phospholipides caractérisées par les bandes d'absorption  $\nu_s(\text{CH}_2)$  et  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ ,<sup>21, 96, 97</sup> ou les groupements amides -NH-CO- chez les protéines caractérisées par les bandes d'absorption *amide I* et *amide II*.<sup>149, 150</sup> Or, on peut constater dans la littérature que cette technique est encore peu appliquée à des molécules synthétiques, et encore moins aux calixarènes.<sup>20, 151, 152</sup> Une revue publiée en 2007 par Mohammed-Ziegler et coll. reporte les quelques études par PM-IRRAS de dérivés calix[n]arène et calix[n]resorcinarène (n = 6, 8),<sup>153</sup> mais aucunes concernant des dérivés du calix[4]arène.

Notons qu'une première caractérisation par PM-IRRAS des dérivés **2** et **3** a été publiée en 2010 par notre équipe.<sup>154</sup>

L'interprétation des spectres PM-IRRAS présentés ci-dessous s'est principalement basée sur les travaux de Katsyuba et coll.<sup>155-158</sup> et de Furer et coll.<sup>159, 160</sup> Appuyées par la modélisation moléculaire, les auteurs reportent des études conformationnelles de calix[4]arènes et de leurs analogues tétra-*p*-(*tert*-butyl)-.

Rappelons que les principes fondamentaux de la spectroscopie PM-IRRAS sont décrits en Chapitre II. Cette technique de choix pour l'étude infrarouge de films monomoléculaires étalés à l'interface eau-air a été appliquée à l'étude des conjugués **2** et **3**. Leurs spectres PM-IRRAS, présentés en Figure 61, ont été collectés à  $\Pi = 15 \text{ mN m}^{-1}$  ( $20^\circ \text{C}$ ). La pression de surface d'étude a été choisie de façon à analyser des films suffisamment condensés, avant leur point de collapse. Les positions des bandes d'absorption caractéristiques sont données dans le Tableau 2.



**Figure 61.** Spectres PM-IRRAS des films monomoléculaires de **3** (A) et de **2** (B), après correction de la ligne de base (lignes discontinues), et déconvolution (lignes pleines). Les spectres ont été collectés à  $\Pi = 15 \text{ mN m}^{-1}$  ( $20^\circ \text{C}$ ). Gauche : région spectrale des vibrations d'élongation des groupes méthyles (noir) et méthylènes (rouge et bleu). Droite : région spectrale de la vibration d'élongation des groupes carbonyles ester (bleu) et cétone (rouge).

Aucuns spectres exploitables des dérivés **4** et **5** n'ont pu être obtenus. Le bruit instrumental trop important ne permettait pas de clairement distinguer les bandes d'intérêt, probablement en raison de films trop expansés.

**Tableau 2.** Fréquences de vibration caractéristiques des composés **2** et **3** à l'interface eau-air.

	<b>3</b>	<b>2</b>	Mode de vibration(Groupe) <sub>Attribution</sub>
Bandes d'absorption  (cm <sup>-1</sup> )	2977	2981, 2969	$\nu_{as}(\text{CH}_3)_{t\text{Bu}}$
	2898	2905	$\nu_s(\text{CH}_3)_{t\text{Bu}}$
	2944	2946	$\nu_{as}(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$
	2874	2882	$\nu_s(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$
	2916	2923	$\nu_{as}(\text{CH}_2)_{\text{propyl}}$
	2850	2855	$\nu_s(\text{CH}_2)_{\text{propyl}}$
	1722	1716	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ester}}$
	1687	1685	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{cétone}}$

Les principales fonctions chimiques de **2** et **3** ont été détectées à l'interface eau-air. Les bandes d'absorption  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$  et  $\nu_s(\text{CH}_3)$ , caractéristiques des groupements *t*Bu ont été identifiées, ainsi que les bandes d'absorption  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ester}}$  et  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{cétone}}$  correspondant aux groupes carbonyles ester et cétone des résidus quinolones. Les bandes  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  et  $\nu_s(\text{CH}_2)$  des groupes diarylméthylènes  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$  et propyliques  $\text{ArO}(\text{CH}_2)_3\text{O}$  ont également pu être observées, et différenciées sur la base des travaux de Katsyuba et coll.<sup>155-158</sup> et de Furer et coll.<sup>159, 160</sup>

Par comparaison avec les résultats de Furer et coll., les relativement hautes fréquences d'élongation  $\nu_{as}(\text{CH}_3)_{t\text{Bu}}$  et  $\nu_s(\text{CH}_3)_{t\text{Bu}}$  observées pour **2** et **3** indiquent une plus grande liberté conformationnelle du macrocycle chez ces dérivés, comparé à un *t*Bu[4]OH à l'état cristallin.<sup>159</sup> Dans le cas de **2**, il peut être constaté après déconvolution de la bande  $\nu_{as}(\text{CH}_3)_{t\text{Bu}}$  que celle-ci est la résultante de deux pics d'absorption. Ceci révèle la perte d'un élément de symétrie chez le composé **2** par rapport au dérivé bis-nalidixate **3** (axe C<sup>2</sup>).

En étudiant des modèles simples comme le bis-(2-hydroxyphényl)-méthane, Katsyuba et coll. ont montré que les vibrations d'élongation  $\nu_{as}(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$  et  $\nu_s(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$  sont sensibles à la conformation du modèle.<sup>155, 156</sup> Les auteurs ont de plus montré que les données

acquises avec leurs modèles sont transposables à des systèmes plus complexes comme le calix[4]arène.

La position de la bande d'absorption  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$ , similaire chez les deux dérivés **2** et **3** ( $\sim 2945 \text{ cm}^{-1}$ ), suggère une conformation intermédiaire entre cône et 1,3-alterné.<sup>155, 159</sup> La bande  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$  de **3** suggère un état intermédiaire entre le cône et le cône partiel.<sup>155, 156</sup>

la bande  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$  du dérivé **2**,  $2882 \text{ cm}^{-1}$ , apparaît avec un plus grand nombre d'onde (plus haute fréquence) par rapport à celle du dérivé **3**,  $2874 \text{ cm}^{-1}$ . Ce décalage vers le bleu (vibration de plus hautes énergies) peut être interprété comme la conséquence d'un degré de liberté plus important du groupement correspondant de **2**.<sup>161, 162</sup> Ainsi, ces résultats indiquent que le calixarène **3** doit se trouver dans une conformation moins fluctuante et plus proche du cône que le calixarène **2**.

Les bandes  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)_{\text{propyl}}$  et  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)_{\text{propyl}}$  correspondant au *spacer* propylique peuvent apporter des indications sur le degré d'organisation de ces courtes chaînes alkyles.<sup>163, 164</sup> Il peut être constaté chez **3** que ces bandes sont décalées vers le rouge, comparé au dérivé **2**. Ces bandes d'absorption indiquent une plus grande propension à la conformation tout-trans de la chaîne propylique du dérivé **3**.

Enfin, on observe que la position de la bande  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{cétone}}$  est peu affectée par le degré de substitution. En revanche, les deux dérivés sont différenciés en fonction de la fréquence d'élongation  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ester}}$  du carbonyle ester. Par comparaison avec le dérivé **3**, la faible fréquence observée dans le cas du dérivé **2** indique que le carbonyle ester de ce dernier est plus sujet à la formation de liaisons H. Ces composés ayant peu de groupements donneurs de liaison H, nous supposons que le groupe ester de **2** interagit principalement avec l'eau de la sous-phase. Nous proposons ainsi que le *linker* ester du dérivé **2** est plus accessible à l'eau de la sous-phase, comparé au dérivé **3**.

A partir de ces résultats, plusieurs hypothèses ont été formulées (Figure 62) :

- D'après les bandes  $\nu(\text{CH}_3)_{\text{iBu}}$ , nous proposons que la substitution de un ou deux groupes -OH phénoliques, réduisant le nombre de liaisons H possible entre eux, a pour conséquence d'accroître la liberté conformationnelle du macrocycle.

- Les bandes  $\nu(\text{CH}_2)_{\text{ArCH}_2\text{Ar}}$  supportent l'hypothèse précédente, en indiquant une conformation fluctuante du macrocycle, moyennée entre la conformation cône et 1,3-alterné. Cette fluctuation semble être d'amplitude plus importante chez **2** que chez **3**.
- La bande  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{cétone}}$  indique que le résidu quinolone se trouve toujours plongé dans la sous-phase. Ce résultat est en faveur du postulat émis précédemment. Le *linker* ester, utilisé pour être labile *in vivo*, ne semble pas être identiquement accessible chez les deux dérivés. Nous supposons que cela puisse avoir une incidence sur la réactivité respective du *linker* chez **2** et **3**.

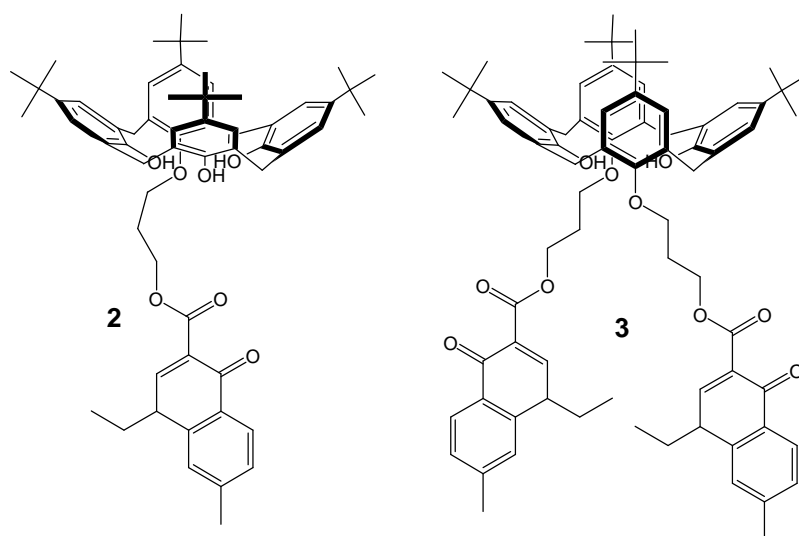


Figure 62. Conformations supposées des dérivés **2** et **3** étalés en film monomoléculaire à la surface d'eau pure.

### III.3.4. Stabilité relative des films

Avant la mise au point d'une méthodologie d'étude de nos présumés prodrogues à libérer leur principe actif depuis un milieu interfacial, il nous fallait sélectionner des candidats dont les propriétés physico-chimiques soient les plus adéquates. Ceux-ci ont été sélectionnés au regard de leur aptitude à former des films de Langmuir suffisamment stables et condensés, pour être au plus proche de conditions physiologiques comme au sein d'une membrane lipidique.

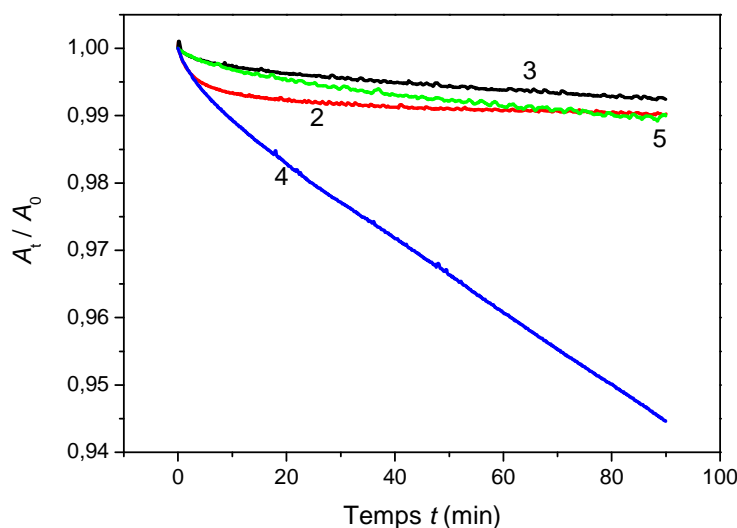
La valeur de la pression de surface au collapse de chaque film ( $\Pi_{\text{coll}}$ ) donne un premier aperçu de la stabilité relative des films (voir Tableau 1). En effet, plus  $\Pi_{\text{coll}}$  est important, plus l'énergie nécessaire pour briser le film augmente, donc plus le film est stable. Cependant,

l'unique prise en compte de ce paramètre n'est pas suffisante, ne rendant pas état d'autres phénomènes ayant lieu à long terme, tels que l'agrégation ou la solubilisation dans la sous-phase.

Nous avons donc suivi à pression constante l'évolution de l'aire moléculaire en fonction du temps de chaque film (Figure 63), ainsi que réalisé plusieurs cycles compression-décompression (Figure 64).<sup>132, 165-167</sup>

❖ Suivi de l'aire moléculaire en fonction du temps.

Pour cette expérience, chaque film a été comprimé et maintenu à une pression de surface située avant le point de collapse et proche du point  $C_s^{-1}{}_{\max}$  (état condensé). Les pressions choisies sont de  $25,0 \text{ mN m}^{-1}$  pour **3**,  $17,0 \text{ mN m}^{-1}$  pour **2**,  $8,5 \text{ mN m}^{-1}$  pour **5** et  $4,4 \text{ mN m}^{-1}$  pour **4**. Le système conservant une pression de surface constante, une diminution de  $\Pi$  au cours du temps est compensée par le resserrement des barrières mesuré par la diminution de l'aire moléculaire,  $A_t$ . Comme présenté en Figure 63, l'évolution de l'aire moléculaire  $A_t$  en fonction du temps a été pondérée par l'aire moléculaire à  $t = 0$  ( $A_0$ ), afin de comparer sur un même ordre de grandeur les résultats obtenus pour chaque composé.



**Figure 63.** Evolution à  $\Pi = C^{ste}$  du ratio  $A_t/A_0$  en fonction du temps. Résultats obtenus avec **2** (rouge),  $\Pi = 17,0 \text{ mN m}^{-1}$ ), **3** (noir,  $\Pi = 25,0 \text{ mN m}^{-1}$ ), **4** (bleu,  $\Pi = 4,4 \text{ mN m}^{-1}$ ) et **5** (vert,  $\Pi = 8,5 \text{ mN m}^{-1}$ ) étalés sur eau pure (pH 5,6 ;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



Dans le cas des composés **2**, **3** et **5**, on peut constater que la diminution du ratio  $A_t / A_0$  après 90 minutes est très faible (~1%). Cette diminution est attribuée aux variations expérimentales telles que l'évaporation de la sous-phase ou le séchage partiel de la lame de Whihelmy, et donc considérée comme nulle. En revanche, la diminution de  $A_t / A_0$  atteint 5,5% après 90 minutes dans le cas du dérivé **4**. Ce résultat, qui ne peut être uniquement dû aux variations expérimentales, est attribué à une solubilisation de **4** dans la sous-phase.<sup>165</sup>

Outre la valeur finale de  $A_t / A_0$ , le coefficient directeur de chaque courbe reflète la vitesse apparente de disparition de chaque film. Les films formés avec **2** et **3** ont une vitesse apparente de disparition similaire. En revanche, on constate que le coefficient directeur de la courbe correspondant à **5** est plus important que pour **2** ou **3**. Le film de **5** est donc sensiblement moins stable que ceux de **2** et **3**.

Ces expériences montrent que les films formés avec les conjugués du groupe **A** (**2** et **3**) sont les plus stables et restent intègres après 90 minutes à la surface d'eau pure. Les films formés avec les conjugués du groupe **B** (**4** et **5**) sont moins stables, particulièrement dans le cas de **4**. Une extrapolation de la courbe de **4** indique que son film monomoléculaire peut disparaître de l'interface en moins de 24 heures.

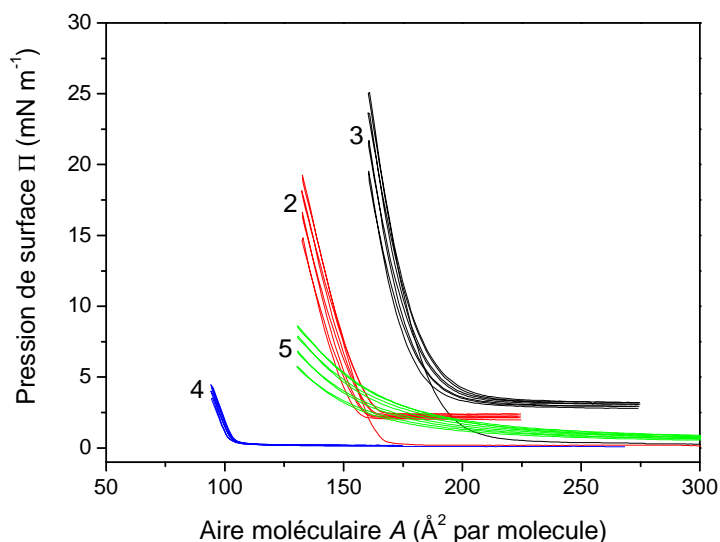
❖ Cycles compression-décompression.

La succession de plusieurs cycles compression-décompression d'un film de Langmuir peut également apporter des informations concernant sa stabilité, ainsi que sur le comportement des molécules le constituant.<sup>166, 167</sup> Comme indiqué en Figure 64, quatre cycles compression-décompression des films formés avec nos quatre dérivés **2-5** ont été effectués. Ces films ont été comprimé-décomprimé depuis leur phase gaz jusqu'aux aires moléculaires correspondantes aux pressions de surface choisies pour les expériences précédentes. Il peut être constaté que les films restent intègres après quatre cycles, et que leurs propriétés interfaciales sont peu modifiées.

Cependant, pour les dérivés du groupe **A**, on remarque l'apparition dès le premier retour à la phase gaz d'un plateau de pression de surface autour de  $3,0 \text{ mN m}^{-1}$  et  $2,5 \text{ mN m}^{-1}$  avec **3** et **2**, respectivement (Figure 64, lignes noir et rouge). A l'inverse, les dérivés du

---

groupe **B** se caractérisent par un retour systématique à  $\Pi \approx 0 \text{ mN m}^{-1}$  après chaque décompression vers la phase gaz (Figure 64, lignes verte et bleue). Le plateau observé avec **2** et **3** reste constant au cours des quatre cycles, et doit indiquer un phénomène d'agrégation irréversible.

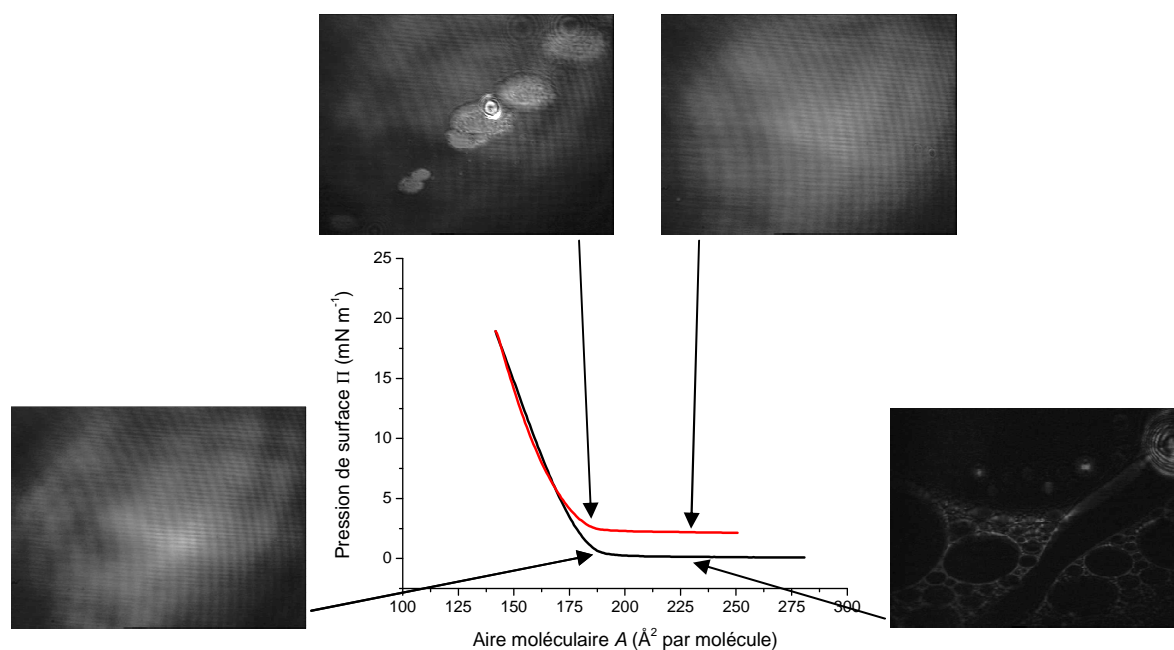


**Figure 64.** Succession de quatre cycles de compression-décompression des films de Langmuir formés sur eau pure avec les conjugués **2** (rouge), **3** (noir), **4** (bleu) et **5** (vert). Première compression à  $\Pi = 17,0 \text{ mN m}^{-1}$  (**2**) ;  $\Pi = 25,0 \text{ mN m}^{-1}$  (**3**) ;  $\Pi = 4,4 \text{ mN m}^{-1}$  (**4**) ;  $\Pi = 8,5 \text{ mN m}^{-1}$  (**5**). Température :  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vitesse de compression :  $5 \text{ mm min}^{-1}$ .

La présence des groupements *t*Bu sur la partie haute des calixarènes du groupe **A**, seule différence structurale avec les calixarènes du groupe **B**, est probablement responsable de cette agrégation. En effet, il a été montré par Katsyuba et coll. que l'introduction de groupes *t*Bu en position *para* d'un calix[4]arène avait une forte influence sur la conformation du macrocycle.<sup>157, 158</sup> Aussi loin que nous le savons, cette émergence dans la phase gaz d'un plateau de pression de surface après un ou plusieurs cycles compression-décompression n'a jamais été décrite dans la littérature.

En revanche, il est connu que la séparation entre une première et une seconde compression d'un film de Langmuir est la conséquence d'un changement de conformation (interactions intramoléculaires) et/ou d'organisation (interactions intermoléculaires) des molécules constituant le film considéré.<sup>167</sup> Dans notre cas, la liberté conformationnelle de la couronne macrocyclique des calixarènes du groupe **A** doit être limitée par la présence des groupements *t*Bu.

Nous suggérons ainsi qu'au cours de la compression de leur film monomoléculaire, les dérivés du groupe **A** adoptent de façon définitive une conformation et/ou une organisation particulière, et ce sans retour à l'état initial après décompression. Cette hypothèse est supportée par l'observation en microscopie BAM de larges agrégats après le premier cycle compression-décompression du dérivé **2** (Figure 65), ainsi qu'une phase plus condensée reconnaissable par une image plus claire après retour au point de départ et comparaison avec l'état initial.



**Figure 65.** Photographies BAM prises au cours du premier cycle compression-décompression (noir-rouge) d'un film de Langmuir formé avec le conjugué **2** sur eau pure (pH 5,6 ; 20 °C). La largeur de chaque image correspond à 400  $\mu\text{m}$ .

Dans le cas des dérivés du groupe **B**, la flexibilité du macrocycle sans groupes *t*Bu doit être accrue par l'absence de contraintes stériques en partie haute, autorisant un retour à l'état initial après décompression vers la phase gaz.

❖ Sélection des leaders.

Les films de Langmuir formés avec les dérivés du groupe **A** sont donc plus stables dans le temps et plus organisés qu'avec les composés du groupe **B**. Ces résultats montrent que la présence de groupes *t*Bu en position *para* du calixarène est déterminante pour obtenir des molécules suffisamment amphiphiles et hydro-insolubles.

Ainsi, les conjugués calixarène-quinolone **2** et **3** peuvent être utilisés pour étudier l'influence du pH de la sous-phase sur leur stabilité à l'interface eau-air. Ces deux dérivés ont donc été sélectionnés pour mettre au point une méthode visant à étudier leur capacité à libérer l'acide nalidixique dans des conditions interfaciales hydrophile-hydrophobe.

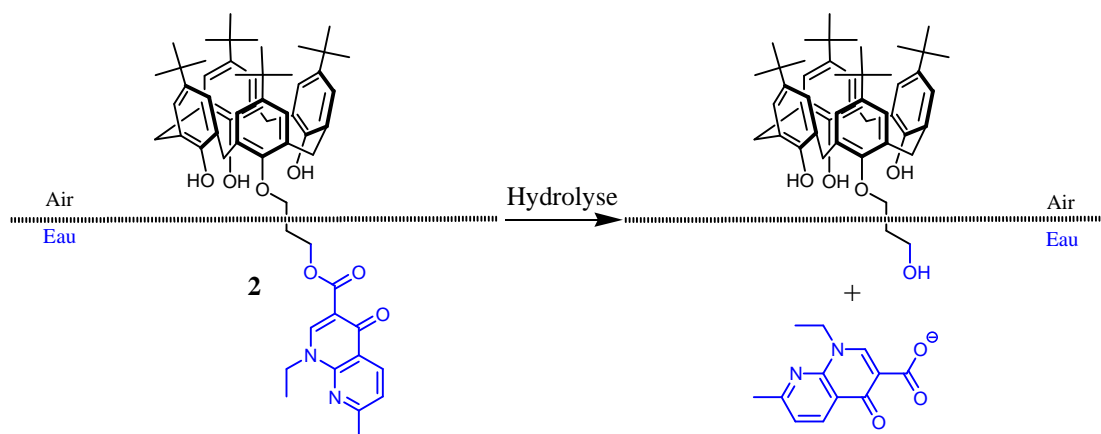
### III.4. Réactivité interfaciale des prodrogues

#### III.4.1. Objectif

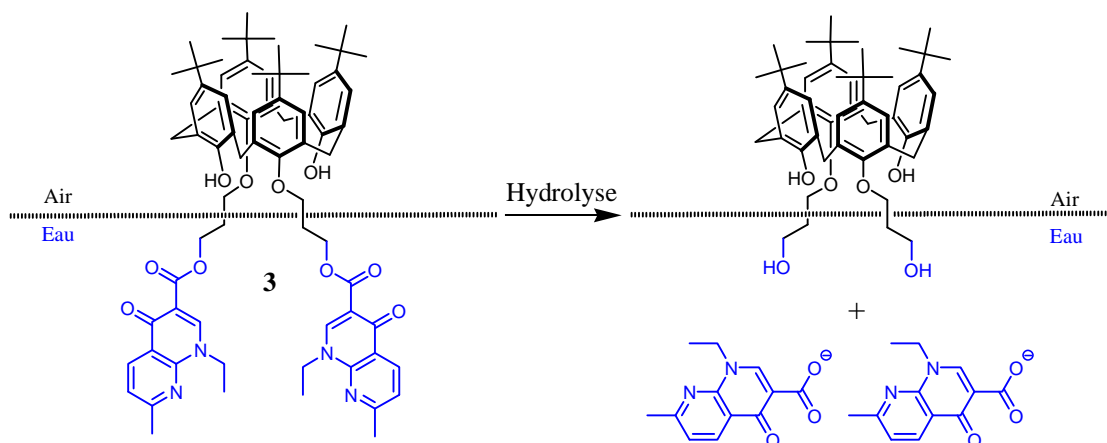
Le groupement acide carboxylique de la quinolone a été utilisé comme point d'encrage sur le calix[4]arène *via* une fonction ester hydrolysable (*linker*). Le principe de cette étude est simple :

Former un film de Langmuir à la surface d'une solution aqueuse tamponnée à pH basique, puis quantifier l'acide nalidixique libéré dans la sous-phase après hydrolyse (Figure 66 et 67).

Remarquons immédiatement que le travail de mise au point de la méthode analytique et du traitement des échantillons explicité ci-après a d'abord été réalisé en utilisant comme sous-phase des tampons phosphate de pH compris entre 7 et 9. Les résultats étaient peu exploitables en raison d'une quantité d'acide nalidixique libéré trop faible. Nous avons par la suite augmenté le pH de la sous-phase à la valeur de 10, en utilisant le couple  $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$ . Les résultats décrits ci-après ont donc été obtenus en utilisant un tampon carbonate 50 mM pH 10.



**Figure 66.** Schéma du conjugué **2** à l'interface tampon-air subissant une hydrolyse.



**Figure 67.** Schéma du conjugué **3** à l'interface tampon-air subissant une hydrolyse.

La question est la suivante : comment aller détecter et quantifier quelques nanomoles d'une substance contenues dans plusieurs centaines de millilitres de solution aqueuse ?

Il est d'abord nécessaire de calculer la concentration théorique en naldixate après hydrolyse, afin de choisir une technique de détection et de dosage adaptée. Connaissant le volume de la sous-phase  $V_s$  ainsi que le titre  $C$  et le volume déposé à l'interface  $V_d$  de la solution chloroformique de chaque composé, la concentration théorique en naldixate après 100% d'hydrolyse  $C_{th}(100\%)$  peut être calculée selon les équations suivantes :

$$C_{th}(100\%) = \frac{(2 \times C \times V_d \times M_3^{-1})}{V_s}$$

où  $M_3$  est la masse moléculaire de **3** obtenue par analyse élémentaire (Cf. *Partie Expérimentale, section synthèse organique*).

**Equation n° 15.**

$$C_{th}(100\%) = \frac{(C \times V_d \times M_2^{-1})}{V_s}$$

où  $M_2$  est la masse moléculaire de **2** obtenue par analyse élémentaire (Cf. *Partie Expérimentale, section synthèse organique*).

**Equation n° 16.**

Sur la base de la cuve de Téflon<sup>®</sup> utilisée pour la mesure des isothermes de compression ( $V_s = 330$  mL), ces calculs nous donnent des concentrations théoriques d'ordre nanomolaire.

### III.4.2. Protocole expérimental

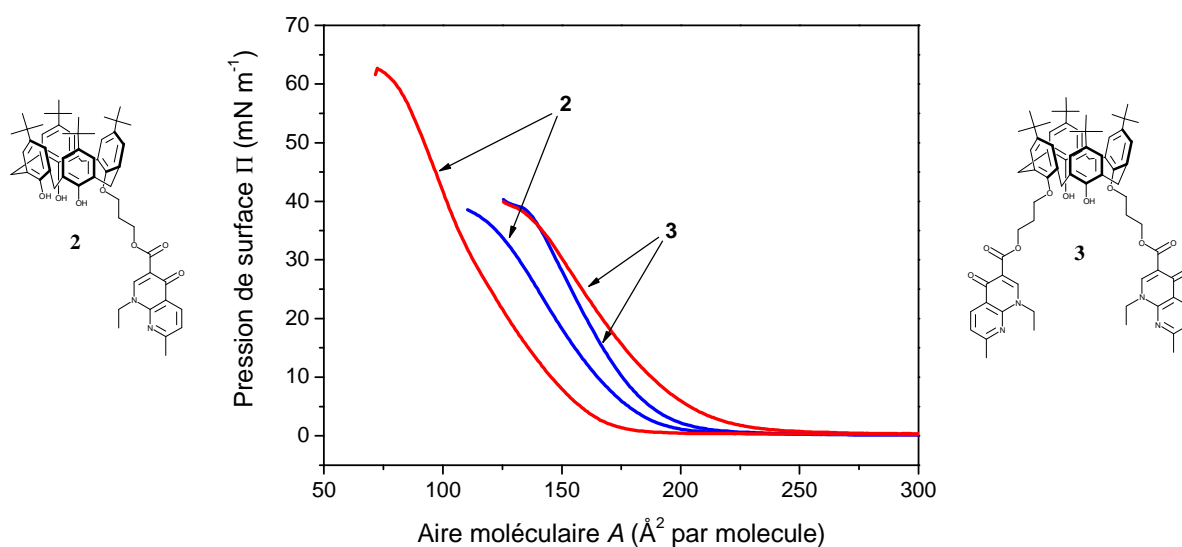
La première étape a consisté à caractériser les films de Langmuir des calixarènes **2** et **3** étendus à la surface du tampon carbonate pH 10. Comme indiqué en Figure 68, les isothermes de compression  $\Pi$ -A des films monomoléculaires de **2** et **3** à la surface d'un tampon  $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 10 (50 mM), ont été réalisées à 20 °C, ainsi qu'à 37 °C. Ceci nous a permis de sélectionner, pour chacun des composés, une aire moléculaire commune pour les deux températures. Les aires moléculaires sélectionnées  $A_3$  et  $A_2$ , correspondantes à des états de film condensés, sont de 155 Å<sup>2</sup> (24 mN m<sup>-1</sup> à 20 °C ; 27 mN m<sup>-1</sup> à 37 °C) et de 130 Å<sup>2</sup> (29 mN m<sup>-1</sup> à 20 °C ; 18 mN m<sup>-1</sup> à 37 °C) pour **3** et **2**, respectivement. De cette manière, la quantité d'un dérivé donné à l'interface tampon-air sera la même quelle que soit la température.

Notons qu'un comportement particulier du composé **2** peut être observé (Figure 68). A 37 °C, on constate un important décalage de l'isotherme vers les faibles aires, avec apparition vers 30 mN m<sup>-1</sup> d'une phase liquide-condensé nouvelle. A l'inverse, le dérivé **3** est peu sensible à la température, les deux isothermes à 20 et 37 °C se superposant dans les états les plus condensés.

Nous sommes dans une situation délicate, où il est difficile d'interpréter ces résultats en raison de la complexité du système. En effet, les films sont en présence de trois ions différents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ), et à un pH suffisamment alcalin pour envisager la déprotonation de groupes -OH phénoliques.

Une récente étude réalisée par Rogalska et coll. avec les dérivés **2** et **3** à l'interface eau-air peut apporter des indications.<sup>154</sup> Les auteurs ont montré que ces dérivés calixaréniques sont capables de complexer certains cations métalliques comme  $\text{Na}^+$ , *via* les carbonyles de la quinolone et les hydroxyles phénoliques. Plusieurs structures de complexe  $\text{Na}^+$ -calixarène ont été proposées à partir de résultats obtenus par modélisation moléculaire. Nos résultats indiquent que le calixarène **3** porteurs de deux bras nalidixates est plus rigide que le calixarène **2**, porteur d'un seul bras nalidixate. Nous supposons ainsi que la structure d'un complexe  $\text{Na}^+$ -**2** soit plus fluctuante que celle d'un complexe  $\text{Na}^+$ -**3**, et donc plus dépendante de la température.

D'autre part, il est connu que, chez un *t*Bu[4]OH mono-substitué sur sa partie basse, le groupe –OH phénolique opposé au phénol substitué est plus acide ( $pK_a^1 \approx 6$ ) que les deux –OH adjacents ( $pK_a^2 \approx 12$  et  $pK_a^3 \approx 14$ ).<sup>24</sup> A pH 10, le groupe phénolique opposé à celui substitué chez **2**, doit être déprotonné et d'autant plus à 37 °C. Cette variable acido-basique, absente chez **3** ( $pK_a^1 \approx 12$ ), peut en partie être responsable de l'allure des isothermes présentées en Figure 67.



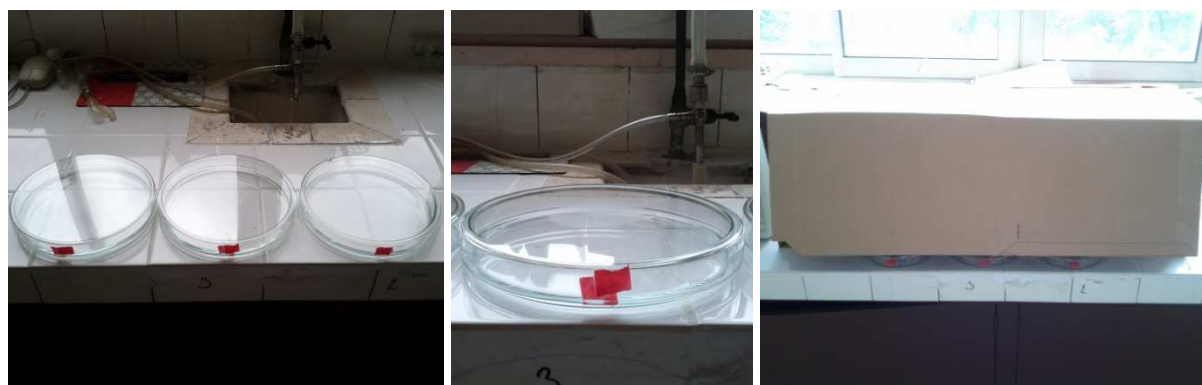
**Figure 68.** Isothermes de compression  $\Pi$ -A des conjugués **2** et **3** étalés sur une sous-phase tamponnée à pH 10 ( $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mM). Température : 20 °C (bleu) ; 37 °C (rouge). Vitesse de compression : 5 mm min<sup>-1</sup>.

Le simple fait de pouvoir former des films de Langmuir sur le tampon basique et d'en collecter les isothermes indique une relative stabilité dans le laps de temps nécessaire à ces mesures (~0,5-1 heure). Les réactions d'hydrolyse interfaciale devaient donc s'effectuer sur plusieurs jours.

Nous avons donc envisagé de réaliser ces expériences d'hydrolyse dans des boîtes de Pétri calibrées en verre borosilicaté et munies d'un couvercle (Figure 69). Le bénéfice apporté par l'emploi de ces boîtes est multiple. Cette méthode permet à la fois de réduire le volume de la sous-phase, de limiter la pollution extérieure ainsi que l'évaporation, et de réaliser nos expériences en *triplicata* et simultanément pour une condition donnée (temps de contact, température, etc).

Chaque boîte est partiellement remplie par 120 mL de tampon carbonate. Le volume adéquat d'une solution chloroformique de **2** ou **3** est alors déposé à la surface du tampon, de façon à former un film monomoléculaire d'aire moléculaire  $A_2$  ou  $A_3$ . Après un délai d'évaporation du  $\text{CHCl}_3$  de 10 min, chaque boîte est couverte.

L'ensemble est maintenu à l'abri de la lumière pour éviter d'éventuelles photolyses, soit à température ambiante ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ), soit en incubateur à  $37^\circ\text{C}$ . Après un jour ou plus de contact, le film de Langmuir est alors éliminé de l'interface par une rapide aspiration.



**Figure 69.** Photographie de nos « réacteurs de Langmuir ». Films monomoléculaires de **2** ou **3**, d'aire moléculaire  $A_2 = 130 \text{ \AA}^2$  ou  $A_3 = 155 \text{ \AA}^2$ , respectivement. Expérience réalisée en *triplicata*, à l'abri de la lumière. Dimensions d'un réacteur :  $\varnothing = 18,5 \text{ cm}$  ;  $S = 268,8 \text{ cm}^2$  soit  $268,8 \cdot 10^{16} \text{ \AA}^2$  ;  $h = 3 \text{ cm}$ ).

Ainsi en fin d'expérience, les concentrations théoriques de la sous-phase en nalidixate pour une hydrolyse totale  $C_{\text{th}}(100\%)$ , données par les Equations n° 15 et 16, sont comprises entre  $2 \cdot 10^{-8}$  et  $8 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  selon le conjugué considéré.

### III.4.3. Comment détecter et doser l'acide nalidixique libéré ?

#### ❖ Spectroscopie UV-visible.

L'acide nalidixique absorbant intensément dans l'UV à  $256 \text{ nm}$  ( $\sim 25000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), nous avons donc envisagé d'utiliser la spectroscopie UV-visible afin de doser directement la sous-phase. Nous avons donc déterminé la limite de détection (LOD) de l'acide nalidixique en solution dans le tampon à l'aide de solutions titrées préparées pour cet usage. Il s'est avéré que cette LOD, autour de  $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , est trop haute pour que cette technique puisse être employée comme méthode d'analyse directe.



Une étude menée au laboratoire par Hugues Massimba-Dibama a montré que la chromatographie liquide haute performance à détection UV-visible (CLHP-UV) peut être utilisée pour détecter et quantifier l'acide nalidixique.<sup>5</sup> Le détecteur UV utilisé (barrette de diodes) permet en outre d'identifier les substances séparées en collectant le spectre UV-visible de chacune d'elle. Nous nous sommes cependant retrouvés face au même problème de sensibilité que précédemment. En effet, cette méthode CLHP-UV utilise une détection UV caractérisée par une LOD de  $5 \cdot 10^{-7}$  M, encore trop élevée pour être directement exploitable.

❖ CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS).

Nous avons alors cherché à mettre au point une technique d'analyse qualitative pour détecter l'acide nalidixique. C'est pourquoi la méthode chromatographique de H. Massimba-Dibama fut dans un premier temps adaptée pour être compatible avec un système CLHP couplé à la spectrométrie de masse (CLHP-MS). La phase stationnaire, de type RP C<sub>18</sub> (phase inverse), est restée inchangée. La phase mobile, à l'origine composée d'un mélange comprenant MeCN, MeOH et un tampon acétate d'ammonium à pH ajusté par H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a été modifiée pour ne contenir que des espèces volatiles en MS. Le tampon acétate a alors été remplacé par un tampon formiate d'ammonium à pH ajusté par HCO<sub>2</sub>H. Ce travail d'anticipation était pour nous une rapide solution de secours pour être au minimum en mesure de détecter l'acide nalidixique libéré dans la sous-phase. Le système CLHP-MS disponible au Service Commun de l'Université n'était en effet pas en notre entière disposition ce qui aurait été contraignant pour calibrer une méthode quantitative.

❖ CLHP-UV.

Les nouvelles conditions chromatographiques développées pour une utilisation en CLHP-MS ont permis d'améliorer la sensibilité de la méthode CLHP-UV, avec une LOD à  $1,6 \cdot 10^{-7}$  M et une LOQ à  $5,0 \cdot 10^{-7}$  M. Ces valeurs, caractérisées par un rapport signal/bruit (S/N) de 3 (LOD) et de 10 (LOQ), ont été déterminées à partir des chromatogrammes correspondant à des échantillons témoins obtenus par dilutions successives de nalidixate de sodium dans l'eau.

Une procédure de concentration de la sous-phase a donc été développée afin d'obtenir un échantillon de molarité supérieure à  $5 \cdot 10^{-7}$  M, pour être analysé quantitativement par notre méthode CLHP-UV disponible au laboratoire.

#### III.4.4. Procédure de concentration des échantillons

Une procédure de traitement d'échantillon (SOP) a été développée dans le but de gagner plusieurs unités logarithmiques sur la concentration de la sous-phase en nalidixate. Ce traitement permet ainsi de contourner le problème lié à la LOD. Cette méthode a ensuite été validée selon les critères d'harmonisation internationale (ICH).<sup>168</sup>

La sous-phase (tampon pH 10  $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$  ; 50 mM) ne pouvait être simplement évaporée à sec pour être reprise dans un volume plus faible. Pour une portion de 100 mL de sous-phase concentrée par un facteur 200, il aurait en effet fallu solubiliser environ 500 mg de sels minéraux dans seulement 500  $\mu\text{L}$  d'eau. De plus, l'injection dans le système CLHP d'un échantillon à forte salinité ( $\sim 10$  M) pourrait être fatale. Il a donc été nécessaire dans un premier temps d'éliminer les sels carbonates par une méthode douce sans risque de dégradation de l'acide nalidixique. Par conséquent, le SOP mis en place est le suivant :

- 100 mL de sous-phase sont précisément collectés à l'aide d'une fiole jaugée, puis lyophilisés.
- Le lyophilisat obtenu ( $\sim 500$  mg) est solubilisé dans le minimum d'eau (5 mL), puis les sels minéraux sont précipités par ajout d'un large excès de MeCN (45 mL) et éliminés par filtration.
- Le filtrat est alors évaporé à sec, et le résidu ( $\sim 5$  mg) est enfin repris par 500  $\mu\text{L}$  d'eau.

L'échantillon ainsi obtenu, concentré d'un facteur 200 et débarrassé de la majeure partie des sels minéraux, est enfin prêt à être injecté dans le système CLHP-UV. Selon les Equations n°15 et n°16, la gamme de concentrations théorique en nalidixate des échantillons ayant subi le SOP est ainsi comprise entre  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M.

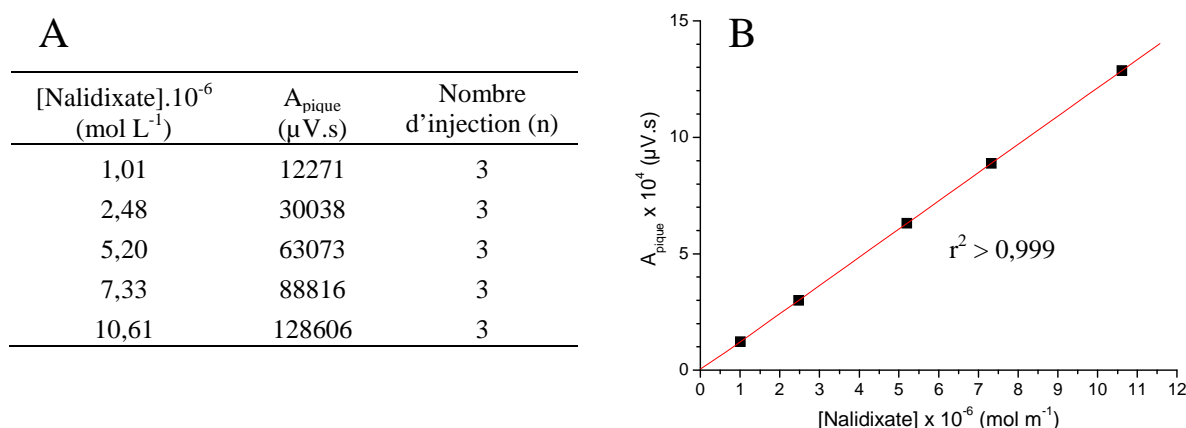
Cette méthode analytique SOP-CLHP nous a ainsi permis d'entreprendre le suivi cinétique de la libération en nalidixate.

### III.4.5. Validation de la méthode SOP-CLHP

La méthode chromatographique précédée du SOP décrit plus haut a été validée selon les critères de linéarité, d'exactitude, et de précision, ainsi que limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ).<sup>168-170</sup>

La spécificité de la méthode a été vérifiée par analyse d'un échantillon exempt de nalidixate et traité selon le SOP, afin de confirmer l'absence d'interférences.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir des chromatogrammes de plusieurs solutions témoins, dans une gamme de concentrations comprises entre  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  M (5 concentrations ;  $n = 3$ ). Les valeurs d'aire sous-pique obtenues sont données en fonction de la concentration de l'échantillon correspondant (Figure 70, A), et la courbe tracée avec ces valeurs a été soumise à une régression linéaire (Figure 70, B).



**Figure 70.** Tableau récapitulatif d'analyse de témoins nalidixate (A). Courbe d'étalonnage (■) et sa régression linéaire (ligne rouge).

Nous avons alors constaté une excellente linéarité de la réponse UV en fonction de la concentration en nalidixate, avec un coefficient de détermination  $r^2 > 0,999$  pour l'équation suivante :

$$y = 1,272.10^{10}x - 990$$

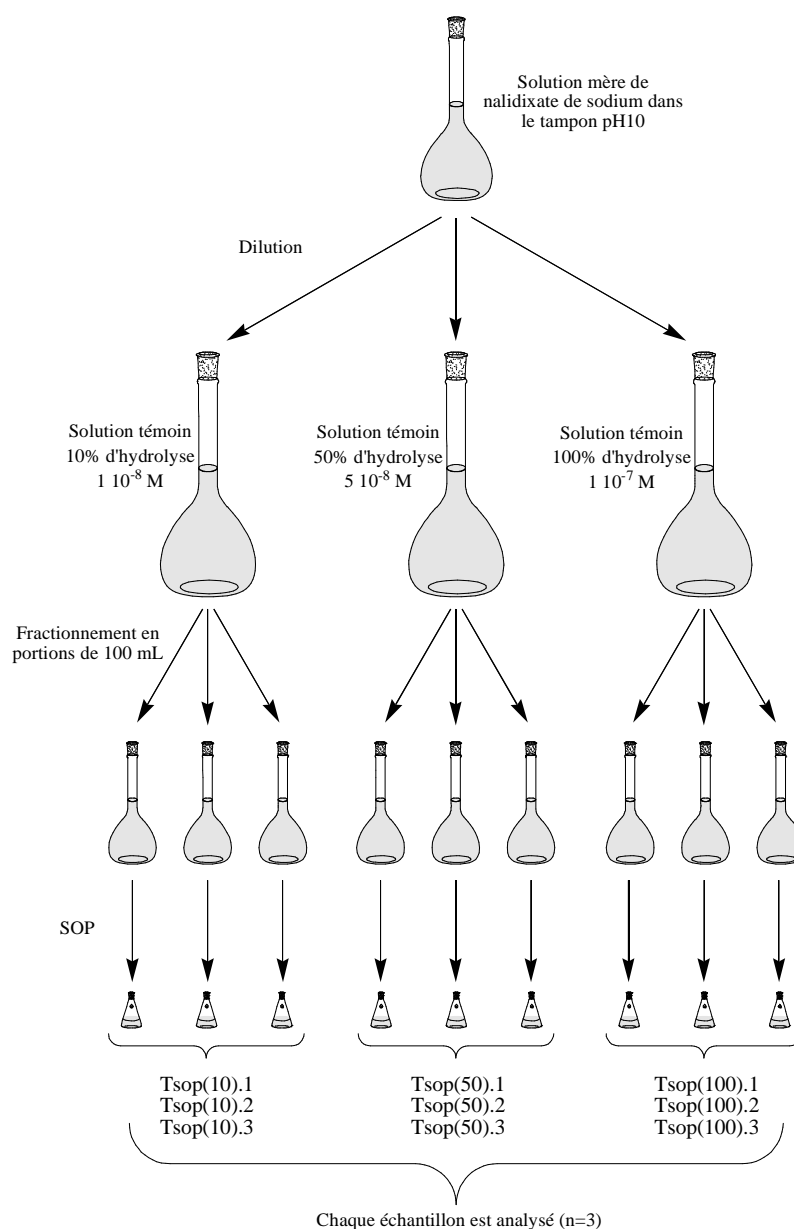
où  $y$  est l'aire sous-pique et  $x$  est la concentration en nalidixate.

#### Equation n° 17.

Cette équation pourra donc être utilisée pour quantifier les échantillons compris dans la gamme de concentration étudiée.

La sensibilité est donnée par la LOD et la LOQ. Ces paramètres ont été déterminés précédemment lors du développement des conditions chromatographiques, et ont pour valeur  $1,6 \cdot 10^{-7}$  M et  $5 \cdot 10^{-7}$  M, respectivement.

La méthode SOP-CLHP a été validée à l'aide d'une solution mère de nalidixate de sodium dans le tampon carbonate, de façon à obtenir par dilution trois solutions filles dans une gamme de concentrations théoriques correspondant à un taux d'hydrolyse compris entre 10 et 100%, soit  $10^{-8}$  M (10%),  $5 \cdot 10^{-8}$  M (50%) et  $10^{-7}$  M (100%). Chacune d'entre elles a alors été fractionnée en trois portions égales de 100,0 mL, représentatives de trois prises d'essai de sous-phase (Figure 71). Le SOP a ensuite été effectué sur ces 3x3 solutions.



**Figure 71.** Préparation des témoins SOP pour la validation de la méthode SOP-CLHP.

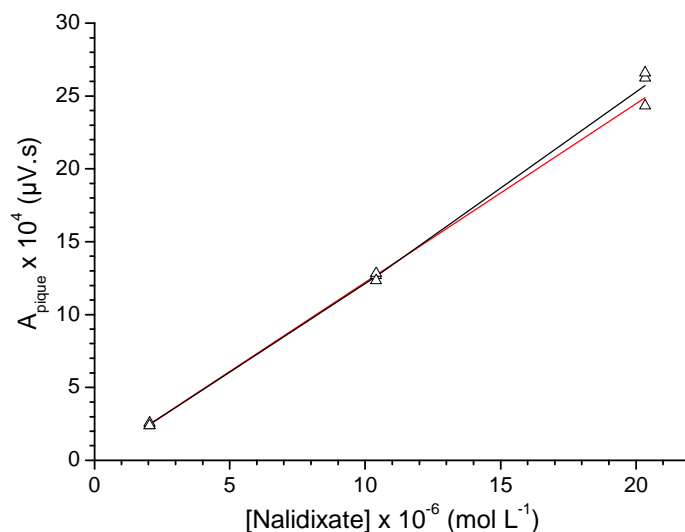
Comme reporté en Tableau 3, chacun des neuf échantillons ainsi  $T_{sop}$  obtenus ont été analysé en *triplicata* ( $n = 3$ ), et leur concentration en nalidixate a été quantifiée à l'aide de témoins aqueux (Figure 70). La précision de la méthode a pu alors être estimée en termes de répétabilité sur un même échantillon ( $n = 3$ ) et de reproductibilité sur trois échantillons consécutifs ( $n = 9$ ). La répétabilité est déterminée par le calcul du coefficient de variation (CV) des trois valeurs de  $A_{\text{pique}}$  obtenues pour un même échantillon. La reproductibilité est déterminée par le calcul du CV des trois valeurs moyennes de  $A_{\text{pique}}$  obtenues pour trois échantillons. Le CV est donné par le rapport de l'écart-type et de la moyenne d'une série. L'exactitude de la méthode a pu alors être estimée en déterminant le taux de récupération en nalidixate, soit en comparant la concentration mesurée avec la concentration théorique attendue.

**Tableau 3.** Validation de la méthode SOP-CLHP. Analyse CLHP des neuf témoins SOP obtenus comme décrit en Figure 71.

	Moyenne $A_{\text{pique}}$ ( $\mu\text{V.s}$ )	Répétabilité	Reproductibilité	[Nalidixate] ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Taux de récupération
Tsop(10).1	23960 ( $n = 3$ )	11,0%		$1,976 \cdot 10^{-6}$	
Tsop(10).2	25680 ( $n = 3$ )	2,0%	4,0% ( $n = 9$ )	$2,117 \cdot 10^{-6}$	$99,5\% \pm 4,0 \%$
Tsop(10).3	23987 ( $n = 3$ )	13,5%		$1,978 \cdot 10^{-6}$	
Tsop(50).1	126840 ( $n = 3$ )	2,4%		$1,046 \cdot 10^{-5}$	
Tsop(50).2	128293 ( $n = 3$ )	1,1%	2,0% ( $n = 9$ )	$1,058 \cdot 10^{-5}$	$102,3\% \pm 2,0 \%$
Tsop(50).3	123307 ( $n = 3$ )	2,0%		$1,017 \cdot 10^{-5}$	
Tsop(100).1	243400 ( $n = 3$ )	0,8%		$2,007 \cdot 10^{-5}$	
Tsop(100).2	262287 ( $n = 3$ )	1,2%	4,7% ( $n = 9$ )	$2,162 \cdot 10^{-5}$	$104,3\% \pm 4,7 \%$
Tsop(100).3	265947 ( $n = 3$ )	2,9%		$2,193 \cdot 10^{-5}$	

Des résultats satisfaisants ont été obtenus en termes de précision avec des valeurs acceptables de CV, inférieures à 5% pour les points haut (100%) et intermédiaire (50%), et inférieures à 15% pour le point bas (10%). L'exactitude constatée est également satisfaisante, avec un taux de récupération en nalidixate autour de 100%.

Ces critères d'exactitude et de précision peuvent être illustrés en comparant les courbes d'aire sous-pique  $A_{\text{pique}}$  en fonction de la concentration en nalidixate attendue et mesurée (Figure 72). L'observation d'une excellente linéarité, représentée par le coefficient de corrélation, et d'une quasi superposition de la courbe théorique et expérimentale atteste la qualité de la méthode mise en place.



**Figure 72.** Droite d'étalonnage aire sous-pique en fonction de la concentration en nalidixate (ligne rouge). Aire sous-pique mesurées des échantillons Tsop(10) (n = 9), Tsop(50) (n = 9) et Tsop(100) (n = 9) en fonction de leur concentration attendue (ligne noire). La régression linéaire de cette courbe donne un coefficient de corrélation  $r^2 > 0,999$ .

Nous avons ainsi montré que le SOP mis en place permet de concentrer les échantillons de sous-phase de façon reproductible et sans perte significative de nalidixate. La méthode SOP-CLHP développée est suffisamment linéaire et précise pour quantifier le nalidixate libéré dans sa gamme de concentration théorique.

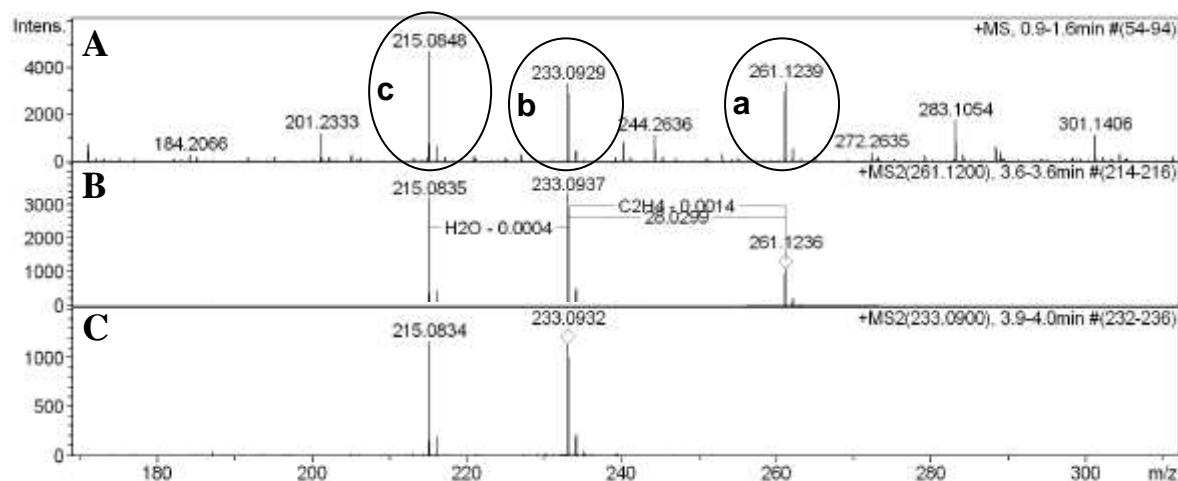
### III.4.6. Résultats et discussions

#### ❖ Problème rencontré.

Une fois les protocoles de traitement d'échantillon et d'analyse validés, les premières expériences d'hydrolyse interfaciale de **2** et **3** ont pu être réalisées. Ces premiers résultats en conditions réelles ont mis en lumière une problématique jamais évoqué dans le domaine des films de Langmuir.

En effet, les premiers chromatogrammes ont révélé la présence d'un produit nouveau, noté provisoirement **X**, de spectre UV équivalent à celui de l'acide nalidixique mais avec un temps de rétention  $t_r$  supérieur d'une minute. La concordance des spectres UV suggère une entité **X** relativement similaire à l'acide nalidixique. Mais le temps rétention supérieur de **X**

indique une espèce moins polaire que l'acide nalidixique (phase stationnaire inverse). La méthode CLHP-MS évoquée plus haut a permis d'identifier ce composé **X** par collecte des spectrogrammes de masse simple (ionisation ESI, mode positif) et de collision MS/MS (voir Figure 73).

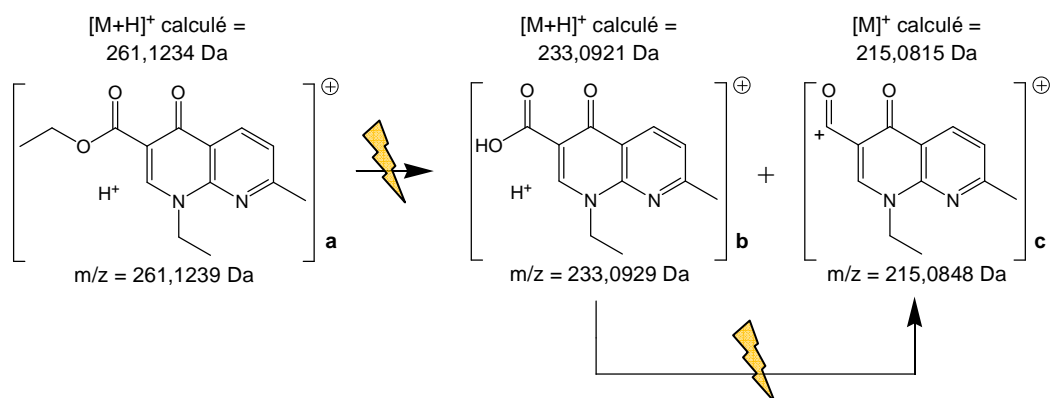


**Figure 73.** Spectrogrammes de masse (ESI-positif) de l'entité inconnue **X** (A). Spectrogrammes de masse en mode collision MS/MS de l'ion **a**  $m/z = 261$  Da (B). Spectrogrammes de masse en mode collision MS/MS de l'ion **b**  $m/z = 233$  Da (C).

L'analyse par spectrométrie MS-ESI de **X** révèle trois ions majoritaires **a**, **b** et **c**, caractérisés par un rapport  $m/z$  d'environ 261, 233 et 215 Da, respectivement (Figure 73). Les massifs isotopiques de chacun (non présentés) sont incrémentés de 1 Da indiquant que nous sommes en présence d'ions mono-chargés.

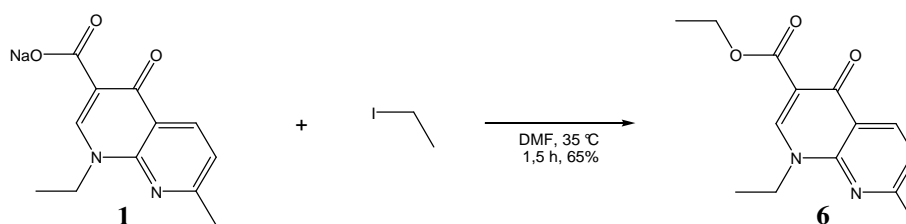
Il peut être observé que la fragmentation de l'ion **a** (Figure 73, milieu) donne les deux autres ions **b** et **c**, indiquant que **a** correspond à l'espèce majoritaire de l'échantillon, à savoir le composé **X**. En parallèle, on constate que la fragmentation de l'ion **b** donne l'ion **c** (Figure 73, bas).

On peut ainsi retracer la vie de l'espèce majoritaire **a**  $[M+H]^+ = 261,1239$  Da, et en déduire qu'il s'agit de l'ester éthylique protonné de l'acide nalidixique de masse calculée  $[M+H]^+ = 261,1234$  Da (Figure 74).



**Figure 74.** Interprétation des spectrogrammes de masse du composé **X**. Fragmentation de l'ion **a** (m/z = 261,1239 Da), et de l'ion **b** (m/z = 233,0929).

La seconde étape a été de synthétiser volontairement cet ester éthylique **X**, désormais noté **6** (Figure 75). Pour cela nous avons appliqué les mêmes conditions que pour l'obtention du **BPN**, en utilisant de l'iodure d'éthyle. L'analyse CLHP-UV nous a définitivement confirmé que l'entité inconnue **X** est bien l'ester éthylique de l'acide nalidixique **6**.



**Figure 75.** Schéma de synthèse du nalidixate d'éthyle **6** à partir du nalidixate de sodium **1** et d'iodure d'éthyle.

Comment cet ester **6** a-t-il pu se former ? Nous avons supposé une trans-estérification des conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone **2** ou **3** avec l'éthanol. Le seul moment où **2** et **3** pouvaient être en contact avec EtOH était lors de leur solubilisation dans CHCl<sub>3</sub>. En effet, le chloroforme peut se dégrader avec le temps et en présence d'oxygène, en libérant du phosgène Cl<sub>2</sub>CO.<sup>171</sup> C'est pourquoi il est généralement stabilisé avec ~1% de EtOH.

Le chloroforme utilisé à l'époque était conditionné dans des bouteilles de 2,5 litres conservées ainsi durant plusieurs mois. Nous avons donc supposé qu'au fil d'ouvertures répétées de la bouteille, l'éthanol pouvait se concentrer jusqu'à atteindre une proportion critique pouvant causer des dommages aux molécules solubilisées. Le dosage par RMN <sup>1</sup>H dans CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de l'éthanol contenu dans ce chloroforme a effectivement montré que notre CHCl<sub>3</sub> avait atteint une proportion d'environ 5% en EtOH stabilisant.

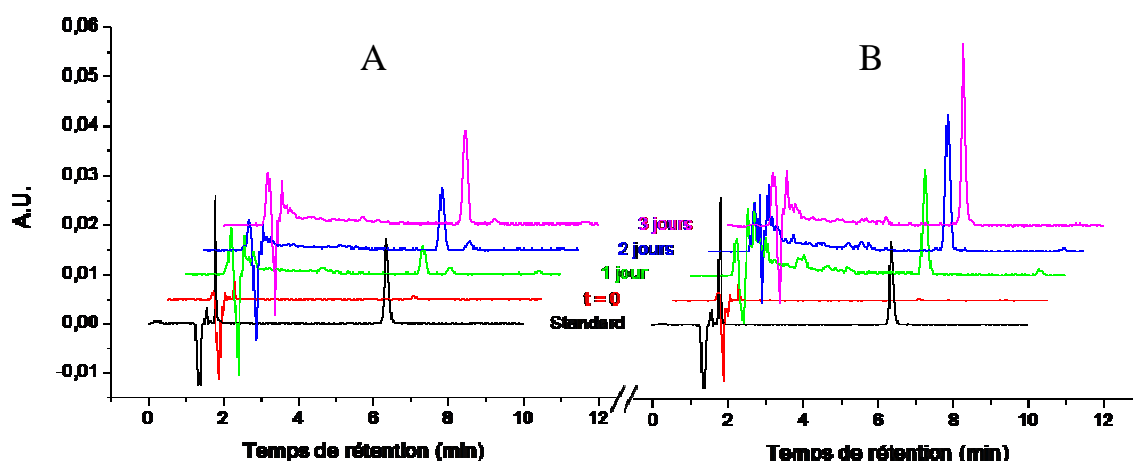


Nous avons alors entrepris de n'utiliser que des petites bouteilles (100 mL maximum), de façon à les consommer rapidement et à ne pas laisser le temps à l'éthanol de se concentrer. Par la suite, plus aucuns problèmes liés à cet éthanol n'ont été rencontrés.

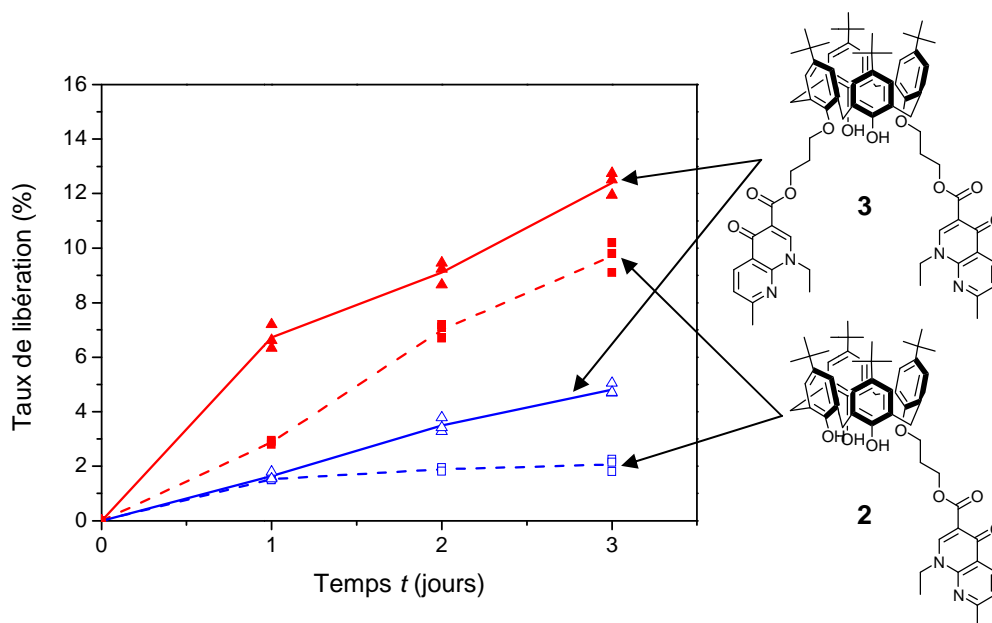
❖ Cinétiques d'hydrolyse à l'interface eau-air.

Les cinétiques de libération du nalidixate à partir des films de Langmuir des conjugués **2** et **3** ont été obtenues à l'aide du protocole expérimental (boîtes de Pétri puis SOP) et de la méthode CLHP-UV décrits précédemment. Chaque point de mesure a été effectué en *triplicata*, de 0 à 3 jours, à 20 et à 37 °C. Notons que cette limite de trois jours nous a été imposée par la condensation d'eau sur la face interne du couvercle des boîtes qui, à 37 °C, devenait trop importante et risquait de détériorer les films en retombant.

Les chromatogrammes relatifs à chaque point de mesure à 37 °C, et pour chacun des deux prodrogues **2** et **3**, sont exposés en Figure 76. L'intégration de chaque pic donne accès à la concentration en nalidixate de l'échantillon correspondant, *via* la courbe d'étalonnage et sa régression linéaire (Equation n° 17). Les cinétiques d'hydrolyse des films de **3** (porteur de deux résidus) ou de **2** (porteur d'un seul résidu) à 20 °C et 37 °C, exprimées en rendement de réaction (%), sont présentées en Figure 77.



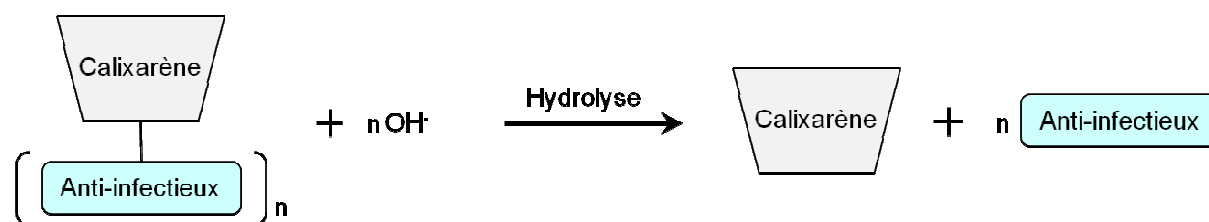
**Figure 76.** Chromatogrammes collectés par analyse CLHP-UV d'échantillons de sous-phase après traitement SOP. Résultats obtenus avec (A) : conjugué **2** ; (B) : conjugué **3**, après 0 (rouge), 1 (vert), 2 (bleu) et 3 jours (magenta) passés à l'état de films de Langmuir étalés sur le tampon pH 10 à 37 °C. Les conditions chromatographiques et le matériel utilisé sont donnés en Partie Expérimentale, section analytique.



**Figure 77.** Cinétique d'hydrolyse des conjugués **2** (■ ; □) et **3** (▲ ; △) à l'interface tampon-air (pH 10), à 20 °C (bleu ; □ ; △) ou 37 °C (rouge ; ■ ; ▲). Résultats exprimés en taux d'avancement (pourcentage libéré relatif à la quantité totale libérable), en fonction du temps exprimé en jours de contact.

Comme le montrent ces résultats, la libération en nalidixate est lente. Au bout de 3 jours à 37 °C, on peut relever des taux effectifs autour de 13% et 10% en nalidixate libéré depuis les films de **2** et **3**, respectivement, contre 5% et 2% à 20 °C.

D'après les équations bilans des réactions d'hydrolyse de **2** ou de **3** (Figure 78), nous sommes en présence de cinétiques d'ordre supérieur à 1. Selon la loi de van t'Hoff, les vitesses de réaction pour **2** et **3** sont définies par l'Equation n° 18.



**Figure 78.** Equations bilans des réactions d'hydrolyse alcaline de **2** (n = 1) ou **3** (n = 2).

$$v_A = k_A \cdot [A] \cdot [^{-}\text{OH}]^n$$

où A correspond au calixarène **2** (n = 1) ou **3** (n = 2), et  $k_A$  est la constante de vitesse.

**Equation n° 18.**

Or dans les deux cas, la concentration  $[\text{OH}^-]$  est maintenue constante par l'emploi d'une solution tampon. Il y a alors dégénérescence d'ordre, et les deux réactions sont donc définies par une cinétique de pseudo-ordre 1 selon l'équation suivante :

$$v_A = k'_A \cdot [A]$$

où  $k'_A = k_A \cdot [\text{OH}^-]^n$  est la constante apparente de vitesse.

**Equation n° 19.**

Il est alors possible de caractériser ces cinétiques par le calcul de leur constante apparente de vitesse  $k'$  selon l'Equation n° 20, donnant accès au temps de demi-vie  $t_{1/2}$  des composés **2** et **3** à l'interface tampon-air selon l'Equation n° 21.

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = -k'_A \cdot t$$

où  $[A] = 100$  - taux d'avancement de **2** ou **3**, et  $[A]_0 = 100$ .

**Equation n° 20.**

$$(t_{1/2})_A = \frac{\ln 2}{k'_A}$$

**Equation n° 21.**

Ces calculs donnent un temps de demi-vie  $t_{1/2}$  des prodrogues **2** et **3** à la surface du tampon pH 10 de 20 jours et 15 jours, respectivement. En milieu physiologique, où l'on pourrait espérer une catalyse quelconque, on peut présumer une délivrance du principe actif étalée sur plusieurs jours à plusieurs semaines. Cependant, force est d'admettre que ces cinétiques d'hydrolyse sont probablement trop longues pour que les prodrogues **2** et **3** soient efficaces *in vivo*.

Il peut être remarqué une différence de réactivité non négligeable entre les conjugués **2** et **3**, représentée par leur temps de demi-vie  $t_{1/2}$  respectif de 20 et 15 jours.

Dans les sous-chapitre précédents, nous avons constaté des comportements interfaciaux significativement différents entre les conjugués mono- **2**, **4** et bis-nalidixate **3**, **5**. Plus particulièrement, il a été observé par PM-IRRAS que l'état d'hydratation du *linker* diffère selon le degré de substitution du conjugué (Cf. III.3.3.). Nous proposons que cet état

d'hydratation variable puisse en partie être responsable des différences de réactivités observées entre **2** et **3**. Nous supposons aussi que l'organisation moléculaire de ces prodrogues à l'interface puisse influencer leur réactivité.

Les résultats d'hydrolyse en matrice physiologique (sérum de rat) obtenus par H. Massimba-Dibama avec des analogues hydrosolubles de **2** et **3**, ont montré une importante différence de réactivité hydrolytique entre les dérivés mono- et bis-nalidixate.<sup>4</sup>

❖ Autres interfaces.

En supplément de l'interface eau-air, la réactivité hydrolytique du composé **2** a été évaluée aux interfaces liquide-liquide et solide-liquide (systèmes bi-phasiques).

Une solution de **2** dans le DCM ( $0,685 \text{ mg mL}^{-1}$  ;  $7,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) a été mise en contact avec le tampon carbonate (3 mL) sous forte agitation à l'abri de la lumière et température ambiante ( $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Après deux semaines dans ces conditions, le nalidixate libéré n'a pas été quantifiable (concentration < LOQ). Un système interfacial solide-liquide a aussi été préparé par l'action d'ultra-sons sur une suspension de **2** (1,52 mg ;  $1,62 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$ ) dans le tampon (3 mL), de sorte à optimiser la dispersion du solide. Dans ce cas aussi, aucune libération n'a été constatée après plus de deux semaines de contact.

Cette comparaison révèle comment la grande surface de contact qu'offre un film de Langmuir à la surface d'une phase aqueuse peut favoriser la libération du principe actif depuis la plate-forme calixarénique adsorbée à l'interface eau-air.

## **IV.5. Conclusion du chapitre**

La synthèse des conjugués calixarène-quinolone a été optimisée, avec dans le cas du conjugué *t*Bu[4]OH-bis-quinolone **3** une multiplication du rendement par un facteur proche de 2. Les difficultés de purification de l'intermédiaire **BPN** et des produits finaux rencontrées à l'époque de A. Ben Salem ont pu être contournées. Pour ce faire, nous avons développé des systèmes chromatographiques impliquant l'utilisation d'acétonitrile comme co-éluant polaire, et une phase stationnaire de silice neutralisée par la triéthylamine.

Deux nouveaux analogues des conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone **2** et **3**, exempts de groupes *tert*-butyles en partie haute du calixarène, ont également été synthétisés comme outils d'investigation dans les études à l'interface eau-air.

Il a été mis au point un protocole supplémentaire de purification pour chacun de ces composés, permettant d'obtenir en fin de parcours des produits ultra-purs parfois sous forme cristalline. Cette dernière étape de purification a permis de préparer avec une grande précision les solutions chloroformiques nécessaires à la constitution de films de Langmuir.

Le comportement à l'interface eau-air des conjugués considérés dans ce chapitre a été étudié par la technique des films de Langmuir. Les isothermes de compression  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A des films monomoléculaires de **2-5** étalés sur eau pure ont montré que la présence de groupes *tert*-butyle est essentielle à l'obtention de films monomoléculaires stables. Il a également été montré que le degré de substitution en partie basse (présence de un ou deux résidus nalidixate) influence la stabilité de ces films, mais de façon moindre. En outre, les résultats obtenus par la mesure des isothermes de compression  $\Delta V$ -A et par microscopie BAM suggèrent que l'orientation du macrocycle calixarénique par rapport à l'interface est fonction de son degré de substitution en partie basse. Nous avons ainsi proposé que les dérivés mono-nalidixate **2** et **4** s'orientent d'abord de façon parallèle à l'interface, puis se redressent sous l'effet de la compression. Des expériences supplémentaires, notamment l'étude d'une bibliothèque de dérivés amphiphiles du calix[4]arène, pourraient permettre de généraliser ou non ce type de comportement.

Des expériences additionnelles (stabilité à long terme et cycles compression-décompression) ont montré que les films monomoléculaires les plus stables étaient ceux formés à partir des dérivés *tert*-butylés **2** et **3**. Les cycles compression-décompression couplés à la microscopie BAM ont montré que, sous l'effet de la compression, ces dérivés s'agrègent de façon irréversible dans le laps de temps des mesures. Nous proposons que ceux-ci adoptent une conformation (interactions intramoléculaires) et/ou une organisation (interactions intermoléculaires) spécifique après compression.

L'analyse PM-IRRAS des conjugués **2** et **3** a mis en évidence une plus grande liberté conformationnelle du macrocycle chez le dérivé mono-nalidixate **2**, comparé à son analogue bis-nalidixate **3**. Nos résultats montrent que les résidus quinolones sont toujours immergés dans la sous-phase aqueuse. Cependant, le *linker* ester n'est pas hydraté de façon identique chez les dérivés mono- ou bis-nalidixate, laissant supposer des réactivités hydrolytiques différentes.

Enfin, la réactivité des conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone **2** et **3** à l'interface eau-air, utilisée comme modèle des interfaces biologiques, a été étudiée. Pour cela, nous avons développé une méthodologie de suivi des cinétiques d'hydrolyse de ces prodrogues potentielles, impliquant l'emploi de boîtes de Pétri comme « réacteur de Langmuir » et d'une méthode de quantification CLHP-UV. Nous avons donc établi le profil cinétique des prodrogues **2** et **3**, et déterminé leur temps de demi-vie à la surface d'un tampon basique. Ces deux prodrogues n'ont pas la même réactivité. Nous proposons que ce résultat soit la conséquence des différences de comportement entre dérivé mono- et bis-nalidixate évoquées précédemment.

Nous constaté que la libération de l'acide nalidixique n'a principalement lieu qu'à l'interface eau-air, comparé aux interfaces liquide-liquide et solide-liquide, sur une échelle temporelle de l'ordre de la semaine. Ceci peut s'expliquer par le caractère hydrophobe global des composés **2** et **3**, montre que ces prodrogues ne sont hydrolysables qu'à l'état organisé en film monomoléculaire.

Nous avons donc mis au point une méthode de « pré-screening », qui permettrait à l'avenir la sélection de dérivés calixréniques conçus comme des prodrogues les plus intéressants. Cette méthodologie est en effet potentiellement applicable à la plupart des prodrogues amphiphiles imaginables à base de *t*Bu[4]OH et apparentées, à condition qu'elles soient suffisamment hydrophobes et amphiphiles pour former des films de Langmuir stables.

# **DEUXIEME PARTIE**

## **Résultats et discussions**

- Chapitre III : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues d'antibactériens
- Chapitre IV : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues d'antiviraux
- Chapitre V : Calix[4]arène hydrophile antibactérien





## **Chapitre IV**

# **Calix[4]arène lipophiles conçus comme prodrogues d'antiviraux**

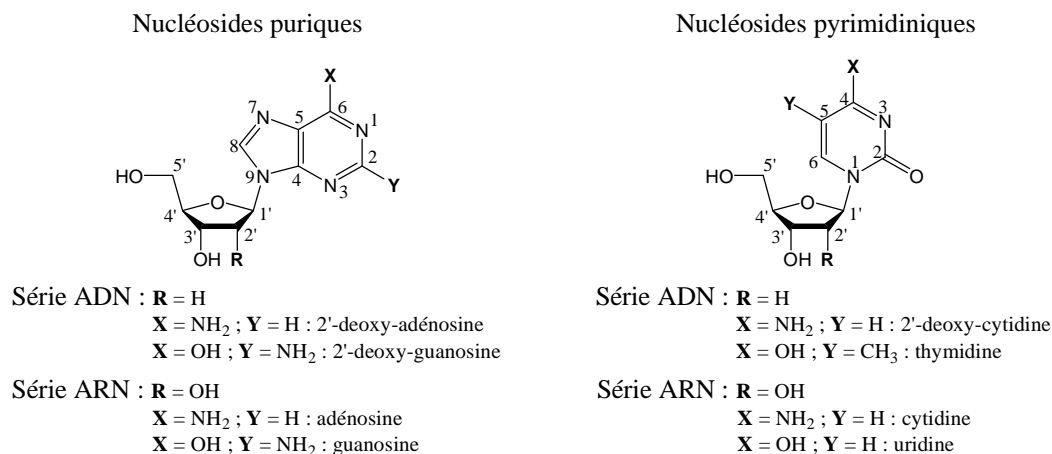
Au cours de ce chapitre, nous verrons que le concept développé avec l'acide nalidixique a été étendu à une autre catégorie de principe actif. Plus particulièrement, le macrocycle *t*Bu[4]OH a été utilisé cette fois-ci comme plate-forme organisatrice d'analogues nucléosidiques à propriétés antivirales. Il s'agit également de développer un concept et de démontrer sa faisabilité d'un point de vue expérimental. C'est pourquoi les espèces antivirales concernées ici doivent être considérées comme des modèles, la notion de calixarène organisateur de principes actifs pouvant potentiellement être applicable à n'importe quelle substance de la pharmacopée.

A l'inverse du chapitre précédent, la partie concernant la chimie organique sera plus volumineuse, puisqu'ici la synthèse des différents conjugués calixarène-antiviral de cette étude n'a encore jamais été décrite. D'autre part, le bon caractère filmogène de ce type de conjugué à base de calix[4]arène *p*-*tert*-butylé a déjà été démontré dans le cas de l'acide nalidixique et de pénicillines.<sup>6, 154</sup> Par conséquent, ne seront traités dans la partie physico-chimique que les isothermes de compression nécessaires à la caractérisation des molécules à l'interface eau-air, et à l'évaluation de leur réactivité en tant que prodrogue à cette interface.

### **IV.1. Introduction**

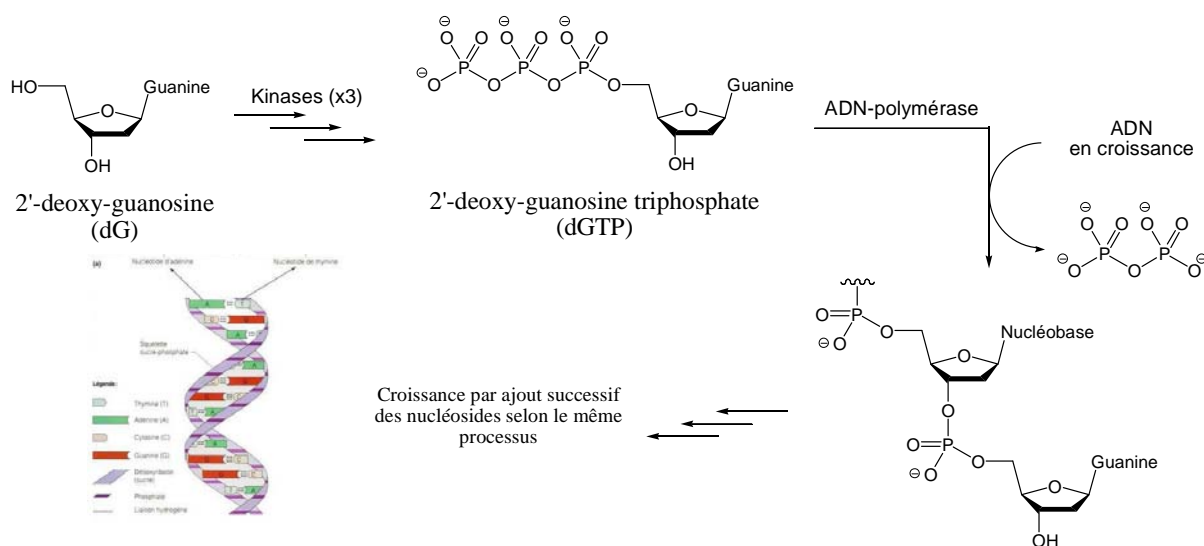
#### **IV.1.1. Les nucléosides et leurs analogues anti-infectieux**

Les nucléosides sont des entités moléculaires naturelles constituées d'une part d'un résidu hétérocyclique dérivé de la purine ou de la pyrimidine, appelé une nucléobase. Celle-ci est reliée à un cyclopentose de type ribose ou 2-déoxy-ribose en position anomérique par une liaison  $\beta$ -glycosidique. Par convention, la nucléobase est numérotée de 1 à 9 pour les purines et de 1 à 6 pour les pyrimidines, tandis que la structure dérivée du ribose est numérotée de 1' à 5', comme indiqué en Figure 79.



**Figure 79.** Structures des nucléosides à base de purine (guanine et adénine) et de pyrimidine (thymine/uracile et cytosine), en série ADN et en série ARN.

Ces substances sont les briques élémentaires des acides nucléiques, que ce soit l'acide déoxyribonucléique (ADN) constitué de nucléosides à base de 2-déoxy-ribose, ou l'acide ribonucléique (ARN) à base de ribose. Comme l'illustre la Figure 80, pour être incorporé dans un acide nucléique, un nucléoside doit subir trois phosphorylations successives en position 5' par différents enzymes, les kinases, présents dans le milieu intracellulaire. Ce nucléoside devenu nucléotide peut alors être incorporé dans la chaîne ARN ou ADN en croissance, par l'intermédiaire d'autres enzymes spécifiques, les ARN- ou ADN-polymérase, avec élimination de pyrophosphate.

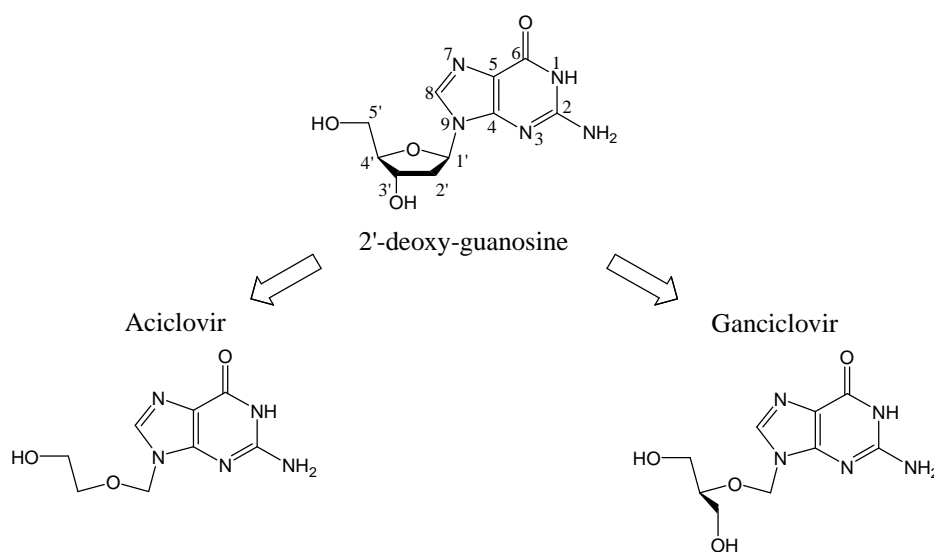


Les nucléosides jouent par conséquent un rôle essentiel dans les processus de réplication et de transcription cellulaire, donc également dans ceux de prolifération virale ou de tumeur maligne.<sup>173</sup> C'est pourquoi les analogues de nucléoside ont été conçus, dans le but de combattre les pathologies liées à la biosynthèse des acides nucléiques.

De nos jours, les analogues nucléosidiques constituent une classe importante de la pharmacopée. Ils sont généralement employés dans la lutte contre les infections virales, ainsi que pour le contrôle de développements cellulaires anarchiques (cancer).<sup>174</sup>

Dans cette catégorie d'anti-infectieux, l'aciclovir, antiviral principalement employé contre les infections causées par les virus de l'herpès, a été choisi comme modèle pour le développement de ce projet. C'est un analogue du nucléoside naturel 2'-deoxy-guanosine (dG), dont une partie du cycle ribose a été amputée des carbones 2' et 3' (Figure 81). Sans centre asymétrique ni fragilité chimique particulière, sa structure est relativement simple et seulement une fonction, l'amine hétérocyclique en position 2 de la nucléobase, nécessite une protection pour être sereinement engagé dans une synthèse multi-étapes.

Le ganciclovir, un autre analogue du nucléoside dG (Figure 80), a également été utilisé dans ce chapitre afin d'élargir le champ d'application de nos futurs prodrogues. Ce second analogue nucléosidique est lui préférentiellement employé dans la lutte contre la forme humaine du cytomégalovirus (CMV), principal responsable d'infections fœtales congénitales dans les pays industrialisés.



**Figure 81.** Structure chimique de l'aciclovir et du ganciclovir, tout deux dérivés du nucléoside naturel 2'-deoxy-guanosine (dG).

Les objectifs que nous nous sommes fixés pour ce projet ont été :

- Développer la synthèse de nouveaux conjugués d'aciclovir à base de tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène.
- Appliquer cette voie de synthèse au ganciclovir.
- Etudier la réactivité de ces prodrogue à l'interface eau-air.

#### **IV.1.2. Mécanisme d'action des analogues nucléosidiques antiviraux**

Les analogues nucléosidiques antiviraux ont la faculté d'interférer dans les processus de réplication et de transcription de l'ADN, aussi bien chez les cellules saines que infectées. Leurs propriétés antivirales viennent généralement du fait que la machinerie cellulaire impliquée dans ces processus est dopée par le virus infectant la cellule. C'est ainsi que le mécanisme d'interférence est plus rapide chez les cellules infectées, générant une sélectivité vis-à-vis des cellules saines. Ces composés ont donc un effet virustatique en agissant sur des virus en phase de réplication.

L'aciclovir et le ganciclovir ont un mécanisme d'action similaire. Après leur passage à travers la membrane cytoplasmique, ils sont rapidement convertis en leur dérivé monophosphate par les thymidine-kinases virales. Ces dérivés monophosphates subissent ensuite deux autres phosphorylations successives par les kinases cellulaires pour devenir les espèces actives triphosphorylées. Celles-ci peuvent alors être prises en charge par les ADN-polymérase effectuant la croissance des chaînes d'ADN virales. Ce mécanisme faisant intervenir au départ une kinase virale est particulièrement avantageux, puisqu'il ne prend donc effet que dans les cellules infectées en limitant l'apparition d'effets secondaires chez le patient traité.

C'est alors que plusieurs phénomènes peuvent entrer en ligne de compte. L'ADN-polymérase peut être inhibée par compétition avec les nucléotides 2'-deoxy-guanosine triphosphate naturels, ce qui stoppe l'élongation des chaînes d'ADN et bloque ainsi la réplication virale. D'autre part, l'insertion de motifs nucléotidiques non-naturels dans une chaîne d'ADN en croissance peut modifier les propriétés, donc les fonctions, de cette dernière. Enfin, l'absence de groupe -OH en position 3' a pour effet d'empêcher l'incorporation d'un nouveau motif nucléotidique et stoppe ainsi la croissance de l'ADN.

Les analogues nucléosidiques sont donc considérés comme des prodrogues, ou plutôt des bio-précurseurs, puisque la substance administrée (nucléoside) n'est pas active en soi, et doit subir trois phosphorylations pour le devenir (nucléotide).

Les antiviraux aciclovir et ganciclovir ont besoin de pénétrer la cellule infectée pour combattre l'infection virale. Une formulation adaptée de ces principes actifs à caractère polaire est donc nécessaire pour faciliter leur diffusion au travers des barrières lipophiles de l'organisme (peau, membrane cellulaire, etc.).

Afin de contourner le problème de biodisponibilité de ce type d'antiviraux, nous avons envisagé d'utiliser le tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène comme plate-forme lipophile, organisatrice d'analogues nucléosidiques hydrophiles. Ces prodrogues, ainsi amphiphiles, doivent avoir une affinité pour les interfaces biologiques. On peut donc espérer d'elles un transport efficace de l'aciclovir ou du ganciclovir vers leur site d'action.

## IV.2. Stratégie de synthèse

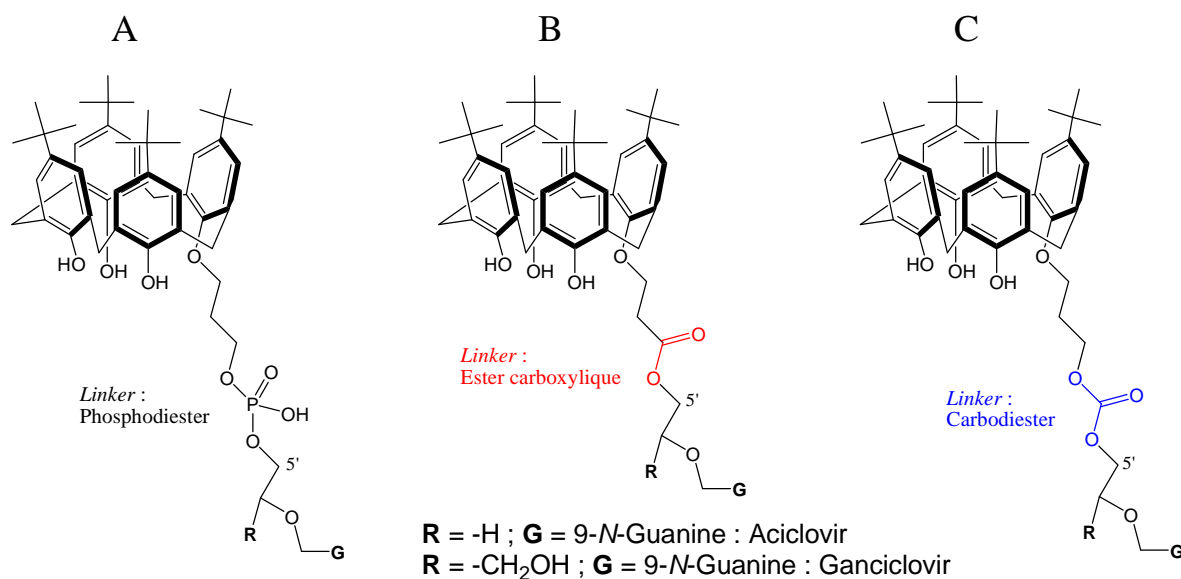
### IV.2.1. Choix du *spacer*

Nous avons choisi de conserver un *spacer* de type propylique, comme utilisé avec les prodrogues d'acide nalidixique (Cf. Chapitre III). En effet, l'étude réalisée en 2007 par Rogalska et coll. concernant des conjugués *t*Bu[4]OH-pénicilline a montré que les dérivés munis d'un *spacer* propylique ont plus d'affinités pour le modèle de membrane cellulaire utilisé, comparé au *spacer* éthylique.<sup>6</sup> Il restait à choisir par quel *linker* greffer les antiviraux sur la plate-forme calixarénique, et selon quelle stratégie de synthèse.

### IV.2.2. Choix du *linker*

Il semble évident d'utiliser la seule fonction chimique facilement transformable et présente à la fois sur l'aciclovir et le ganciclovir, à savoir le groupement hydroxyle en position 5'. Nous avons ainsi envisagé trois types de *linker* avec le calixarène, comme indiqué en Figure 82 :

- Une fonction phosphodiester entre un dérivé aciclovir ou ganciclovir 5'-phosphate, et un calixarène-*O*-(3-hydroxy-propyle) (Figure 82, A).
- Une fonction ester carboxylique entre l'hydroxyle 5' de l'aciclovir ou du ganciclovir, et un acide calixarène-*O*-propanoïque (Figure 82, B).
- Une fonction carbodiester entre l'hydroxyle 5' de l'aciclovir ou du ganciclovir, et un calixarène-*O*-(3-hydroxy-propyle) (Figure 82, C).

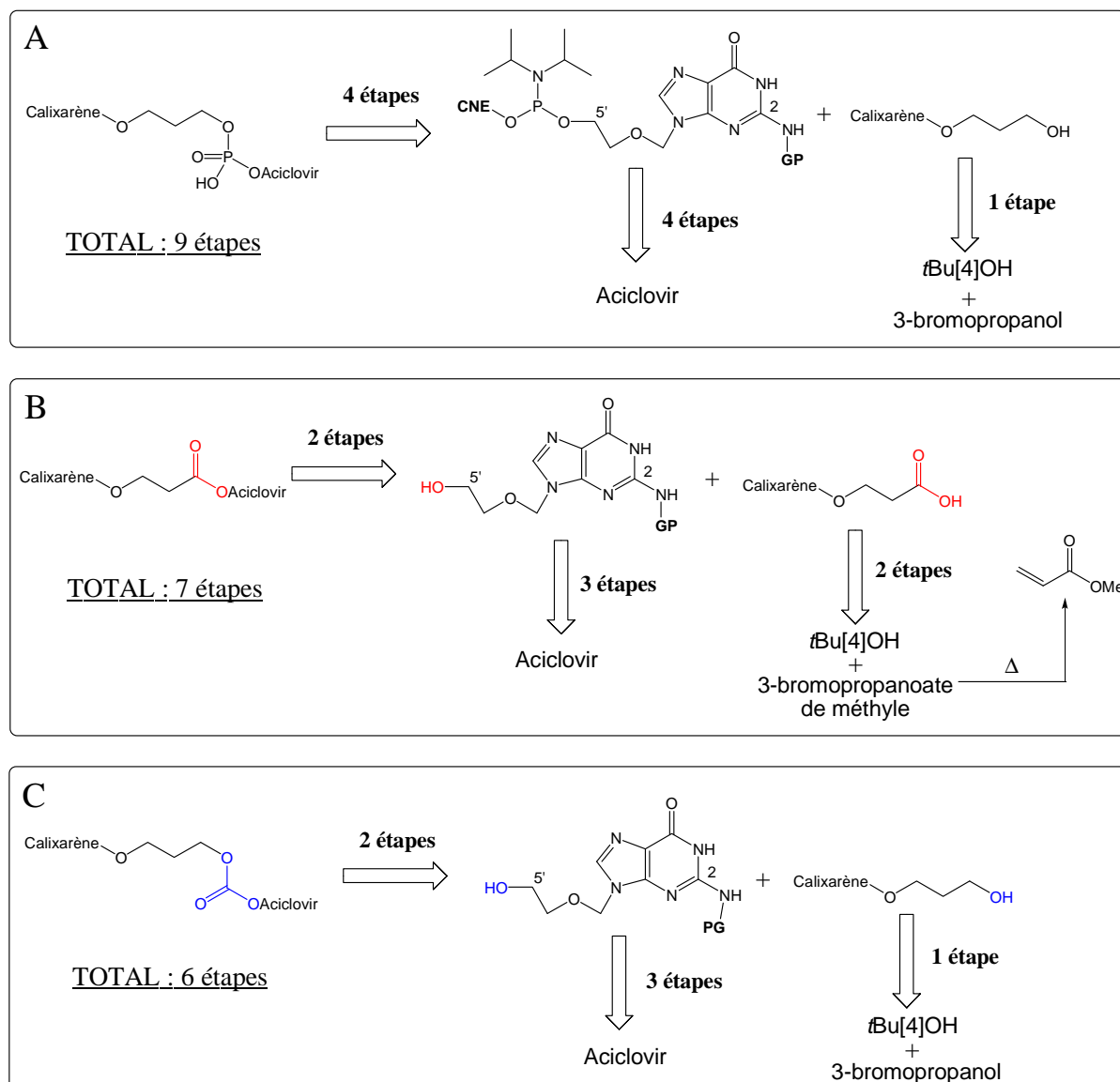


**Figure 82.** Trois *linker* envisagés pour la conjugaison calixarène-antiviral. Représentation unique de dérivés mono-substitués par souci de clarté.

L'option d'un *linker* phosphodiester semble séduisante, car elle permet de libérer une espèce déjà pré-phosphorylé, la forme active étant le dérivé triphosphorylé. Cependant, nous avons vu que la sélectivité de ces antiviraux est en partie liée à leur première phosphorylation par une kinase virale. De plus, la chimie de couplage entre un aciclovir ou un ganciclovir 5'-phosphate et le calixarène, bien que faisable *via* la chimie des phosphoramidites,<sup>62</sup> comporte de nombreuses étapes parfois délicates (Figure 83, A). Notons que l'aspect relativement coûteux qu'implique la chimie des phosphoramidites ne joue pas en la faveur du *linker* phosphodiester.

Nous aurions donc pu nous replacer sur l'option d'un ester carboxylique, nécessitant moins d'étapes de synthèse par comparaison avec un *linker* phosphodiester (Figure 83, B). Outre le fait d'une chimie de couplage plus aisée, la préparation d'un calixarène porteur en

partie basse d'un groupement acide propanoïque peut poser quelques problèmes. D'après l'expérience acquise au laboratoire, l'acide 3-bromo-propanoïque, ainsi que ses esters méthylique ou éthylique, se dégradent spontanément dans les conditions requises de *O*-alkylation d'un calix[4]arène (MeCN chauffé à reflux soit  $\sim 90$  °C). Dans ces conditions, ces réactifs subissent en effet une  $\beta$ -élimination conduisant à l'acide ou à l'ester acrylique correspondant, favorisé par conjugaison  $\pi$ .



**Figure 83.** Rétrosynthèse d'un conjugué *t*Bu[4]OH-aciclovir selon un *linker* ester carboxylique (A). Rétrosynthèse d'un conjugué *t*Bu[4]OH-aciclovir selon un *linker* phosphodiester (B). Rétrosynthèse d'un conjugué *t*Bu[4]OH-aciclovir selon un *linker* carbodiester (C). GP : Groupe Protecteur. CNE : cyanoéthyle -  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ .

C'est l'option d'un *linker* carbodiester qui nous a parue la plus appropriée, en combinant plusieurs avantages par comparaison aux deux autres *linker* (Figure 83, C). En effet, ce type de couplage requiert moins d'étapes, toutes relativement bien décrites dans la littérature, sans contraintes particulières, et peu coûteuses. Cette option a donc été retenue pour notre projet de synthèse de conjugués calixarène-aciclovir ou -ganciclovir.

### IV.2.3. Couplage calixarène - antiviral

Nous avons donc choisi un *linker* carbodiester, selon une stratégie convergente à partir de deux synthons, un calix[4]arène-*O*-(3-hydroxy-propyle) et un dérivé d'aciclovir 2-*N*-protégé, tous les deux indépendamment préparés à partir de leur dérivés commerciaux.

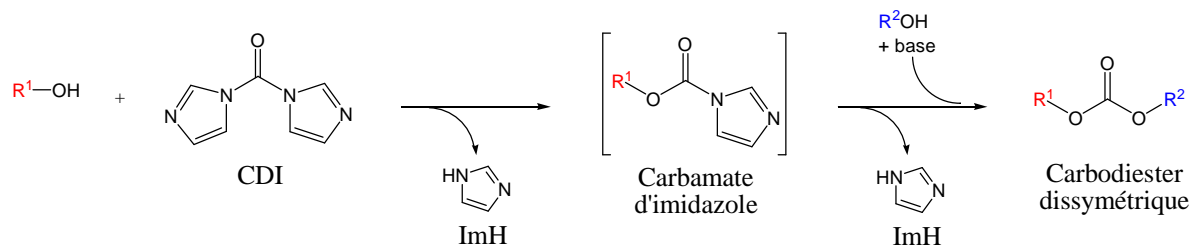
Hosseini et coll. ont montré que la synthèse de calix[4]arènes porteurs en partie basse de groupes 3-hydroxy-propyle peut se faire à partir du 3-bromopropanol.<sup>175</sup> D'autre part, Martin et coll. ont publié la préparation de dérivés d'aciclovir ou de ganciclovir pourvus d'un groupe protecteur *p*-anisyl-diphénylméthane (MTrt) sur la fonction amine en position 2 de la guanine.<sup>176, 177</sup> Ce groupement MTrt, acido-labile, peut alors être éliminé par acidolyse en fin de synthèse, en évitant l'hydrolyse du *linker* carbodiester. Ainsi, la préparation de la plupart des synthons nécessaires sont décrites dans la littérature. Nous avons donc en premier lieu étendu ces descriptions à la synthèse de certains synthons requis et non décrits. Notre travail a été ensuite de développer la chimie de couplage entre ces synthons, par formation de dérivés carbodiesters.

D'un point de vue théorique, une fonction carbodiester se prépare à partir de deux alcools et de phosgènes Cl<sub>2</sub>CO. La réactivité importante de ce dernier rend délicat de contrôler la réaction, avec formation probable de carbodiesters symétriques. En pratique, la toxicité de Cl<sub>2</sub>CO ainsi que son caractère gazeux font de ce réactif un véritable danger et contraignant d'utilisation. C'est pourquoi un autre réactif plus commode a été utilisé, le *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI),<sup>178</sup> rendant plus accessible et moins dangereuse la préparation de dérivés carbodiesters dissymétriques.

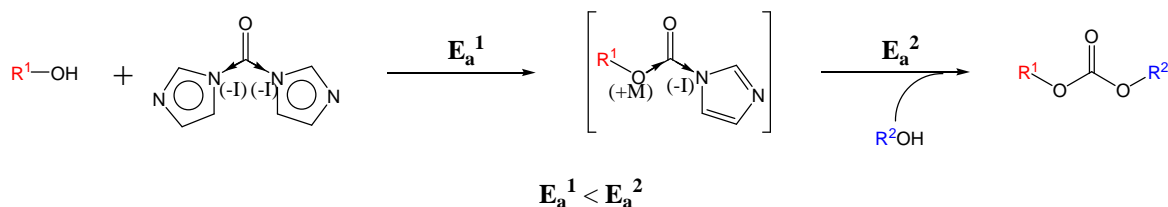
La première étape consiste à faire réagir un des deux alcools sur le CDI pour former un carbamate d'imidazole intermédiaire, souvent peu stable, et ne pouvant donc généralement pas être isolé et conservé (Figure 84). Le second alcool réagit ensuite sur cet intermédiaire en



présence d'une base organique pour former le carbodiester désiré. Cette seconde attaque est plus difficile, c'est pourquoi l'alcool le plus nucléophile est généralement réservé pour cette étape, la présence d'une base organique forte favorisant d'autant plus la réaction.

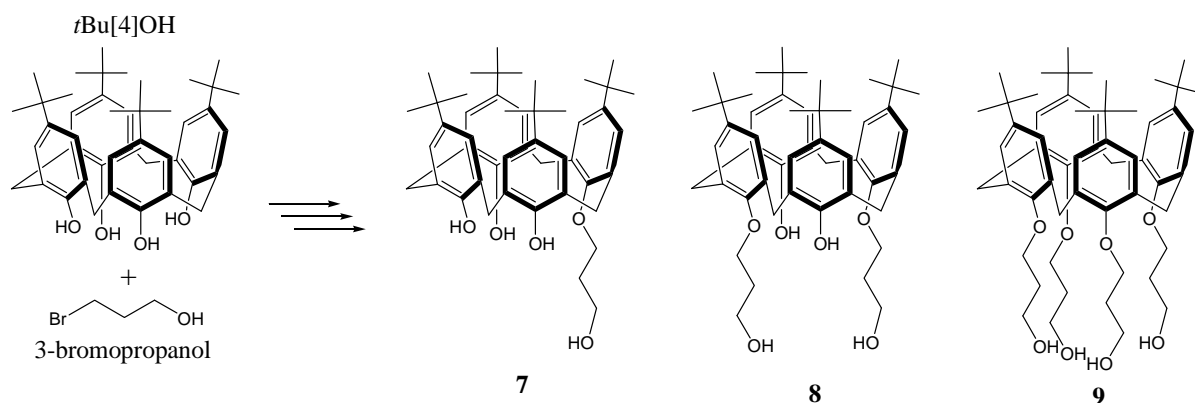


**Figure 84.** Schéma de synthèse d'un carbodiester dissymétrique à l'aide du *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI).



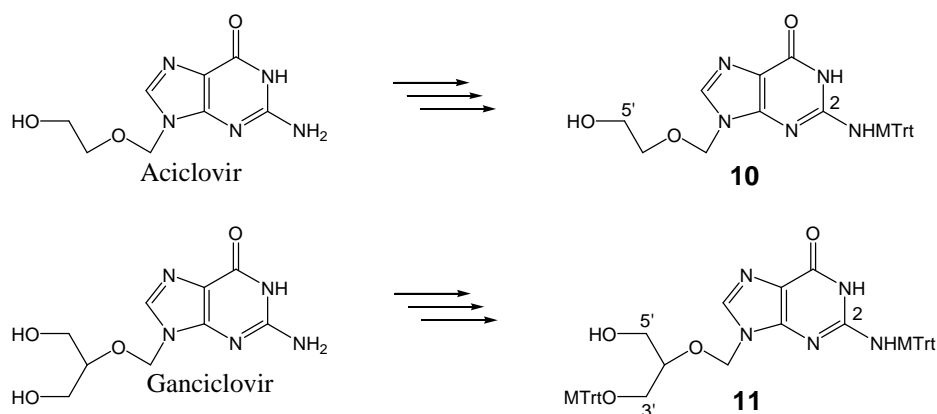
**Figure 85.** Effets inductifs (I) et mésomères (M) chez le CDI et son carbamate intermédiaire, et énergies d'activation relatives  $E_a^1$  et  $E_a^2$ .

Dans le CDI, deux effets inductifs attracteurs (-I) en provenance des hétérocycles imidazoles appauvrissant en électrons le groupe C=O, accentuant son caractère électrophile (Figure 85). Or, chez le carbamate d'imidazole, ce caractère est diminué par l'effet mésomère donneur (+M) de l'oxygène nouvellement introduit. Ainsi, l'énergie d'activation de la première réaction ( $E_a^1$ ) est plus faible que celle de la seconde étape ( $E_a^2$ ). Cette dernière peut être favorisée avec l'aide d'une base pour fragiliser la liaison O-H de l'alcool  $R^2$ .



**Figure 86.** Schéma de synthèse de trois synthons calixaréniques : *t*Bu[4]OH-mono- (7), 1,3-bis- (8) et tétra-*O*-(3-hydroxy-propyle) (9).

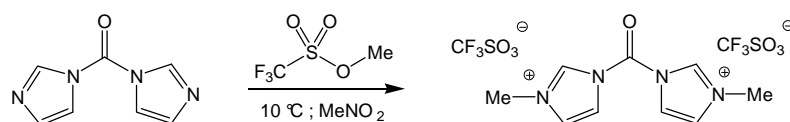
La stratégie de synthèse envisagée est donc de type convergent. Il s'agit d'une part de préparer les synthons *t*Bu[4]OH-*O*-(3-hydroxy-propyle) (Figure 86), et d'autre part les synthons d'aciclovir et de ganciclovir, respectivement 2-*N*-protégés et 3'-*O*,2-*N*-diprotégés par des groupes *p*-anisylidiphénylméthane (MTrt) (Figure 87).



**Figure 87.** Schémas de synthèse des synthons d'aciclovir 2-*N*-MTrt (**10**) et de ganciclovir 3'-*O*,2-*N*-di-MTrt (**11**).

Il vient alors se poser la question suivante : quel alcool, le dérivé calixarénique ou nucléosidique, utiliser en première étape, et lequel réserver pour la seconde étape de couplage ? Nous verrons plus loin que plusieurs possibilités seront testées.

D'autre part, au cas où seraient rencontrés des difficultés lors du couplage, la possibilité d'accroître la réactivité du CDI reste à notre disposition. En effet, Ashi et coll. ont montré en 1989 que la réactivité du CDI peut très nettement être augmentée par une *N,N'*-dialkylation à l'aide de triflate de méthyle (Figure 88).<sup>179</sup> Cette méthode a en effet été appliquée par la suite par Pirrung et coll., justement en chimie des nucléosides.<sup>180</sup>



**Figure 88.** *N,N'*-di-méthylation du CDI par le triflate de méthyle.

### IV.3. Synthèse des synthons clés

#### IV.3.1. Synthons *t*Bu[4]OH *O*-(3-hydroxy-propyle)

Hosseini et coll. ont montré en 2006 que le 3-bromopropanol peut être employé dans la préparation de dérivés tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène *O*-alkylé par des groupements 3-hydroxy-propyles (Figure 89).<sup>175</sup> Pour cela, ils ont appliqué les conditions classiques pour ce type de transformation, à savoir le  $K_2CO_3$  comme base dans MeCN chauffé à reflux. Ainsi, la synthèse de nos trois synthons de calixarène *O*-alkylé par un, deux ou quatre groupes 3-hydroxy-propyles est envisageable selon la même stratégie, en fonction des conditions opératoires mises en œuvre (Cf. Chapitre I).<sup>25</sup>

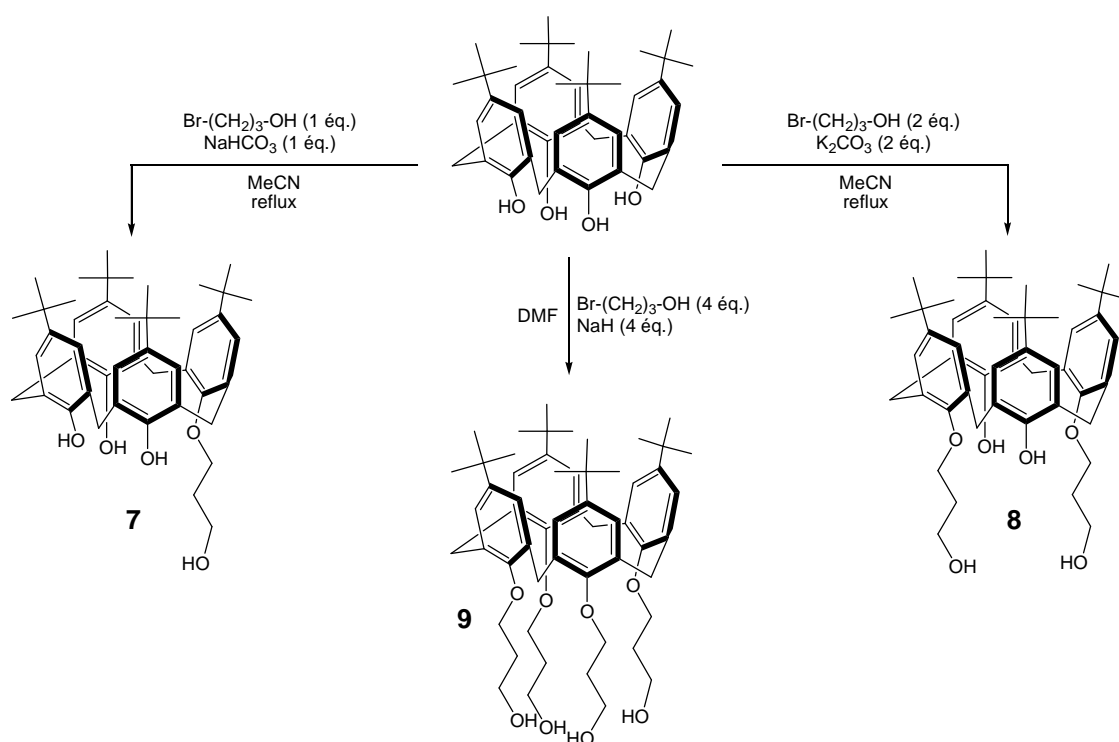


Figure 89. Synthèse des synthons clés *t*Bu[4]OH-*O*-(3-hydroxy-propyle) **7**, **8** et **9**.<sup>175</sup>

#### ❖ Synthon mono-*O*-(3-hydroxy-propyle) 7.

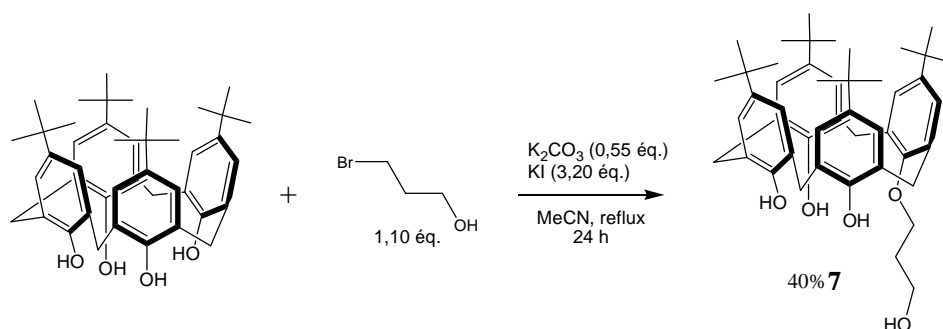
Un certain nombre de méthodes de mono fonctionnalisation du *t*Bu[4]OH ont été développées au cours des 30 dernières années, faisant intervenir divers solvants (MeCN, toluène, DMF,) et bases ( $NaH$ ,  $NaHCO_3$ ,  $K_2CO_3$ ). Quelques stratégies impliquant un jeu de

protection/déprotection ont été décrites dans la littérature, mais la plupart se sont révélées peu efficaces d'un point de vue du rendement final en l'espèce désirée.<sup>181-184</sup> La seule méthode de ce type ayant montré un rendement intéressant (~80%) fut celle de Shang et coll., qui ont employé le trichlorométhylsilane pour une tri-protection des -OH phénoliques sous la forme d'un triéther de silyle.<sup>185, 186</sup> Une telle stratégie nécessite au minimum trois étapes de synthèse pour la protection, l'introduction du groupe fonctionnel voulu, et la déprotection. Cette multitude d'étapes la rend peu commode et demande plus de temps, comparé à une mono-alkylation directe en une étape.

L'expérience accumulée au laboratoire en chimie des calix[4]arènes a montré que l'emploi de carbonates alcalins comme base dans MeCN chauffé à reflux en présence KI donne souvent de bons résultats et en une seule étape.

Ainsi, des essais ont été réalisés dans un premier temps avec 1,1 équivalent de NaHCO<sub>3</sub> dans MeCN à reflux, en présence ou non de KI. Cette méthode a donné systématiquement des rendements faibles, autour de 15%. En effet, ces résultats rappellent la faible réactivité des halogénures d'alkyle par comparaison, à titre d'exemple, aux halogénures de benzoyle.

Nous avons ensuite remplacé le NaHCO<sub>3</sub> par 0,6 équivalent de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Par cette méthode, il a immédiatement été observé une augmentation des rendements (Figure 90). Lors de l'optimisation des conditions réactionnelles, il s'est révélé que le volume de MeCN en fonction de la masse de calixarène de départ, soit le facteur de dilution, est un paramètre déterminant pour l'obtention sélective du dérivé mono- **7** vis-à-vis du dérivé bis-alkylé **8**.



**Figure 90.** Préparation du synthon *t*Bu[4]OH *O*-mono-(3-hydroxy-propyle) **7**.

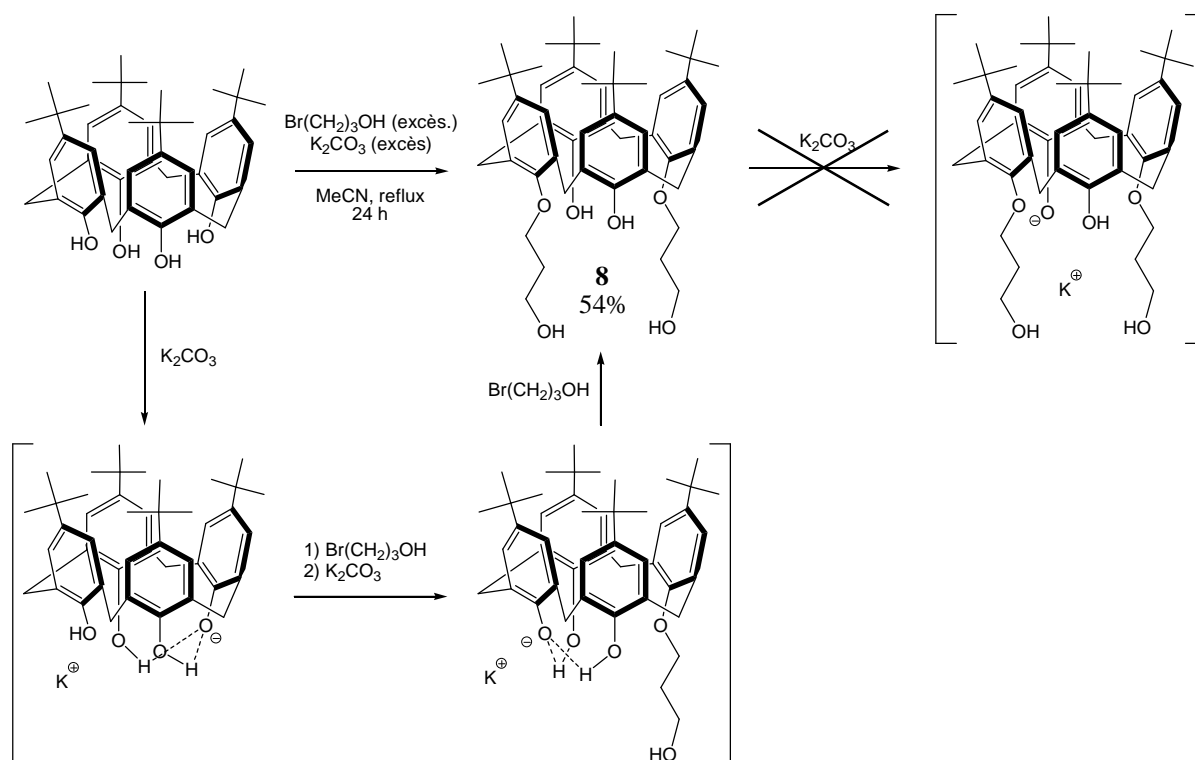
Après optimisation, le dérivé mono-*O*-(3-hydroxy-propyle) **7** a ainsi pu être préparé avec un rendement de 40%, en exploitant les deux pK<sub>a</sub> du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> soit 0,55 équivalent par rapport au calixarène de départ. L'ajout d'un excès d'iodure de potassium KI au milieu

réactionnel, permettant de former *in situ* le dérivé iodé de l'agent alkylant, fut un paramètre essentiel. En effet, la relativement faible réactivité du 3-bromopropanol, par comparaison à un bromure d'aroyle, est ainsi en partie compensée.

❖ Synthon 1,3-bis-O-(3-hydroxy-propyle) 8.

Dans les conditions  $K_2CO_3$  / MeCN, si la base est en excès, la double *O*-alkylation 1,3-alternée du *t*Bu[4]OH est favorisée vis-à-vis d'une mono-, tris- ou tétra-alkylation. Ceci est la conséquence de la stabilisation successive de chacun des deux oxoanions par les deux groupes phénoliques adjacents, assez proches pour créer un réseau intramoléculaire de liaisons hydrogènes (Figure 91).<sup>25</sup> Ainsi, après l'alkylation de deux phénols opposés, les deux phénols restants ne sont plus suffisamment acides, les oxoanions correspondant n'étant plus stabilisés par liaison H.

Un excès de  $K_2CO_3$  permet donc de favoriser la formation du composé 1,3-bis-alkylé, sans risque majeur d'obtention de dérivés 1,2-bis-, tris- ou tétra-alkylés. Cette sélectivité, en plus de la présence de KI, permet également d'accélérer la vitesse de réaction en exploitant principalement le premier pKb du  $K_2CO_3$  en excès.



**Figure 91.** Mécanisme réactionnel conduisant au dérivé *t*Bu[4]OH *O*-1,3-bis-alkylés **8**.

Le synthon **8** a ainsi pu être obtenu avec un bon rendement supérieur à 50%, en employant le  $K_2CO_3$  en excès comme base dans MeCN chauffé à reflux et en présence de KI.

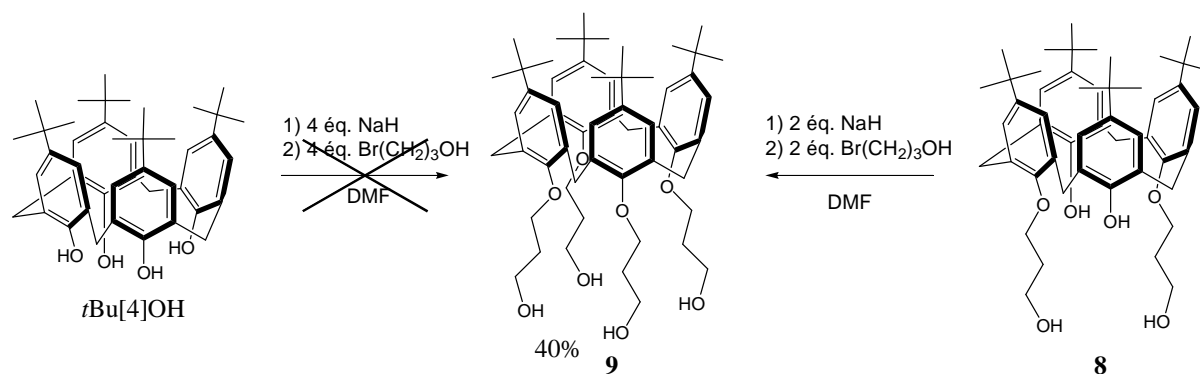
❖ Synthon tétra-O-(3-hydroxy-propyle) **9**.

Pour une tétra-O-alkylation, il est nécessaire d'utiliser une base forte pour déprotonner les deux derniers phénols nettement moins acides que les deux premiers alkylés. Ceci doit donc être fait dans un solvant polaire aprotique afin de stabiliser au mieux les oxanions intermédiaires et favoriser leur formation. Diverses méthodes de tétra-O-alkylation de calix[4]arène sont décrites dans la littérature, comme le résumet Gutsche et Asfari dans leurs ouvrages respectifs.<sup>24, 25, 35</sup> Il est ainsi connu que les *t*Bu[4]OH tétra-alkylés en partie basse s'obtiennent par l'action d'hydrure de sodium NaH sur une suspension du calixarène dans le DMF. Cette voie d'obtention a donc été retenue et testée.

Ce type de transformation d'un *t*Bu[4]OH paraît la plus aisée, ne nécessitant pas de contrôle du taux d'alkylation et de la régiosélectivité (1,3- Vs 1,2-bis-alkylation par exemple). Cependant, la tétra-alkylation par le 3-bromopropanol requiert un contrôle délicat du nombre d'équivalent de base ainsi que d'agent alkylant. Ce dernier est en effet potentiellement réactif en présence de NaH *via* son groupe hydroxyle aliphatique. Les quantités en réactifs mis en jeu sont donc cruciales afin d'éviter toutes réactions parasites, comme l'auto-alkylation du 3-bromopropanol, ou l'alkylation d'un groupe 3-hydroxy-propyle après son incorporation sur le calixarène. Néanmoins, la formation d'oxoanions de type phénolique est favorisée vis-à-vis d'oxoanions de type aliphatique, ne serait-ce qu'en raison de la stabilisation des phénolates par délocalisation de la charge dans le cycle aromatique. En supposant ainsi que les phénols réagissent les premiers, le risque d'oligomérisation est d'autant plus important que le taux d'alkylation augmente.

Plusieurs essais ont d'abord été réalisés avec 4,0 équivalents de NaH dans le DMF, en faisant varier les temps de réaction avant et après ajout de 4,0 équivalents de 3-bromopropanol (Figure 92). Cette voie de synthèse s'est avérée insatisfaisante en raison de l'obtention systématique d'un mélange complexe sans formation majoritaire du synthon désiré tétra-alkyle **9**.

Face à ces médiocres résultats, il a alors été envisagé de préparer le synthon **9** en deux étapes, à partir du dérivé bis-(3-hydroxy-propyle) **8** (Figure 92). Celui-ci a été soumis en premier lieu à l'action de 2,0 équivalents de NaH dans le DMF, avant ajout de 2,0 équivalents de bromopropanol. Cette méthode a permis de réduire le nombre de réactions parasites et ainsi d'obtenir un mélange moins complexe en fin de réaction.



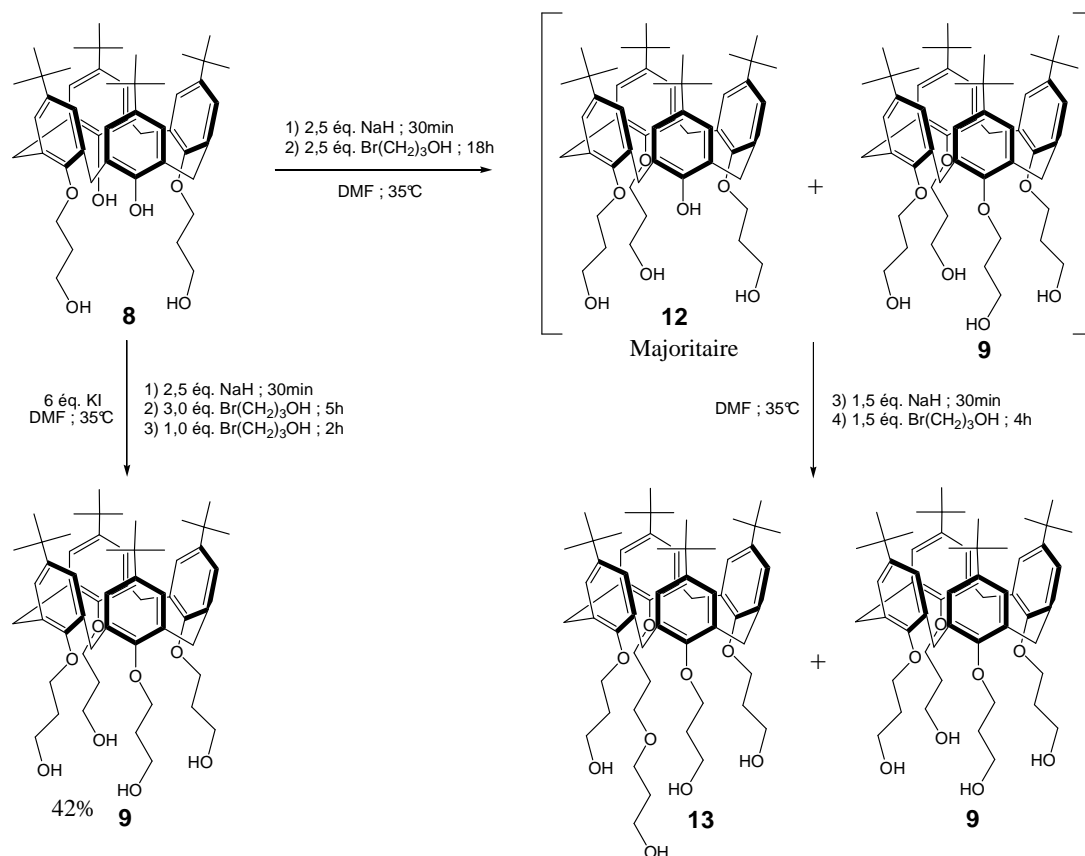
**Figure 92.** Schéma des deux voies d'obtention du synthon **9** expérimentées, celle à partir du synthon **8** ayant par la suite été retenue.

Cette voie de synthèse a nécessité un important travail d'optimisation. En effet, lors des premiers essais, il a été observé la formation majoritaire du dérivé tris-alkylé **12**, comme indiqué en Figure 93. Nous avons alors tenté d'augmenter le taux de conversion par l'ajout d'un supplément de NaH, puis de 3-bromopropanol. Ceci a permis de consommer le dérivé **12**, mais au profit d'un mélange de deux composés aux propriétés physico-chimiques proches (Figure 93, à droite).

Ceux-ci ont pu être isolés par chromatographie et analysés par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H, dont les spectres sont comparés en Figure 94. Il a alors été constaté que nous avons à faire d'une part au dérivé tétra-alkylé **9** attendu, et d'autre part à un sous-produit noté **13** issu de l'alkylation par le 3-bromopropanol d'un groupe -OH aliphatique de **9**. C'est exactement le type de réaction parasite que nous avons craint, indiquant que notre raisonnement avant le développement de cette synthèse était justifié.

Il a donc été nécessaire de bien ajuster certains paramètres réactionnels, comme le nombre d'équivalents en NaH et en 3-bromopropanol, ainsi que le temps de réaction, afin de trouver le meilleur compromis entre le taux de conversion et le rendement. C'est-à-dire de façon à former le plus possible du composé **9** attendu (taux de conversion), sans pour autant

générer un mélange trop complexe avec perte de produit lors des étapes de purification (rendement). Notons que l'influence d'autres paramètres probablement clés, comme la température ou la concentration, n'ont pas été évalués par manque de temps.



**Figure 93.** Résumé des différentes conditions réactionnelles appliquées pour l'obtention du synthon **9**. Indication des sous-produits **12** et **13** identifiés par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H.

Dans un premier temps, l'ajout d'un excès de KI (~6 éq.) a permis d'accélérer la réaction par formation *in situ* du dérivé iodé de l'agent alkylant. On minimise ainsi le temps de contact entre le dérivé tétra-alkylé **9** nouvellement formé et l'halogénopropanol résiduel. En effet, nous savons maintenant que les oxoanions phénolates se forment préférentiellement devant les alcoolates. De plus, nous avons observé l'apparition du sous-produit **13** seulement après l'ajout des réactifs à un mélange composé principalement de dérivés tris- **12** et tétra-alkylés **9**. Nous proposons donc que ce sous-produit **13** s'est formé à partir du composé tétra-alkylé **9**. C'est pourquoi il est préférable de produire rapidement dans le milieu réactionnel le plus possible de **9**.



Le meilleur compromis trouvé entre les proportions de base et d'agent alkylant a été d'employer 2,5 équivalents de NaH durant 30 minutes à 35 °C, puis 3,0 équivalents de 3-bromopropanol durant 5 heures. Un équivalent supplémentaire de ce dernier est ensuite ajouté durant encore 2 heures dans les mêmes conditions. Ce protocole de synthèse, sans conversion totale en tétra-alkylé **9**, a néanmoins permis de limiter la formation du sous-produit **13**.

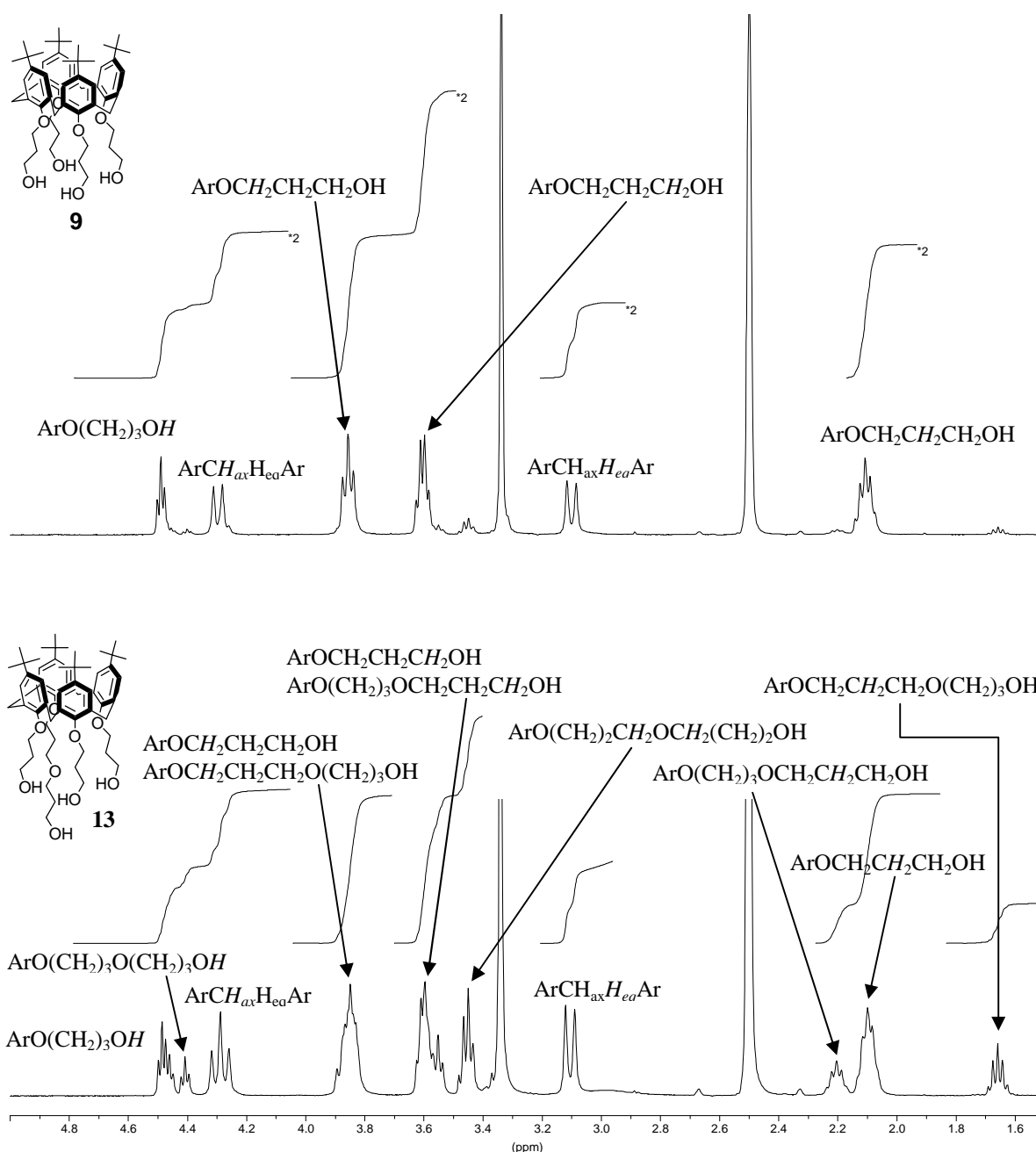


Figure 94. Spectres RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, t.a.) des composés **9** (en haut) et **13** (en bas).

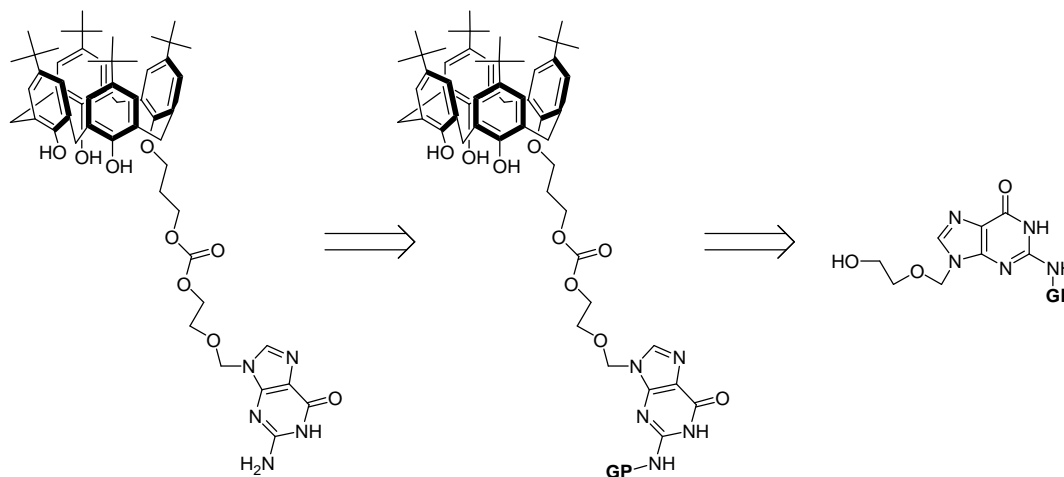
Finalement, le synthon *t*Bu[4]OH tétra-*O*-(3-hydroxy-propyle) **9** a été produit dans les conditions décrites ci-dessus avec un rendement acceptable de 42%.

Ce composé **9** a été obtenu associé à un équivalent de NaI. Son spectrogramme de masse (ESI) a montré un unique pic mono-chargé de masse  $m/z = 903,573$  Da correspondant à l'ion  $[\mathbf{9}+\text{Na}]^+$ . Il est connu que les calix[4]arènes sont capables de complexer de petits cations alcalins *via* leurs oxygènes phénoliques.<sup>187, 188</sup> La réaction se déroulant en présence d'un excès d'anions iodures  $\text{I}^-$  (provenant du KI), nous avons donc envisagé que nous avions à faire à un complexe de sodium avec l'iodure comme contre-anion.

Une analyse élémentaire a conforté cette hypothèse, avec des valeurs correspondantes à celles calculées pour le complexe  $[\mathbf{9}\text{Na}]^+\text{I}^-$ .

### IV.3.2. Synthons d'aciclovir et de ganciclovir

Afin de s'affranchir d'un risque de réaction parasite lors de la formation ultérieure de la fonction carbodiester, il est nécessaire de masquer temporairement le caractère nucléophile non négligeable de la fonction amine en position 2 de la nucléobase (Figure 95). Pour cela, il a été envisagé d'utiliser un groupe protecteur adapté, c'est-à-dire facile à introduire en début, et labile en fin de synthèse dans des conditions non agressives pour le reste du conjugué ainsi préparé.



**Figure 95.** Rétrosynthèse d'un conjugué calixarène-mono-aciclovir. Situation transposable aux autres conjugués multi-substitués aciclovir ou ganciclovir.

Parmi les groupes protecteurs à notre disposition, les groupes dérivés du triphénylméthane, communément appelés trityles (Trt) et souvent employés en chimie des nucléosides, semblaient être parfaitement appropriés. Ces groupements acido-labiles peuvent en effet être éliminés facilement en fin de synthèse par acidolyse, sans risquer d'hydrolyser la fonction carbodiester principalement sensible aux conditions basiques et aux nucléophiles. De

plus, il existe plusieurs variétés de groupes trityles plus ou moins labiles, laissant une certaine marge de manœuvre en cas de difficulté lors de la déprotection.

Il a été décrit par Martin et coll. la synthèse d'un dérivé d'aciclovir *N*-protégé en position 2 par un groupe *p*-anisylodiphénylméthyl ou monométhoxytrityl (MTrt).<sup>176</sup> Conforme à ce que nous cherchions, cette procédure a donc été appliquée.

Comme indiqué en Figure 96, l'hydroxyle en position 5' de l'aciclovir est d'abord acétylé par l'anhydride acétique en présence de DMAP catalytique pour donner le composé **14**. La fonction amine en position 2 de **14** est alors tritylée à l'aide du chlorure de *p*-anisylodiphénylméthane en présence de NEt<sub>3</sub> et de DMAP catalytique dans le DMF anhydre, conduisant au dérivé **15**. Enfin, l'hydroxyle 5' de **15** est libéré par l'action de NH<sub>4</sub>OH aqueux, dans le méthanol. Le synthon d'aciclovir **10** protégé en position 2 a ainsi été obtenu avec un rendement global sur les trois étapes de 84%.

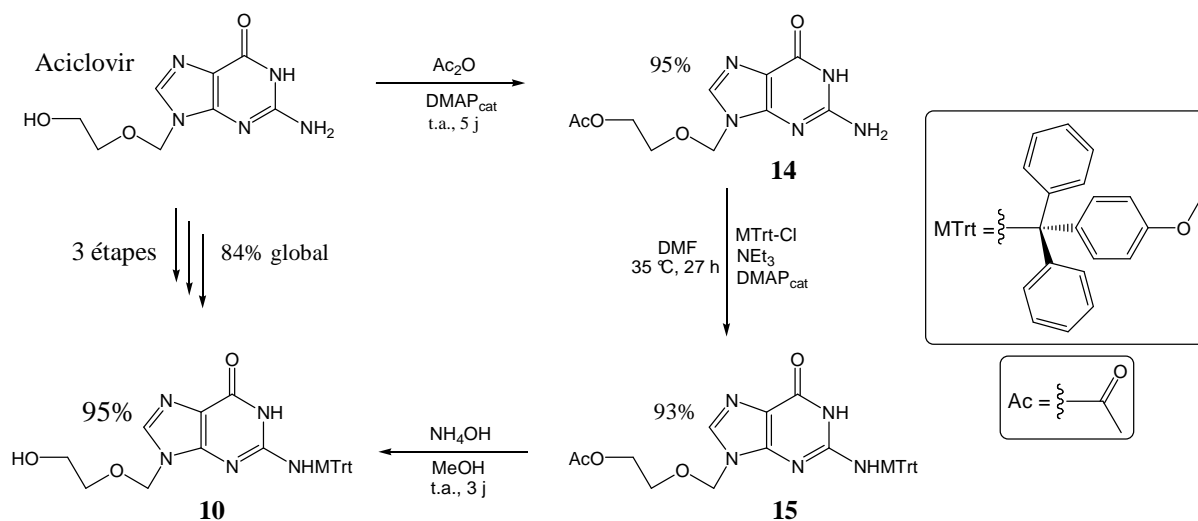
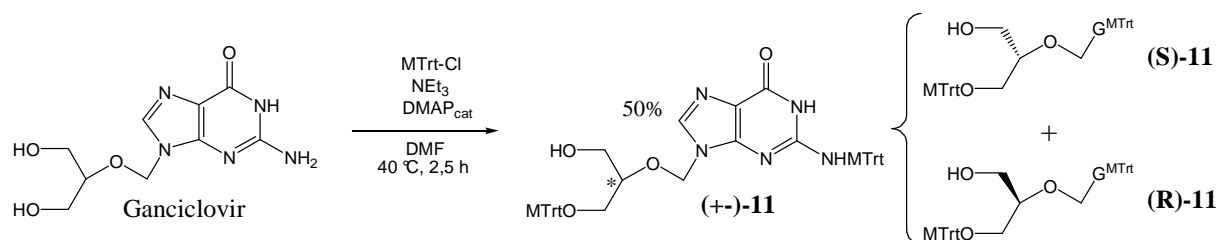


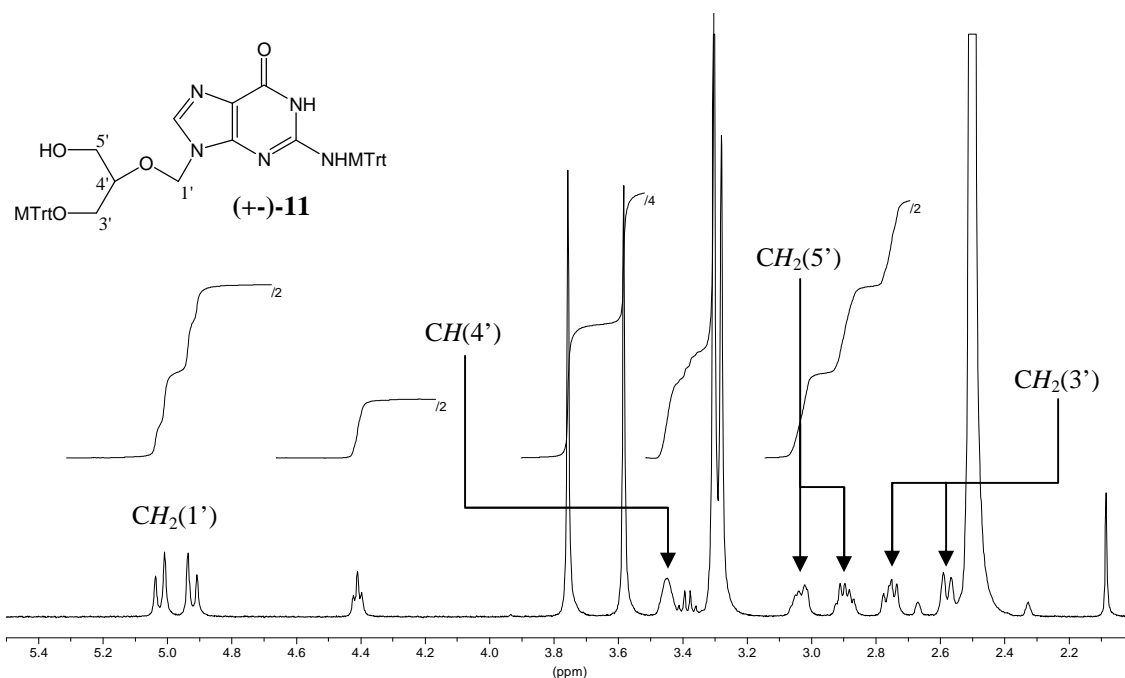
Figure 96. Synthèse en trois étapes du synthon 2-*N*-MTrt-aciclovir **10**.

Dans le même article, Martin et coll. ont également décrit la synthèse en une étape d'un ganciclovir *N*- et *O*-protégé par deux groupements MTrt en position 2 et 3', respectivement (Figure 97). Rapide mais de rendement plus faible, cette synthèse nécessite en effet un contrôle chimio-sélectif visant à former majoritairement le dérivé *N,O*-bis-protégé. Nous avons appliqué les conditions décrites par Martin, et avons obtenu le synthon 2-*N*,3'-*O*-bis-MTrt-ganciclovir **11** avec un rendement attendu de 50%.



**Figure 97.** Synthèse en une étape du synthon racémique 2-*N*,3'-*O*-bis-MTrt-ganciclovir (+)-11.

Il peut être remarqué que la protection d'un seul des deux groupes –OH du ganciclovir génère un carbone asymétrique en position 4'. Le composé **11** a donc été obtenu en mélange racémique de deux énantiomères (**R**)-11 et (**S**)-11. Comme le montre la Figure 98, cette chiralité a de lourdes conséquences en spectroscopie RMN <sup>1</sup>H, où le caractère diastéréotopique de chaque groupe méthylène est clairement visible à la multiplicité parfois complexe de leurs signaux respectifs.



**Figure 98.** Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, t.a.) du synthon ganciclovir (+)-11. Conforme à la description de Martin et coll.<sup>176</sup>

Ce caractère diastéréotopique est facilement reconnaissable à l'allure du signal vers 5 ppm correspondant au groupe méthylène en position 1'. Celui-ci passe d'un singulet dans le cas du ganciclovir de départ, non chiral, à un système AB de constante de couplage  $J = 11$  Hz dans le cas du dérivé **11**. Les méthylènes 3' et 5' apparaissent respectivement autour de 2,7 et 2,9 ppm sous la forme de deux systèmes ABM. Chacun de ces deux systèmes complexes est

la conséquence du dédoublement de chaque système AB 3' et 5' dû à la présence de l'hydrogène 4' voisin en  $J^1$ .

Nous verrons plus loin lors de la synthèse du conjugué *t*Bu[4]OH-bis-ganciclovir que la chiralité du synthon (+-)-**11** implique la formation de plusieurs stéréoisomères, avec une nette influence sur la structure de la plate-forme calixarénique.

## **IV.4. Synthèse des conjugués calixarène-antiviral**

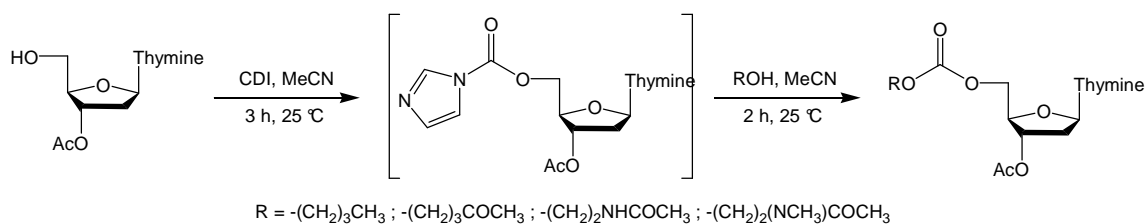
### **IV.4.1. Couplage par le *N,N'*-carbonyldiimidazole**

Afin de nous affranchir d'éventuelles complications dues à la chiralité du synthon ganciclovir (+-)-**11**, la procédure de couplage par le *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) a été développée dans un premier temps avec le synthon d'aciclovir **10**.

#### ❖ Bibliographie.

La chimie visant à coupler deux molécules *via* une fonction carbodiester en utilisant le CDI est bien décrite dans la littérature,<sup>189-191</sup> dont une part dans le domaine des nucléosides et de leurs analogues.<sup>178, 192-194</sup> Néanmoins, il existe également une grande diversité de conditions opératoires.

Différents auteurs reportent l'emploi de divers solvants, toujours aprotiques, mais à polarité très variables allant du dichlorométhane ou le toluène (apolaire), à l'acétonitrile ou le THF (polaire), pour ne citer qu'eux. Plusieurs bases sont aussi utilisées comme la *N,N*-diméthylaminopyridine, la triéthylamine ou la 1,1,3,3-tétraméthylguanidine (TMG), et cela à diverses températures. Il est donc évident que les conditions opératoires sont spécifiques à chaque cas, selon la solubilité des deux entités à coupler. C'est pourquoi nous avons sélectionné un article en particulier parmi cette bibliographie nous basant sur des éléments tels que la similitude moléculaire avec notre cas ou le non-emploi de substances dangereuses comme la pyridine.

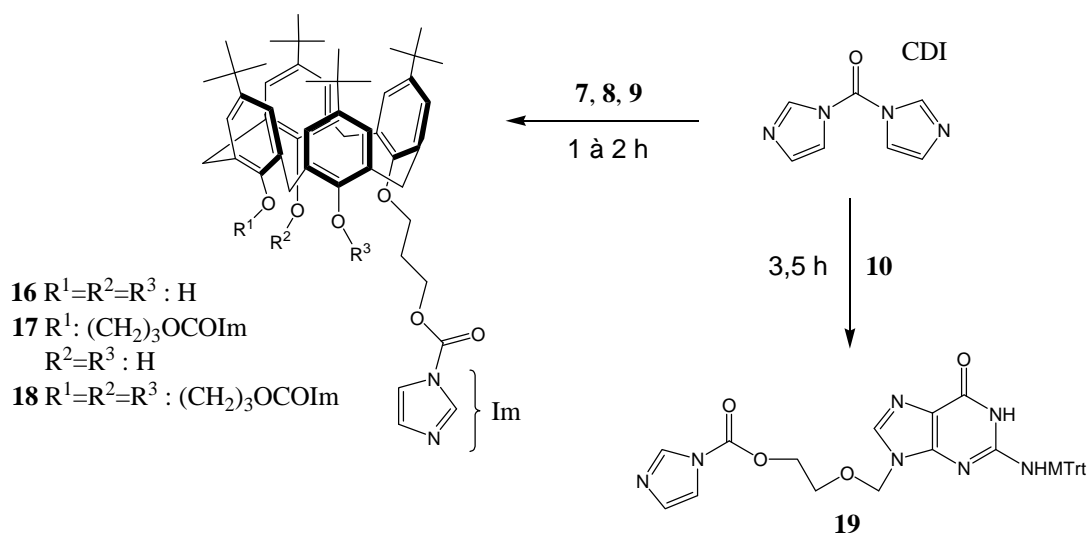


**Figure 99.** Conditions opératoires appliquées par Chmielewski et coll.<sup>178</sup>

Le protocole décrit par Chmielewski et coll. (Figure 99)<sup>178</sup> implique l'utilisation de MeCN anhydre à température ambiante pour la formation du carbamate d'imidazole intermédiaire. Puis, la TMG est utilisée en seconde étape, également dans MeCN à température ambiante, pour conduire au carbodiester désiré. Comme dans la plupart des articles cités plus haut, Chmielewski et coll. gardent l'alcool le plus nucléophile pour la seconde étape.

❖ Application.

Nous avons d'abord cherché à comparer le caractère nucléophile de chacun des synthons dans des conditions identiques (T °C, concentration, nombre d'équivalents). Pour ce faire, nous avons mis en réaction chaque synthon avec le CDI, et avons comparé le temps nécessaire à chacun pour être consommé et former le carbamate correspondant (Figure 100).

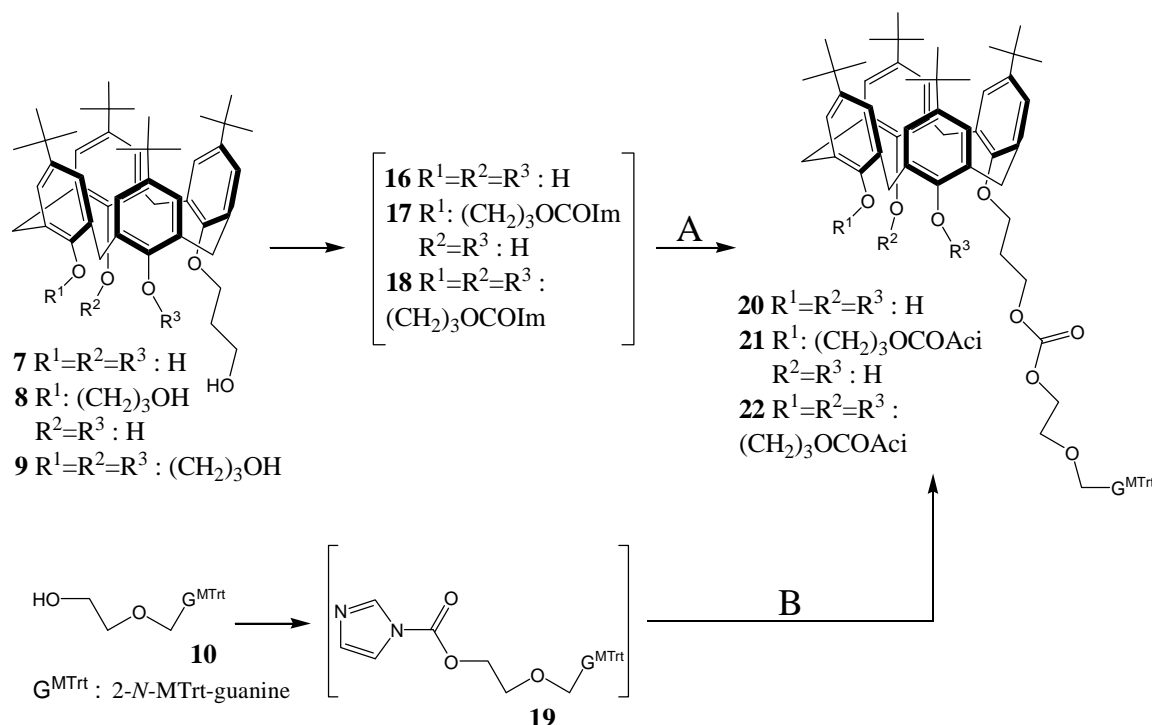


**Figure 100.** Réactivité relative de chaque synthons clés vis-à-vis du CDI, indiqué par leur temps de réaction.

Nous avons observé que le synthon d'aciclovir **10** est converti en 3,5 heures, contre seulement 1 à 2 heures pour les différents synthons *t*Bu[4]OH-*O*-(3-hydroxy-propyle) **7**, **8** et **9**. Ces résultats indiquent donc que le dérivé d'aciclovir **10** est moins nucléophile que les alcools **7**, **8** et **9** dans les conditions mises en œuvre. Ces derniers devraient par conséquent être utilisés en deuxième étape de couplage.

Mis à part le calixarène tétra-alkylé **9**, nous ne devons pas oublier que les groupes hydroxyles phénoliques restants sont potentiellement réactifs. Il n'est donc pas exclu que l'un de ces groupes –OH puisse entrer en compétition avec un hydroxyle aliphatique, que ce soit en réaction avec le CDI ou le carbamate d'aciclovir **19**. Notons qu'une rapide expérience mettant en jeu le *t*Bu[4]OH et le CDI a montré par CCM la formation de nouveaux composés, non-isolés cependant, suggérant une réactivité non négligeable de ces phénols.

Il a donc été jugé nécessaire d'expérimenter la formation de chacun des conjugués *t*Bu[4]OH-aciclovir mono- (**20**), bi- (**21**) et tétra-substitués (**22**), d'une part avec un calixarène *O*-(3-hydroxy-propyle) en première étape (Figure 101, A), ou d'autre part avec le synthon d'aciclovir **10** en première étape (Figure 101, B).



**Figure 101.** Résumé des deux voies de couplage testées pour l'obtention des conjugués calixarène-antiviral.

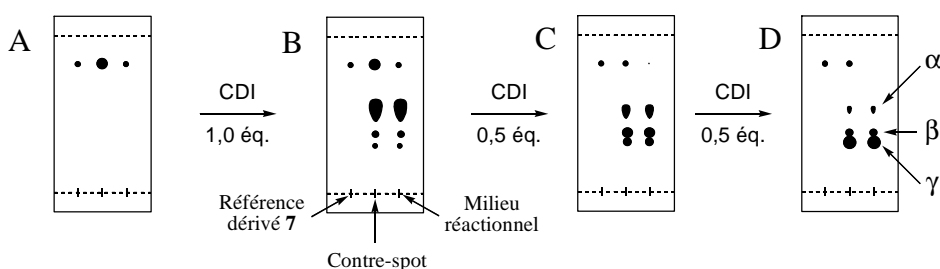
Avec tous les synthons, nous avons observé que la voie **B**, illustrée en Figure 101, conduit en fin de réaction à un mélange plus complexe que selon la voie d'accès **A**. C'est donc cette dernière que nous avons retenue pour la synthèse des conjugués *t*Bu[4]OH-aciclovir, et plus tard *t*Bu[4]OH-ganciclovir.

#### IV.4.2. Conjugué calixarène-mono-aciclovir *N*-tritylé

Le cas du conjugué mono-substitué noté **20** a été instructif en raison de la réactivité vis-à-vis du CDI du groupe phénol libre opposé au phénol alkylé. Cette réactivité non négligeable a occasionné certaines réactions parasites. Nous verrons que la relative instabilité du carbamate d'imidazole intermédiaire **16** n'a pas permis de l'isoler et de le caractériser (évaporation MeCN = dégradation).

##### ❖ Première étape : Carbamate d'imidazole 16.

Lors de la première étape de couplage, il a été observé que l'action d'un équivalent de CDI conduit à un mélange de plusieurs composés dont un très majoritaire, sans totalement consommer le calixarène **7** de départ. Comme illustré en Figure 102, il s'est formé majoritairement un nouveau produit  $\alpha$  plus polaire que le dérivé **7**, et minoritairement deux autres encore plus polaires  $\beta$  et  $\gamma$ . Le composé **7** n'ayant pas totalement été consommé, nous avons supposé qu'un des nouveaux produits soit issu de la réaction de 2 équivalents de CDI.



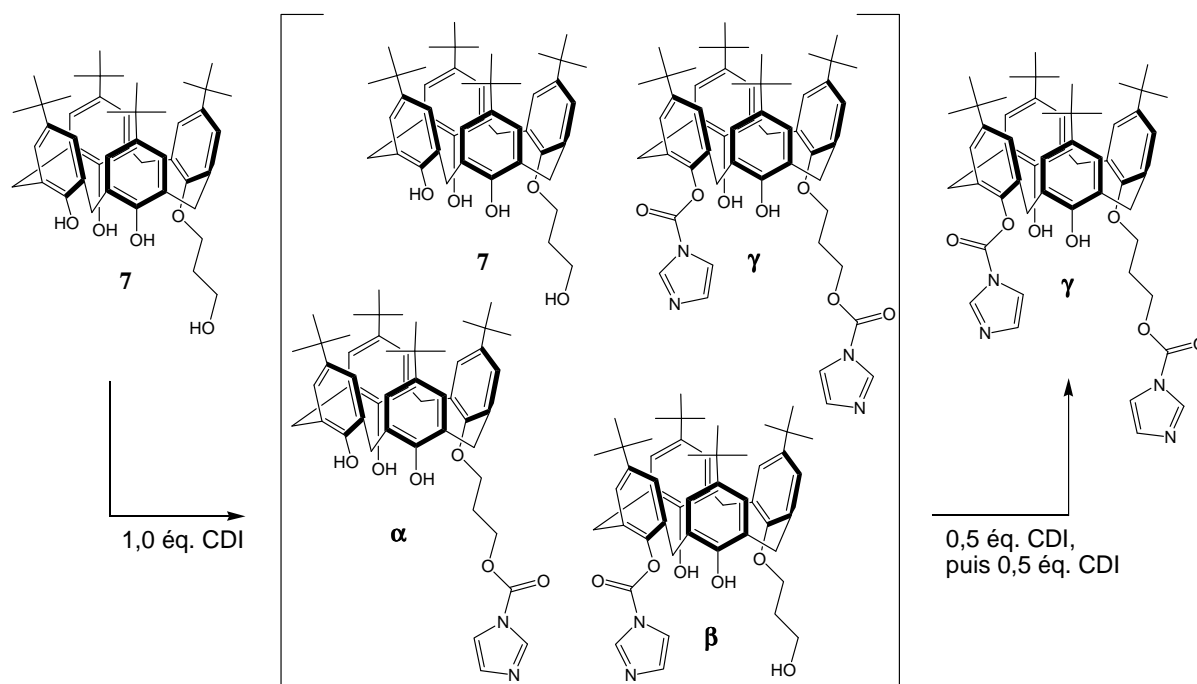
**Figure 102.** Chromatographies sur couche mince (CCM) réalisées avant, et après chaque ajout de CDI au milieu de réactionnel **7** / MeCN agité à température ambiante sous atmosphère d'argon. Départ (A). CCM 1 h après ajout de 1,0 équ. de CDI (B). CCM 1 h après ajout de 0,5 équ. de CDI (C). CCM 1 h après ajout de 0,5 équ. de CDI (D). Support : SiO<sub>2</sub>. Eluant : DCM/MeOH 95:5 (v/v). Révélation : UV 254 nm.

L'ajout de 0,5 équivalent supplémentaire de CDI a permis de consommer le calixarène **7** restant, mais également une fraction du nouveau composé  $\alpha$  majoritaire, au profit des autres



composés  $\beta$  et  $\gamma$ . Finalement, un dernier ajout de 0,5 équivalent conduit à une quasi disparition des deux composés  $\alpha$  et  $\beta$ , au profit du troisième plus polaire  $\gamma$ . Un total de 2 équivalents de CDI a donc été nécessaire pour aboutir au système final.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le phénol libre en opposition au phénol alkylé soit réactif comme nous le présumions, formant également un carbamate d'imidazole par réaction avec le CDI (Figure 103). Ainsi, selon cette hypothèse, le produit le plus polaire  $\gamma$  formé après l'action de deux équivalents de CDI doit correspondre à l'intermédiaire bis-carbamate. Les deux autres,  $\alpha$  et  $\beta$ , doivent donc correspondre à deux dérivés mono-carbamate. Enfin, sachant qu'un alcool aliphatique est plus nucléophile qu'un alcool phénolique, et dans notre cas probablement moins encombré stériquement, nous proposons que le produit majoritaire  $\alpha$  corresponde au produit attendu n° 16.



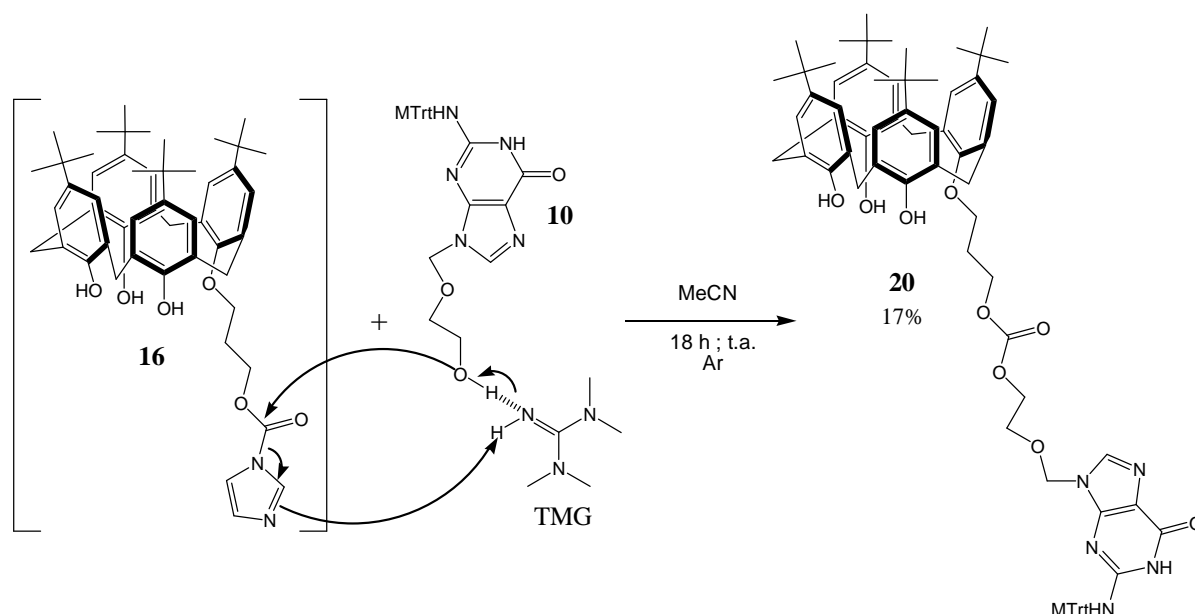
**Figure 103.** Hypothèse émise d'après les observations faites par CCM, exposées en Figure 102.

❖ Deuxième étape : Carbodiester 20.

Le carbamate d'imidazole **16** est donc formé *in situ* comme décrit plus haut. Le synthon 2-N-MTrt-aciclovir **10** est alors ajouté au mélange, ainsi qu'un excès de TMG

(Figure 104). Cette base organique forte ( $pK_a \sim 14$ ) permet d'accroître la nucléophilie de l'alcool attaquant en fragilisant, voire en rompant, la liaison O-H.

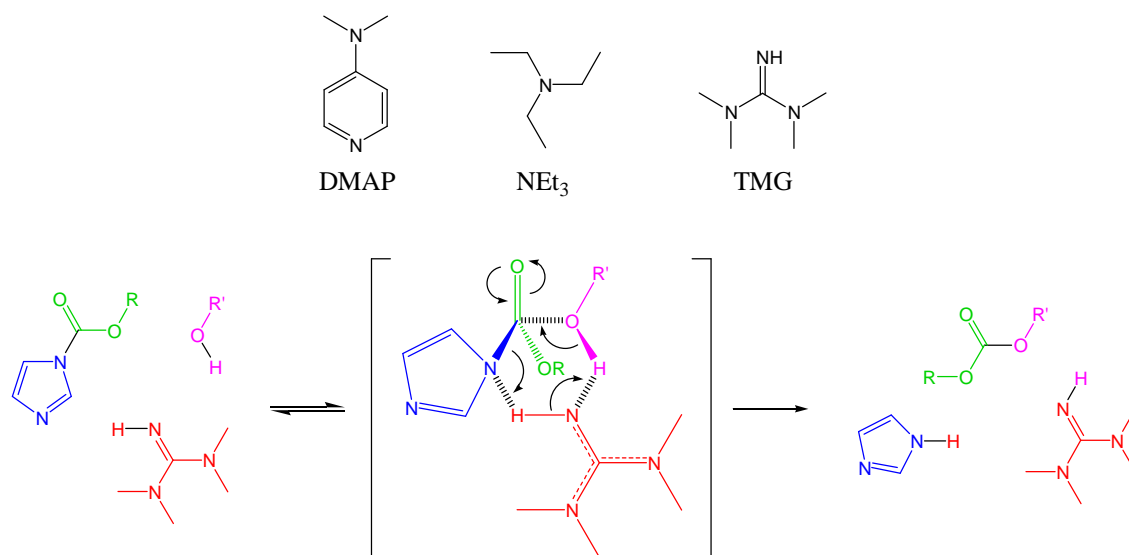
Nous avons observé que la nature de la base utilisée a une nette influence sur la vitesse de la réaction. La DMAP a montré une cinétique lente de l'ordre de plusieurs jours dans des conditions modérées (MeCN chauffé à 40 °C). Les descriptions de la littérature utilisant la DMAP ou encore la  $NEt_3$  vont dans le même sens,<sup>190, 191, 194</sup> tandis que la TMG présente une cinétique plus rapide de l'ordre de quelques heures et à température ambiante.<sup>178</sup> Outre son  $pK_a$  plus important, il peut être remarqué qu'à la différence de la DMAP ou de la  $NEt_3$ , la TMG possède un proton échangeable.



**Figure 104.** Proposition d'un mécanisme réactionnel conduisant au conjugué calixarène-mono-aciclovir N-tritylé **20**, à partir de l'intermédiaire **16** et du synthons **10** en présence de TMG.

Nous faisons l'hypothèse que la TMG favorise la réaction par un transfert de proton entre l'alcool attaquant et l'imidazole partant, selon un état de transition cyclique à 6 centres exposé en Figure 105. La représentation graphique de cet état de transition hypothétique fait apparaître que des bases comme DMAP ou  $NEt_3$  ne peuvent former un tel système. En effet, celles-ci ne disposent pas de proton échangeable sur leur site basique, et ce dernier est encombré stériquement par ses substituants.

Un marquage isotopique au deutérium pourrait, à titre d'exemple, permettre d'étayer cette hypothèse en vérifiant par analyse ESI-MS s'il y a bien un transfert hydrogène/deutérium entre l'alcool R'OH et l'imidazole par l'intermédiaire de la TMG.



**Figure 105.** Mécanisme réactionnel hypothétique de la formation d'un carbodiester à partir d'un alcool et d'un carbamate d'imidazole en présence de TMG.

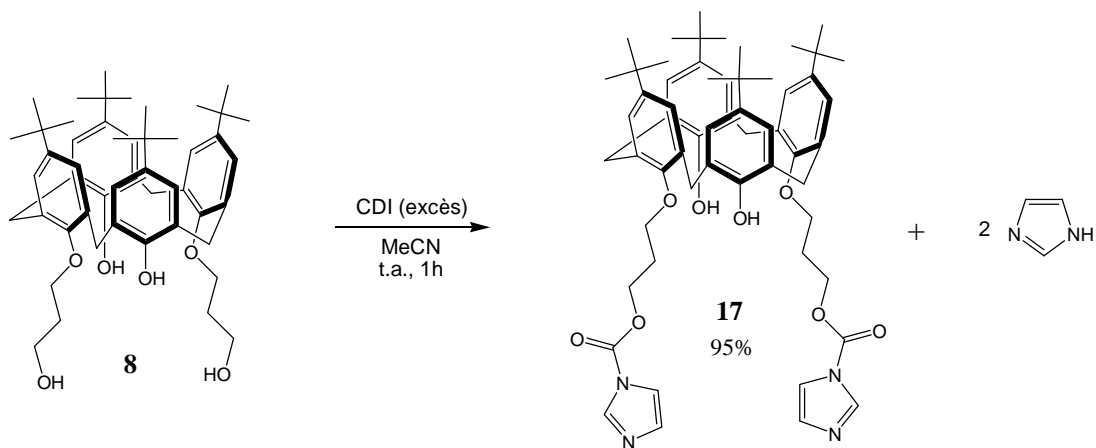
Le conjugué *t*Bu[4]OH-mono-aciclovir *N*-tritylé **20** n'a pu être obtenu qu'avec un faible rendement n'excédant pas 17%. Ce résultat reflète les nombreuses possibilités de réactions parasites en partie liées à la réactivité du –OH phénolique libre opposé au phénol substitué du calixarène. Il est donc probable que la sélectivité peut être améliorée en mettant en jeu une stratégie de protection-déprotection de ce groupe –OH phénolique.

#### IV.4.3. Conjugué calixarène-bis-aciclovir *N*-tritylé

##### ❖ Première étape : Carbamate d'imidazole 17.

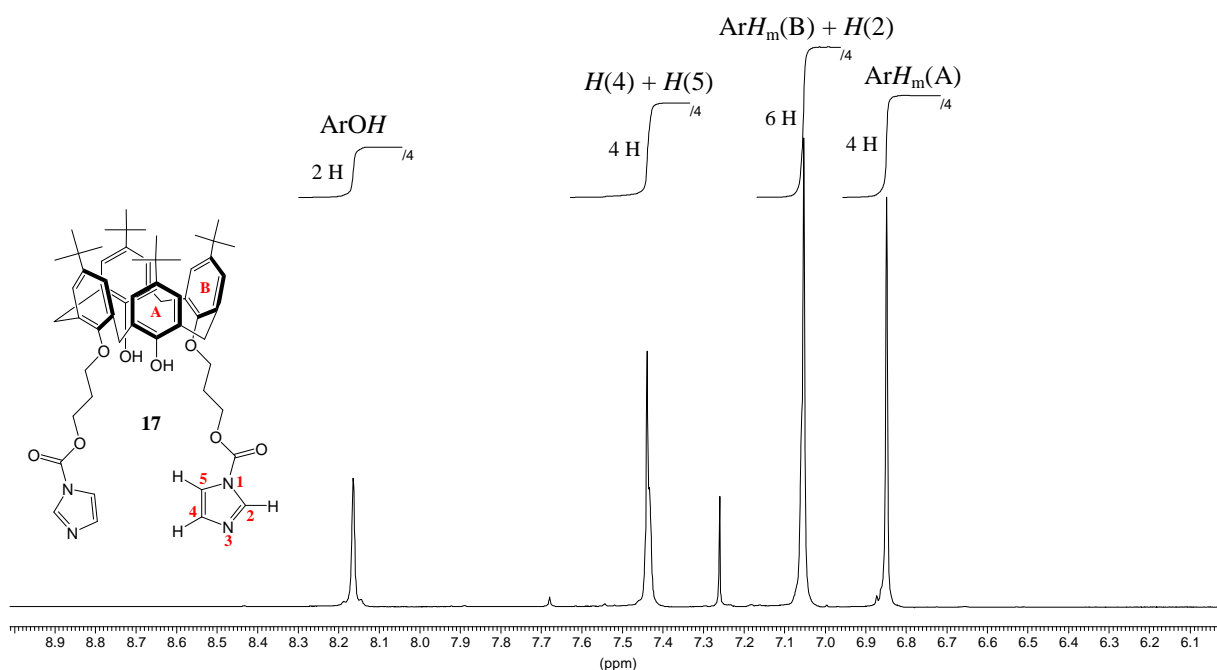
Nous allons voir que la synthèse du conjugué *t*Bu[4]OH-bis-aciclovir *N*-tritylé **21** s'est montrée plus aisée que celle de son analogue mono-substitué **20**. La faible réactivité des deux groupes –OH phénoliques libres, en partie basse du calixarène, en est sûrement la cause.

L'action d'un excès de CDI sur le calixarène **8** (3,2 éq. soit 1,6 éq. par fonction PrOH) conduit à la formation exclusive d'un seul nouveau composé **17** (Figure 106). Celui-ci s'est montré suffisamment stable pour être isolé et caractérisé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ .

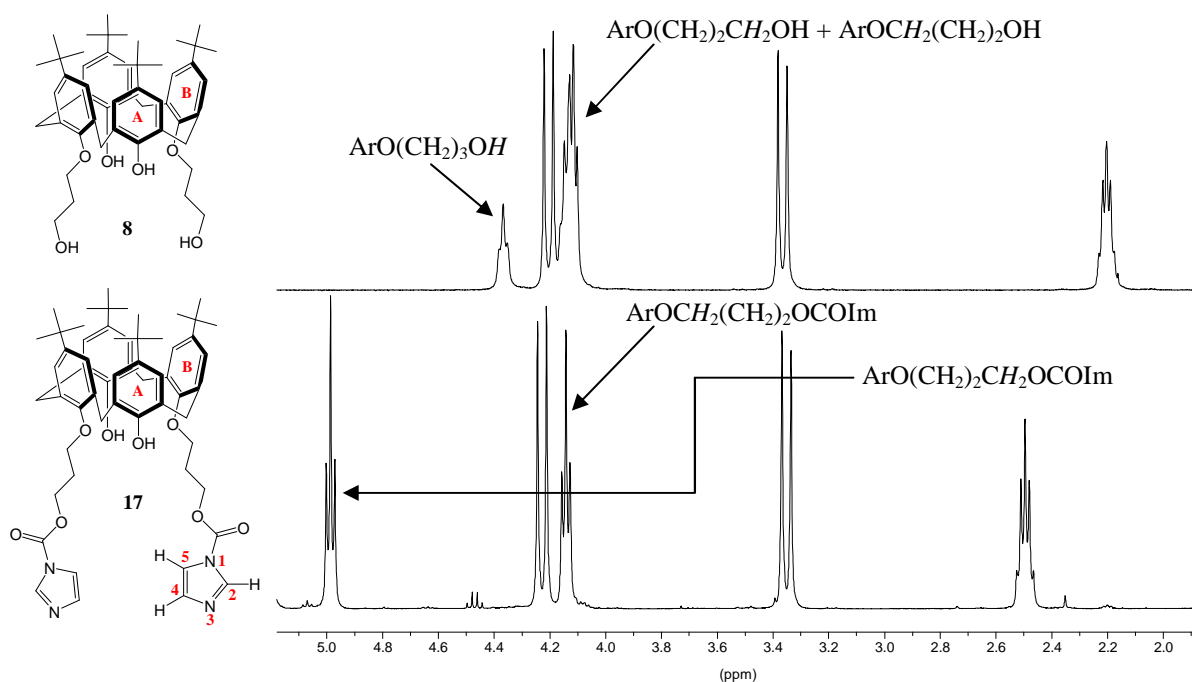


**Figure 106.** Schéma de synthèse du carbamate d'imidazole **17** à partir du synthon calixarène-bis-(3-hydroxypropyle) **8**.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'intermédiaire **17**, scindé en Figure 107 et 108, montre que nous avons bien obtenu le dérivé bis carbamate d'imidazole attendu.



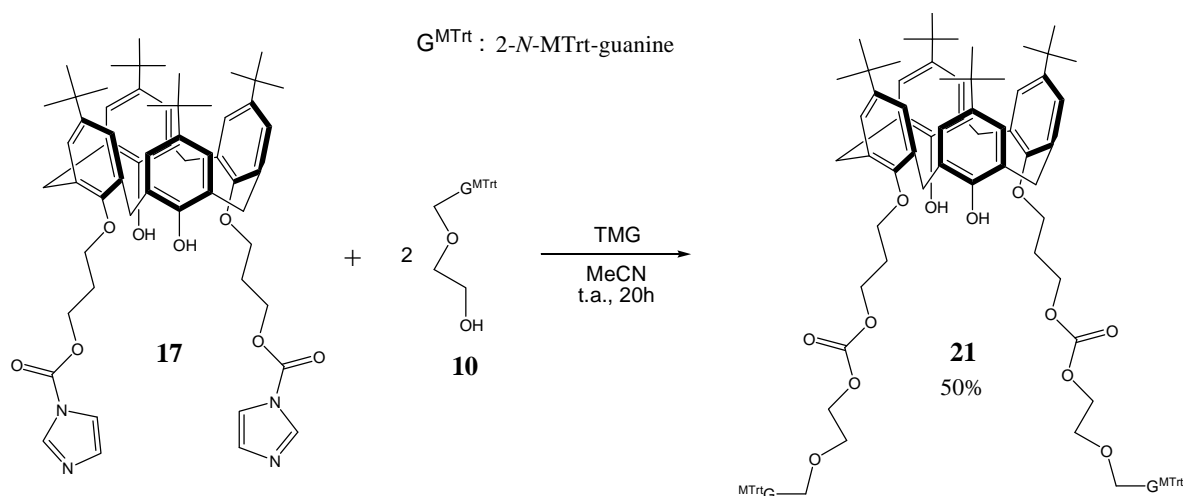
**Figure 107.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , t.a.) du composé **17**. Région des champs faibles (9-6 ppm).



**Figure 108.** Spectres RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , t.a.) des composés **8** (en haut) et **17** (en bas). Région des champs moyens à forts (5-2 ppm).

Les signaux correspondant aux hydrogènes du résidu imidazole, notés  $H(2)$ ,  $H(4)$  et  $H(5)$ , respectivement autour de 7,45, 7,05 et 7,45 ppm, ont été observés (Figure 107). La conservation du signal correspondant aux hydrogènes phénoliques notés  $\text{ArOH}$  ( $\sim 8,15$  ppm), et la disparition du signal triplet correspondant aux hydrogènes aliphatiques  $\text{PrOH}$  ( $\sim 4,35$  ppm), confirment que les carbamates ont été introduit à l'endroit voulu (Figure 108).

❖ Deuxième étape : Carbodiester **21**.

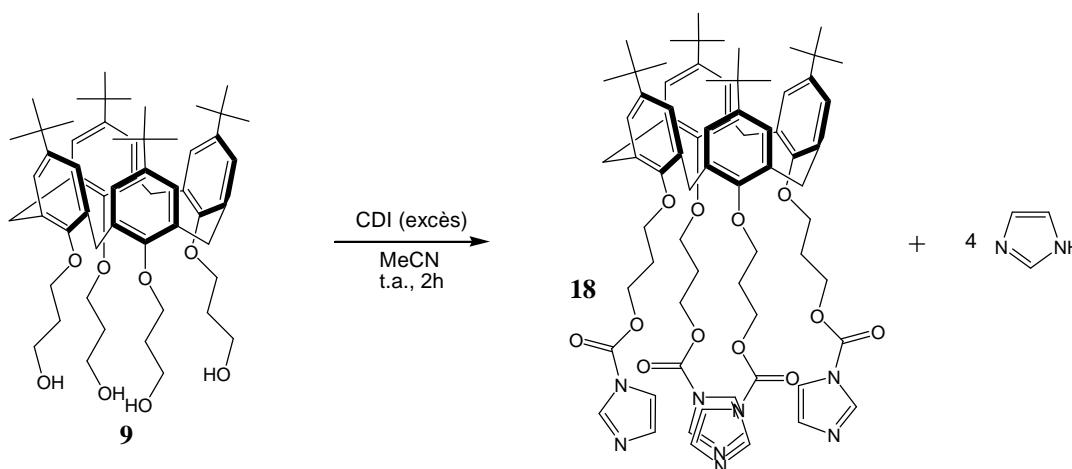


**Figure 109.** Synthèse du conjugué calixarène-bis-aciclovir *N*-tritylé **21**, en présence de TMG, à partir du calixarène bis-carbamate intermédiaire **17** et du synthon 2-*N*-MTrt-aciclovir **10**.

Afin d'éliminer le CDI en excès, l'intermédiaire **17** est lavé à l'eau. Le synthon d'aciclovir **10** est alors ajouté, le tout est solubilisé sous argon dans MeCN anhydre, et la TMG est ajoutée (Figure 109). Bien que les problèmes liés aux phénols libres rencontrés lors de la préparation du dérivé **20** ne se soient pas présentés dans ce cas ci, la réaction de couplage ne s'est pas révélée parfaitement sélective. Il a en effet été observé la formation d'autres produits non désirés. Nous n'avons pas procédé à l'isolement et à la caractérisation de tous les produits issus de réactions parasites, d'autant plus que **21** a ainsi pu être obtenu avec un bon rendement de 50%.

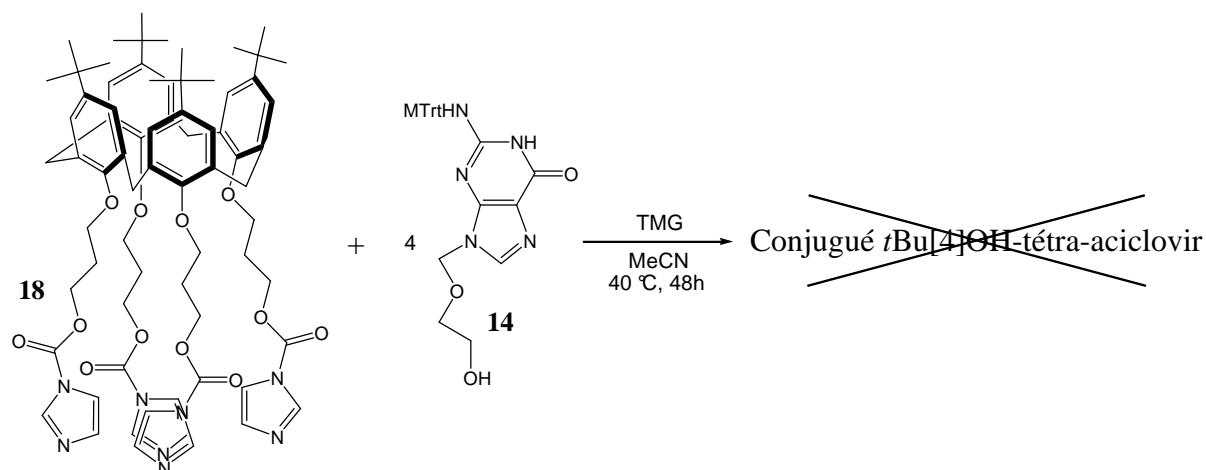
#### IV.4.4. Conjugué calixarène-tétra-aciclovir *N*-tritylé

Cette synthèse s'est montrée particulièrement délicate, et le conjugué tétra-aciclovir **22** n'a pas été obtenu. Malgré cela, c'est un cas intéressant d'un point de vue chimique, et il a été jugé pertinent de le présenter.



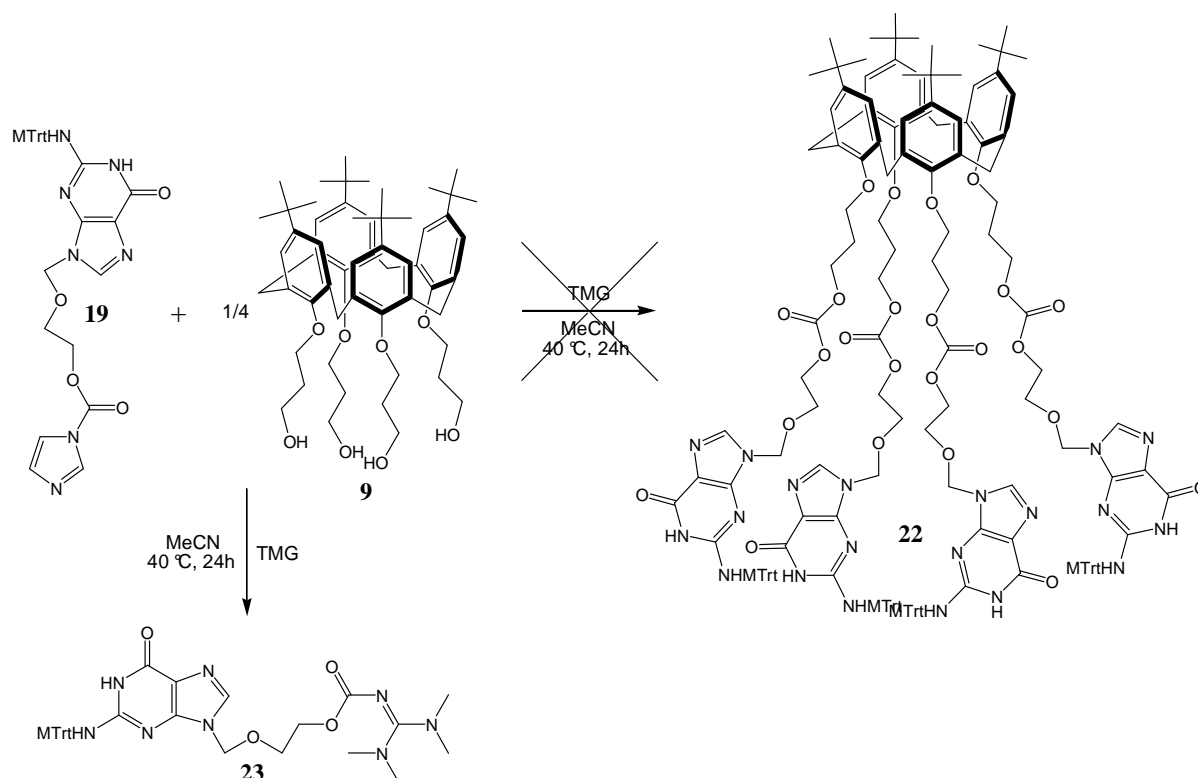
**Figure 110.** Synthèse du calixarène intermédiaire tétra-carbamate d'imidazole **18**, à partir du synthon tétra-*O*-(3-hydroxy-propyle) **9**.

Selon la stratégie appliquée pour les conjugués mono- et bis-aciclovir, l'intermédiaire calixarénique tétra-carbamate d'imidazole **18** a été obtenu sans problème particulier (Figure 110). En revanche, le couplage avec 4 équivalents du synthon d'aciclovir **10** n'a jamais été total (Figure 111). Le composé le plus avancé ayant pu être isolé est un dérivé calixarène-tris-aciclovir.



**Figure 111.** Schéma de synthèse infructueuse du conjugué **22**.

Face à la difficulté d'obtention du conjugué tétra- **22** comme décrit ci-dessus, nous avons entrepris de tester la stratégie inverse (Figure 112), à savoir la préparation en premier lieu du carbamate d'imidazole d'aciclovir **19** suivi par l'ajout du calixarène tétra-*O*-(3-hydroxy-propyle) **9**.

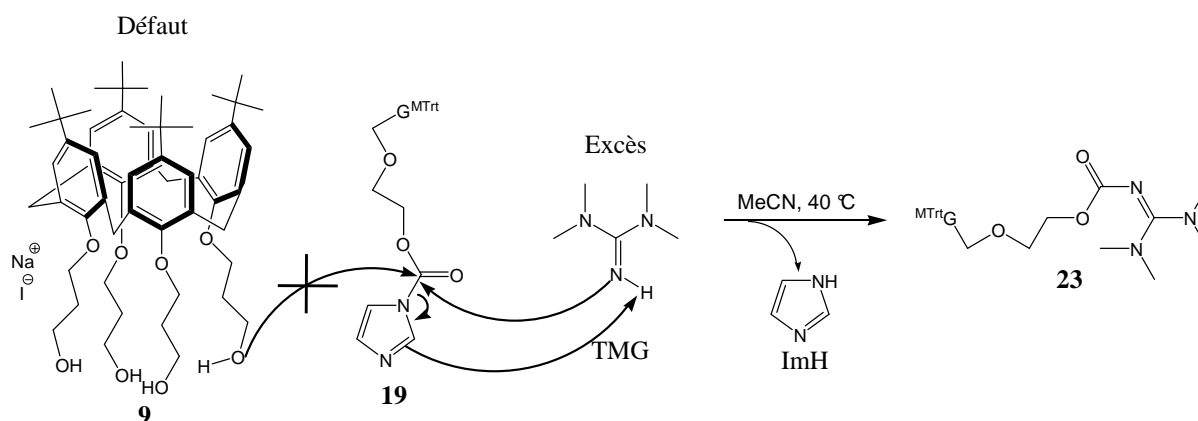


**Figure 112.** Seconde voie de synthèse de **22**, testée à partir de l'aciclovir carbamate d'imidazole **19** et du synthon calixarène tétra-*O*-(3-hydroxy-propyle) **9**. Formation d'un nouveau composé **23** indésirable.

Après 24 heures de réaction à 40 °C, nous avons observé un abondant précipité blanc isolé par filtration, pur sur CCM. Les analyses par RMN  $^1\text{H}$  et MS-ESI (mode positif) ont montré que nous étions en présence de l'aciclovir carbamate de TMG noté **23** en Figure 112 et 113.

L'identification d'une telle réaction parasite nous a mis sur la voie pouvant expliquer, en partie, le faible rendement observé lors de la synthèse du conjugué mono-aciclovir **20**. Cette question sera approfondie prochainement.

Notons que les difficultés rencontrées lors de cette synthèse peuvent aussi être en partie la conséquence de la présence d'un équivalent de NaI associé au calixarène **9**. Il peut être supposé que le déroulement de la réaction puisse être perturbé, d'une part en raison de  $\text{Na}^+$  probablement complexé par le calixarène **9**, et d'autre part en raison de la présence de I possédant un caractère nucléophile potentiellement exalté si son contre-ion  $\text{Na}^+$  est complexé (virtuellement plus mou).

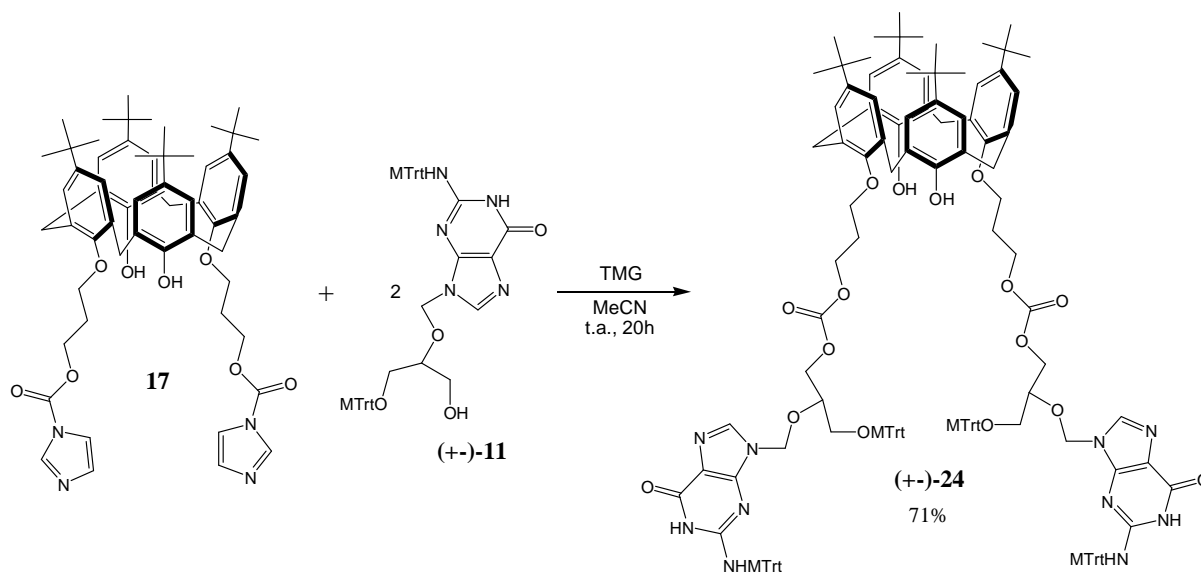


**Figure 113.** Proposition d'un mécanisme conduisant à la formation de l'aciclovir carbamate de TMG **23** à partir de l'aciclovir carbamate d'imidazole **19**, en présence d'un large excès de TMG.

#### IV.4.5. Conjugué calixarène-bis-ganciclovir *N,O*-tritylé

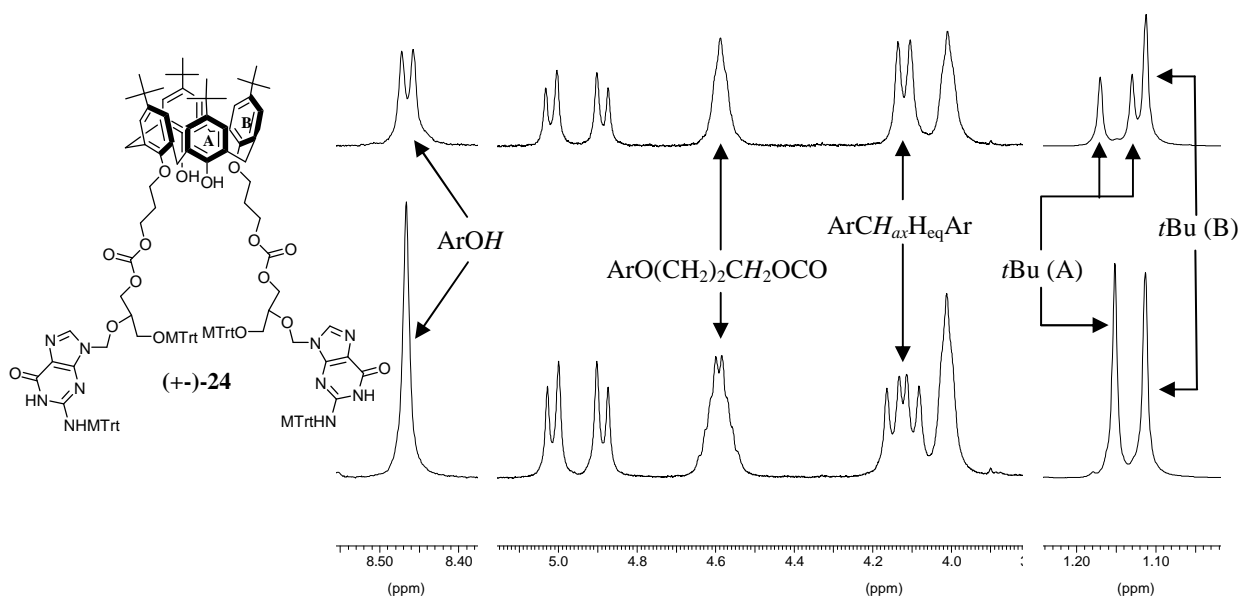
A l'instar du conjugué bis-aciclovir **21**, la préparation du conjugué calixarène-bis-ganciclovir *N,O*-tritylé **24** s'est déroulée, d'un point de vue synthétique, sans difficulté majeure. Celui-ci a été obtenu avec un bon rendement de 71% (Figure 114). Cependant, le caractère asymétrique du synthon de ganciclovir (+)-**11** évoqué dans la partie concernant sa synthèse a pour conséquence la formation d'un couple d'énantiomères et d'un composé *méso*.





**Figure 114.** Synthèse du conjugué calixarène-bis-ganciclovir *N,O*-tritylé **24**, en présence de TMG, à partir du calixarène bis-carbamate intermédiaire **17** et du synthon racémique 2-*N*,3'-*O*-bis-MTrt-ganciclovir (+-)-**11**.

Les calixarènes (*R,R*)-bis-ganciclovir (ou *S,S*) et (*R,S*)-bis-ganciclovir (composé *méso*) sont facilement discernables sur CCM et ont donc été isolés. Comme indiqué en Figure 115, l'analyse par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  des diastéréoisomères *R,R* (ou *S,S*) et *R,S* a révélé une forte influence de la chiralité du ganciclovir sur la structure de la plate-forme calixarénique.



**Figure 115.** Spectres RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , t.a.) de deux diastéréoisomères du conjugué *t*Bu[4]OH-bis-ganciclovir **24**.

On peut distinguer pour un stéréoisomère le dédoublement des signaux correspondant aux phénols libres notés  $\text{ArOH}$  ( $\sim 8,45$  ppm) et aux groupes *tert*-butyle **A** (entre 1,12 et 1,17 ppm).

Pour l'autre stéréoisomère, ces signaux restent sous la forme de singulets, tandis que se dédouble le demi-système AB correspondant aux hydrogènes axiaux notés  $\text{ArCH}_{\text{ax}}\text{H}_{\text{eq}}\text{Ar}$  ( $\sim 4,16$  ppm). Un des signaux correspondant au *spacer* propylique  $\text{ArO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OCO}$  ( $\sim 4,59$  ppm) se retrouve également dédoublé.

Il est surprenant de voir à quel point la chiralité du ganciclovir, relativement éloignée du système macrocyclique, peut avoir de telles répercussions sur la structure du calixarène.

La spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  nous a donc permis de différencier ces deux composés géométriquement différents, mais sans pour autant pouvoir affirmer lequel était l'isomère optiquement actif ou l'isomère *méso*. S'il avait été nécessaire de les identifier, plusieurs méthodes sont envisageables :

- Certaines séquences de spectroscopie RMN bidimensionnelle comme la NOESY pourraient être utiles en révélant les couplages H-H dans l'espace.
- La synthèse du stéréoisomère R,R (ou S,S) pourrait être entreprise, en effectuant au préalable la résolution optique du synthon (+-)-**11**. L'estérification de ce synthon avec un acide chiral et optiquement pur, comme un aminoacide *N*-Boc à chaîne latérale inerte (Valine ?), conduirait à la formation de diastéréoisomères théoriquement séparables. Une simple saponification permettrait alors d'isoler les deux énantiomères (**R**)-**11** et (**S**)-**11**, qui seraient séparément engagés dans un double couplage avec le calixarène bis-*O*-(3-hydroxy-propyle) **8**.

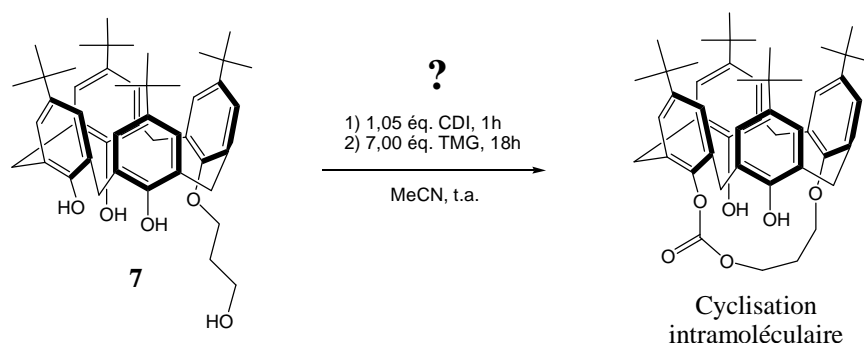
Lors du couplage entre le synthon (+-)-**11** et le calixarène **8**, l'absence d'induction asymétrique conduit à un mélange proportionné en chacune des entités. Nous avons donc choisi de ne pas séparer les différents stéréoisomères, et d'utiliser le mélange « racémique » pour la déprotection dans l'immédiat, puis les études à l'interface eau-air.

#### IV.4.6. Réaction parasite

Lors de la synthèse des différents conjugués *t*Bu[4]OH-antiviral, nous avons observés par CCM la formation de plusieurs sous-produits. Nous supposons que les groupements –OH

phénoliques du calixarène peuvent être réactifs vis-à-vis du CDI, puis des carbamates d'imidazole intermédiaires. Cette situation est particulièrement problématique avec la synthèse du conjugué mono-aciclovir **20**, pour laquelle nous n'avons obtenu que des rendements inférieurs à 20%. Nous avons donc choisi d'étudier le cas du conjugué **20**, utilisé comme modèle.

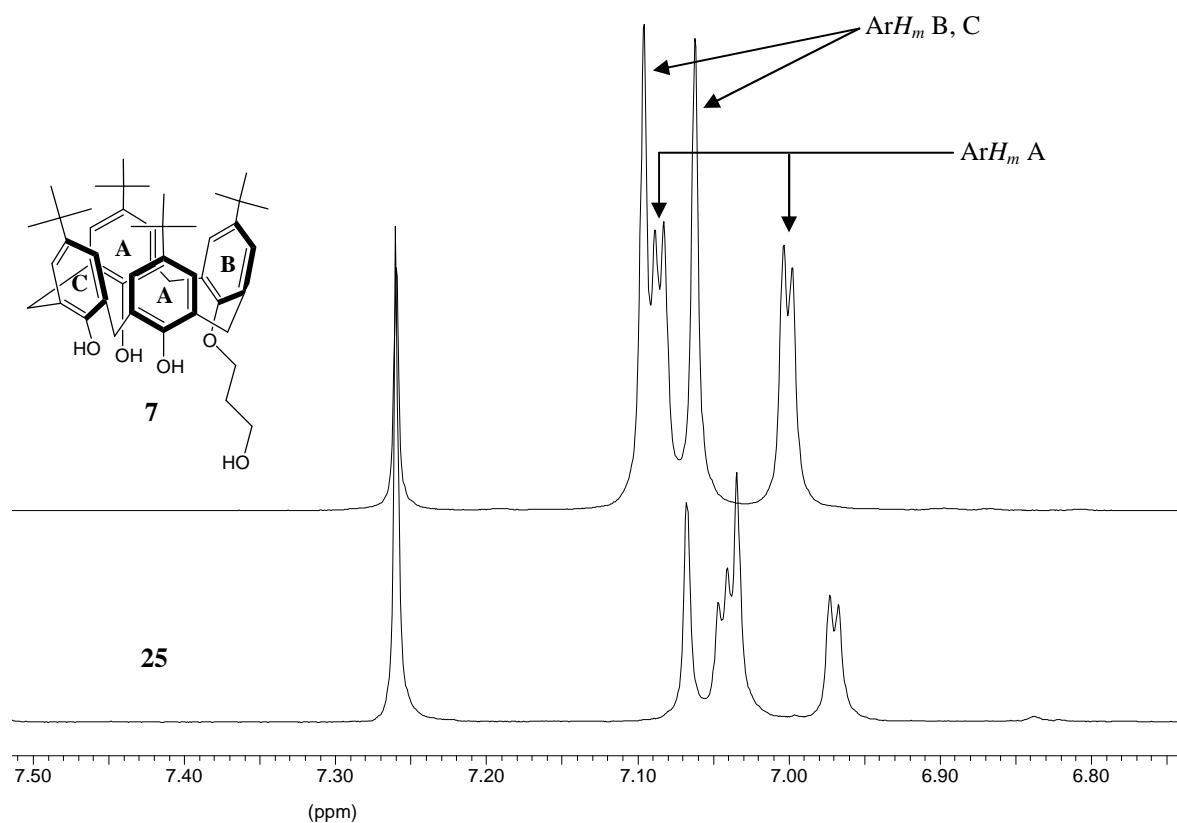
Le dérivé **7** a été mis en réaction avec 1,05 équivalent de CDI dans MeCN anhydre à température ambiante et sous argon. Au bout d'une heure, **7** est presque consommé au profit du mélange représenté en Figure 102 B (CCM). La TMG est alors ajoutée (~7 éq.) au milieu réactionnel, et maintenu sous argon à température ambiante durant 22 heures. Comme indiqué en Figure 116, nous supposons provoquer une cyclisation intramoléculaire des espèces  $\alpha$  et  $\beta$  présentées précédemment en Figure 103.



**Figure 116.** Supposition d'une cyclisation intramoléculaire du dérivé **7** par le CDI en présence de TMG.

Il a effectivement été observé par CCM la formation très majoritaire d'un nouveau produit. Ce composé, noté **25**, a été isolé et analysé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ , dont le spectre correspondant est donné de façon séquencée en Figures 117, 118 et 119.

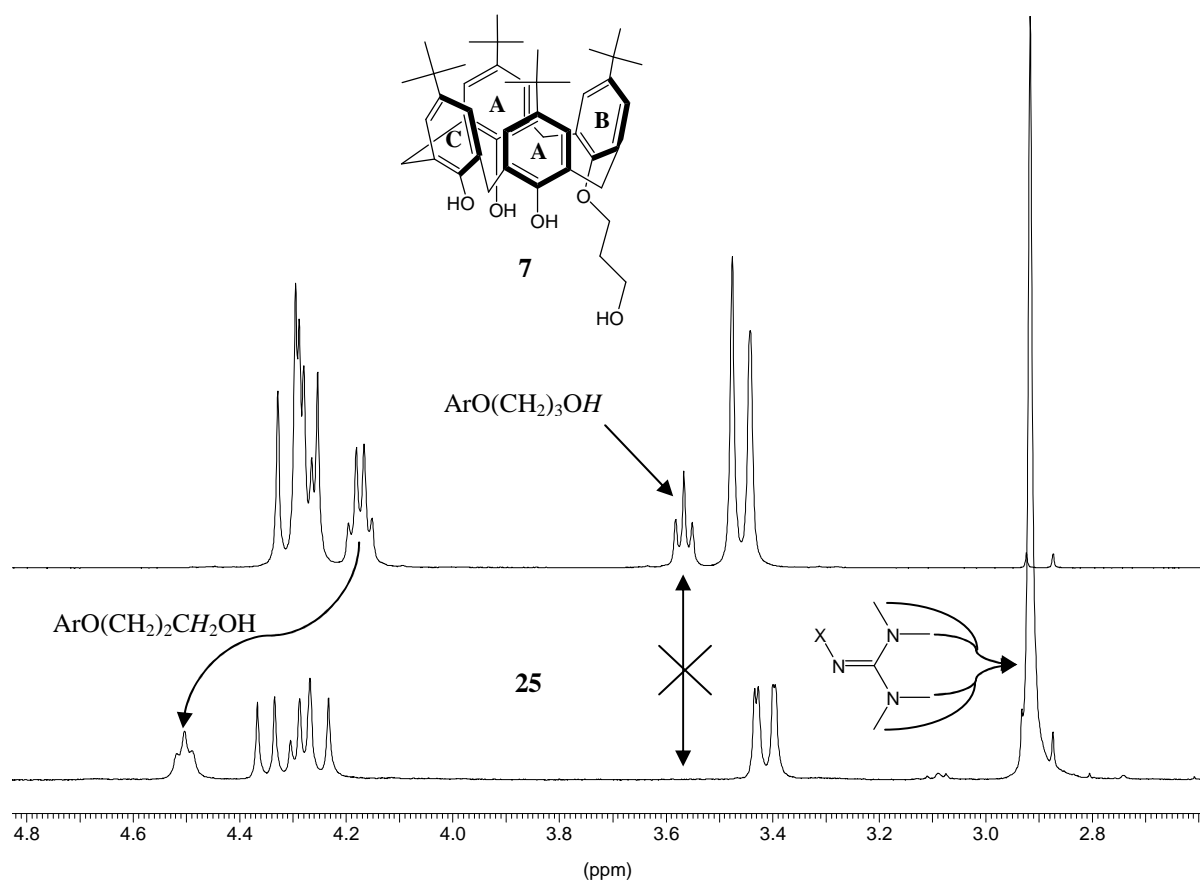
Par comparaison avec le spectre de **7**, on observe chez **25** la conservation du système AX correspondant aux protons aromatiques en position *mé*ta des phénols libres notés **A** (Figure 117,  $\text{Ar}H_m \text{A}$ ). Ce couplage entre les protons  $\text{Ar}H_m \text{A}$  côté **B** et  $\text{Ar}H_m \text{A}$  côté **C** indique la non-équivalence des phénols notés **B** et **C**. Cette non-équivalence est confirmée par la distinction en deux singulets des groupes *t*Bu correspondants (non présenté). Nous sommes donc en présence, soit d'un analogue de **7**, soit d'un dérivé *O*-substitué sur le phénol noté **C**.



**Figure 117.** Comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , t.a.) des composés **7** (en haut) et **25** (en bas). Région spectrale des champs faibles (7,6-6,8 ppm).

La zone spectrale des champs moyens (Figure 118) a apporté des informations capitales sur la structure moléculaire de **25**. Le signal singulet autour de 2,90 ppm, intégrant pour 12 H, est caractéristique des groupes méthyles de la TMG.<sup>195</sup> D'autre part, on peut observer de **7** vers **25** la disparition du signal vers 3,55 ppm intégrant pour 1 H, correspondant au groupe  $-\text{OH}$  aliphatique de **7**, caractérisé par un triplet selon un couplage en  $J^3$  avec le groupe méthylène voisin. Ceci indique la substitution chez **25** du groupe  $-\text{OH}$  aliphatique. Cette déduction est confirmée par l'allure du signal correspondant au groupe méthylène  $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OX}$ , passant d'un quadruplet chez **7** à un triplet chez **25**. Notons que ce signal se trouve nettement déblindé chez **25**, tandis que le signal correspondant au méthylène aryléther  $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OX}$ , confondu avec le demi système AB des  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$  axiaux ( $\sim 4,3$  ppm), se trouve quant-à lui peu modifié par comparaison avec **7**.

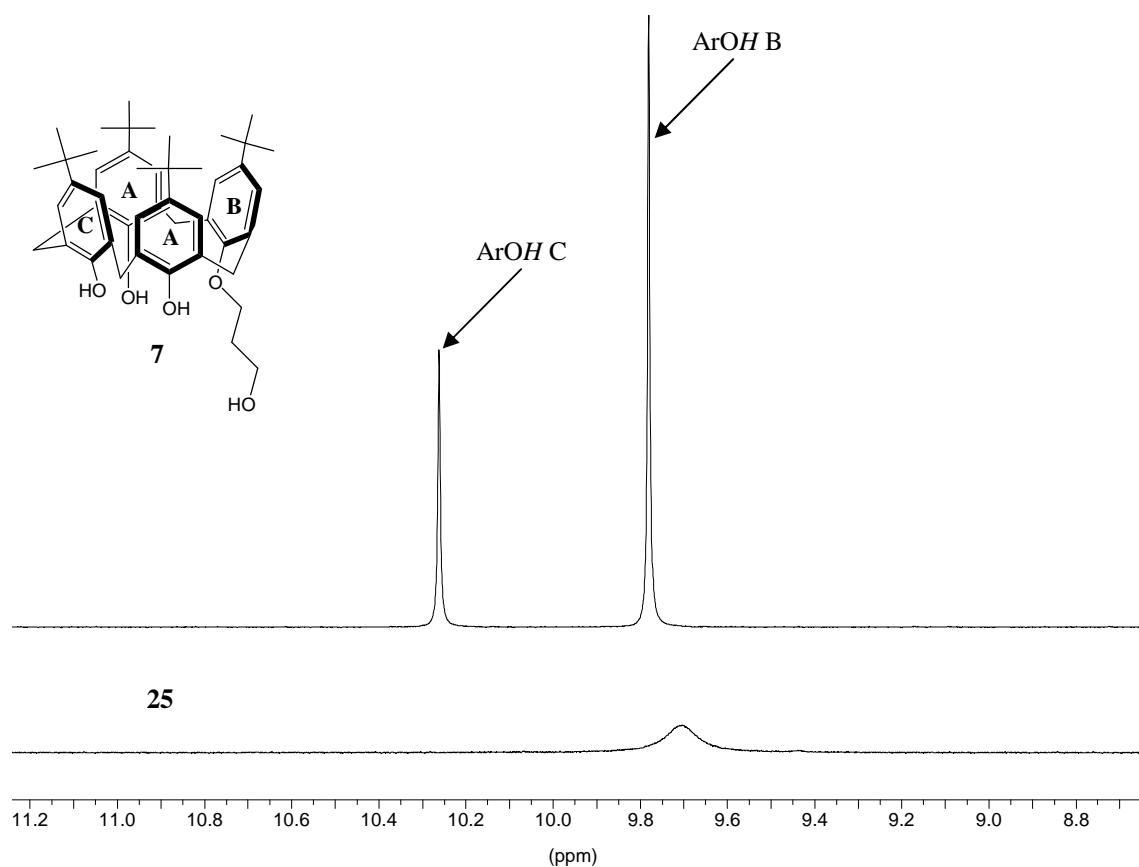
Nous en avons donc conclu que l'entité **25** est constituée d'un résidu TMG fixé de façon covalente au groupe hydroxyle aliphatique.



**Figure 118.** Comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , t.a.) des composés **7** (en haut) et **25** (en bas). Région spectrale des champs moyens (4,7-2,7 ppm).

Enfin, la zone des champs faibles (Figure 119) donne des indications intéressantes, mais difficiles d'interprétation, concernant les groupes  $-\text{OH}$  phénoliques du calixarène **25**. Par comparaison avec le spectre du dérivé **7**, la disparition du signal vers 10,25 ppm correspondant à l'hydroxyle  $\text{ArOH}$  noté **C** semble indiquer que celui-ci se trouve désormais substitué chez **25**. Or, l'allure élargie du signal vers 9,70 ppm et son intégration imprécise (2-3 H) suggèrent que ce groupe  $\text{ArOH}$  **C** est encore présent, mais avec une certaine mobilité le confondant avec les deux autres groupes  $\text{ArOH}$ .

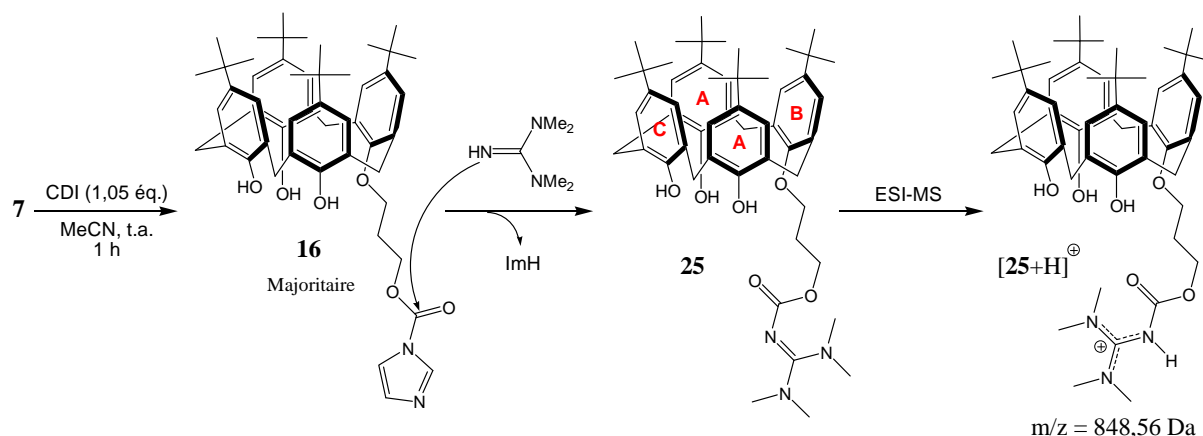
Nous proposons donc que les trois groupes  $\text{ArOH}$  de **25** soient engagés dans un système de liaisons H inexistant chez **7**, pour lequel les hydroxyles  $\text{ArOH}$  **A** et **C** sont clairement discernables.



**Figure 119.** Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, t.a.) des composés **7** (en haut) et **25** (en bas). Région spectrale des champs faibles (11,2-9,2 ppm).

Les résultats RMN <sup>1</sup>H présentés en Figure 117, 118 et 119 suggèrent donc que le carbamate d'imidazole **16** a subi une attaque nucléophile de la TMG présente en excès, pour former le calixarène carbamate de TMG correspondant noté **25** (Figure 120). Cette première hypothèse est supportée par des données de la littérature reportant la possibilité de produire des dérivés 4,*N*-acylés de la TMG, par des réactions de substitution ou d'addition.<sup>196</sup> L'analyse en spectrométrie de masse ESI (mode positif) de l'entité **25** a en effet montré la présence d'un unique ion monochargé de masse  $m/z = 848,56$  Da, attribué au composé  $[\mathbf{25}+\text{H}]^+$  en Figure 120.

L'analyse structurale de **25** aurait pu être approfondie par d'autres mesures RMN telles que la RMN <sup>13</sup>C ou certaines séquences à 2 dimensions, notamment pour éclaircir l'état des hydrogènes phénoliques. A titre d'exemple, une analyse RMN <sup>1</sup>H à basse température pourrait permettre de figer le système dans un état donné, et ainsi de mieux discerner ces hydrogènes mobiles.



**Figure 120.** Hypothèses émises concernant l'entité **25** suite aux observations faites en spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et en spectrométrie de masse ESI (mode positif).

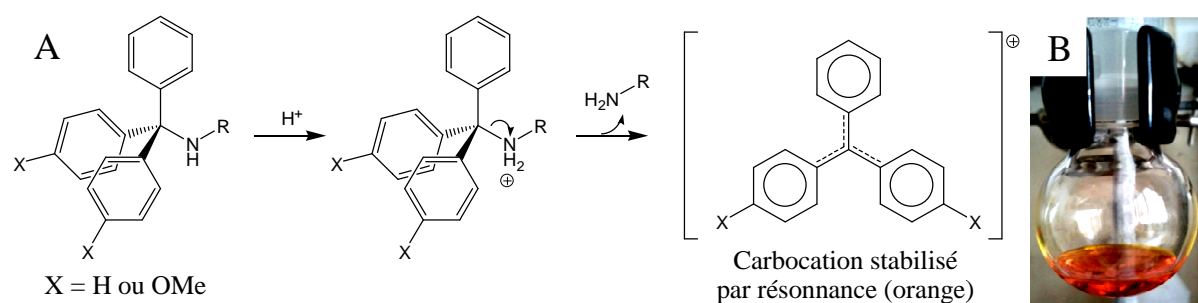
Il n'a donc pas clairement été établi que l'hydroxyle phénolique  $\text{ArOH C}$  de **7** peut être réactif dans les conditions de couplage employées. Cependant, nous avons mis en lumière une réaction parasite liée au caractère nucléophile de la base TMG. Nous avons en effet montré que le résidu imidazole du carbamate **16** peut être substitué par la TMG en générant un carbamate stable. D'autre part, ces résultats semblent indiquer que l'espèce majoritaire  $\alpha$  (Figure 102, B), formée après l'action de 1,05 éq. de CDI sur le synthon **7**, soit le carbamate d'imidazole **16** recherché.

L'existence de cette réaction parasite peut expliquer la formation de sous-produits lors de la synthèse du conjugués *t*Bu[4]OH-bis-aciclovir **21**. De plus, lors des tentatives de synthèse du conjugué *t*Bu[4]OH-tétra-aciclovir **22**, l'isolement du sous-produit **23** confirme que le caractère nucléophile de la TMG est à prendre en considération.

#### IV.4.7. Cleavage des groupes protecteurs

##### ❖ Généralités et mise au point.

Les groupes protecteurs de la famille des trityles (Trt) sont généralement éliminés en condition acide fort, en présence d'un quencheur de carbocation. En effet, la rupture acide de la liaison  $\text{N-CPh}_3$  ou  $\text{O-CPh}_3$  conduit transitoirement à la formation d'un carbocation triphénylméthylum, facilement identifiable par sa vive coloration orange (Figure 121, B). Celui-ci est particulièrement stable en raison de la délocalisation de la charge positive dans les trois cycles aromatiques.



**Figure 121.** Détritylation d'une amine primaire en milieu acide fort. Schéma réactionnel conduisant à la formation d'un carbocation triphénylméthylum (A). Photographie du milieu réactionnel après acidification (B).

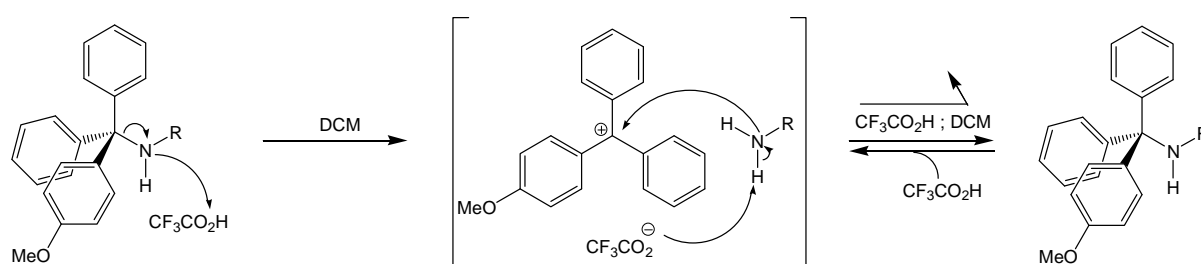
La labilité de ces groupes protecteurs peut être modulée par l'incorporation de substituants électro-donneurs ou attracteurs, stabilisant ou déstabilisant ce carbocation. Par conséquent, un groupe mono-*p*-méthoxytrityle (MTrt) sera plus labile qu'un groupe trityle (Trt), le caractère mésomère donneur du substituant méthoxy en position *para* d'un des phényles stabilisant d'autant plus le carbocation. Différentes conditions de cleavage de ces groupes trityles sont décrites dans la littérature.<sup>197, 198</sup>

Généralement, les acides employés sont l'acide acétique ou ses analogues halogénés. Martin et coll. utilisent un acide minéral, l'acide chlorhydrique, en milieu aqueux.<sup>176, 177</sup> Cette éventualité a dès le départ été éliminée afin d'éviter un risque d'hydrolyse acide de la fonction carbodiester, préférant l'emploi d'acides organiques ne nécessitant pas de conditions aqueuses, tels que les acides acétique (AA), dichloroacétique (DCA) et trifluoroacétique (TFA).

Ces trois acides ont d'abord été testés séparément sur le conjugué bis-aciclovir **21**. Après dissolution dans le DCM distillé sur CaH<sub>2</sub>, quelques gouttes d'acide sont ajoutées au milieu. Dans le cas de l'acide AA, aucune observation n'a été faite, et un suivi CCM a montré la stabilité du composé **21** dans ces conditions, même après plusieurs heures. En revanche, dans le cas des acides DCA et TFA, nous avons immédiatement observé l'apparition d'une intense coloration orange, signalant la formation du carbocation tritylium. Le suivi CCM a confirmé dans chacun de ces deux cas la disparition du conjugué **21** au profit d'un produit plus polaire. Pour des raisons pratiques, nous avons sélectionné le TFA comme acide de cleavage. Celui-ci, de point d'ébullition plus faible que le DCA, est en effet plus facilement éliminable par évaporation.



Le TFA est donc éliminé par co-évaporation avec le DCM. Le résidu huileux contenant encore du TFA est repris dans le DCM pour subir une nouvelle évaporation, cette procédure étant répétée plusieurs fois jusqu'à obtenir un résidu solide. Il est intéressant de remarquer que plus le TFA est éliminé au fil des co-évaporations, plus la coloration orange s'estompe, finissant par disparaître. Un contrôle CCM a montré à cet instant que le système était revenu à son état initial, démontrant la nécessité de piéger le carbocation  $MTrt^+$  (Figure 122). Il a effectivement été montré que la formation du tritylium est réversible, selon une réaction équilibrée décrite par l'Equation n° 22.<sup>198</sup>



**Figure 122.** Equilibre réactionnel mis en jeu entre rupture et formation de la liaison NH-MTrt en présence de TFA.

$$\frac{[RNHMTrt]}{[RNH_2]} = \frac{[MTrt^+ A^-]}{[AH] \cdot K_{eq}} \quad 197$$

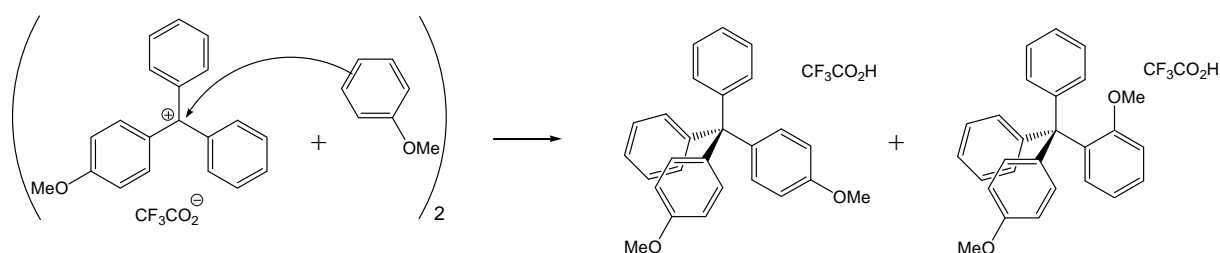
où  $[RNHMTrt]$  et  $[RNH_2]$  sont respectivement les concentrations en l'amine protégée et l'amine libre,  $[AH]$  la concentration en acide, et  $[MTrt+A^-]$  la concentration en carbocation tritylium. Le terme  $K_{eq}$ , représentant la constante d'équilibre, est un composant adimensionnel.

#### Equation n° 22.

Le premier quencheur à avoir été testé est le méthanol MeOH. Celui-ci s'est montré très efficace, faisant disparaître en quelques secondes la coloration orange du mélange acide. Cependant, cette coloration est progressivement réapparut lors des premières co-évaporations, indiquant que le processus piégeant le tritylium est probablement équilibré lui aussi. Tant que l'acidité est présente, le MeOH étant plus volatile que le TFA, le simple fait de l'évaporer doit le régénérer selon le principe de Le Chatelier. Il est donc essentiel de produire une réaction irréversible avec ce carbocation, non équilibrée, pour pouvoir le piéger efficacement.

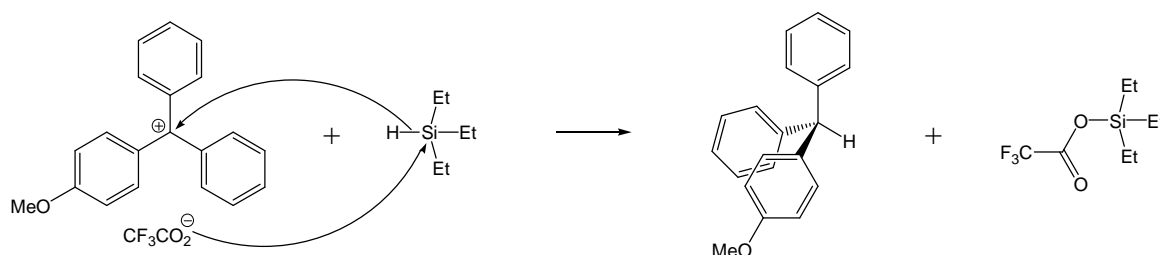
Dans le cadre de la synthèse d'oligonucléotides, Garland et coll. ont répertorié plusieurs quencheurs mettant en jeu des réactions irréversibles.<sup>198</sup> Parmi les différentes substances utilisées pour piéger le carbocation tritylium, on peut distinguer deux catégories :

- Les composés aromatiques électro-enrichis tels que les indoles et les pyrroles ou encore l'anisole (Figure 123). Ceux-ci piègent le carbocation tritylium par substitution électrophile aromatique avec création d'une liaison C-C.



**Figure 123.** Carbocation tritylium piégé par l'anisole selon une réaction de substitution électrophile aromatique.

- Certains composés donneurs d'hydrures tels que les trialkyl- ou triarylsilanes et stannanes (Figure 124). Ceux-ci piègent le carbocation tritylium par transfert d'hydrure avec création d'une liaison C-H.



**Figure 124.** Carbocation tritylium piégé par le triéthylsilane (TES) selon un transfert d'hydrure. Mécanisme réactionnel supposé impliquant la formation de trifluoroacétate de silanol.

Notons que certains articles de la littérature reportent également l'emploi de divers nucléophiles soufrés comme les thiols. Ceux-ci n'étant évidemment pas commode à manipuler en raison de leur forte odeur nauséabonde, nous avons dès le départ éliminé ces candidats.

Dans notre cas, les composés aromatiques comme l'anisole se sont révélés peu efficaces pour piéger le carbocation  $MTr^+$ . Ceci est en accord avec les résultats de Garland, classant ce type de composé parmi les moins efficaces.

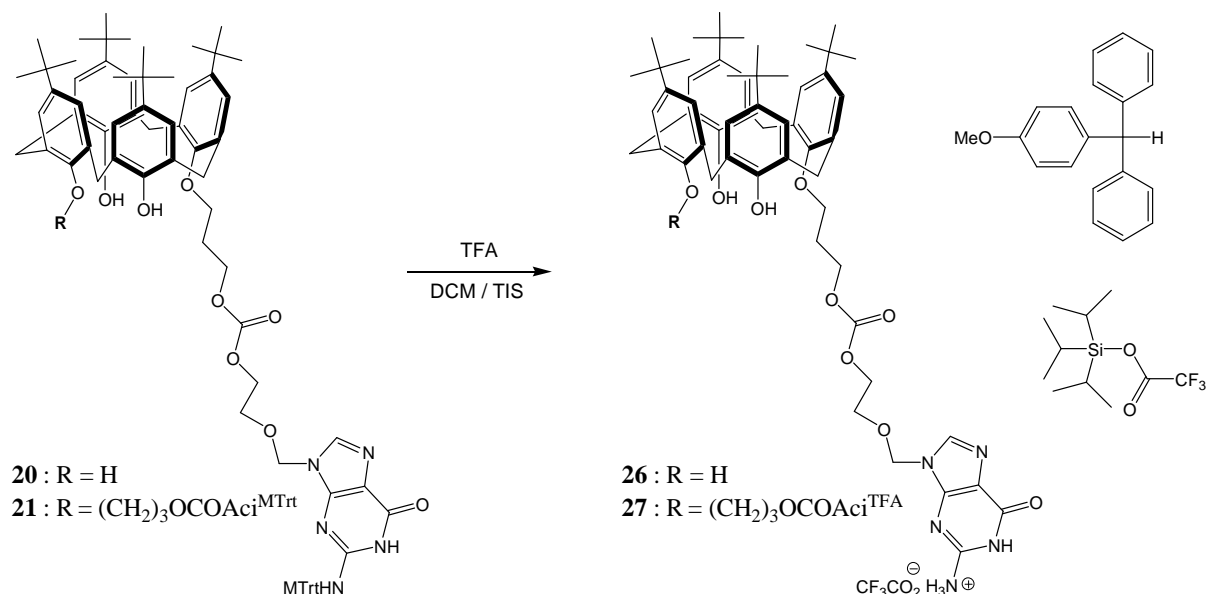
A l'inverse, les donneurs d'hydrure testés, comme le triéthylsilane (TES) et le triisopropylsilane (TIS), ont montré une excellente réactivité vis-à-vis du carbocation  $MTrt^+$ . L'ajout d'un excès de TES au milieu acide entraîne une décoloration quasi immédiate, indiquant la disparition du carbocation  $MTrt^+$ . Soucieux de mieux contrôler la réaction, nous avons par la suite utilisé le TIS, légèrement moins réactif que le TES du fait d'un encombrement stérique un peu plus important. Nous avons observé que le TES piège le carbocation en une quinzaine de minutes.

❖ Déprotection des conjugués d'aciclovir **20** et **21**.

Comme pour les conjugués calixarène-quinolone (Cf. Chapitre III), une attention particulière a été portée sur la purification des produits avant et après déprotection, et sur l'obtention de substance à l'état solide sous forme d'une poudre manipulable.

Les conjugués mono- ou bis-aciclovir *N*-tritylés **20** ou **21** sont donc solubilisés dans un mélange DCM / TIS, avant l'ajout de TFA. Après disparition progressive de la coloration orange indiquant la fin de la réaction, le solvant est évaporé et le TFA co-évaporé par le DCM pour donner les conjugués mono- ou bis-aciclovir finaux **26** ou **27** (Figure 125). Dans le cas de **27**, un simple lavage par le pentane du résidu vitreux obtenu permet à la fois de cristalliser le produit d'intérêt et d'éliminer par filtration l'excès de TIS et les sous-produits apolaires. Le conjugué mono- **26** s'est révélé quant-à lui soluble dans le pentane, mais suffisamment apolaire et bien résolu sur CCM pour être chromatographié. Il est obtenu sous la forme d'une poudre en laissant cristalliser pendant 24 heures une solution de **26** dans MeCN à 4 °C.

Les masses obtenues après déprotection, ainsi que les analyses élémentaires et de spectrométrie de masse ESI ont suggéré l'obtention de sels de trifluoroacétates. Une analyse par spectroscopie RMN du fluor  $^{19}F$  a permis de confirmer cette hypothèse, avec l'apparition d'un signal unique autour de -74 ppm et caractéristique des trifluoroacétates. En effet, les formes acide et basique du TFA sont facilement discernables en RMN  $^{19}F$ , où la forme acide ( $CF_3CO_2H$ ) apparaît autour de -78 ppm tandis que la forme basique ( $CF_3CO_2^-$ ) apparaît autour de -74 ppm.



**Figure 125.** Acidolyse des groupes protecteurs MTTr chez les conjugués calixarène-mono- et bis-aciclovir **20** et **21**. Obtention des espèces finales **26** et **27**.

Le conjugué **27** a donc été obtenu accompagné de deux molécules de TFA. Il est en revanche surprenant de constater après analyse élémentaire que le conjugué **26** n'a pas été obtenu sous la forme d'un sel stoechiométrique, mais sous la forme d'un héli-TFA (Cf. *Partie Expérimentale*). La base hétérocyclique guanine de **26** n'est donc que partiellement ionisée. Nous supposons donc l'existence de dimères, voire de multimères, se partageant un proton H<sup>+</sup> pour deux guanines.

Les deux conjugués mono- **26** et bis-aciclovir **27** à l'état final ont ainsi été obtenus sous la forme désirée, et avec d'excellents rendements de déprotection compris entre 85 et 95%.

❖ Déprotection du conjugué bis-ganciclovir (+-)-**24**.

La déprotection du conjugué *t*Bu[4]OH-bis-ganciclovir (+-)-**24** en mélange racémique a été effectuée dans des conditions similaires à celles employées pour son analogue bis-aciclovir **21**. Nous avons cependant été confrontés à une réaction parasite inattendue.

Les premières analyses RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C n'ont pas clairement révélé d'anomalies. C'est en spectrométrie de masse que nous avons constaté la présence d'une impureté en quantité non négligeable et notée **29**, de masse supérieure à celle du produit **28** attendu (Figure 126). Plus particulièrement, la fragmentation de l'ion inconnu a fait apparaître plusieurs ions

fragments suggérant la présence d'un groupe trifluoroacyle  $\text{CF}_3\text{-(C=O)-}$  sur l'hydroxyle en position 3' du résidu ganciclovir (ester de trifluoroacétate).

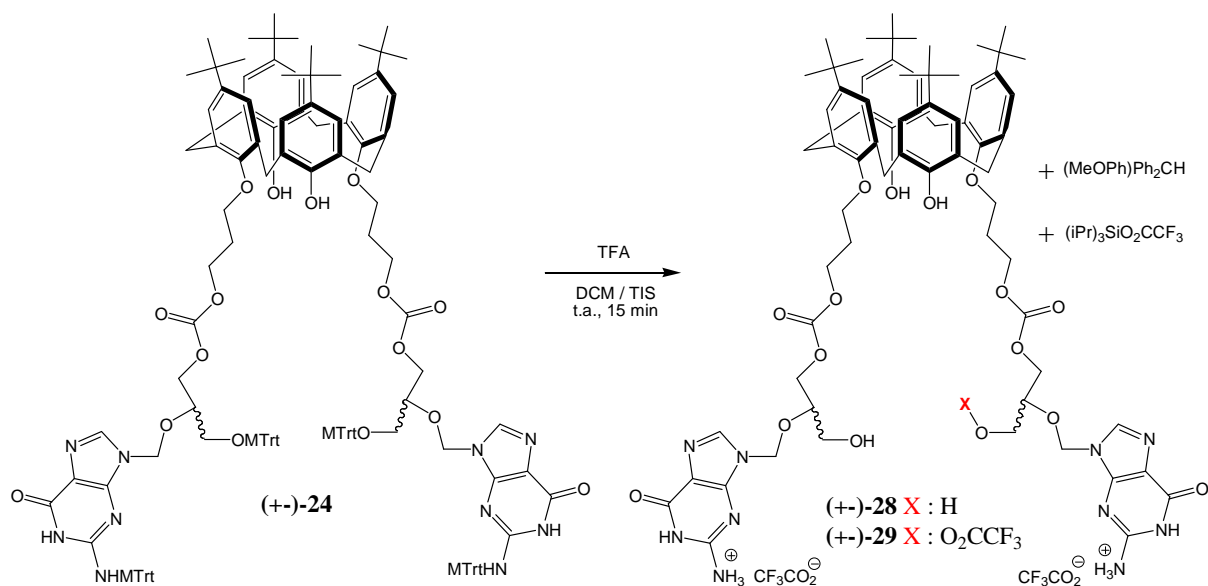


Figure 126. Acidolyse des groupes protecteurs MTTr chez le conjugué calixarène-bis-ganciclovir (+)-24.

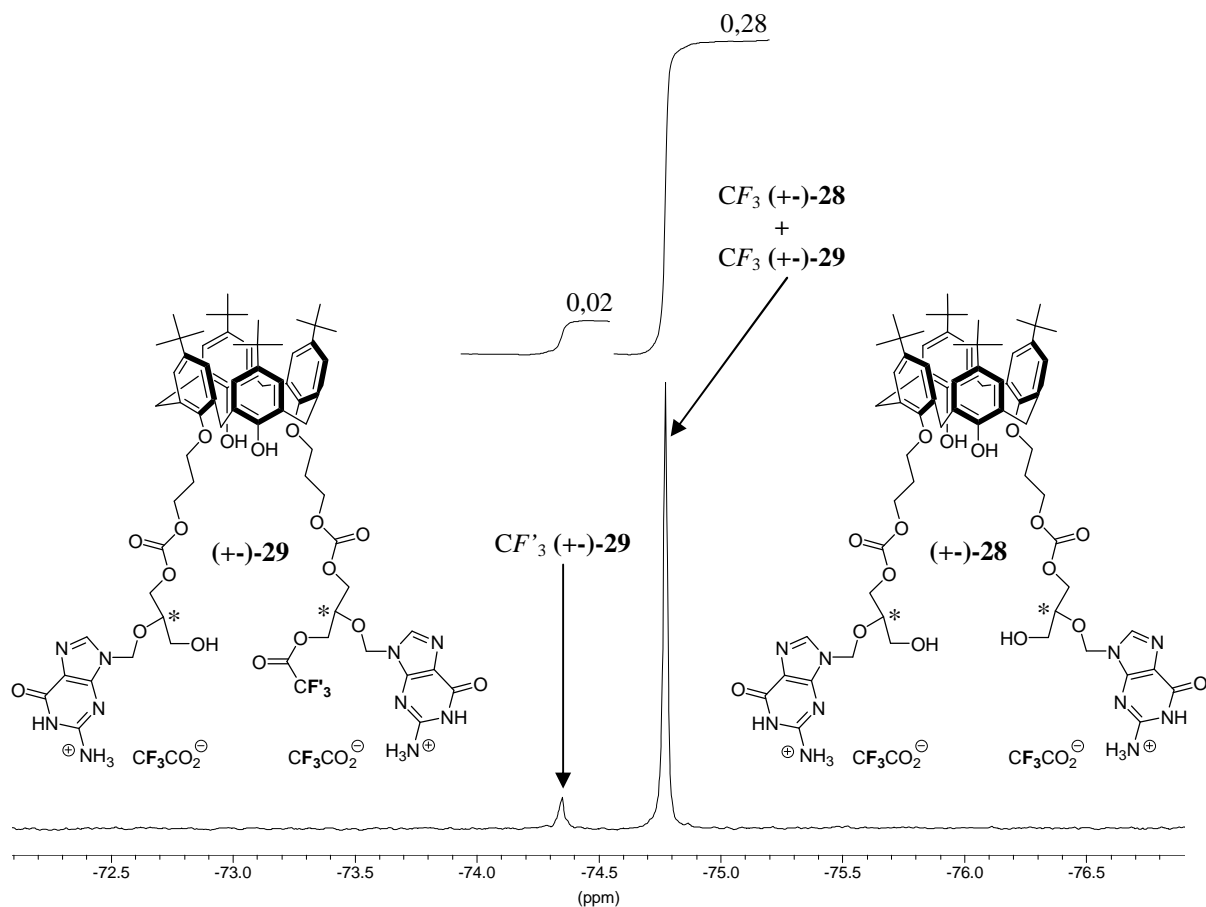
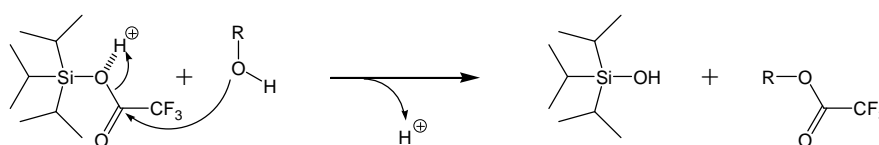


Figure 127. Spectre RMN  $^{19}\text{F}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , t.a.) du mélange obtenu après acidolyse de 24.

La spectroscopie RMN  $^{19}\text{F}$  a confirmé cette hypothèse en révélant un signal plus déblindé que celui des trifluoroacétates (Figure 127). Les temps de relaxation du fluor  $^{19}\text{F}$  étant suffisamment courts, il est possible d'intégrer les deux signaux afin d'évaluer le taux de pureté. Il a ainsi été déterminé que le composé (+-)-**28** n'était pur qu'à 85% en masse.

Selon le mécanisme hypothétique exposé en Figure 124, l'échange d'hydrure entre le TIS et le trifluoroacétate de tritylium ( $\text{MTrt}^+\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ) peut conduire à la formation du trifluoroacétate de triisopropylsilyle. Il est connu qu'un silanolate est moins basique que l'alcoolate correspondant, ce qui en fait un meilleur groupe partant. Nous proposons donc que le trifluoroacétate de triisopropylsilyle puisse être trans-estérifié par le groupe hydroxyle en position 3' du ganciclovir (Figure 128), d'autant plus avec l'acidité du milieu pouvant catalyser cette réaction.



**Figure 128.** Proposition d'un mécanisme réactionnel conduisant aux calixarènes **29**.

Aussi loin que nous le savons, une telle réaction parasite lors du cleavage d'un groupe *O*-MTrt n'a jamais été décrite dans la littérature.

Le mécanisme proposé expliquant cette réaction peut être étudiée de multiples façons. Tout d'abord, l'isolement et la caractérisation du trifluoroacétate de triisopropylsilyle. Par la suite, l'ajout au mélange d'un quencheur supplémentaire de type alkyl-OH (éthanol par exemple) peut permettre de vérifier à la fois :

- la récupération exclusive du produit **28** désiré.
- la formation d'un ester de formule générale  $\text{CF}_3\text{-CO-O-alkyl}$ .

Malheureusement, le temps nous a manqué pour finaliser la synthèse du conjugué calixarène-ganciclovir (+-)-**28**. Celui-ci n'a donc pas pu être obtenu suffisamment pur pour étudier ses propriétés à l'interface eau-air.

## IV.5. Conjugués d'aciclovir à l'interface eau-air

Similairement aux conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone décrits dans en Chapitre III, les conjugués *t*Bu[4]OH-aciclovir ont une structure amphiphile et, à condition d'être totalement insolubles dans l'eau, doivent donc être filmogènes à l'interface eau-air. Les films de Langmuir des conjugués mono- et bis-aciclovir, composés **26** et **27** respectivement (Figure 129), ont donc été formés sur eau pure en premier lieu puis sur le tampon NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 mM, pH 10.

Le conjugué *t*Bu[4]OH-bis-ganciclovir (+-)-**28** n'ayant pu être obtenu pur, son cas ne sera pas traité lors de cette partie.

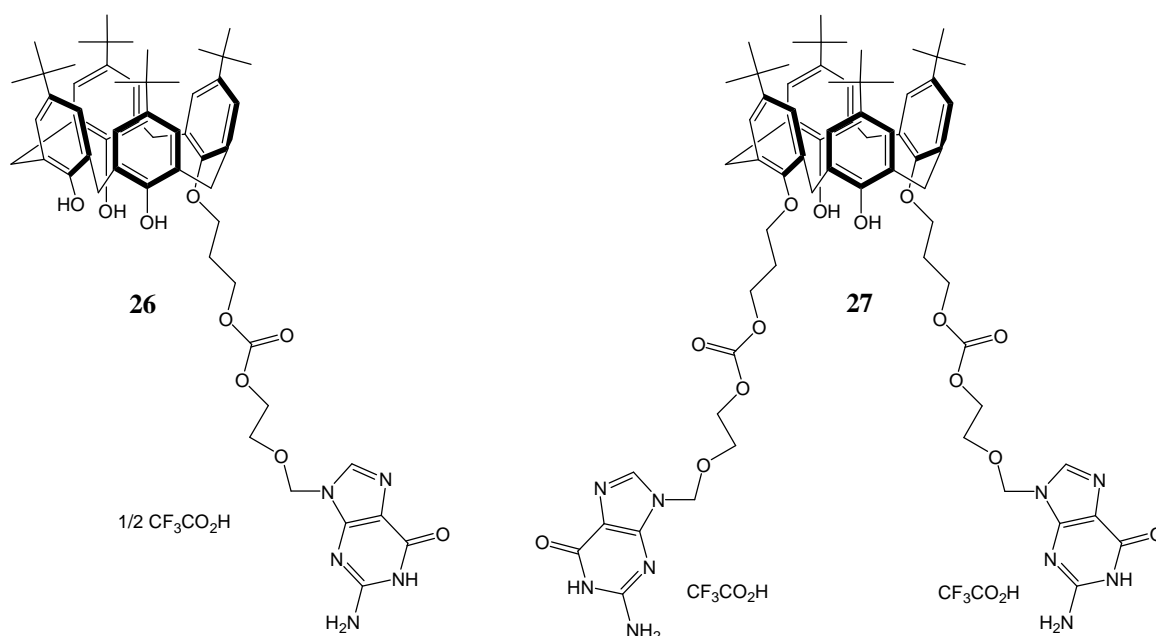
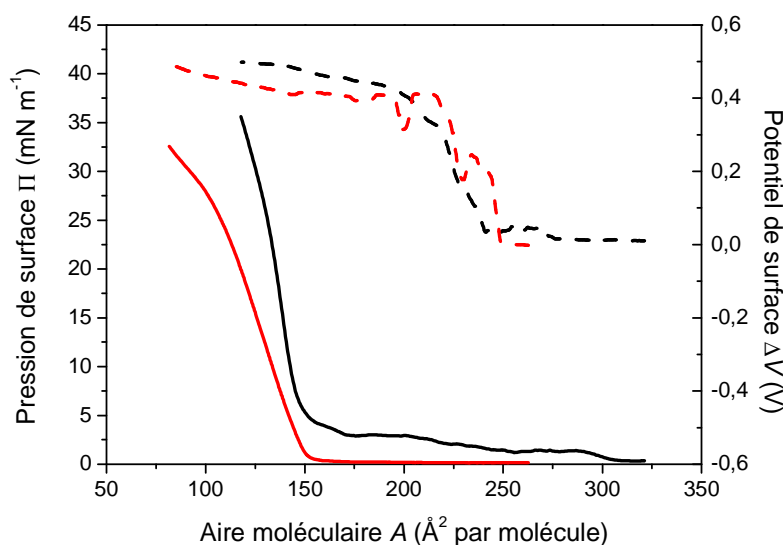


Figure 129. Rappel de la structure des conjugués *t*Bu[4]OH-mono-aciclovir **26** et *t*Bu[4]OH-bis-aciclovir **27**.

### IV.5.1. Films de Langmuir étalés sur eau pure

En Figure 130 sont présentées les isothermes de compression  $\Pi$ -A (lignes continues) et  $\Delta V$ -A (lignes discontinues) des films monomoléculaires du conjugué mono-aciclovir **26** (rouge) et bis-aciclovir **27** (noir), étalés sur eau pure à 20 °C. Dans le Tableau 4, sont donnés leurs paramètres caractéristiques au point de collapse.

Au cours de cette partie, l'étude du comportement à l'interface eau-air de **26** et **27** sera plus brève qu'avec les conjugués de quinolone.



**Figure 130.** Isothermes de compression  $\Pi$ - $A$  des conjugués *t*Bu[4]OH-aciclovir **26** (rouge) et **27** (noir) étalés sur eau pure à 20 °C. Vitesse de compression : 5 mm min<sup>-1</sup>.

**Tableau 4.** Paramètres caractéristiques des isothermes de compression présentées en Figure 130.

	$\Pi_{\text{coll}}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$A_{\text{coll}}$ (Å <sup>2</sup> )	$C_{\text{s}}^{-1}{}_{\text{max}}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$\Delta V_{\text{coll}}$ (V)	$\mu_{\text{eff}}$ (D)
<b>27</b>	23,2	133	215,7	0,50	1,74
<b>26</b>	20,7	116	88,9	0,44	1,37

Il peut être constaté que les conjugués **26** et **27** forment des films de Langmuir à l'interface eau-air, d'une apparente stabilité similaire comparé aux conjugués de quinolone (Cf. Chapitre III). Comme indiqué en Tableau 4 par les valeurs de  $\Pi_{\text{coll}}$  et de  $C_{\text{s}}^{-1}{}_{\text{max}}$ , le film monomoléculaire formé avec **27** (bis-aciclovir) est plus stable et de caractère plus solide que celui formé avec le dérivé **26** (mono-aciclovir). Cependant, cette différenciation entre dérivé mono- et bi-substitué est moins prononcée avec ces conjugués d'aciclovir qu'avec ceux d'acide nalidixique.

Selon le modèle de double-couche de Vogel-Möbius,<sup>86, 87</sup> plus la valeur du moment dipolaire effectif  $\mu_{\text{eff}}$  est importante, plus grande est la différence entre les moments dipolaires de la couche hydrophobe et de la couche hydrophile. Ainsi, la valeur de  $\mu_{\text{eff}}$  donne des indications sur la caractère amphiphile du composé étudié (Tableau 4).



Dans le cas de **26**, il peut être noté que la valeur de  $\mu_{\text{eff}}$  est plus faible que chez le dérivé **27**, indiquant donc que celui-ci possède un caractère amphiphile plus marqué que son analogue mono substitué.

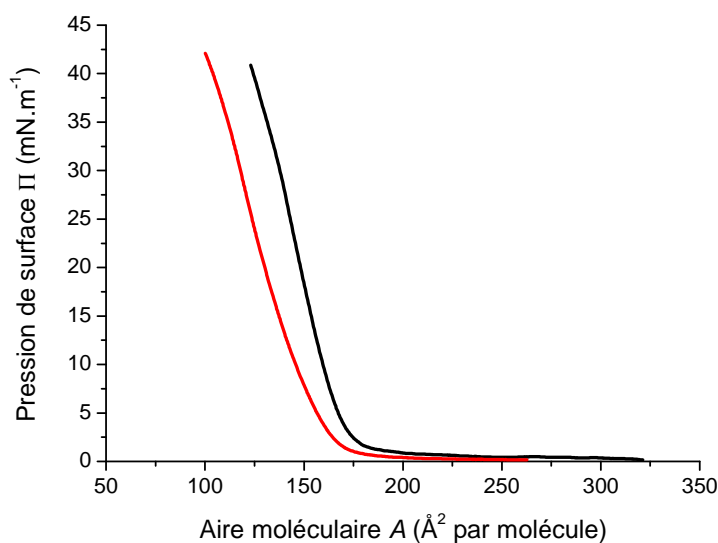
Nous pouvons remarquer un profil d'isotherme  $\Delta V$ - $A$  similaire entre le dérivé mono-**26** et le dérivé bis-aciclovir **27**. Le saut de potentiel en début d'isotherme indique une transition de phase G/LE avec une réorientation des molécules dans le film monomoléculaire. Avec ces composés, le degré de substitution de la partie basse du macrocycle a donc peu d'influence sur l'orientation de ce dernier, contrairement à ce qui a été proposé avec les conjugués de quinolone.

Avec ces conjugués *t*Bu[4]OH-aciclovir, le système hétérocyclique (guanine), principal résidu hydrophiles, est plus éloigné du macrocycle que dans le cas des conjugués de quinolone. Nous proposons que cet éloignement accrue des résidus polaires chez les conjugués **26** et **27** est responsable de leur comportement interfacial relativement proche, indiqué par les isothermes de compression en Figure 130, par comparaison avec les conjugués *t*Bu[4]OH-quinolone **2** et **3**.

#### IV.5.2. Films de Langmuir étalés sur le tampon pH 10

Afin de réaliser les études d'hydrolyse interfaciale dans nos réacteurs de Langmuir (boîtes de Pétri, Cf. III.4.2.), les isothermes de compression  $\Pi$ - $A$  des conjugués **26** et **27** étalés sur le tampon  $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mM pH 10 ont été collectées. Celles-ci sont présentées en Figure 131, directement à 37 °C.

Ces données expérimentales nous ont permis de choisir les aires moléculaires  $A_{26} = 120 \text{ \AA}^2$  et  $A_{27} = 140 \text{ \AA}^2$  pour les conjugués **26** et **27**, respectivement. Le choix de ces deux aires permet en plus d'étudier les deux films à la même pression de surface ( $\Pi = 25 \text{ mN m}^{-1}$ ). A partir de ces valeurs, nous avons ainsi calculé les quantités nécessaire de conjugué à déposer à la surface du tampon dans nos réacteurs de Langmuir (boîte de Pétri), de façon à former un film de Langmuir dans un état condensé (voir Figure 131).



**Figure 131.** Isothermes de compression  $\Pi$ -A des conjugués calixarène-aciclovir **26** (rouge) et **27** (noir) étalés sur le tampon carbonate pH 10 à 37 °C. Vitesse de compression : 5 mm min<sup>-1</sup>.

#### **IV.6. Réactivité interfaciale des prodrogues**

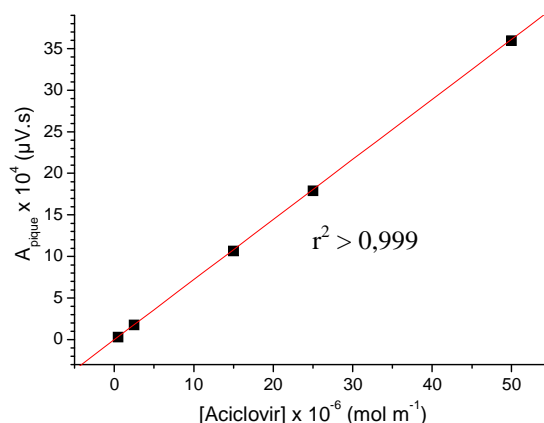
A partir des valeurs  $A_{26}$  et  $A_{27}$ , et des Equations N° 15 et 16 (Cf. III.4.1.), nous avons calculé les volumes de solutions chloroformiques de **26** et **27** à déposer à l'interface tampon-air. La même procédure SOP qu'employée en Chapitre III a été appliquée ici avec succès pour concentrer les échantillons de sous-phase. La seule différence concerne le volume final de l'échantillon (1,00 mL), concentrant l'aciclovir libéré avec un facteur 100. Ainsi, les concentrations théoriques en aciclovir des échantillons après 100% d'hydrolyse et traitement SOP valent  $2,7 \cdot 10^{-5}$  M pour **26** et  $4,9 \cdot 10^{-5}$  M pour **27** selon les Equations n° 15 et 16 (Cf. III.4.1.).

La méthode CLHP-UV développée pour l'aciclovir consiste à utiliser une phase mobile simplement composée d'eau pure et de MeOH, en proportion volumique 90:10. La phase stationnaire employée est une colonne à phase inverse RP C18. Le reste des conditions chromatographiques sont détaillées en Partie Expérimentale, section Analytique.

### IV.6.1. Validation de la méthode

La méthode CLHP-UV précédée du SOP a été validée selon les mêmes critères que ceux imposés en Chapitre III. La LOD et la LOQ ont respectivement pour valeur  $1,5 \cdot 10^{-7}$  et  $5,0 \cdot 10^{-7}$  M. La LOQ correspond à une hydrolyse autour de 1%. Une excellente linéarité de la réponse UV a été constatée à l'aide d'échantillons aqueux d'aciclovir dans une gamme de concentrations comprises entre  $5 \cdot 10^{-7}$  et  $5 \cdot 10^{-5}$  M (Figure 132).

[Aciclovir]. $10^{-6}$ (mol L <sup>-1</sup> )	A <sub>picque</sub> ( $\mu$ V.s)	Nombre d'injection (n)
0,5	3067	3
2,5	17620	3
15,0	106827	3
25,0	184887	3
50,0	359547	3



**Figure 132.** Tableau récapitulatif d'analyse de témoins aciclovir (A). Courbe d'étalonnage (■) et sa régression linéaire (ligne rouge).

L'équation de la droite obtenue après régression linéaire donne un coefficient de détermination  $r^2 > 0,999$ .

$$y = 1,0 \cdot 10^{-10} x + 3,8 \cdot 10^{-8}$$

où y est la concentration en aciclovir de l'échantillon et x est l'aire sous-pic.

#### Equation n° 23.

La spécificité de la méthode a été vérifiée par analyse d'un échantillon de sous-phase exempt d'aciclovir et traité selon le SOP.

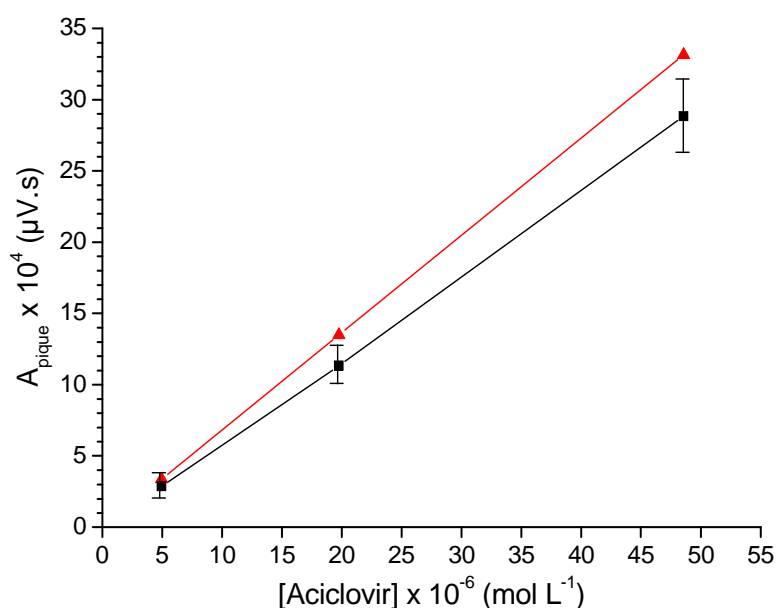
La méthode SOP-CLHP a été validée comme décrit en Chapitre III. Comme reporté en Tableau 5, chacun des neuf échantillons T<sub>sop</sub> ont été analysé en *triplicata* (n = 3), et leur concentration en aciclovir a été quantifiée à l'aide de témoins aqueux (Figure 132).

Des résultats satisfaisants ont été obtenus en termes de précision avec des valeurs acceptables de CV, inférieures à 5% pour les points hauts (100%), intermédiaires (50%), et bas (10%). Il a cependant été constaté un taux de récupération en aciclovir d'environ 85%.

**Tableau 5.** Validation de la méthode SOP-CLHP. Analyse CLHP des neuf témoins SOP d'aciclovir.

	Moyenne $A_{\text{pique}}$ ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Répétabilité	Reproductibilité	[Aciclovir] ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Taux de récupération
Tsop(10).1	30133 (n = 3)	1,9%		$4,42 \cdot 10^{-6}$	
Tsop(10).2	30287 (n = 3)	3,1%	2,7% (n = 9)	$4,44 \cdot 10^{-6}$	$87,2\% \pm 4,0 \%$
Tsop(10).3	29340 (n = 3)	2,6%		$4,30 \cdot 10^{-6}$	
Tsop(50).1	114240 (n = 3)	1,4%		$1,631 \cdot 10^{-5}$	
Tsop(50).2	118070 (n = 3)	0,2%	2,6% (n = 9)	$1,685 \cdot 10^{-5}$	$83,5\% \pm 2,0 \%$
Tsop(50).3	120900 (n = 3)	1,0%		$1,726 \cdot 10^{-5}$	
Tsop(100).1	301100 (n = 3)	0,5%		$4,233 \cdot 10^{-5}$	
Tsop(100).2	281407 (n = 3)	0,5%	3,1% (n = 9)	$3,956 \cdot 10^{-5}$	$81,9\% \pm 4,7 \%$
Tsop(100).3	297120 (n = 3)	0,5%		$4,177 \cdot 10^{-5}$	

Ces critères d'exacititude et de précision peuvent être illustrés en comparant les courbes d'aire sous-pique  $A_{\text{pique}}$  en fonction de la concentration en aciclovir attendue et mesurée (Figure 133). L'observation d'une excellente linéarité, représentée par le coefficient de corrélation, et d'une quasi superposition de la courbe théorique et expérimentale atteste la qualité de la méthode mise en place.



**Figure 133.** Droite d'étalonnage aire sous-pique en fonction de la concentration en aciclovir (ligne rouge). Aire sous-pique mesurées des échantillons Tsop(10) (n = 9), Tsop(50) (n = 9) et Tsop(100) (n = 9) en fonction de leur concentration attendue (ligne noire). La régression linéaire de cette courbe donne un coefficient de détermination  $r^2 > 0,999$ .

La méthode SOP-CLHP développée pour l'aciclovir est suffisamment linéaire et précise pour quantifier l'aciclovir libéré dans sa gamme de concentration théorique.

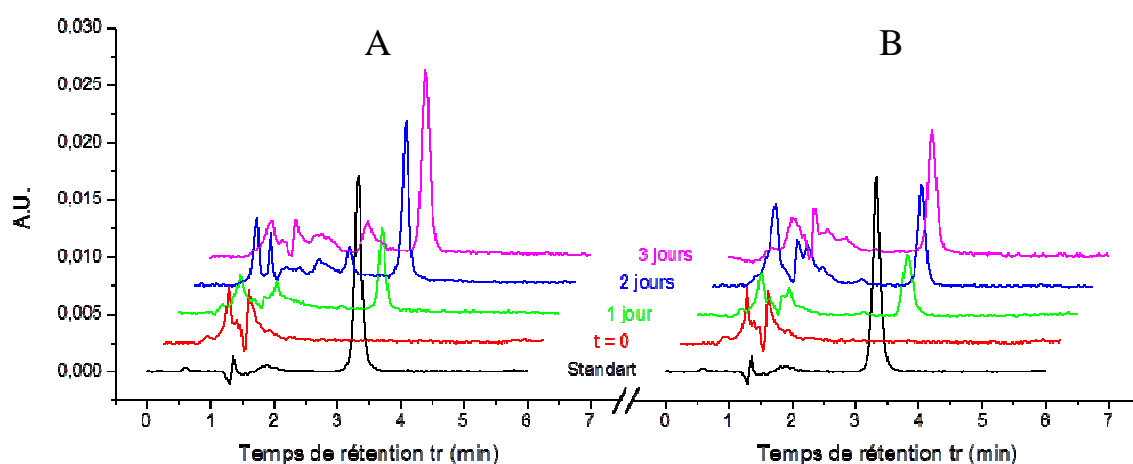
Cependant, le taux de récupération après traitement SOP étant autour de 85%, il sera nécessaire d'utiliser des témoins ayant également subi le SOP pour quantifier les échantillons après hydrolyse. Pour cela, des portions de 250  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon Tsop d'un point ont été rassemblées de façon à obtenir un échantillon Tsop standart pour chaque point haut, intermédiaire et bas.

#### IV.6.2. Résultats et discussions

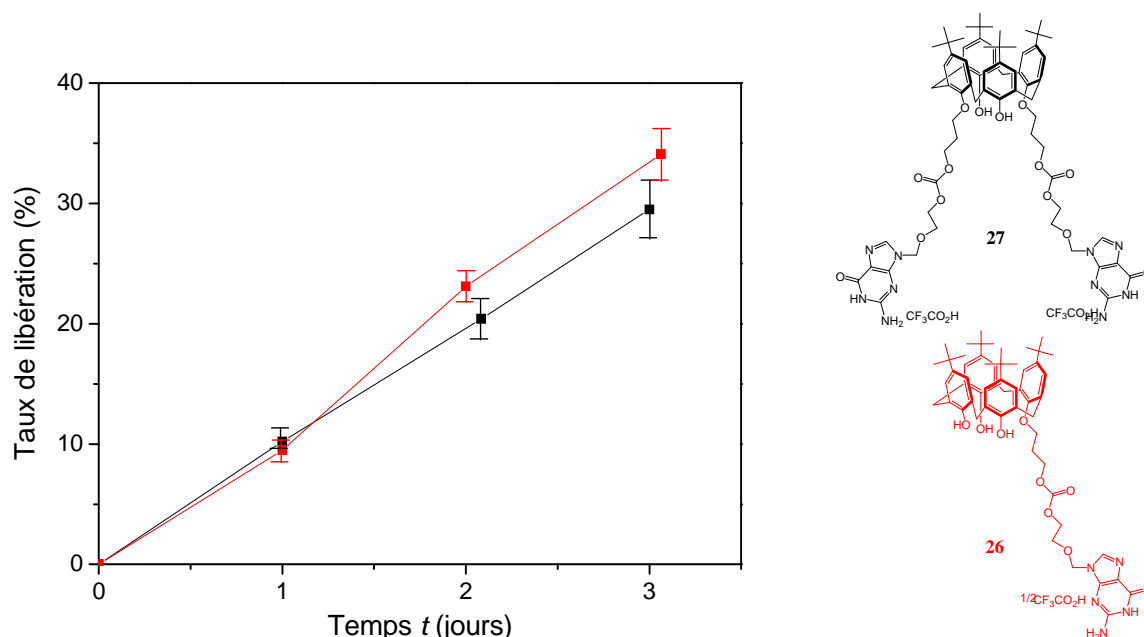
##### ❖ Cinétiques d'hydrolyse à l'interface eau-air.

Les cinétiques de libération de l'aciclovir à partir des films de Langmuir des conjugués **26** et **27** ont été obtenues selon le même protocole que celui décrit en Chapitre III.

Les chromatogrammes relatifs à chaque point de mesure à 37 °C, et pour chacun des deux conjugués étudiés, sont exposés en Figure 134, en plus d'un standard de contrôle de temps de rétention  $t_r = 3,3$  min. L'intégration de chaque pic donne accès à la concentration en aciclovir de l'échantillon correspondant *via* l'Equation n° 24. Ainsi, la quantité d'aciclovir libérée à partir du film de **26** (porteur de un résidu) ou de **27** (porteur de deux résidus), exprimés en rendement de réaction (%), est présentée en fonction du temps en Figure 135.



**Figure 134.** Chromatogrammes collectés par analyse CLHP-UV d'échantillons de sous-phase après traitement SOP. Résultats obtenus avec (A) : conjugué **27** ; (B) : conjugué **26**, après 0 (rouge), 1 (vert), 2 (bleu) et 3 jours (magenta) passés à l'état de films de Langmuir étalés sur le tampon pH 10 à 37 °C. Les conditions chromatographiques et le matériel utilisé sont donnés en Partie Expérimentale, section analytique.



**Figure 135.** Cinétique d'hydrolyse des conjugués **26** (■) ou **27** (▲) à l'interface tampon-air (pH 10) à 37 °C. Résultats exprimés en taux d'avancement (pourcentage libéré relatif à la quantité totale libérable), en fonction du temps exprimé en jours de contact.

Ces résultats montrent que les cinétiques d'hydrolyse des conjugués d'aciclovir **26** et **27** sont plus rapides que celles observées avec les conjugués d'acide nalidixique **2** et **3**. On peut constater un taux de libération autour de 30% pour **26** et **27**, après 3 jours à l'état de film monomoléculaire étalé à la surface du tampon pH 10, à 37 °C.

Selon le même raisonnement qu'en Chapitre III, nous suggérons que ces cinétiques sont de pseudo-ordre 1. Ainsi, d'après les Equations n° 20 et 21, nous avons déterminé les temps de demi-vie des prodrogues **26** et **27** à l'interface tampon-air.

Nous constatons ainsi que les prodrogues **26** et **27** sont caractérisés, pour ce système donné, par leur temps de demi-vie respectifs  $(t_{1/2})_{26} = 5,0$  jours et  $(t_{1/2})_{27} = 5,9$  jours. Par comparaison avec les dérivés de l'acide nalidixique, ces prodrogues **26** et **27** ont une réactivité plus importante à l'interface tampon-air. De plus, cette réactivité est peu sensible au nombre de résidu aciclovir introduits sur la plate-forme calixarénique. En effet, comme nous l'avons brièvement suggéré à partir des isothermes de compression (Figure 130 ; Tableau 4), le degré de substitution du calixarène a peu d'influence sur le comportement interfacial de **26** et **27**.

❖ Autres interfaces.

En supplément de l'interface eau-air, réactivité hydrolytique du conjugué **27** a été étudiée à l'état d'une micro-dispersion dans le tampon pH 10. Pour cela, une solution de **27** dans le THF a été préparée, avec pour concentration  $0,82 \text{ mg mL}^{-1}$ . A l'aide d'une microseringue, 100  $\mu\text{L}$  de cette solution sont ajoutés dans le vortex d'agitation de 10 mL de solution tampon. Le tout a été maintenu ainsi sous forte agitation à température ambiante.

Dans ces conditions, la concentration théorique du milieu en aciclovir est alors supérieure à la LOQ du système CLHP-UV, quel que soit le taux de libération. Le milieu réactionnel a donc été occasionnellement analysé par CLHP-UV, sans traitement préalable, afin de contrôler l'avancement de l'hydrolyse.

Nous n'avons ainsi observé aucune libération d'aciclovir, même après plus d'une semaine de réaction.

## **IV.7. Conclusion du chapitre**

Le cahier des charges que nous nous étions fixé a été respecté. De nouveaux conjugués tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène-antiviral ont été synthétisés comme prodrogues de l'aciclovir et du ganciclovir. Pour cela, une chimie de couplage par le *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) *via* la formation de carbodiesters a été développée. Cette méthode ne nécessite pas de conditions dures et de substances à haut risque, et peut s'appliquer à un grand nombre de principes actifs porteurs d'une fonction hydroxyle.

Les conjugués bis-aciclovir (**21**) et bis-ganciclovir (**24**) protégés ont ainsi été obtenus avec des rendements bon à excellent, de 50% et 71% respectivement. Cependant, le conjugué mono-aciclovir (**20**) n'a été obtenu qu'avec un faible rendement de 17%, le conjugué tétra-aciclovir n'a pas pu être obtenu.

Les quantités obtenus et la qualité des conjugués mono-aciclovir (**26**) et bis-aciclovir (**27**) après déprotection sont satisfaisantes. Cependant, le conjugué "racémique" bis-ganciclovir (**28**) n'a été obtenu qu'avec un taux de pureté de 85%.

La synthèse du conjugué d'aciclovir **21**, et en particulier du conjugué **20**, pourra à l'avenir être améliorée à partir des réactions parasites mises en évidence. Une stratégie de

protection des groupes –OH du calixarène peut être mise en place, en utilisant des groupes protecteurs peu encombrants. Ces groupes devront être acido-labiles pour être éliminés avec les groupes MTrt en une seule étape de déprotection. Nous suggérons en exemple les groupes méthoxyméthyléther (MOM) ou tétrahydropyranyle (THP).

L'utilisation de la TMG comme base peut être problématique lors de la seconde étape de couplage par le CDI. Nous avons montré que celle-ci possède un caractère nucléophile non négligeable. Dans les conditions réactionnelles mises en œuvre, la présence de TMG en excès peut en effet générer des réactions parasites par attaque nucléophile sur les carbamates d'imidazole intermédiaires. Nous proposons donc que cette base forte ( $pK_a \sim 15$ ) soit à l'avenir remplacée par une autre base forte peu nucléophile, et suggérons en exemple le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU ;  $pK_a \sim 13$ ).

Le conjugué bis-ganciclovir (+-)-**24** pourra être obtenu sous la forme stéréoisomères purs en ajoutant une étape de résolution optique du synthon de ganciclovir (+-)-**11**. Un couple de deux esters diastéréoisomères, formés à partir d'un acide chiral optiquement pur comme un aminoacide, doit être séparable par colonne de chromatographie. Après élimination du résidu aminoacide par saponification, les synthons (+)-**11** et (-)-**11** pourront donc être séparément engagés dans un couplage avec le calixarène.

A l'étape de cleavage des groupes MTrt de (+-)-**24**, nous avons observé que l'emploi d'un silane comme quencheur de carbocation est problématique. Selon nos propositions de mécanisme réactionnel, les silanes triéthyl- et triisopropylsilane (TES et TIS) favorisent le transfert d'un groupe trifluoroacyl sur le groupe –OH en position 3' du résidu ganciclovir. Cette trans-estérification peut probablement être défavorisée en remplaçant le TES ou le TIS par un autre quencheur de carbocation plus encombré ou de nature différente.

Les propriétés filmogènes à l'interface eau-air des conjugués d'aciclovir **26** et **27** ont été précisées *via* la technique des films de Langmuir. Leurs films monomoléculaires respectifs ont été formés sur eau pure, et caractérisés par la mesure des isothermes de compression  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A. Nous avons ainsi observé des comportements similaires, mais moins prononcés, aux conjugués de quinolone. Le nombre de résidu aciclovir en partie basse de la plate-forme calixarénique a moins d'influence sur le comportement interfacial des conjugués **26** et **27**, comparé aux conjugués **2** et **3** (Cf. *Chapitre III*). En particulier, les deux conjugués d'aciclovir, mono- et bis-, subissent une importante réorientation au cours de leur transition de



phase G/LE. Nous proposons que l'éloignement de la plate-forme macrocyclique du système hétérocyclique (guanine) offre une plus grande mobilité à la partie calixarénique de **26** et **27**.

Enfin, une méthode CLHP-UV, inspirée de la littérature, a été mise au point pour détecter et quantifier l'aciclovir en solution aqueuse. A l'aide du protocole développé en Chapitre III, nous avons étudié la réactivité hydrolytique des conjugués **26** et **27** à l'interface eau-air, utilisée comme modèle d'un environnement membranaire. Nous avons ainsi caractérisé les cinétiques d'hydrolyse de ces prodrogues, et avons déterminé leur temps de demi-vie à l'interface étudiée. Il a alors été trouvé les valeurs  $(t_{1/2})_{26} \approx (t_{1/2})_{27} = 5-6$  jours.



# **DEUXIEME PARTIE**

## **Résultats et discussions**

- Chapitre III : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues d'antibactériens
- Chapitre IV : Calix[4]arènes lipophiles conçus comme prodrogues d'antiviraux
- Chapitre V : Calix[4]arène hydrophile antibactérien

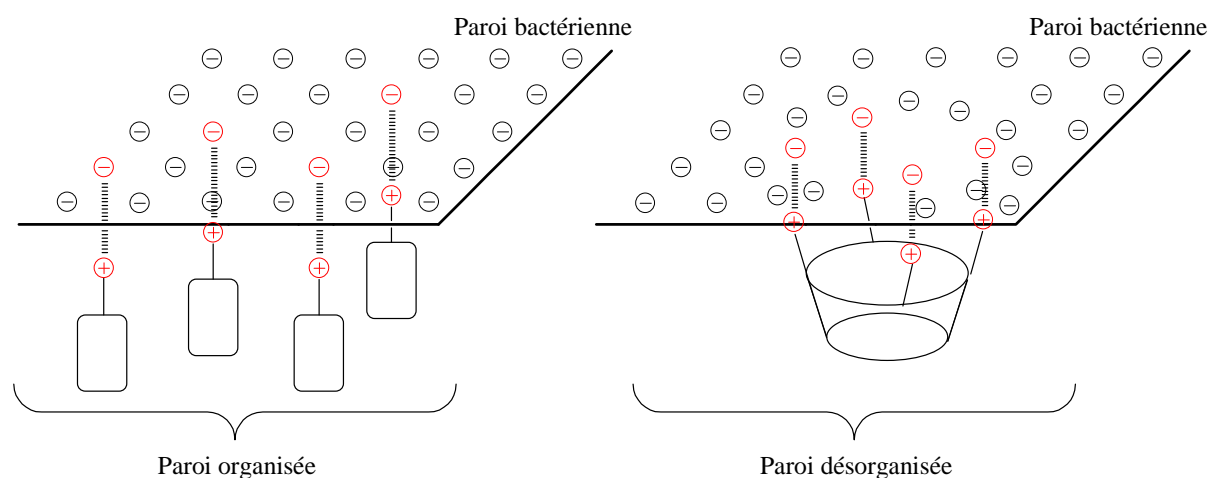


## Chapitre V

### Calix[4]arène hydrophile antibactérien

Les travaux menés par Maxime Mourer au GEVSM ont conduit à la synthèse de dérivés polycationiques du calix[4]arène à propriétés antibactériennes.<sup>7</sup> Ces composés ont été synthétisés dans le cadre d'une recherche de nouveaux antibactériens, afin de contrecarrer l'émergence toujours croissante de bactéries multi-résistantes.<sup>199-201</sup> Une des cibles à envisager pour le développement de nouveaux antibiotiques est la paroi, et en particulier, la membrane phospholipidique bactérienne.<sup>52</sup> En effet, la structure et la composition chimique de cette dernière sont communes chez un grand nombre d'espèces (molécules anioniques), mais différentes de celles des cellules eucaryotes (molécules zwitterioniques). Par conséquent, il doit être possible d'interagir et de perturber sélectivement la membrane bactérienne, tout en limitant ces mêmes interactions avec les cellules eucaryotes hôtes, donc sans toxicité.<sup>202, 203</sup>

C'est ainsi que Mourer et coll. ont synthétisés plusieurs molécules basées sur le calix[4]arène, organisant dans l'espace quatre groupements cationiques (ammonium, guanidinium).<sup>10</sup> L'hypothèse de départ, illustrée en Figure 136, était que la répartition presque figée dans l'espace de ces quatre cations pourrait induire des changements d'organisation des constituants anioniques de la membrane lipidique bactérienne. La structure de celle-ci s'en verrait alors modifiée au niveau moléculaire, perturbant ainsi ses fonctions biologiques.



**Figure 136.** Hypothèse ayant conduit à la synthèse du CX1.

## V.1. Introduction

Parmi les substances ainsi synthétisées et testées en bactériologie, l'une d'entre elles a été identifiée comme étant la plus encourageante. Le trifluoroacétate de tétra-*p*-(guanidinoéthyl)-calix[4]arène (**CX1**) a en effet montré une bonne activité antibactérienne sur un large spectre de souches à Gram positif ou négatif (Figure 137).<sup>9, 11</sup> Fait intéressant, son équivalent monomérique, le trifluoroacétate de *p*-(guanidinoéthyl)-phénol (**mCX1**), n'a quant-à lui montré aucune activité antibactérienne.<sup>10, 11</sup>

Ces résultats obtenus *in vitro* suggèrent que l'organisation spatiale de quatre groupements guanidinium par un calix[4]arène en conformation cône génère bien une activité antibactérienne.

Cependant, les parois bactériennes, sont des systèmes complexes. L'activité du **CX1** ne peut donc pas être seulement résumée à des interactions électrostatiques entre celui-ci et les constituants anioniques membranaires. En effet, d'autres phénomènes sont probablement impliqués dans son mécanisme d'action.

Souches de références	CMI (mg L <sup>-1</sup> )	
	CX1	mCX1
E. coli (Gram -)	4	512
S. aureus (Gram +)	8	512
E. faecalis (Gram +)	32	>512
P. aeruginosa (Gram -)	32	>512
Isolats cliniques		
E. coli à pénicillinase	2	512
E. faecium (gene vanB)	8	>512
E. faecalis (gene vanA)	64	>512
P. aeruginosa (surexpression des pompes d'efflux)	64	>512

Figure 137. Structure du **CX1** et du **mCX1**, et leurs activités antibactériennes.

### V.1.1. Bibliographie du CX1

Des études préliminaires ont été réalisées *in vitro* afin de mieux cerner le mode d'action du **CX1**. Les résultats ont montré une modification des propriétés de surface des bactéries exposées à ce dernier. Plus précisément, ces résultats ont fait apparaître que :

- ✓ Chez *P. Aeruginosa* (Gram-) exposé 24 heures au **CX1**, il a été observé une diminution de la mobilité électrophorétique de la bactérie, indiquant une neutralisation partielle des charges anioniques à sa surface.<sup>12</sup> Nous proposons cet effet soit une conséquence de l'adsorption du **CX1** sur la membrane externe.
  
- ✓ Une importante perturbation de l'intégrité des bactéries traitées a été constatée chez la même souche, en utilisant une technique de microscopie AFM en mode contact.<sup>12</sup> Il a été en effet observé une sensibilisation des bactéries au passage de la pointe, avec l'apparition de brèches dans la paroi bactérienne. Nous suggérons que cette dégradation soit due une pénétration du **CX1** dans la paroi bactérienne.
  
- ✓ Chez *E. Coli* (Gram-) exposé 24 heures au **CX1**, il a été observé une augmentation de la perméabilité membranaire. Cela a pu être mis en évidence par une méthode de double marquage fluorescent utilisant deux marqueurs de pouvoir pénétrant différent.<sup>14</sup> Nous proposons que ces changements de perméabilité de la paroi de *E. Coli* sont liés à une modification de fluidité de sa membrane externe.

Ces résultats indiquent donc que le **CX1** interagit avec la paroi bactérienne. Il est probable que les premières étapes de son mécanisme antibactérien impliquent des interactions électrostatiques entre certains constituants anioniques des parois bactériennes le **CX1**. La fixation de ce dernier à la surface des bactéries traitées entraîne des modifications de propriétés de la membrane, et doit donc perturber ses fonctions biologiques. Il a été proposé que la disposition organisée dans l'espace de ses groupements cationiques puisse induire des changements dans la circulation, à l'échelle moléculaire, des constituants membranaires. Cependant, il reste encore beaucoup de travail à accomplir pour éclaircir les différents phénomènes ayant lieu.

### V.1.2. Objectifs

Ainsi, notre objectif dans ce projet a été d'éclaircir certains aspects du mode d'action du **CX1**. Les résultats obtenus en microbiologie ont montré que ce mode d'action passe essentiellement par une modification des propriétés de la paroi bactérienne.

Nous avons donc étudié les interactions mises en jeu entre la membrane lipidique bactérienne et le **CX1**. Plus particulièrement, notre attention a porté sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus d'adsorption de ce dernier à la surface de la membrane. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique des films monomoléculaires de Langmuir afin de préparer des modèles de membrane bactérienne, à l'aide de phospholipides choisis en conséquence et étalés à l'interface eau-air. Par cette même approche, des modèles de membrane cellulaire eucaryote ont également été préparés et utilisés comme référence. Ceux-ci nous ont servis à étudier la sélectivité du **CX1** observée *in vitro* vis-à-vis de cellule eucaryote.

Le dernier travail a été de comparer les effets du **CX1** et du **mCX1** sur les propriétés de nos modèles de membrane bactérienne. Notre objectif a été de mettre en évidence l'influence de l'organisation spatiale des groupements cationiques sur les modifications des propriétés des membranes modèles. Le **mCX1** a de plus été utilisé comme outil d'investigation pour mieux comprendre comment, par quels types d'interactions, le **CX1** induit les perturbations observées.

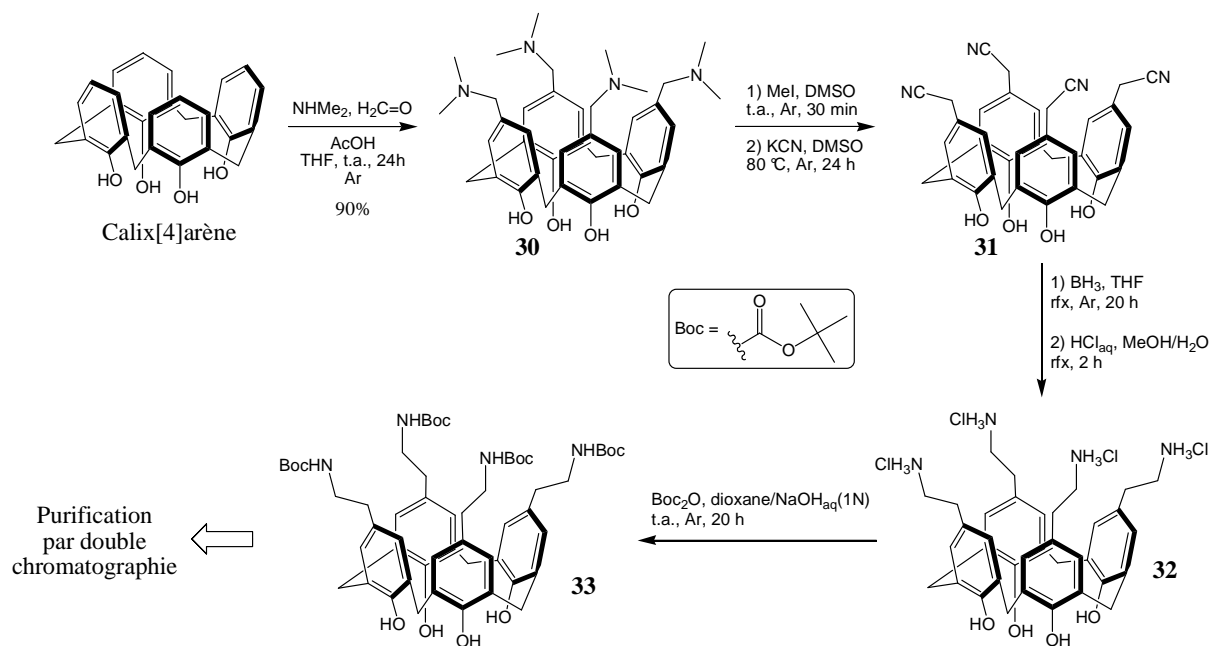
Ces résultats ont pour finalité d'être comparés à ceux obtenus *in vitro*, de sorte à mieux comprendre les relations structure-activité impliquées dans le mécanisme d'action du **CX1** pour à l'avenir synthétiser des analogues plus efficaces.

### V.1.2. Synthèse du CX1

La synthèse du **CX1** a été développée et optimisée au laboratoire lors de la thèse de Maxime Mourer.<sup>7</sup> Notre travail ici a été de produire cette molécule en quantité suffisante, afin d'entreprendre les études sur les modèles de membranes évoquées plus haut. Ainsi, la préparation de cette molécule selon des protocoles déjà établis ne sera que brièvement exposée.<sup>8, 10</sup>



La préparation du **CX1** compte sept étapes à partir du calix[4]arène, parmi lesquelles deux sont considérées comme des étapes clés (Figure 138 et 139). En effet, la plupart des intermédiaires sont des composés à fort caractère polaire. Cette propriété les rend donc difficiles à purifier par les méthodes usuelles comme la chromatographie sur gel de silice ou d'alumine. C'est pourquoi un soin particulier a porté sur la purification de l'intermédiaire **33**, puis sur l'avant-dernier composé **36**, à partir duquel le produit final est obtenu.

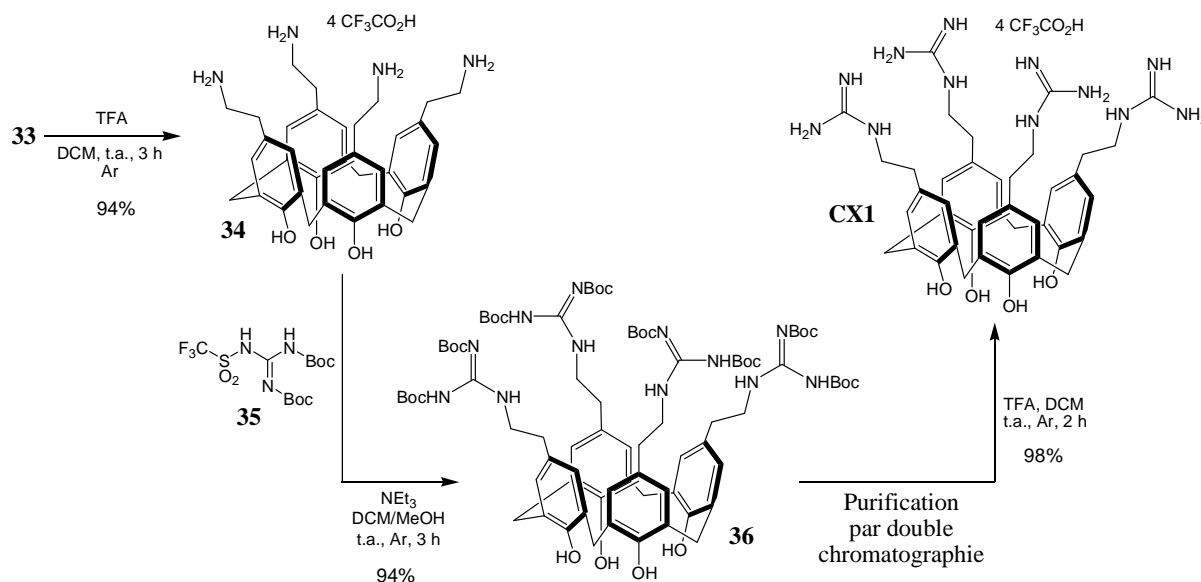


**Figure 138.** Synthèse en quatre étapes du premier intermédiaire clé **33** à partir du calix[4]arène.

La première étape passe par une réaction de Mannich, impliquant la formation *in situ* d'une imine par condensation acido-catalysée de la diméthylamine et du formaldéhyde. Cet électrophile subi ensuite une réaction de type  $\text{SE}_{\text{Ar}}$  par le calix[4]arène pour donner le tétra-*p*-(diméthylaminométhyl)-calix[4]arène **30**. La quaternisation des fonctions amines de **30** permet leur substitution par des ions cyanure. On obtient ainsi le tétra-*p*-(cyanométhyl)-calix[4]arène **31**. Ces groupements cyanométhyle sont ensuite réduits par le borane, et le dérivé aminoéthyle correspondant est isolé sous la forme du chlorhydrate **32**.

Jusqu'à présent, les différents intermédiaires n'ont pas pu être totalement purifiés. Leur caractère polaire important, et leur faible solubilité dans les solvants usuels, n'ont pas permis d'effectuer les chromatographies habituelles en chimie organique. Mourer et coll. avaient contourné le problème en ajoutant temporairement des groupes *tert*-butyloxycarbonyl (Boc). L'importante lipophilie du dérivé **33** correspondant autorise une

purification par chromatographie sur gel de silice. Nous avons choisi de faire une première chromatographie pour éliminer la majorité des impuretés accumulées, puis une deuxième afin d'affiner la purification pour donner un intermédiaire **33** de haute qualité.



**Figure 139.** Synthèse en deux étapes du deuxième intermédiaire clé **36**, puis obtention du produit final **CX1**.

L'intermédiaire **33** pur est déprotégé en milieu TFA pour redonner le dérivé tétra-aminoéthyle, cette fois sous la forme d'un sel de trifluoroacétate (**34**). Les groupements guanidines sont alors construits à l'aide du di-Boc-triflylguanidine **35**. Ce réactif onéreux a l'avantage de pouvoir être préparé au laboratoire à partir d'anhydride trifluorométhansulfonique (anhydride triflyque) et de chlorhydrate de guanidine.<sup>204-206</sup> Le deuxième intermédiaire clé **36** est alors obtenu avec un excellent rendement. Celui-ci est purifié par succession de deux chromatographies sur gel de silice avant l'étape de déprotection finale.

Les groupes guanidines de **36** sont ainsi libérés par acidolyse en milieu TFA, pour donner le produit final sous la forme d'un tétra sel de trifluoroacétate, **CX1**. La lyophilisation d'une solution aqueuse a permis d'obtenir ce dernier sous la forme d'une poudre blanche. Nous avons ainsi produit environ 2 g de substance, en accord avec notre cahier des charges.

### V.1.3. Synthèse du mCX1

La synthèse du **mCX1** est plus aisée et moins longue que celle du **CX1**. Elle s'effectue en deux étapes à partir du chlorhydrate de *p*-aminoéthyl-phénol (tyramine) d'origine

commerciale.<sup>8, 10</sup> Ainsi, seule la construction du groupe guanidine *N,N'*-di-Boc suivi par son acidolyse sont nécessaires pour obtenir le **mCX1** avec un rendement global de 96% (Figure 140).

Le réactif **35** est également employé pour transformer la fonction amine de la tyramine en fonction guanidine protégée, pour donner le dérivé **37**. Ce dernier subi une purification par double chromatographie sur gel de silice, et le traitement final par le TFA conduit au sel trifluoroacétique du *p*-guanidinoéthyl-phénol (**mCX1**).

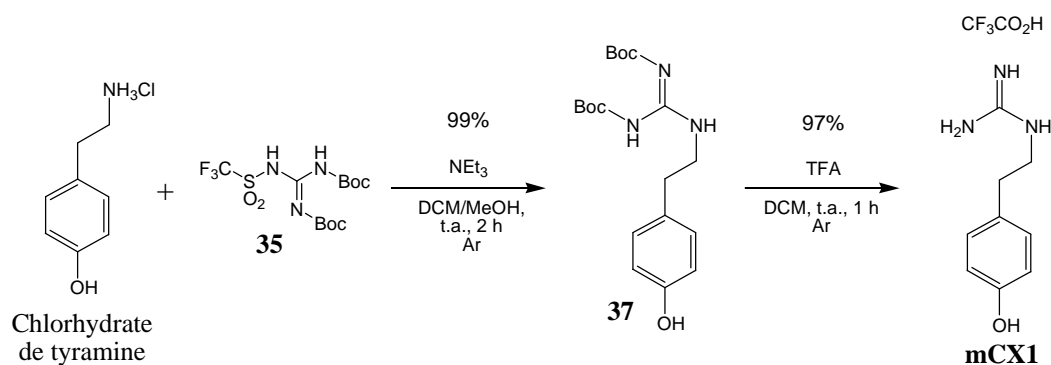


Figure 140. Synthèse en deux étapes du **mCX1** à partir du chlorhydrate de tyramine.

## V.2. **CX1** et membranes modèles : introduction

Il a été montré que la surface d'une bactérie est globalement chargée négativement, par la présence d'acides teïchoïques dans la membrane plasmique des bactéries à Gram positif, de lipopolysaccharides (LPS) dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et de la riche proportion en phospholipides anioniques tels que les phosphatidylglycérols (PG) au sein des membranes phospholipidiques chez ces deux catégories de bactéries.<sup>22, 23</sup>

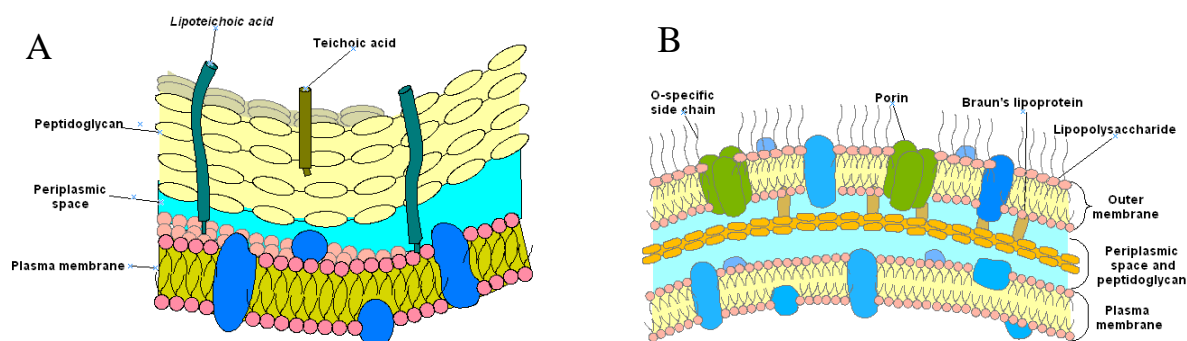
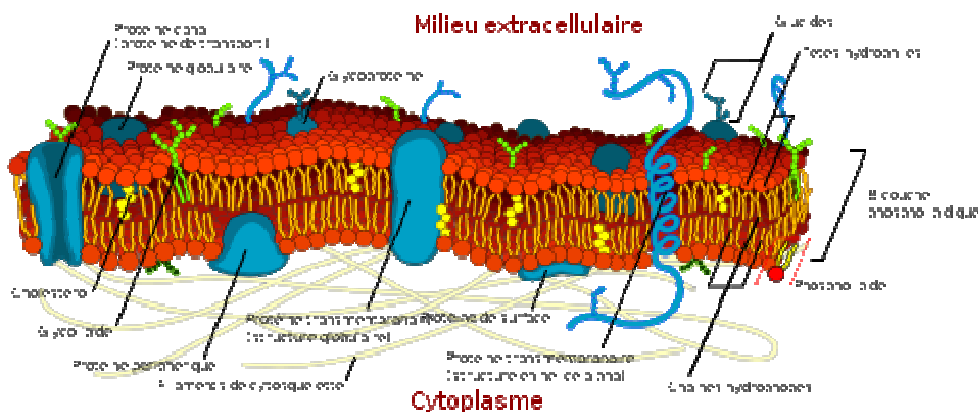


Figure 141. Schéma en coupe transversale d'une paroi bactérienne, avec en haut le milieu extracellulaire et en bas le cytoplasme. Bactérie à Gram positif (A). Bactérie à Gram négatif (B).<sup>207</sup>

A l'inverse, la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes, tel que chez l'Homme, est globalement neutre (Figure 142). Celle-ci est en effet principalement composée de phospholipides zwitterioniques comme les phosphatidylcholines (PC), de sphingomyélines, ainsi que de cholestérol.<sup>23</sup>

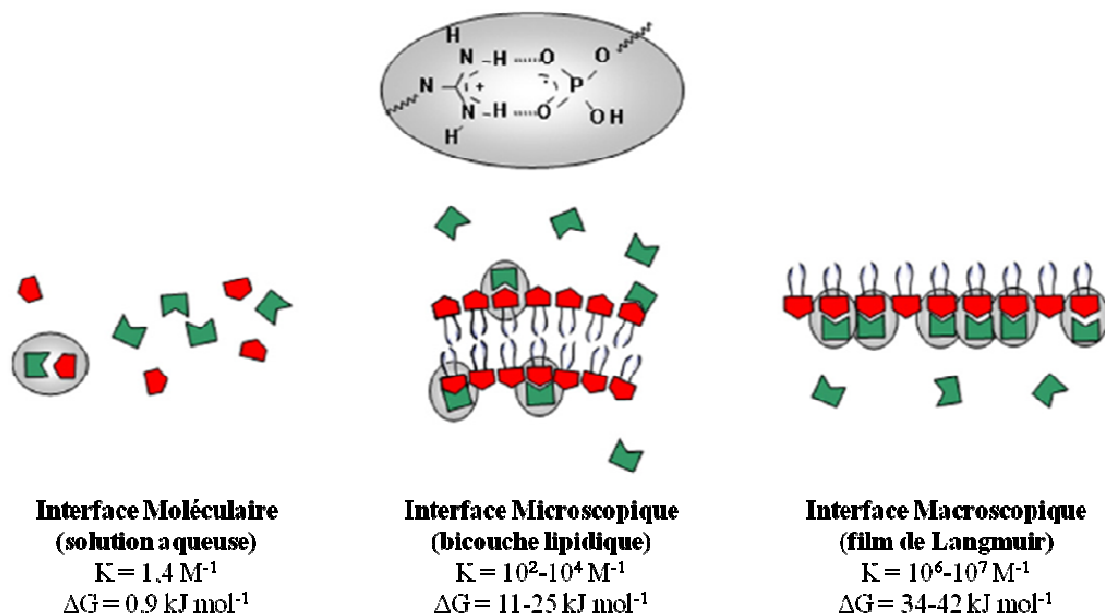


**Figure 142.** Schéma en coupe transversale d'une paroi cellulaire eucaryote, avec en haut le milieu extracellulaire et en bas le cytoplasme.<sup>208</sup>

Nous avons vu que le concept ayant conduit au développement du **CX1** repose sur ces différences chimiques entre les membranes lipidiques eucaryotes et procaryotes. Cette discrimination entre les deux types de cellules a déjà depuis longtemps été exploitée dans la nature par différents organismes. Certains peptides amphiphiles polycationiques, en particulier les peptides riches en résidu arginine (chaîne latérale guanidinopropyle), ont en effet des propriétés antibactériennes.<sup>203, 209, 210</sup> Ces peptides antibactériens (AMPs) et leurs mécanismes d'action commencent aujourd'hui à être bien connus.<sup>203, 209, 211-213</sup> Nous verrons que les interactions entre le **CX1** et les modèles de membranes utilisés ont une analogie avec celles mises en œuvre avec les AMPs. C'est pourquoi notre raisonnement s'est basé sur les connaissances scientifiques dans le domaine des AMPs.

Il a été montré que le groupe guanidinium, sous forme cationique, est en partie responsable de l'affinité des AMPs pour certaines biomolécules comprenant des groupes phosphodiester.<sup>214</sup> En effet, l'association entre un cation guanidinium et un anion phosphodiester est favorisée par l'établissement de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques,<sup>215, 216</sup> avec un fort caractère directionnel.<sup>217, 218</sup> De plus, l'association guanidinium/phosphate est d'autant plus stable aux interfaces macroscopiques (Figure 143),

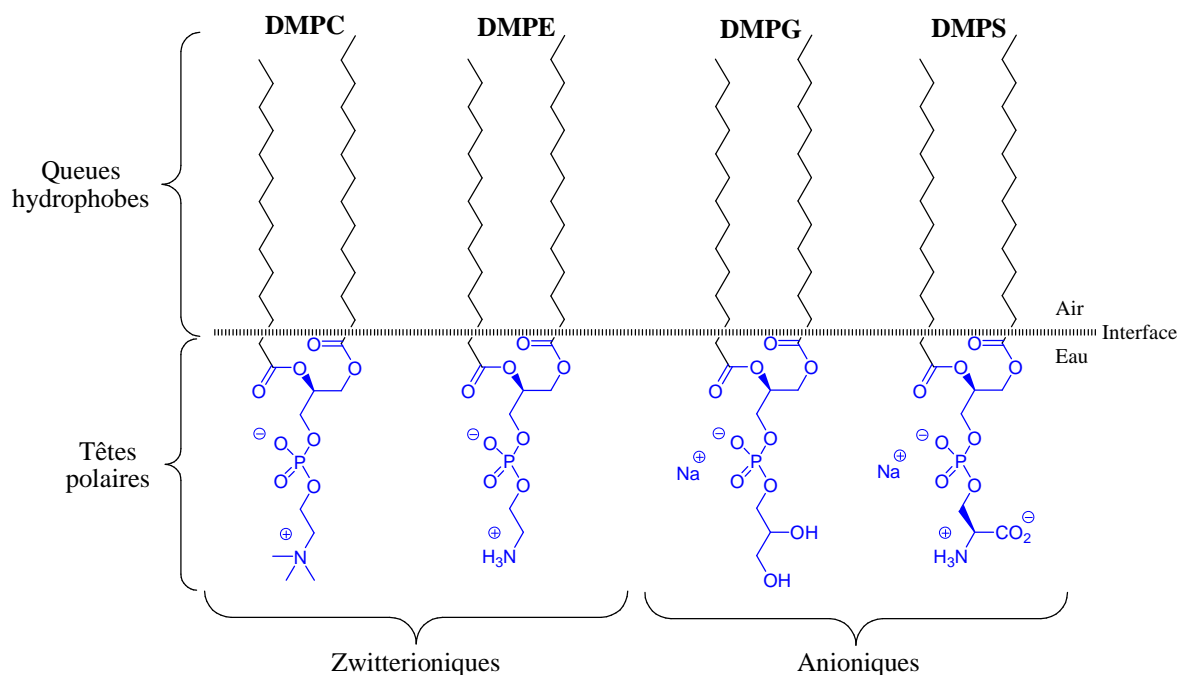
comme les micelles, les vésicules ou encore les films de Langmuir, qu'à une interface moléculaire en solution.<sup>219-221</sup>



**Figure 143.** Association guanidinium / phosphate à différentes interfaces, et leur enthalpie d'association.<sup>221</sup>

Dans le but de compléter les résultats déjà obtenus *in vitro*, nous avons utilisé la technique des films de Langmuir pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires des interactions du **CX1** avec les membranes lipidiques. En effet, un film monomoléculaire constitué de phospholipides étalés à l'interface eau-air peut être considéré comme une demi-membrane biologique, et donc utilisé comme un modèle (Cf. *Chapitre II*).<sup>15-17</sup> Ainsi, selon les phospholipides utilisés (zwitterionique ou anionique), ce modèle peut être représentatif d'une membrane bactérienne ou eucaryote.

Dans cette étude, nous avons utilisé quatre phospholipides différents (Figure 144). Deux phospholipides zwitterioniques, le 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC) et le 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DMPE), ainsi que deux phospholipides anioniques, les sels de sodium du 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-*rac*-(1-glycérol) (DMPG) et du 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine (DMPS). Les films monomoléculaires de lipides zwitterioniques DMPC et DMPE ont donc été utilisés comme modèles de membrane eucaryote, et les anioniques DMPG et DMPS comme modèles de membrane bactérienne.



**Figure 144.** Structure des phospholipides utilisés, et proposition d'organisation à l'interface eau-air.

Les isothermes de compression  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A, ainsi que la microscopie à l'angle de Brewster (BAM) et la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de polarisation (PM-IRRAS) ont été employées pour étudier l'impact du **CX1** ou du **mCX1** dissouts dans la sous-phase sur les propriétés des modèles de membranes. Nous verrons que les résultats obtenus permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions **CX1**/membrane, et donc son mode d'action.

Nous avons choisi de travailler dans une gamme de concentrations autour de la concentration minimale inhibitrice (CMI) observée chez *E. Coli* exposée au **CX1** ( $[\text{CX1}]_{\text{CMI}} = 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).<sup>11</sup> Ces concentrations sont donc de 40, 4 et 0,4  $\text{mg L}^{-1}$  pour le **CX1**. La comparaison entre le **CX1** et le **mCX1** a été faite à concentration cationique équivalente correspondant à  $[\text{CX1}]_{\text{CMI}}$ , soit 4,0  $\text{mg L}^{-1}$  et 3,8  $\text{mg L}^{-1}$  pour le **CX1** et le **mCX1**, respectivement. Cette concentration a été utilisée comme point de comparaison en raison de l'absence d'activité du **mCX1** à 3,8  $\text{mg L}^{-1}$ .

### **V.3. CX1 et membranes modèles : résultats et discussions**

Les propriétés des différents films monomoléculaires en présence ou en absence de **CX1** ont été étudiées en premier lieu *via* les isothermes de compression  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A (Figure 145) et leurs paramètres caractéristiques (Tableau 6). Certains paramètres des

isothermes tels que l'aire moléculaire  $A$  ou le potentiel de surface  $\Delta V$  ont été comparés à la pression de surface  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  (Tableau 7), correspondant à la densité considérée comme étant représentative des membranes biologiques.<sup>222</sup>

### V.3.1. Isothermes de compression $\Delta V$ - $A$

Les isothermes de compression  $\Delta V$ - $A$  des films de Langmuir des quatre phospholipides étudiés étalés sur l'eau pure et sur les solutions de **CX1** (40, 4 et 0,4  $\text{mg L}^{-1}$ ) sont présentées en Figure 145 (lignes discontinues). D'un point de vue général, les isothermes  $\Delta V$ - $A$  des phospholipides zwitterioniques DMPC et DMPE sont peu modifiées en présence de **CX1**, par comparaison avec les anioniques DMPG et DMPS.

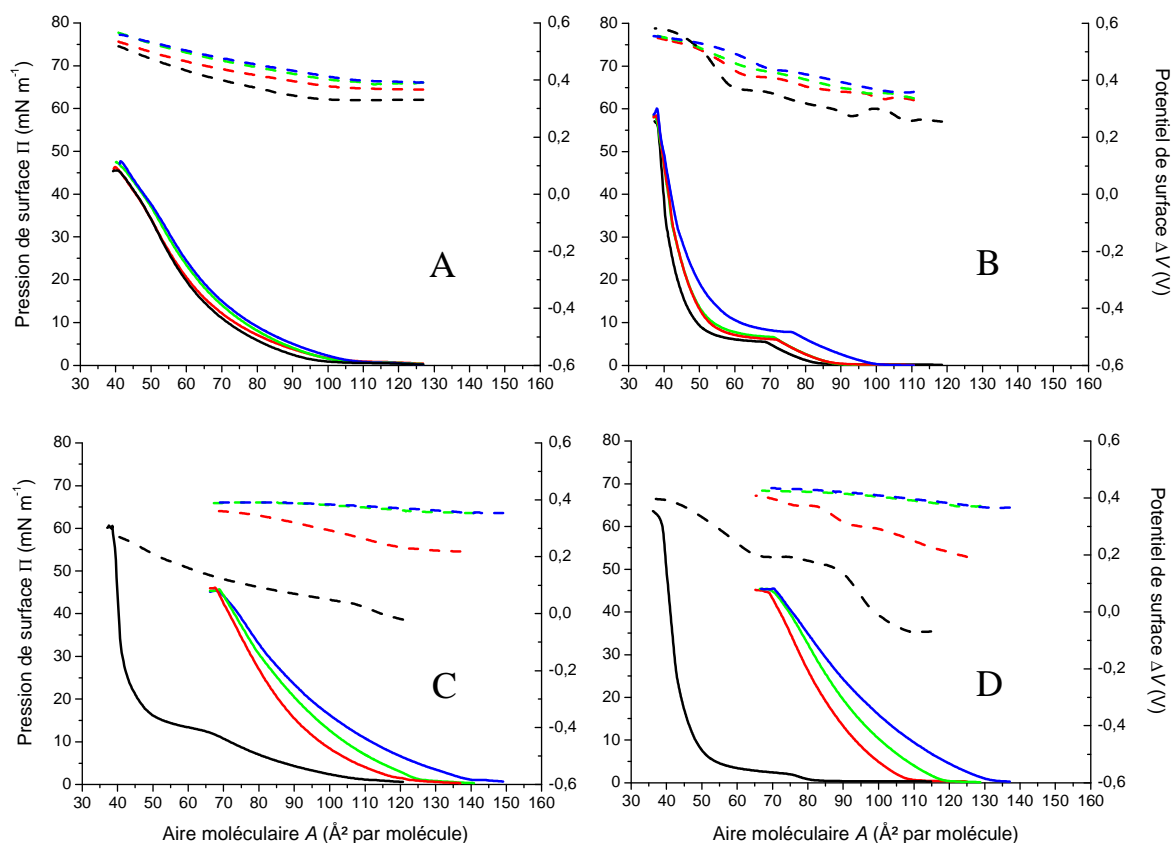
Dans tous les cas, l'effet du **CX1** sur les propriétés de surface des lipides étudiés est clairement visible sur les isothermes  $\Delta V$ - $A$ . Il peut être observé que la présence de **CX1** dans la sous-phase entraîne une augmentation de la valeur de  $\Delta V$ , et ce quelle que soit l'aire moléculaire considérée. Ce phénomène, visible dès la première concentration (0,4  $\text{mg L}^{-1}$ ), est particulièrement prononcé dans le cas de DMPG et DMPS, indiquant une plus importante modification de leur orientation par rapport à l'interface, comparé à DMPC et DMPE. De façon plus précise, on observe à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  que l'élévation de  $\Delta V$  est plus importante chez DMPG que chez DMPS (Tableau 7). Ce résultat suggère une plus forte déshydratation des têtes polaires PG, par comparaison avec DMPS sujet à de multiples liaisons hydrogènes intramoléculaires.<sup>223</sup> Selon le même raisonnement, cet effet de déshydratation est observé chez DMPC comportant à l'origine une importante population de molécules  $\text{H}_2\text{O}$  dans la sphère d'hydratation de sa tête polaire, comparé à DMPE dont le réseau de liaisons H d'hydratations est moins important.<sup>224</sup> Ces résultats indiquent une plus forte affinité du **CX1** pour DMPG, puis DMPS, comparé à DMPC, puis DMPE.

Pour les zwitterioniques DMPC et DMPE, les isothermes  $\Delta V$ - $A$  ont permis de calculer leur moment dipolaire effectif,  $\mu_{\text{eff}}$ ,<sup>86, 87</sup> au point de collapse (Tableau 6), ainsi qu'à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  (Tableau 7). Il peut être constaté pour DMPE que les valeurs de  $\mu_{\text{eff}}$  ne sont pas significativement affectées par la présence de **CX1**, par comparaison avec DMPC. Cette observation est en accord avec l'analyse précédente des isothermes  $\Delta V$ - $A$  de ces deux lipides,

confirmant que les têtes polaires PC sont plus déshydratées en présence de **CX1** que les têtes polaires PE.

Notons que la charge formelle présente sur les têtes polaires PG et PS ne permet pas de calculer  $\mu_{\text{eff}}$  selon le modèle de Vogel-Möbius.<sup>86, 87</sup> Ce paramètre nous est donc inaccessible avec les phospholipides DMPG et DMPS.

D'autre part, on peut constater chez les phospholipides anioniques que le **CX1** induit une stabilisation de la valeur de  $\Delta V$  en fonction de  $A$ . En effet, le saut de potentiel observé en début d'isotherme pour les films de DMPG et DMPS étalés sur eau pure, caractérisant leur transition de phase G/LE, disparaît avec l'augmentation de [CX1]. A partir de  $[\text{CX1}] = 4,0 \text{ mg L}^{-1}$ , on n'observe plus qu'une lente augmentation du de  $\Delta V$  depuis la phase gaz jusqu'au collapse du film monomoléculaire. Nous proposons que ce phénomène soit dû à une orientation quasi constante des phospholipides tout au long de la compression du film. Ce phénomène est beaucoup moins prononcé avec DMPE et DMPC.



**Figure 145.** Isothermes de compression  $\Pi$ -A (lignes continues) et  $\Delta V$ -A (lignes discontinues) des films monomoléculaire de phospholipides étendus sur eau pure et sur les solutions de **CX1**. Résultats obtenus avec (A) DMPC, (B) DMPE, (C) DMPG, (D) DMPS. Composition de la sous-phase : eau pure (noir) ; CX1  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  (rouge) ; CX1  $4 \text{ mg L}^{-1}$  (vert) ; CX1  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (bleu). Température :  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Compression :  $5 \text{ mm min}^{-1}$ .



Nous pouvons également observer que les isothermes  $\Delta V$ -A d'un film de DMPG étalé sur les solutions de **CX1** à 4 et 40 mg L<sup>-1</sup> sont presque indiscernables. La même observation est faite avec DMPS. Nous suggérons donc qu'à [CX1] = 4 mg L<sup>-1</sup>, l'interface eau-DMPG (ou eau-DMPS) arrive à saturation en molécules de **CX1** adsorbée. Ce phénomène est nettement moins prononcé dans le cas de DMPC et DMPE, indiquant une faible quantité de **CX1** adsorbée à l'interface eau-DMPC ou eau-DMPE.

Nous avons donc observé en présence de **CX1** de plus importantes modifications des isothermes  $\Delta V$ -A des films de DMPG et DMPS comparé aux films de DMPC et DMPE. Nos résultats indiquent donc une plus grande affinité pour les modèles de membrane bactérienne. De plus, nous avons vu qu'une plus grande quantité de **CX1** est adsorbée à la surface des films anioniques, en orientant ces phospholipides de façon constante tout au long de la compression de leur film de Langmuir. Ceci indique que l'adsorption du **CX1** à l'interface eau-DMPG ou eau-DMPS est indépendante de l'état de compactage. A partir de ces résultats, il est raisonnable de supposer que les interactions misent en jeu entre lipides anioniques et **CX1** soient de type électrostatique.

**Tableau 6.** Paramètres caractéristiques au point de collapse des isothermes présentées en Figure 145.

Lipide	Sous-phase	$\Pi_{\text{coll}}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$A_{\text{coll}}$ (Å <sup>2</sup> )	$C_s^{-1}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$\Delta V_{\text{coll}}$ (V)	$\mu_{\text{eff}}$ (D)
DMPC	Eau pure	39,6	46,5	88,2	0,49	0,60
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	40,3	45,9	87,4	0,52	0,63
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	43,3	45,3	84,7	0,54	0,65
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	38,8	49,5	82,6	0,54	0,71
DMPE	Eau pure	55,8	38,6	471,6	0,58	0,59
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	57,8	38,5	314,6	0,55	0,56
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	58,0	38,1	305,4	0,56	0,57
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	60,2	38,3	294,6	0,55	0,56
DMPG	Eau pure	58,3	39,2	648,3	0,27	nd
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	46,3	67,8	127,5	0,36	nd
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	46,0	68,8	115,3	0,39	nd
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	44,6	70,1	103,8	0,39	nd
DMPS	Eau pure	60,7	39,0	424,6	0,39	nd
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	44,6	69,4	147,1	0,40	nd
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	43,2	72,3	129,3	0,42	nd
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	45,7	70,6	98,8	0,43	nd

Le caractère zwitterionique de DMPC et DMPE laisse difficilement présager des interactions charge-charge avec le **CX1**. Or, l'hydratation des têtes polaires PC est modifiée en présence de ce dernier, comme l'ont indiqué les valeurs de  $\mu_{\text{eff}}$ . Nous supposons donc que cette observation soit la conséquence d'autres phénomènes que les interactions électrostatiques.

**Tableau 7.** Paramètres caractéristiques à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  des isothermes en Figure 145 et 148.

Phospholipide	Sous-phase	A ( $\text{\AA}^2$ )	$C_s^{-1}$ ( $\text{mN m}^{-1}$ )	$\Delta V$ (V)	$\mu_{\text{eff}}$ (D)
DMPC	Eau pure	52,5	85,8	0,46	0,64
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	52,7	81,6	0,49	0,68
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	54,9	76,5	0,51	0,74
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	55,8	78,5	0,52	0,77
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	51,2	67,4	0,49	0,67
DMPE	Eau pure	41,2	194,7	0,58	0,63
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	43,2	162,5	0,53	0,61
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	43,2	153,6	0,54	0,61
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	44,6	114,6	0,54	0,64
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	41,4	191,7	0,59	0,65
DMPG	Eau pure	41,7	181,8	0,26	nd
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	78,0	117,3	0,35	nd
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	80,5	95,5	0,39	nd
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	82,6	75,8	0,39	nd
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	58,8	27,5	0,20	nd
DMPS	Eau pure	42,2	366,7	0,38	nd
	CX1 0,4 mg L <sup>-1</sup>	77,8	126,4	0,37	nd
	CX1 4 mg L <sup>-1</sup>	81,7	125,3	0,42	nd
	CX1 40 mg L <sup>-1</sup>	84,4	89,4	0,43	nd
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	42,5	376,6	0,37	nd

### V.3.2. Isothermes de compression $\Pi$ -A

Les isothermes de compression  $\Pi$ -A des films de Langmuir formés avec les quatre phospholipides étudiés étalés sur l'eau pure et sur les solutions de **CX1** (40, 4 et 0,4 mg L<sup>-1</sup>) sont présentées en Figure 145 (lignes continues). Leurs paramètres caractéristiques au point de collapse et à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  sont respectivement donnés en Tableaux 6 et 7. Globalement, on observe en présence de **CX1** un décalage des isothermes vers de plus grandes aires

moléculaires. Similairement aux isothermes  $\Delta V$ -A, cet effet est significativement plus prononcé avec les lipides anioniques DMPG et DMPS.

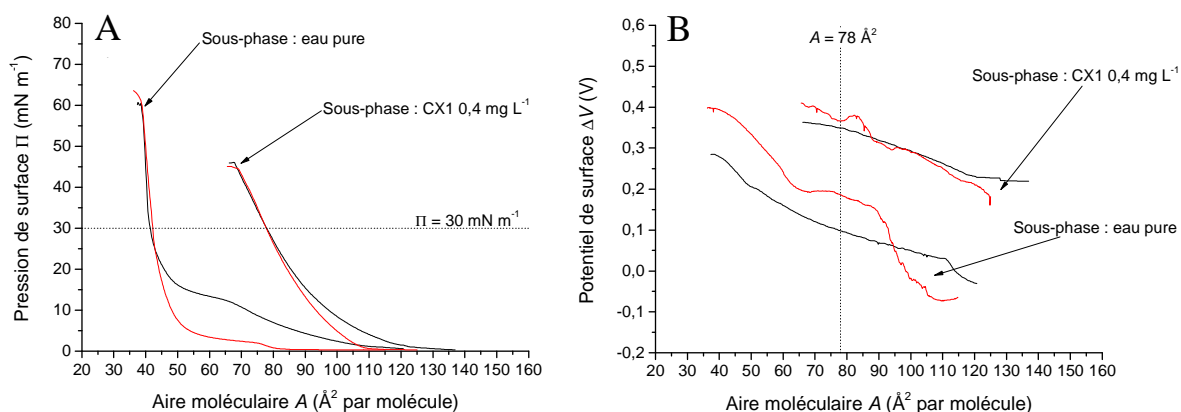
❖ Films monomoléculaires anioniques (DMPG et DMPS).

Il peut être observé la disparition de la transition de phase liquide-étendu / liquide-condensé (LE/LC) chez les deux lipides anioniques. Cet effet est accompagné d'un important décalage des isothermes  $\Pi$ -A vers les plus grandes aires moléculaires dès  $[CX1] = 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ . Ce décalage s'accroît régulièrement avec l'augmentation de  $[CX1]$ . D'autre part, la stabilité de ces films est hautement affectée par la présence de **CX1** dans la sous-phase, comme le montrent les valeurs de  $\Pi_{\text{coll}}$  (voir Tableau 6). Ces observations indiquent que les films monomoléculaires de DMPG et DMPS sont moins stables et ont un caractère plus liquide en présence de **CX1** qu'en son absence.

On peut constater que le décalage des isothermes est similaire, comparé à leur référence respective obtenues avec une sous-phase d'eau pure. Les isothermes de DMPG et de DMPS en présence de **CX1** sont en effet quasiment superposables.

Pour  $[CX1] = 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ , il peut être constaté à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  une augmentation d'aire moléculaire  $A$  de 36 et 35  $\text{\AA}^2$  pour DMPG et DMPS, respectivement. Autrement dit, au voisinage de  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ , les aires moléculaires caractérisant les films de DMPG et DMPS sont identiques avec  $A = 78,0$  et  $77,8 \text{ \AA}^2$ , respectivement. C'est également le cas en comparant leur isotherme obtenue sur une sous-phase d'eau pure. Cette observation indique qu'une quantité similaire de **CX1** est adsorbée aux interfaces eau-DMPG et eau-DMPS. Dans un état condensé, les dimensions moléculaires de DMPG et DMPS ne sont donc plus fixées par leur structure propre mais par le **CX1**.

Notons que la même tendance se retrouve sur les isothermes de compression  $\Delta V$ -A. L'écart de potentiel de surface entre DMPG et DMPS est moins important en présence de **CX1** qu'en son absence (voir Figure 146, B). Ceci indique que les moments dipolaires de DMPG et de DMPS sont plus proches en présence de **CX1**, donc que leur orientation par rapport à l'interface eau-air et leur hydratation sont similaires.



**Figure 146.** Isothermes de compression  $\Pi$ -A (A) et  $\Delta V$ -A (B) des films monomoléculaires de DMPG (noir) et DMPS (rouge) étalés sur une sous-phase d'eau pure ou de CX1 0,4 mg L<sup>-1</sup>.

Après l'important décalage des isothermes  $\Pi$ -A dès [CX1] = 0,4 mg L<sup>-1</sup>, on n'observe plus qu'une faible variation de  $A$  avec l'élévation de la teneur en **CX1**. A  $\Pi = 30$  mN m<sup>-1</sup>, l'augmentation de  $A$  est d'environ 3 Å<sup>2</sup> en fonction de l'élévation de [CX1] (Tableau 7). Ce résultat est en accord avec les isothermes  $\Delta V$ -A indiquant une saturation en **CX1** de l'interface eau-lipide dès les concentrations les plus basses.

D'autre part, on observe que les isothermes correspondantes à chaque concentration de **CX1** se superposent dans les états les plus condensés. Cette observation conforte la proposition que le système soit saturé en **CX1** dès les basses concentrations.

Les résultats obtenus avec les isothermes de compression  $\Pi$ -A convergent avec ceux des isothermes  $\Delta V$ -A. Le mode d'association entre **CX1** et DMPG ou entre **CX1** et DMPS est comparable. Nos résultats indiquent que pour ces deux lipides, le **CX1** interagit de façon similaire avec leur film monomoléculaire respectif dans leur état condensé. En combinant les résultats obtenus par les isothermes  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A, nous proposons que les films de DMPG et de DMPS se trouvent saturés en **CX1** à partir d'une concentration comprise entre 0,4 mg L<sup>-1</sup> et 4,0 mg L<sup>-1</sup>.

D'une façon générale, ces résultats indiquent que les modifications des propriétés interfaciales impliquent des interactions électrostatiques.

❖ Films monomoléculaires zwitterioniques (DMPC et DMPE).

Globalement, les effets du **CX1** observés sur les propriétés interfaciales des films monomoléculaires de lipides anioniques sont beaucoup moins prononcés avec les zwitterioniques DMPC et DMPE. L'isotherme de compression  $\Pi$ - $A$  du film de DMPC étalé sur la sous-phase  $[\text{CX1}] = 0,4 \text{ mg L}^{-1}$  est quasiment superposée à sa référence (Figure 146, A). A  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ , les valeurs de  $A$  correspondantes aux films de DMPC et de DMPE ne s'élèvent que d'environ  $3 \text{ \AA}^2$  par rapport à leur référence respective (Tableau 7).

Les valeurs de  $\Pi_{\text{coll}}$  et de  $C_s^{-1}$  indiquent que la stabilité ainsi que le caractère solide/liquide du film de DMPE sont peu affectés par la présence de **CX1**, tandis qu'aucuns changements significatifs ne sont observés avec DMPC. De plus, on peut constater que la transition de phase LE/LC du film de DMPE est conservée à toutes les concentrations en **CX1**.

Ces résultats obtenus avec DMPC et DMPE montrent l'absence des interactions mises en jeu dans les cas des lipides anioniques. Nous proposons donc que les effets observés avec les films de DMPC et DMPE observés soient la conséquence des changements de propriétés physiques de la sous-phase contenant le **CX1**, comme par exemple la force ionique.

### V.3.3. Fluidité des films

Une étude microbiologique, utilisant une méthode de double marquage fluorescent, a montré une augmentation de la perméabilité membranaire des bactéries exposées au **CX1**.<sup>14</sup> Les propriétés de perméabilité d'une membrane biologique peuvent être corrélées avec la compressibilité d'un film monomoléculaire étalé à l'interface eau-air.<sup>225, 226</sup> On peut donc relier le module de compressibilité  $C_s^{-1}$ , représentant l'état de compactage d'un film monomoléculaire utilisé comme modèle de membrane,<sup>83</sup> à la perméabilité d'une membrane biologique.

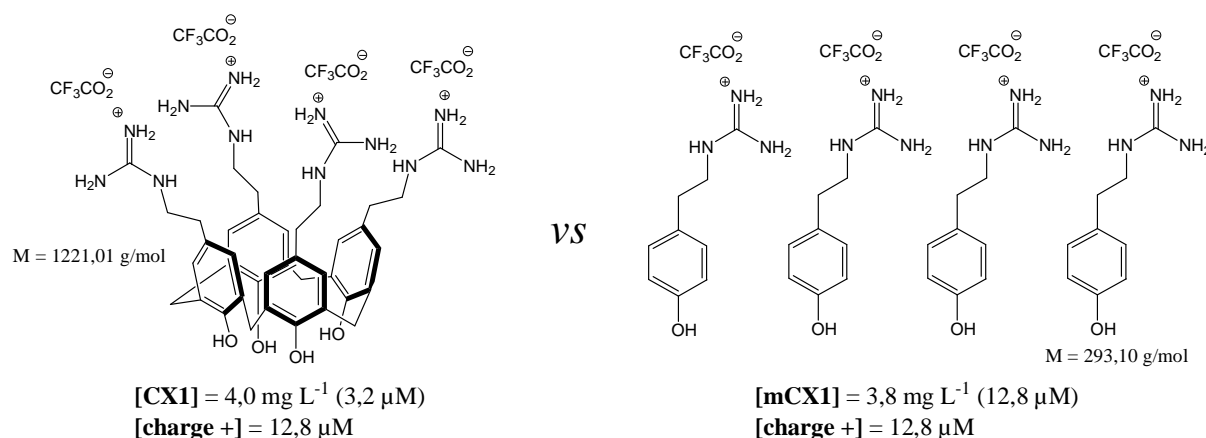
Les valeurs de  $C_s^{-1}$  indiquées en Tableau 6 et 7 sont significativement influencées par la présence de **CX1** chez DMPC et DMPS, modestement chez DMPE, et faiblement chez DMPC. On observe ainsi une baisse de la valeur de  $C_s^{-1}$  avec l'élévation de  $[\text{CX1}]$ . A

[CX1] = 40 mg L<sup>-1</sup>, la décroissance de C<sub>s</sub><sup>-1</sup> au point de collapse des de DMPG et de DMPS atteint 84% et 77%, respectivement, par rapport à leur référence (Tableau 6). Cette observation est en accord avec les isothermes Π-A montrant la disparition des transitions de phase LE/LC. Cet effet de liquéfaction du **CX1** est moins prononcé chez les lipides zwitterioniques DMPE et DMPC, pour lesquels la valeur de C<sub>s</sub><sup>-1</sup> décroît de 38% et seulement 6%, respectivement.

Ces résultats indiquent que le **CX1** a un effet liquéfiant prononcé sur les films monomoléculaires des phospholipides anioniques. Ce caractère liquide traduit donc une augmentation de la perméabilité de ces modèles de membrane bactérienne. Nous proposons que l'effet liquéfiant du **CX1** soit ainsi lié à son mode d'action antibactérien.

#### V.4. Comparaison entre CX1 et mCX1

Les études menées au laboratoire sur la compréhension du mode d'action du **CX1** ont conduites à la synthèse de son équivalent monomérique, le **mCX1** (Figure 147). La comparaison de leurs activités antibactériennes respectives a été entreprise afin d'examiner l'hypothèse émise au départ portant sur l'intérêt d'une organisation spatiale de plusieurs charges positives.



**Figure 147.** Rappel de la structure du **CX1** (quatre charges positives organisées) et du **mCX1** (une charge positive indépendante).

Nous avons vu que le **mCX1** est inactif aux concentrations d'activité du **CX1**.<sup>8, 11</sup> Par exemple, chez *E. Coli*, il a été observé une CMI de 4 μg mL<sup>-1</sup> pour **CX1** contre 256 μg mL<sup>-1</sup>

pour **mCX1**. Ces CMI exprimées en unité de masse tiennent compte du nombre de charges positives, la différence de masse entre 1 **CX1** et 4 **mCX1** (soit 4 groupements méthylènes) étant négligeable. Le **mCX1** peut donc nous servir d'outil pour identifier les interactions spécifiques au **CX1** entraînant son activité antibactérienne.

#### V.4.1. Isothermes de compression

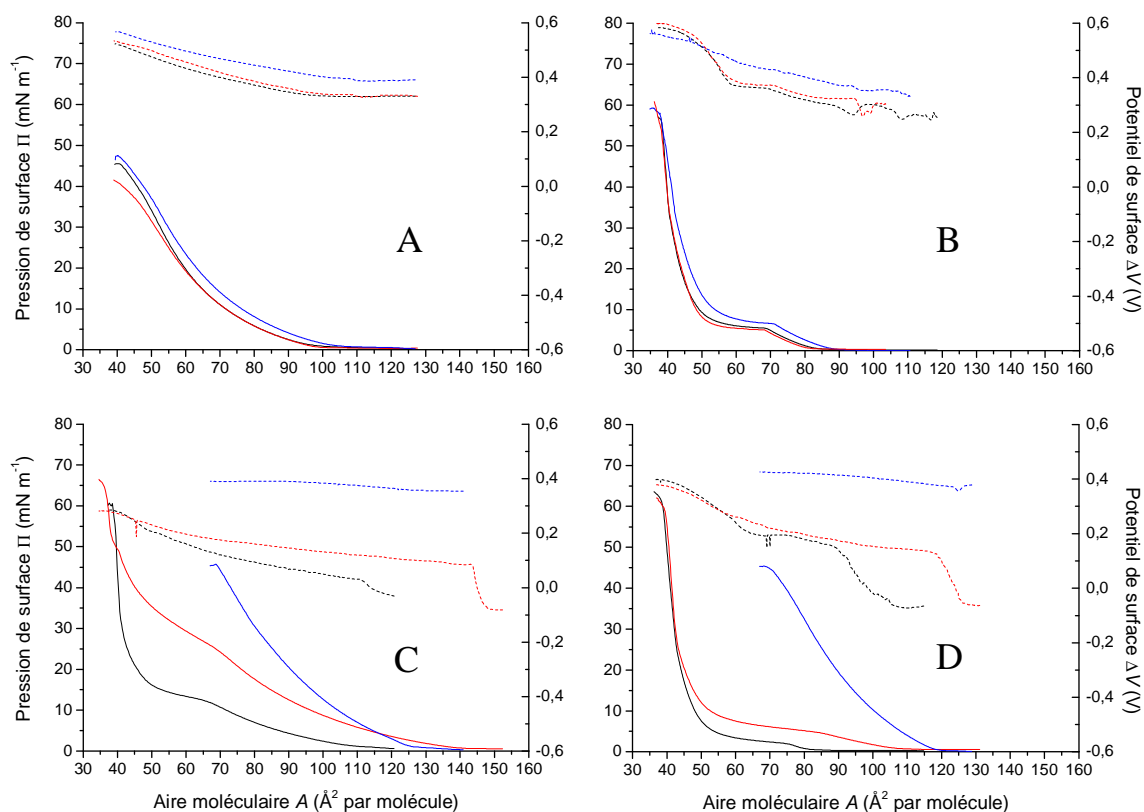
Nous avons donc comparé les effets du **mCX1** et du **CX1** sur nos modèles de membrane, à concentration ionique équivalente (Figure 147). La concentration correspondante à la CMI de *E. Coli* exposé au **CX1** a été choisie pour cette comparaison. Les isothermes de compression  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A des films monomoléculaires des quatre phospholipides de cette étude ont donc été réalisées pour les concentrations  $[\text{CX1}] = 4,0 \text{ mg L}^{-1}$  et  $[\text{mCX1}] = 3,8 \text{ mg L}^{-1}$  (Figure 148). Ainsi, la concentration en cations guanidiniums vaut  $12,8 \mu\text{M}$  dans les deux cas. Les paramètres caractéristiques de ces isothermes au point de collapse et à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  sont reportés en Tableau 8 et 7, respectivement.

D'une façon générale, on peut constater que les changements de profil des isothermes  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A sont moins importants en présence de **mCX1** qu'en présence de **CX1**.

Chez les zwitterioniques DMPC et DMPE, les isothermes obtenues en présence de **mCX1** sont quasiment identiques à celles obtenues en son absence, indiquant très peu d'interactions de celui-ci avec ces modèles de membranes eucaryotes (Figure 148, A, B). Cependant, le **mCX1** a une influence plus significative sur les films de DMPG et DMPS, mais moins importante qu'en présence de son analogue macrocyclique. Ces résultats indiquent que certains mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions avec les films de Langmuir étudiés n'ont lieu qu'avec le **CX1**.

La transition de phase LE/LC visible sur les isothermes des films de DMPG et DMPS étalés sur eau pure est préservée en présence de **mCX1** (Figure 148, C, D). Cette simple observation indique déjà que l'effet de liquéfaction du **mCX1** est moins prononcé que celui du **CX1**. La valeur de  $C_s^{-1}$  au point de collapse du film de DMPG en présence de **mCX1**, quantifie cette observation (Tableau 8). Ceci est d'autant plus important dans le cas du film de

DMPS, où la valeur de  $C_s^{-1}$  n'est que peu affectée par la présence de **mCX1**, indiquant aucun phénomène majeur de liquéfaction (Tableau 8). Les valeurs de  $\Pi_{coll}$  n'indiquent pas d'effet déstabilisant majeur du **mCX1** par comparaison avec son analogue **CX1**.



**Figure 148.** Isothermes de compression  $\Pi$ -A (lignes continues) et  $\Delta V$ -A (lignes discontinues) des films monomoléculaires de phospholipides étendus sur eau pure, **CX1**, ou **mCX1**. Résultats obtenus avec (A) DMPC, (B) DMPE, (C) DMPG, (D) DMPS. Composition de la sous-phase : eau pure (noir) ; **mCX1** 3,8 mg L<sup>-1</sup> (rouge) ; **CX1** 4,0 mg L<sup>-1</sup> (bleu). Température : 20 °C. Vitesse de compression : 5 mm min<sup>-1</sup>.

Il est intéressant de constater une plus grande différence de comportement entre les films de DMPG et de DMPS en présence de **mCX1** qu'en présence de **CX1**. En effet, là où les isothermes  $\Pi$ -A de DMPG et DMPS étalés sur une solution de **CX1** sont quasiment superposables (voir Figure 146, A), ce n'est plus le cas avec une sous-phase contenant le **mCX1** (Figure 149, A). Ces lipides n'interagissent donc pas de façon similaire avec **mCX1**.

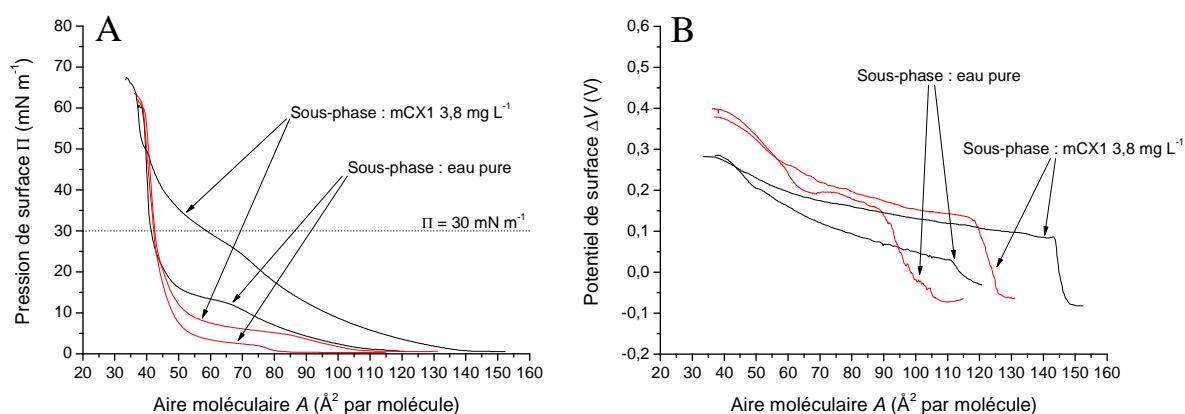
La superposition à partir de  $\sim 25$  mN m<sup>-1</sup> des isothermes  $\Pi$ -A du film de DMPS en présence et en absence de **mCX1** indique que ce dernier est éjecté du film sous l'effet de la compression (voir Figure 148, D). Cependant, le **mCX1** reste présent dans le film de DMPG quel que soit son état de compression.



**Tableau 8.** Paramètres caractéristiques au point de collapse des isothermes présentées en Figure 148.

Phospholipide	Sous-phase	$\Pi_{\text{coll}}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$A_{\text{coll}}$ (Å <sup>2</sup> )	$C_s^{-1}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$\Delta V_{\text{coll}}$ (V)
DMPC	Eau pure	39,6	46,5	88,2	0,49
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	37,0	45,8	80,4	0,51
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	43,3	45,3	84,7	0,54
DMPE	Eau pure	55,8	38,6	471,6	0,58
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	54,0	38,5	413,8	0,60
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	58,0	38,1	305,4	0,56
DMPG	Eau pure	58,3	39,2	648,3	0,27
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	63,4	36,9	416,5	0,28
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	46,0	68,8	115,3	0,39
DMPS	Eau pure	60,7	39,0	424,6	0,39
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	59,0	39,8	494,5	0,38
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	43,2	72,3	129,3	0,42

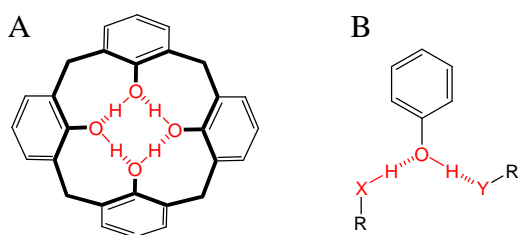
Ces résultats indiquent que différents types d'interactions s'établissent entre le **mCX1** et chacun de ces deux lipides anioniques. Il peut être proposé que cela soit en relation avec l'unique distinction structurale entre DMPG et DMPS, soit la nature du résidu lié au groupe phosphodiester à savoir un groupe glycérol ou L-sérine (voir Figure 144).

**Figure 149.** Isothermes de compression  $\Pi$ -A (A) et  $\Delta V$ -A (B) des films monomoléculaires de DMPG (noir) et DMPS (rouge) étalés sur une sous-phase d'eau pure ou de mCX1 3,8 mg L<sup>-1</sup>.

Il est connu que la structure cyclique des dérivés du calix[4]arène en conformation cône favorise l'établissement d'un réseau intramoléculaire de liaisons H entre les hydroxyles

phénoliques (Figure 150, A).<sup>24</sup> Ceci n'est plus vrai dans le cas d'un dérivé phénolique, où le groupe hydroxyle est alors accessible à d'autres molécules (Figure 150, B).

Nous proposons donc que l'insertion de molécules de **mCX1** au sein du film de DMPG soit favorisée par l'établissement d'un réseau intermoléculaire de liaisons H à l'interface eau-DMPG. Ceci implique l'existence d'interactions mCX1-mCX1 et mCX1-DMPG.

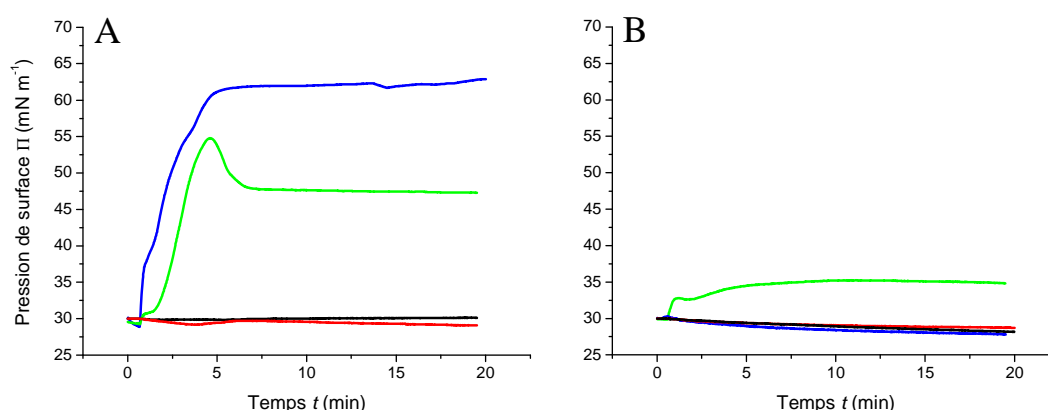


**Figure 150.** Liaisons H intramoléculaires chez le calix[4]arène (A) et intermoléculaires chez le phénol (B). X et Y sont des atomes, respectivement, donneur et accepteur de liaison H.

D'autre part, nous pouvons remarquer que la transition de phase G/LE visible sur les isothermes  $\Delta V$ -A des films de DMPG et DMPS est conservée en présence de **mCX1**, par contraste au cas du **CX1**. Ceci indique que ces lipides ne sont pas fixés selon une orientation spécifique sous l'influence du **mCX1**. Cette interprétation du profil des isothermes  $\Delta V$ -A est quantifiée par les valeurs de  $\Delta V$  aux points de collapse, non significativement affectées par la présence de **mCX1** (Tableau 8).

#### V.4.2. Cinétiques d'adsorption à l'interface eau-lipide

Comme indiqué en Figure 151, lorsque le **CX1** ou ses équivalents monomériques en solution concentrée sont injectés dans la sous-phase pure d'un film monomoléculaire comprimé à une pression de surface initiale  $\Pi_0 = 30 \text{ mN m}^{-1}$ , l'élévation de  $\Pi$  qui s'en suit reflète leur cinétique d'adsorption à l'interface eau-lipide.<sup>101</sup> Le volume d'injection (1,0 mL) a été ajusté de façon à être négligeable par rapport au volume de la sous-phase (330 mL). La concentration de la solution mère a donc été calculée pour obtenir une concentration finale dans la sous-phase de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  ou  $3,8 \text{ mg L}^{-1}$  en **CX1** ou **mCX1**, respectivement.



**Figure 151.** Cinétiques d'adsorption du CX1 (A) et du mCX1 (B) à l'interface eau-lipide. Résultats obtenus avec DMPC (noir) ; DMPE (rouge) ; DMPG (vert) ; DMPS (bleu), initialement comprimés à  $\Pi_0 = 30 \text{ mN m}^{-1}$  ( $t = 0$ ). Concentration en CX1 et mCX1 après injection dans la sous-phase :  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  et  $3,8 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivement. Température :  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

❖ Films monomoléculaires zwitterioniques (DMPC et DMPE).

Chez les zwitterioniques DMPC et DMPE (Figure 151, A, B, lignes noir et rouge), aucune variation significative de  $\Pi$  n'est observée après injection dans la sous-phase de l'un ou l'autre des deux composés étudiés. Cette observation est en accord avec le faible impact du **CX1** et du **mCX1** sur l'allure des isothermes correspondantes (Figures 145 et 148), et suggère une très lente vitesse d'adsorption à l'interface eau-lipide ainsi qu'une faible quantité adsorbée.

❖ Films monomoléculaires anioniques (DMPG et DMPS).

Dans le cas du **CX1**, une rapide et importante élévation de  $\Pi$  après injection est observée (Figure 151, A, lignes verte et bleue). En effet, les pressions de surface d'équilibre  $\Pi_{\text{final}}$  sont atteintes au bout d'environ 5 minutes, suggérant de fortes interactions attractives. Ces résultats montrent que le **CX1** pénètre rapidement dans les films anioniques comprimés à une pression de surface  $\Pi_0$  considérée comme représentative d'une membrane biologique.<sup>222</sup> A l'équilibre, les valeurs  $\Pi_{\text{final}}$  des films de DMPG et de DMPS atteignent environ 48 et  $62 \text{ mN m}^{-1}$ , respectivement. Ces valeurs étant supérieures aux valeurs  $\Pi_{\text{coll}}$  des isothermes correspondantes (voir Tableau 6), il y a donc rupture du film monomoléculaire après adsorption. Ceci est particulièrement vrai dans le cas de DMPS.

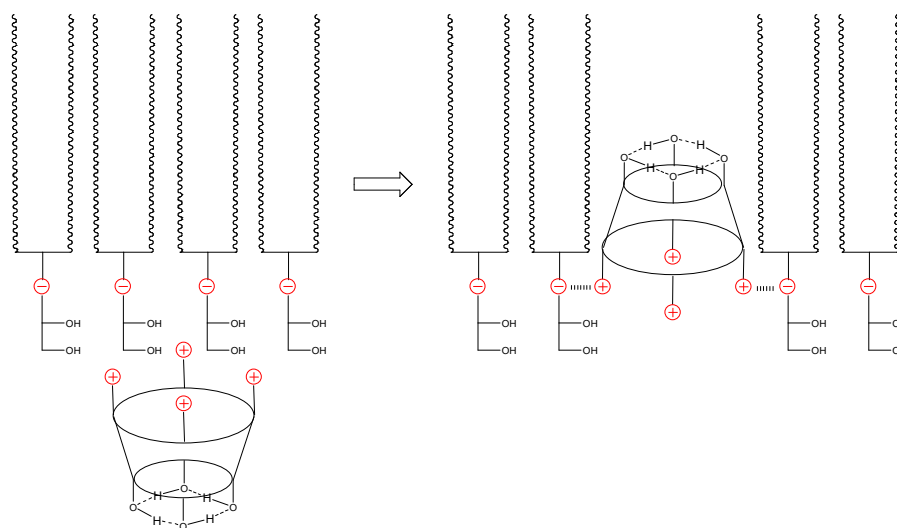
D'autre part, il peut être constaté une différence notable entre les profils de cinétique d'adsorption du **CX1** à l'interface eau-DMPG et eau-DMPS. Là où l'adsorption du **CX1** à la surface d'un film de DMPS s'opère globalement en une seule étape, deux étapes sont clairement discernables dans le cas d'un film de DMPG. Avec ce dernier, on observe dans un premier temps une élévation de  $\Pi$  jusqu'à environ  $55 \text{ mN m}^{-1}$ , suivie d'une baisse jusqu'à l'équilibre autour de  $48 \text{ mN m}^{-1}$ . Le mécanisme d'adsorption du **CX1** au film de DMPG passe donc par un état de transition, suivi d'une réorganisation vers l'état d'équilibre. Un profil d'adsorption en deux étapes est aussi observé avec le **mCX1** (Figure 151, B, ligne verte).

Dans le cas du film de DMPS, l'injection de **mCX1** dans la sous-phase n'entraîne aucune variation significative de  $\Pi$  (Figure 151, B, ligne bleue). Ce résultat est conforme aux isothermes de compression obtenues dans les mêmes conditions de concentration en **mCX1**, indiquant que celui-ci se trouve éjecté du film de DMPS comprimé à  $\sim 25 \text{ mN m}^{-1}$ . Cependant, la différence de ce profil entre **CX1/DMPS** et **mCX1/DMPS** indique que les interactions s'établissant à l'équilibre de ces deux systèmes sont différentes.

Ces expériences d'adsorption ont ainsi confirmé l'affinité des deux composés étudiés pour les modèles de membrane bactérienne, tout en apportant des informations supplémentaires sur les interactions mises en jeu.

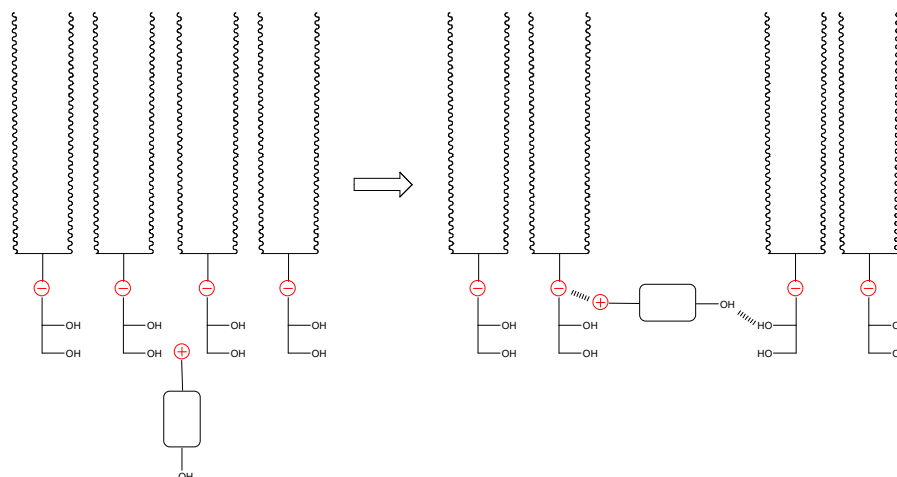
Nous avons pu voir que le **CX1** pénètre dans les films monomoléculaires de DMPG et DMPS. Le **mCX1** s'insère aussi dans le film de DMPG, mais pas dans le film de DMPS. Nous avons montré que des interactions charge-charge sont impliquées dans tous cas. Or ces résultats indiquent qu'un autre type d'interaction est mis en jeu, différent chez le **CX1** et **mCX1**. Il a été vu que les groupes  $-\text{OH}$  calixaréniques du **CX1** sont hydrophobes en raison du réseau de liaisons H intramoléculaire qu'ils forment (voir Figure 150). Cependant, le groupe  $-\text{OH}$  phénolique du **mCX1** est disponible.

Nous proposons donc que la stabilité du **CX1** inséré dans les deux films soit la conséquence de l'établissement d'interactions apolaire, en plus des interactions électrostatiques, entre les chaînes hydrocarbonées des lipides et le macrocycle calixarénique (Figure 152).



**Figure 152.** Hypothèse de l'insertion d'une molécule de **CX1** au sein d'un film monomoléculaire de DMPG ( $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ ). Coupe transversale du film de Langmuir.

L'insertion du **mCX1** dans le film de DMPG est également favorisée en raison de la possible formation de liaisons H entre son groupe  $-\text{OH}$  phénolique et les groupes  $-\text{OH}$  glycéroliques de la tête polaire PG. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le **mCX1** ne pénètre pas le film de DMPS, lipide avec lequel la formation de ces liaisons H est peu probable.



**Figure 153.** Hypothèse de l'insertion d'une molécule de **mCX1** au sein d'un film monomoléculaire de DMPG ( $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ ). Coupe transversale du film de Langmuir.

Nous suggérons donc l'établissement de deux types d'interactions entre **CX1** ou **mCX1** et le film monomoléculaire de DMPG. On peut spéculer, avec réserve, que ceci puisse en partie expliquer l'observation de cinétiques d'adsorption en deux étapes.

D'autre part, ces hypothèses pourraient être étudiées en utilisant la modélisation moléculaire. Cet outil peut nous donner des informations sur la possibilité de former des systèmes comme décrits en Figure 152 et 153, ainsi que des données structurales comme des aires moléculaires permettant de préciser nos propositions.

Extrapolés à un système biologique, ces résultats montrent que le **CX1** est capable de détériorer les membranes bactériennes de façon plus importante que le **mCX1**. Ces deux composés sont en outre inactifs vis-à-vis de membranes cellulaires eucaryotes.

### V.4.3. Microscopie à angle de Brewster

La microscopie à l'angle de Brewster (BAM) est une technique de spectroscopie optique permettant de visualiser *in situ* l'anisotropie d'un film de Langmuir.<sup>88, 90</sup> Il est ainsi possible de suivre en temps réel les changements de morphologie d'un film monomoléculaire à l'interface eau-air au cours de sa compression, comme par exemple lors d'une transition de phase LE/LC. Les fondements sur lesquels repose cette technique sont décrits en Chapitre II.

Dans le but d'obtenir des informations sur la morphologie des films de Langmuir étudiés en interactions avec le **CX1** et le **mCX1**, la microscopie BAM a été utilisée. A l'exception de DMPC, les phospholipides employés sont caractérisés par une transition de phase LE/LC, visible sur leur isotherme  $\Pi$ -A obtenues dans des conditions pures. Parce que les phospholipides DMPE et DMPG forment ainsi des domaines caractéristiques, dans une gamme de valeurs de  $\Pi$  et de  $A$  comparable, ces derniers ont été choisis comme modèle zwitterionique et anionique, respectivement. Ces lipides nous ont donc permis d'étudier les effets du **CX1** et du **mCX1** sur la structure microscopique des films correspondants, apportant ainsi des informations sur leur structure moléculaire.

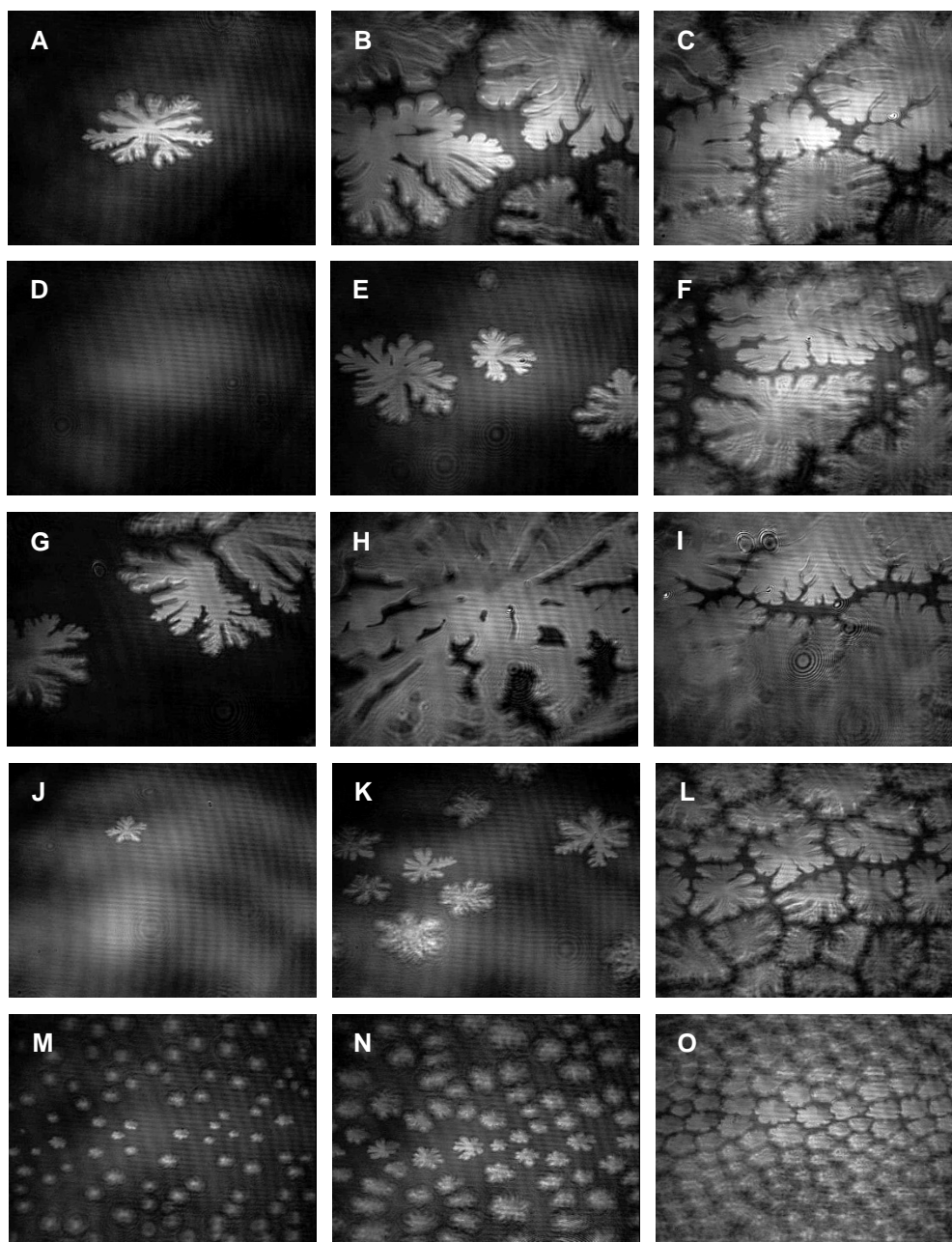
Les images BAM des films monomoléculaires de DMPE et de DMPG, en présence ou non de **CX1** ( $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou de **mCX1** ( $3,8 \text{ mg L}^{-1}$ ), sont données en Figure 154. Ces photographies sont à mettre en relation avec les isothermes de compression correspondantes (Figure 148, B et C). Chaque ligne correspond à trois photographies prises successivement au cours de la transition de phase LE/LC d'un film de Langmuir d'un lipide étalé sur une sous-phase donnée.

Ainsi, dans la première ligne (A-C), les images révèlent les domaines de phase condensée (LC) formés lors de la transition LE/LC du film monomoléculaire de DMPE étalé sur eau pure, à  $\Pi = 6,0 \text{ mN m}^{-1}$  (A),  $7,0 \text{ mN m}^{-1}$  (B) et  $9,5 \text{ mN m}^{-1}$  (B). Cette ligne nous a donc servi de référence pour DMPE. La seconde ligne (D-F) et la troisième ligne (G-I) d'images correspondent au même film, respectivement en présence de **CX1** ou de **mCX1**, aux mêmes valeurs de  $\Pi$ .

Les deux dernières lignes présentent les images obtenues lors de la transition de phase LE/LC du film monomoléculaire de DMPG en l'absence de **mCX1** (J-L), utilisées comme référence, ou en sa présence (M-O). Ces photographies ont été prises en fonction de  $A$ , en raison de la trop importante différence de pression de surface entre les transitions LE/LC avec une sous-phase d'eau pure ou de **mCX1** (voir Figure 148, C). Les valeurs de  $A$  ainsi choisies au cours de la transition sont de 68, 60 et  $48 \text{ \AA}^2$ . Comme indiqué par son isotherme  $\Pi$ - $A$  (Figure 148, C), le film de DMPG en présence de **CX1** ne montre pas de transition de phase LE/LC. Les images BAM correspondantes sont d'un ton gris uniforme, confirmant l'isotropie du film. Outre cette information en accord avec les isothermes de compression, ces images ne présentent donc aucun intérêt et ne sont donc pas présentées.

Les domaines LC formés lors de la transition LE/LC du film de DMPE sont clairement visibles quelle que soit la composition de la sous-phase. En présence de **CX1**, les domaines LC apparaissent plus petits (D-F), par comparaison avec la référence (A-C). Le phénomène inverse est observé en présence de **mCX1** (G-I), où ces domaines LC apparaissent plus gros. La morphologie du film monomoléculaire de DMPE est donc peu affectée par la présence de **CX1** ou de ses monomères.

D'autre part, on peut remarquer avec le **CX1** que cette transition LE/LC commence à une pression de surface légèrement supérieure ( $\sim 1 \text{ mN m}^{-1}$ ) qu'en son absence. D'après l'Equation n° 1 (Cf. Chapitre II), la valeur de  $\Pi$  est liée, *via* les dimensions de la lame de Wilhelmy, à la tension superficielle  $\gamma$ , elle-même fonction du travail nécessaire pour modifier l'aire de l'interface eau-air par compression. Nous proposons donc d'interpréter cette observation en termes d'énergie demandée par le système pour passer d'un état expansé à un état condensé. Cette énergie nécessaire étant plus importante en présence de **CX1** qu'en son absence ( $\Pi$  de début de transition plus grande), le phénomène observé traduit donc un caractère plus liquide du film de DMPE. Ceci est en accord avec les valeurs de  $C_s^{-1}$  au point de collapse, plus basse en présence de **CX1** qu'en son absence (Tableau 8).



**Figure 154.** Photographies BAM prises lors de la transition de phase LE/LC des films monomoléculaires de DMPE ou de DMPG, en absence et en présence de **CX1** ou de **mCX1**. Ligne A-C : DMPE étalé sur eau pure à 6,0 (A), 7,0 (B) et 9,5  $\text{mN m}^{-1}$  (C) ; ligne D-F : DMPE étalé sur **CX1** 4,0  $\text{mg L}^{-1}$  à 6,0 (D), 7,0 (E) et 9,5  $\text{mN m}^{-1}$  (F) ; ligne G-I : DMPE étalé sur **mCX1** 3,8  $\text{mg L}^{-1}$  à 6,0 (G), 7,0 (H) et 9,5  $\text{mN m}^{-1}$  (I) ; ligne J-L : DMPG étalé sur eau pure à 68 (J), 60 (K) et 48  $\text{Å}^2$  (L) ; ligne M-O : DMPG étalé sur **mCX1** 3,8  $\text{mg L}^{-1}$  à 68 (M), 60 (N) et 48  $\text{Å}^2$  (O). La largeur de chaque photographie correspond à 344  $\mu\text{m}$ . Température : 20 °C. Vitesse de compression : 5  $\text{mm min}^{-1}$ .

Un effet nettement plus important du **CX1** et du **mCX1** est observé dans le cas de DMPG. Les domaines LC observés lors de la transition de phase LE/LC d'un film monomoléculaire de DMPG étalé sur eau pure (J-L) disparaissent totalement en présence de **CX1**. Le film est alors parfaitement isotrope comme l'indiquent des images d'un ton gris



uniforme (résultats non présentés). Ceci confirme visuellement que la liquéfaction d'un film monomoléculaire de DMPG en présence de **CX1** est beaucoup plus importante que pour un film de DMPE. De plus, cette isotropie du film de DMPG tout au long de sa compression suggère que les molécules de **CX1** adsorbées à l'interface eau-DMPG sont uniformément réparties selon une organisation régulière entre les lipides libres et les lipides en interactions. Nous proposons donc l'existence de supra-molécules de formule générale  $(\text{DMPG})_x(\text{CX1})_y$ .

La conservation partielle de la transition de phase LE/LC du film de DMPG en présence de **mCX1** est confirmé par les images BAM correspondantes, révélant la formation de domaines LC (M-O). Par comparaison avec la référence (J-L), ces domaines sont significativement plus petits et plus nombreux, ce qui confirme une liquéfaction du film comme indiquée par les valeurs de  $C_s^{-1}$  (Tableau 8). La pression de surface mesurée au début de la transition LE/LC en présence de **mCX1** est nettement supérieure à celle mesurée en son absence ( $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ ). Selon le même raisonnement évoqué avec DMPE, nous proposons que ce phénomène soit une traduction de l'effet de liquéfaction du **mCX1**. Cet effet est cependant moins prononcé que celui du **CX1** avec lequel, de façon extrême, le film reste en phase LE même en fournissant de l'énergie au système par compression.

On peut ainsi conclure que les résultats obtenus en microscopie BAM sont en adéquation avec l'analyse des isothermes de compression faite précédemment. Ces résultats confirment que l'impact du **mCX1** sur les propriétés de surface des films anioniques (modèle bactérien) est similaire, mais significativement moins prononcé que celui du **CX1**.

## **V.5. Spectroscopie IR de réflexion-absorption à modulation de polarisation**

Dans le but de mieux cerner à l'échelle moléculaire les effets et le mode de liaison du **CX1** et du **mCX1** sur les différents modèles de membrane étudiés, nous avons entrepris l'acquisition *in situ* de spectres infrarouges de ces films monomoléculaires en utilisant la spectroscopie PM-IRRAS.<sup>93-95</sup> Les principes fondamentaux de cette technique sont décrits en Chapitre II.

Les spectres PM-IRRAS des films de Langmuir composés de DMPC, DMPE, DMPG ou DMPS, en absence et en présence de **CX1** ou de **mCX1** (4,0 mg L<sup>-1</sup> et 3,8 mg L<sup>-1</sup>, respectivement) sont présentés en Figure 155. Les fréquences vibratoires des bandes d'absorption caractéristiques des lipides sont données en Tableau 9. Tous les spectres ont été collectés à la pression de surface  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ , considérée comme étant représentative de l'état de densité rencontré dans les membranes biologiques.<sup>222</sup>

L'influence du **CX1** et du **mCX1** sur la région hydrophobe des films monomoléculaires étudiés, à savoir les chaînes alkyles, a été suivie *via* les groupes méthylènes et leurs fréquences d'élongation antisymétrique  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  et symétrique  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ , autour de 2920 cm<sup>-1</sup> et 2850 cm<sup>-1</sup>, respectivement. D'autre part, la fréquence d'élongation des groupes carbonyles  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , ainsi que la fréquence d'élongation antisymétrique des groupes phosphodiester  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ , autour de 1730 cm<sup>-1</sup> et 1220 cm<sup>-1</sup>, respectivement, ont permis de suivre l'effet du **CX1** et du **mCX1** sur la région polaire des films étudiés. En effet, les valeurs de  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  et  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  sont sensibles à la conformation des chaînes alkyles, donc à leur état plus ou moins liquide,<sup>96, 97</sup> tandis que les fréquences  $\nu(\text{C}=\text{O})$  et  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  sont sensibles à l'état d'hydratation des têtes polaires.<sup>98, 99</sup>

La diminution des fréquences vibratoires des groupes CH<sub>2</sub>, représentatifs des chaînes alkyles, peut être reliée à une diminution de l'agitation moléculaire comme lors d'un refroidissement, donc à un état plus solide et structuré. Au contraire, l'élévation de ces fréquences implique une augmentation de la liberté conformationnelle avec désorganisation des chaînes alkyles, donc un état plus liquide et agité. Ainsi, un décalage des valeurs de  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  et  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  vers les faibles nombres d'onde (ou faibles fréquences, soit un décalage dans le rouge) indique une élévation de l'ordre dans les chaînes alkyles.<sup>161, 162</sup>

Dans un milieu aqueux, les fréquences vibratoires des groupes C=O et PO<sub>2</sub><sup>-</sup> sont directement liées au nombre de molécules H<sub>2</sub>O dans leur sphère d'hydratation. Plus ce nombre est important, donc plus il y a de liaisons H possibles, plus leur fréquence diminue. Ainsi, Les valeurs de  $\nu(\text{C}=\text{O})$  et  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  sont influencées par l'implication des groupements chimiques correspondant dans un réseau plus ou moins étendu de liaisons H, et sont par conséquent directement liées à l'état d'hydratation des têtes polaires lipidiques. Un décalage de ces bandes vers de faibles nombres d'onde indique donc une augmentation de

l'hydratation, tandis qu'un décalage vers de grands nombres d'onde indique une déshydratation partielle autrement dit une diminution de l'accessibilité des têtes polaires aux molécules d'eau environnantes.<sup>99, 150, 227</sup>

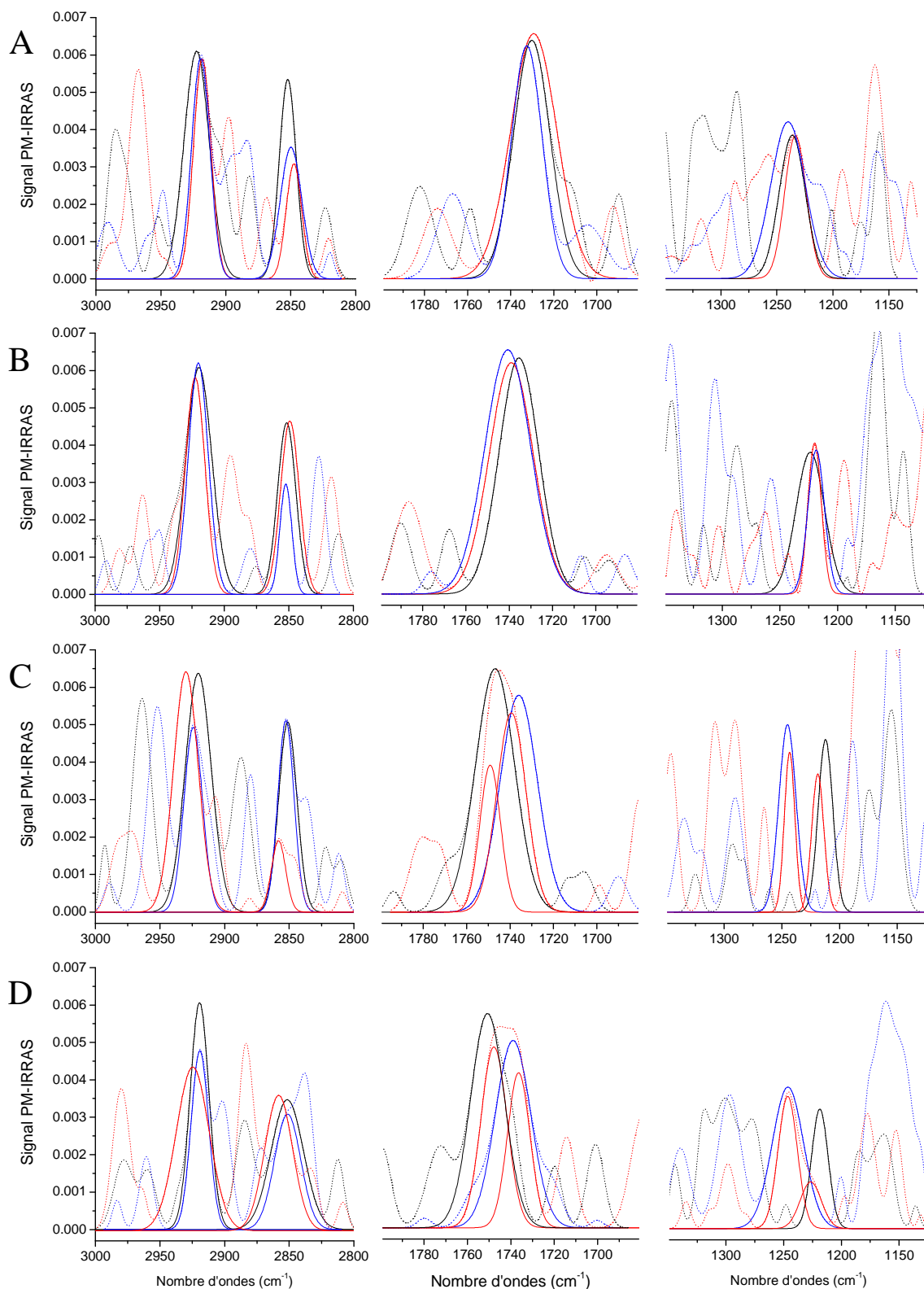
### V.5.1. Films lipidiques étalés sur une sous-phase d'eau pure

Avant d'étudier par PM-IRRAS les effets du **CX1** et du **mCX1** sur les films de phospholipides, il est essentiel de les caractériser dans leur état de référence, étalés sur une sous-phase d'eau pure (Figure 155, lignes noires).

Il peut être relevé que la position des bandes  $\nu_{as}(CH_2)$  et  $\nu_s(CH_2)$  augmentent à partir de DMPS vers DMPE et DMPG puis DMPC (Tableau 9), indiquant que le niveau d'ordre des chaînes alkyles décroît selon le même ordre. Ceci est en accord avec les valeurs  $C_s^{-1}$  calculées à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$  montrant une accentuation du caractère liquide, selon un ordre croissant, des films de DMPC à DMPS, où DMPE et DMPG sont intermédiaires (voir Tableau 7).

La différenciation des têtes polaires zwitterioniques et anioniques est clairement visible par l'analyse des bandes  $\nu(C=O)$  (Tableau 9). Observées autour de  $1732 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  et  $1748 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  pour les lipides zwitterioniques et anioniques, respectivement, ces bandes indiquent que les groupes C=O sont plus hydratés dans le cas de DMPC et DMPE comparé à DMPG et DMPS.<sup>21</sup> Nous suggérons que la présence de contre-cations  $Na^+$  au niveau des têtes polaires anioniques puisse être responsable de cette discrimination. En effet, la proximité de ces cations  $Na^+$  des groupes C=O peut limiter l'accessibilité à l'eau environnante de ces derniers.<sup>100, 154</sup>

A l'inverse, les fréquences de vibration  $\nu_{as}(PO_2^-)$  montrent que les groupes phosphates sont plus hydratés chez les lipides anioniques DMPG et DMPS, comparé à DMPC et DMPE (Tableau 9). Chez ces derniers, nous supposons que des interactions intra- et intermoléculaires entre les anions phosphate et les cations choline (ou éthanolamine selon le lipide considéré), réduisent l'accessibilité de ces groupes phosphates vis-à-vis de l'eau environnante.<sup>228</sup>



**Figure 155.** Spectre PM-IRRAS, collectés à  $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ , dans les régions spectrales de vibration d'élongation des groupes méthylènes (gauche), carbonyles (milieu) et phosphates (droite). Résultats obtenus avec (A) DMPC, (B) DMPE, (C) DMPG et (D) DMPS. Composition de la sous-phase : eau pure (noir) ; CX1  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  (rouge) ; mCX1  $3,8 \text{ mg L}^{-1}$  (bleu). Température :  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Par souci de clarté, ne sont présentés que les pics d'intérêts (lignes continues) après déconvolution du spectre d'origine (lignes discontinues).

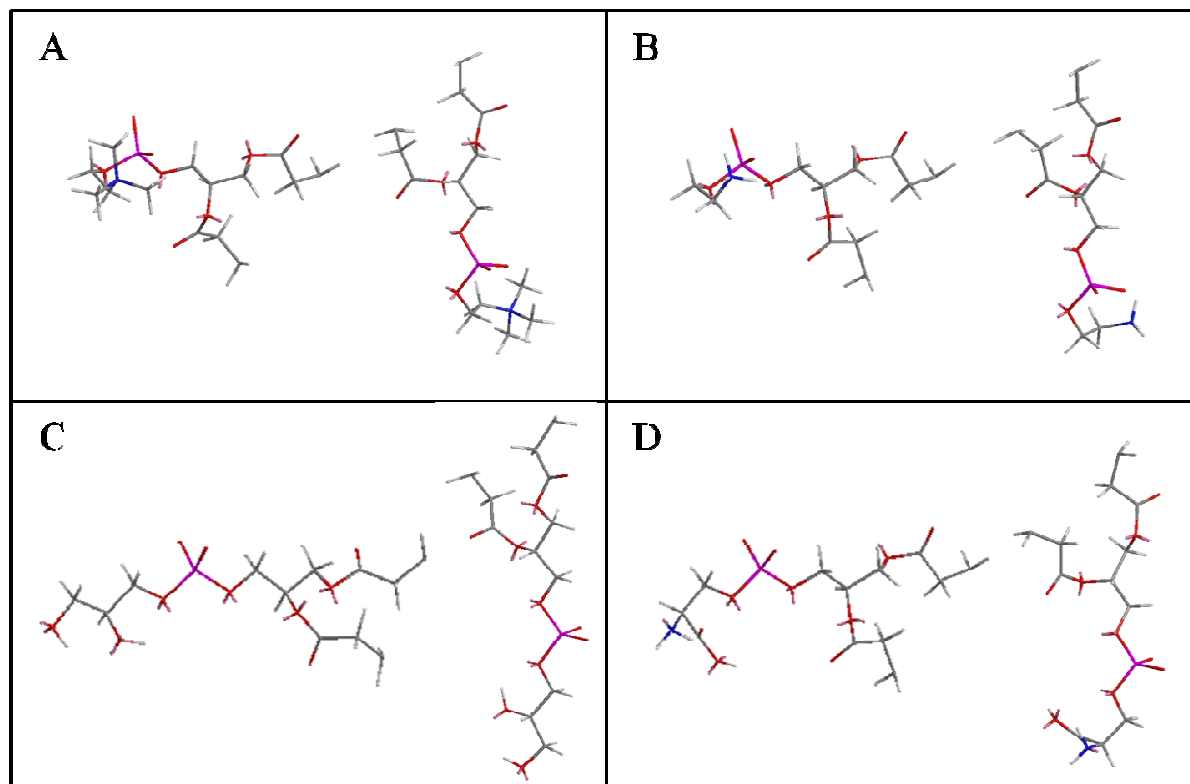
**Tableau 9.** Fréquences de vibration d'élongation des groupes méthylènes, carbonyles et phosphates de DMPC, DMPE, DMPG et DMPS en absence et en présence de **CX1** ou **mCX1** ( $\Pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ ).

Phospholipide	Sous-phase	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu(\text{C=O})$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
DMPC	Eau pure	2923	2852	1730	1236
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	2918	2848	1729	1233
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	2919	2850	1733	1240
DMPE	Eau pure	2920	2852	1735	1224
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	2922	2850	1739	1220
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	2920	2852	1741	1219
DMPG	Eau pure	2920	2851	1747	1212
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	2930	2858	1739, 1749	1219, 1243
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	2924	2853	1736	1245
DMPS	Eau pure	2919	2850	1751	1219
	CX1 4,0 mg L <sup>-1</sup>	2925	2858	1736, 1748	1226, 1246
	mCX1 3,8 mg L <sup>-1</sup>	2919	2851	1739	1246

Cette hypothèse est appuyée par une simple comparaison structurale des phospholipides étudiés. Comme indiqué en Figure 156, de telles interactions intramoléculaires peuvent être envisagées.

Ces structures ont été obtenues à l'aide du logiciel *Chem3D<sup>®</sup> Ultra v8.0* (CambridgeSoft Corporation), par optimisation dans le vide à partir d'un dessin bidimensionnel.<sup>229</sup> Attention, soyons bien clairs. Ce ne sont que de simples représentations ne pouvant être considérées comme de la modélisation moléculaire, le résultat étant totalement dépendant du dessin initial. Cependant, cette méthode prenant en compte les lois générales de la Chimie (interactions charge-charge, angles de liaisons, etc.), il est possible d'en tirer quelques indications comme un modèle manipulable, à condition de dessiner selon un modèle unique les différentes structures avant calcul.

Il peut ainsi être constaté chez DMPC et DMPE que les groupes respectifs choline et éthanolamine, chargés positivement, pourraient se rapprocher du groupe phosphodiester adjacent et chargé négativement, par repliement de la partie  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  les séparant (Figure 156, A et B). En revanche chez DMPG et DMPS, L'absence d'un contre-ion intramoléculaire rend leur groupe anionique phosphodiester plus accessibles (Figure 156, C et D).



**Figure 156.** Structures des phospholipides étudiés, optimisées dans le vide (*Chem3D<sup>®</sup> Ultra v8.0*). Résultats obtenus avec (A) DMPC, (B) DMPE, (C) DMPG et (D) DMPS. Les chaînes alkyles ont été retirées après calcul par souci de clarté. Code Couleur : hydrogènes en blanc, carbones en gris, oxygènes en rouge, azotes en bleu et phosphores en magenta.

### VI.5.2. Films lipidiques étalés sur une sous-phase de CX1

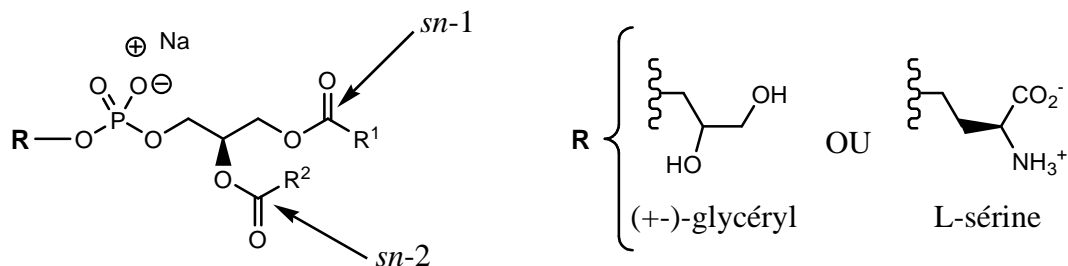
La présence de **CX1** dans la sous-phase induit chez DMPG et DMPS un décalage des bandes  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  et  $\nu_s(\text{CH}_2)$  vers les grands nombres d'ondes, indiquant une désorganisation des chaînes alkyles, donc un caractère plus liquide des films (Tableau 9). L'effet inverse est observé chez DMPC, tandis qu'aucun effet significatif n'est à relever dans le cas de DMPE. Cet effet de liquéfaction des chaînes alkyles de DMPG et DMPS observé en PM-IRRAS est en adéquation avec les premiers résultats obtenus à l'aide des isothermes de compression.

Nous avons vu précédemment que les molécules de **CX1** pénètrent rapidement dans les films monomoléculaires de DMPG et de DMPS. Nos résultats obtenus par PM-IRRAS montrent que cette insertion du **CX1** a pour effet global de désorganiser la partie hydrophobe des films de Langmuir anioniques.

Aucun effet significatif du **CX1** n'a été observé sur l'hydratation des groupes C=O appartenant au lipide DMPC (Tableau 9). En outre, un faible décalage vers les grands nombre

d'onde ( $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$ ) de la bande  $\nu(\text{C}=\text{O})$  de DMPE est observé. Ceci indique une légère déshydratation des têtes polaires de PE au niveau des groupes carbonyles.

Cependant, d'importants changements de la bande  $\nu(\text{C}=\text{O})$  sont clairement visibles chez DMPG et DMPS, caractérisés par une large bande non-gaussienne (Figure 155, C et D ; spectres centraux). Dans les deux cas, la déconvolution de cette bande révèle deux pics discernables, attribués aux groupes carbonyles *sn*-1 et *sn*-2 (voir Figure 157).



**Figure 157.** Nomenclature spécifique aux phosphoglycérides. Selon la nature de R, présentation de DMPG ou DMPS.  $R^1$  et  $R^2$  peuvent être identiques ou différents, ici  $R^1 = R^2 =$  chaîne alkyle.

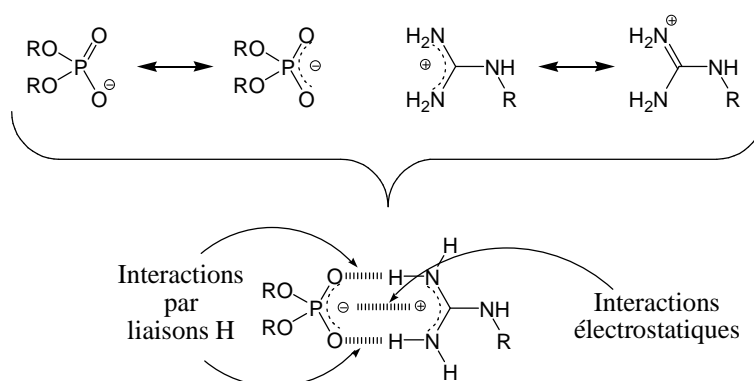
Cette dissociation des deux bandes  $\nu(\text{C}=\text{O})_{sn-1}$  et  $\nu(\text{C}=\text{O})_{sn-2}$  indique que l'environnement chimique de chacun des deux groupes  $\text{C}=\text{O}$  *sn*-1 et *sn*-2 est plus différencié en présence de **CX1** qu'en son absence. D'après les études de Casal et coll. (et plus récemment Binder et coll.), ce phénomène est la conséquence d'une restriction de liberté conformationnelle des groupes esters, les rendant chimiquement différents.<sup>100, 230</sup> Cette restriction peut être la conséquence d'un changement de conformation du squelette glycérolique des lipides DMPG et DMPS.<sup>100</sup>

Selon la littérature, nous assignons le pic de plus haut nombre d'ondes aux groupes  $\text{C}=\text{O}_{sn-1}$ , tandis que le pic de plus bas nombre d'ondes est assigné aux groupes  $\text{C}=\text{O}_{sn-2}$ .<sup>99, 100</sup> Par comparaison avec l'unique bande observée en conditions pures, seuls les carbonyles *sn*-2 sont significativement affectés par la présence de **CX1** (Tableau 9). Leur bande d'absorption subi en effet un décalage vers les faibles nombres d'ondes (de 8 et 15  $\text{cm}^{-1}$  pour DMPG et DMPS, respectivement), signifiant une importante hydratation des groupes  $\text{C}=\text{O}_{sn-2}$ . Les carbonyles *sn*-1 sont quant-à eux légèrement déshydratés chez DMPG et légèrement hydratés chez DMPS, comme l'indiquent les faibles décalages respectivement vers le bleu et vers le rouge des bandes  $\nu(\text{C}=\text{O})_{sn-1}$  correspondantes (2 et 3  $\text{cm}^{-1}$ ).

Cette analyse des bandes  $\nu(\text{C}=\text{O})$  montre que l'environnement chimique des groupes carbonyles *sn*-1 est peu modifié en présence de **CX1**, tandis que les carbonyles *sn*-2 sont plus

accessibles aux molécules H<sub>2</sub>O environnantes. Il peut être envisagé que ce phénomène soit la conséquence du déplacement des cations Na<sup>+</sup> depuis les têtes polaires vers la sous-phase, suite à l'adsorption de **CX1** à l'interface eau-DMPG ou eau-DMPS. On peut également proposer en parallèle que le carbonyle *sn*-2 étant le plus proche du groupe anionique phosphodiester, site de liaison du **CX1** le plus probable, il serait donc plus affecté par la présence de ce dernier. En effet, il est décrit dans la littérature que l'association entre un anion phosphodiester et un cation guanidinium implique des interactions électrostatiques ainsi que des liaisons hydrogène,<sup>215, 216</sup> impliquant donc un fort caractère directionnel (Figure 158).<sup>217, 218</sup> Il est ainsi probable que la contrainte spatiale du **CX1** soit alors transmise aux phospholipides. Par conséquent, une conformation spécifique des têtes polaires lipidiques, en particulier du squelette glycérolique, pourrait être induite par l'adsorption de **CX1** à la surface des films anioniques.

Par extrapolation, les films de DMPG et DMPS modélisant une membrane cellulaire bactérienne, ces résultats suggèrent comment le **CX1** peut modifier la structure à l'échelle moléculaire d'une de ces membranes.



**Figure 158.** Association guanidinium/phosphate. Cation guanidinium mono-substitué et anion phosphodiester..<sup>231</sup>

Les résultats obtenus jusqu'à présent montrent qu'il est fort probable que le groupement phosphodiester, chargé négativement, de chaque tête polaire PG ou PS soit le principal site de liaison du calixarène *via* ses groupes guanidinium chargés positivement. Afin de clarifier ce point de vue, la bande d'absorption  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$  a été analysée.<sup>99</sup>

Il peut être observé sur les spectres PM-IRRAS des films de DMPG et DMPS que l'allure et la fréquence de vibration de la bande  $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$  sont très nettement modifiées par la présence de **CX1** (Figure 155, C et D, spectres de droite ; Tableau 9).



La bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  se trouve divisée en deux pics, tous deux décalés vers les grands nombres d'ondes. Cette division suggère la co-existence de deux populations de groupes phosphodiester. Nous pouvons à ce stade de notre étude faire l'hypothèse que l'une de ces populations soit constituée de lipides libres, et l'autre de lipides associés au **CX1**. En effet, il est raisonnable de supposer que la liaison d'un groupe guanidinium à un groupe phosphodiester selon l'association illustrée en Figure 158 puisse induire une déshydratation de ce groupe phosphodiester.<sup>232</sup> Ce phénomène doit donc être détectable en PM-IRRAS par un décalage vers de grands nombres d'onde. Par conséquent, le pic à la plus faible fréquence, peu décalé vers le bleu et indiquant une légère déshydratation des groupes phosphodiesters correspondants, est attribué aux phospholipides non-liés. D'autre part, le second pic à la plus haute fréquence, plus nettement décalé vers le bleu et indiquant une importante déshydratation des groupes phosphodiesters correspondants, est attribué aux phospholipides liés au **CX1** via une association guanidinium/phosphodiester.

Avec les films zwitterioniques (DMPC ou DMPE), l'influence du **CX1** sur la bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  est peu prononcée, selon un léger décalage autour de 3 à 4  $\text{cm}^{-1}$  vers les faibles nombres d'ondes (Figure 155, A et B, spectres de droite). De plus l'allure de la bande n'est également pas affectée, et reste sous la forme d'un unique pic d'absorption. Ainsi, similairement aux résultats obtenus par l'analyse de la bande  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , l'observation de la bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  indique que le **CX1** n'interagit que faiblement avec les têtes polaires zwitterioniques PC et PE. Nous supposons que les groupes guanidinium du calixarène soient électrostatiquement repoussés par les groupes cationiques choline ou éthanolamine des têtes polaires PC ou PE. De plus, les interactions intra- et intermoléculaires entre ces cations choline ou éthanolamine et les anions phosphodiester doivent masquer ce dernier, défavorisant d'autant plus la formation d'un complexe guanidinium/phosphate.<sup>233</sup>

On peut constater que les groupes phosphodiester des lipides DMPC et DMPE sont sensiblement plus hydratés en présence de **CX1**, comme l'indique leur bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  apparaissant dans les deux cas avec un léger décalage vers le rouge. Il est relativement difficile d'interpréter cette observation. Cependant, celle-ci pourrait en partie être expliquée par les travaux de Lafrance et coll. qui, par comparaison entre DPPE et son analogue *N*-acylé, ont démontré que l'éloignement forcé des ions éthanolamines et phosphates a pour effet d'accroître l'état d'hydratation de ce dernier.<sup>228</sup> De plus, il est connu qu'en modifiant la force

ionique d'une solution aqueuse, notée  $I$  et exprimée en  $\text{mol L}^{-1}$ , on modifie en conséquence l'équilibre d'une réaction de dissociation ionique s'y déroulant. Nous proposons donc, avec réserve, que la dissociation des paires ioniques choline/phosphate chez DMPC et éthanolamine/phosphate chez DMPE soit favorisée par l'augmentation de la force ionique de la sous-phase due à la présence de **CX1**. Cette dissociation pourrait ainsi rendre les groupes phosphodiester plus accessibles à l'eau environnante et expliquer le décalage observé de la bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ . Selon l'Equation n° 25, la force ionique  $I$  d'une solution de **CX1** à  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  est de  $0,032 \text{ mM}$ . Cette valeur est suffisamment faible pour que l'électrolyte considéré se rapproche d'une solution idéale par analogie avec un gaz parfait.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i \cdot z_i^2$$

où  $C_i$  est la concentration d'un ion noté  $i$ , et  $z_i$  son nombre de charge.

#### Equation n° 25.

En outre, bien que la même tendance soit observée chez DMPE dans le cas du **mCX1**, il peut être remarqué que celui-ci a l'effet inverse chez DMPC en provoquant cette fois un décalage de la bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  vers les grands nombres d'ondes (Tableau 9). Ceci indique que le seul facteur de la force ionique n'est pas le seul responsable des effets observés. En effet, il est à noter que la position de la bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  peut aussi être affectée par des changements de conformation de la tête polaire PC.<sup>234</sup>

### V.5.3. Films lipidiques étalés sur une sous-phase de **mCX1**

Nous avons vu que le **CX1** entraîne peu de modifications sur les bandes d'adsorption étudiées des phospholipides zwitterioniques DMPC et DMPE. De même, il n'a été observé que peu d'effets du **mCX1** sur les bandes d'absorption de DMPC et DMPE. C'est pourquoi seuls le cas des phospholipides anioniques DMPG et DMPS seront relatés au cours des paragraphes suivants (Figure 155, C et D, lignes bleues).

Il peut être constaté qu'en présence de **mCX1**, la bande d'absorption  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$  est fortement décalée vers les grands nombres d'onde. Remarquons d'ailleurs que cette bande apparaît autour de la même valeur que le pic le plus décalé observé dans le cas du **CX1**, soit

environ  $1245\text{ cm}^{-1}$ , signifiant une déshydratation du même ordre des groupes phosphodiester correspondants (Tableau 9). Ce résultat indique un mode de liaison similaire entre **mCX1** ou **CX1** et les groupes phosphodiester. De plus, par contraste avec le cas du **CX1**, la présence d'un unique pic d'absorption suggère que la majorité des phospholipides interagissent avec le **mCX1**. En effet, aucune restriction spatiale ou stérique ne sont imposées aux groupes guanidinium du monomère, qui pourraient limiter son association à chaque lipide du film monomoléculaire.

De même, la bande d'absorption  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , correspondant aux groupes  $\text{C}=\text{O}$  de DMPG ou DMPS, se trouve dans les deux cas décalée dans le rouge, à une valeur comparable à celle relevée pour le pic le plus décalé observé en présence de **CX1**. Ceci indique un accroissement de l'état d'hydratation de ces carbonyles, probablement pour les mêmes raisons explicitées précédemment avec le **CX1**. Fait intéressant, l'apparition d'un unique pic d'absorption suggère que la conformation du squelette glycérolique n'est pas significativement modifiée par l'adsorption de **mCX1** aux phospholipides, contrairement à son analogue macrocyclique.

Ainsi, cette analyse de la bande  $\nu(\text{C}=\text{O})$  conforte nos propositions faites de l'analyse de la bande  $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ . Le **mCX1** semble se lier aux phospholipides anioniques selon le même mode de liaison que le **CX1**. Cependant, ce dernier cause peu de modifications structurales au niveau moléculaire des films de Langmuir constitués de DMPG ou de DMPS.

De plus, le **mCX1** à peu d'influence sur la position des bandes  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  et  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  de ces phospholipides anioniques, par comparaison avec l'effet observé en présence de **CX1**. Un faible décalage de ces bandes d'absorption vers les grands nombres d'onde est encore mesurable pour DMPG, tandis qu'aucun changement significatif n'est observé avec DMPS (Tableau 9). Le fait que le **mCX1** interagisse avec les groupes phosphodiester sans affecter la conformation de leurs chaînes alkyles indique que cette molécule ne pénètre pas dans la partie hydrophobe des films monomoléculaires de DMPG et de DMPS.

Le faible décalage des bandes  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  et  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  observé avec DMPG est un indice en faveur de son insertion partielle dans la partie hydrophile du film. Ce résultat appuie donc notre hypothèse concernant la formation de liaisons H entre les groupes  $-\text{OH}$  des molécules de **mCX1** et des têtes polaires PG. Ces interactions, absentes chez DMPS comme le conforte les résultats obtenus par PM-IRRAS, pourraient ainsi être responsables de la plus grande stabilité du **mCX1** dans le film de DMPG comparé à DMPS.

Les résultats ainsi obtenus par PM-IRRAS convergent avec ceux obtenus avec les autres méthodes précédentes. Ces résultats montrent que le **mCX1** interagit de manière électrostatique avec les films monomoléculaires de lipides anioniques, *via* une association phosphate/guanidinium (Figure 158). Le mode de liaison mis en jeu est donc identique à celui impliqué dans le cas du **CX1**. Cependant, l'absence d'interactions apolaires défavorise la pénétration du **mCX1** dans la partie hydrophobe des films. Ce dernier ne perturbe donc que modestement la structure des films monomoléculaires de DMPG et de DMPS.

## **V.6. Conclusion du chapitre**

Au cours de ce projet, nous avons étudié les propriétés interfaciales de films monomoléculaires composés de phospholipides zwitterioniques (DMPC ou DMPE) ou anioniques (DMPG ou DMPS), étalés à l'interface eau-air selon la technique de Langmuir. Ces films de Langmuir ont respectivement été utilisés comme des modèles de membranes cellulaires eucaryotes (globalement neutre) ou bactériennes (globalement négative).

L'impact de l'antibactérien trifluoroacétate de tétra-*p*-(guanidinoéthyl)-calix[4]arène (**CX1**) sur les propriétés de ces membranes modèles a ainsi été étudié, et comparé avec celui du *p*-(guanidinoéthyl)-phénol (**mCX1**), équivalent monomérique inactif du **CX1**. Les mesures d'isothermes de compression  $\Pi$ -*A* et  $\Delta V$ -*A*, et d'adsorption  $\Pi$ -*t*, des films monomoléculaires en présence ou non de **CX1** ou de **mCX1** ont donc été réalisées. Ces méthodes d'investigation ont été complétées par l'emploi de la microscopie BAM et de la spectroscopie infrarouge PM-IRRAS.

Nos résultats montrent que le **CX1** et le **mCX1** ont un impact différent sur les modèles de membranes lipidiques utilisés. Les effets de ces molécules chargées positivement sont clairement visibles dans le cas des phospholipides anioniques DMPG et DMPS (modèles bactériens). Par contraste, aucun effet significatif n'a été observé sur les propriétés interfaciales des films de Langmuir formés avec les phospholipides zwitterioniques DMPC et DMPE (modèles eucaryotes). Cette discrimination entre les deux classes de lipides étudiées indique que les attractions charge(+)-charge(-) jouent un rôle décisif dans les interactions entre nos modèles de membranes et les deux dérivés **CX1** et **mCX1**. Nous proposons donc que ce résultat puisse être une des raisons expliquant les bons indices de sélectivité observés *in vitro* avec le **CX1**.

Les propriétés physico-chimiques des films monomoléculaires de DMPG et de DMPS sont modifiées de façon plus prononcée par le **CX1**, comparé au **mCX1**. Nous avons montré que les attractions électrostatiques mises en jeu impliquent la formation de systèmes guanidinium/phosphate, selon des interactions de type charge-charge et liaison H. Ce phénomène est commun aux deux dérivés étudiés. Cependant, nous avons montré que le **mCX1** ne pénètre que partiellement dans un film monomoléculaire de DMPG, et pas du tout dans le cas de DMPS. En revanche, nos résultats indiquent que le **CX1** peut pénétrer plus profondément dans le film de chacun des deux lipides anioniques. Nous proposons que cette stabilité accrue des systèmes CX1-DMPG ou CX1-DMPS soit due à l'existence d'interactions charge-charge, au niveau de la partie hydrophile, et d'interactions apolaires, au niveau de la partie hydrophobe des films. Ces interactions apolaires, inexistantes dans le cas du **mCX1**, doivent donc être un élément essentiel en partie responsable de l'activité antibactérienne du **CX1**.

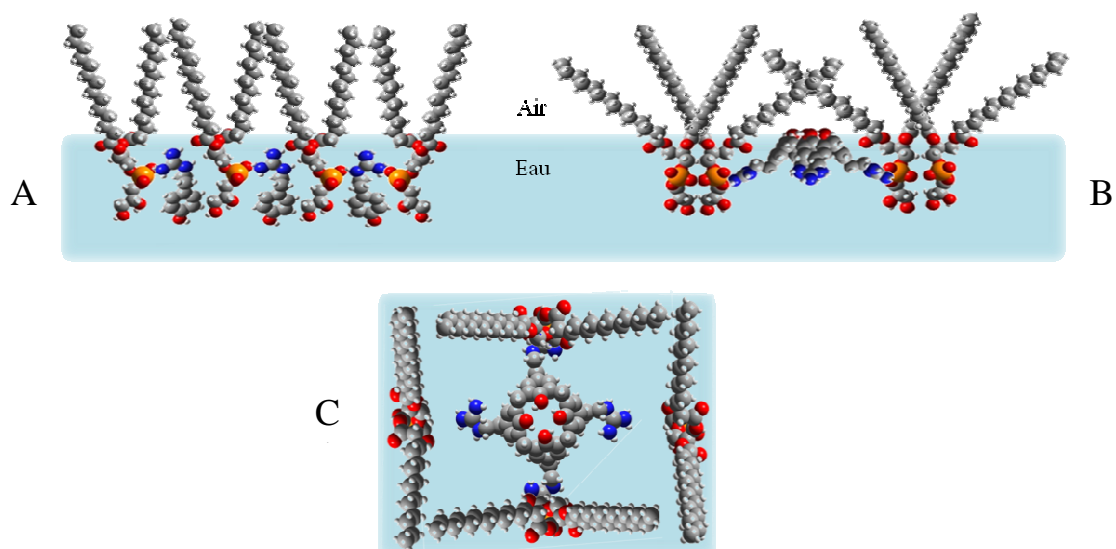
Dans le cas du **CX1**, la formation d'un complexe entre ce dernier et quatre phospholipides peut ainsi être envisagée (supramolécule  $(CX1)_1(lipide)_4$ ). Cependant, de probables gênes stériques doivent défavoriser la formation d'un tel complexe. De plus, nous avons pu constater la coexistence de deux populations de phospholipides, l'une liée, et l'autre non liée au **CX1**. Ainsi, une organisation possible d'un film monomoléculaire de DMPG ou de DMPS en présence de **CX1** est proposée en Figure 159. Cette hétérogénéité des films monomoléculaires de DMPG et de DMPS pourrait être responsable de l'important effet liquéfiant du **CX1** sur ces films.

Nous proposons donc que les effets de liquéfaction et de déstabilisation du **CX1** ainsi observés sur nos modèles de membranes bactériennes puissent être liés à la fragilisation et la perméabilisation de la paroi des bactéries étudiées auparavant en microbiologie. Il semblerait que l'existence d'interactions apolaires soit un élément incontournable pour obtenir d'une molécule un effet antibactérien.

Ces résultats peuvent donc permettre de mieux comprendre comment le **CX1** perturbe les propriétés de la paroi des bactéries traitées. A l'avenir, cette meilleure compréhension du mode d'action du **CX1** pourrait être exploitée afin d'optimiser sa structure et donc son activité antibactérienne. Certaines recherches pourraient aussi être orientées pour approfondir les connaissances sur ce mode d'action. Par exemple, on peut envisager la synthèse d'analogues du CX1 disposant d'un nombre variable de groupes guanidinium, afin d'appréhender le rôle

---

de la structure calixarénique. D'autre part, l'introduction de chaînes alkyles en partie basse du macrocycle pourrait accroître les interactions hydrophobes et ainsi améliorer l'activité antibactérienne.



**Figure 159.** Propositions d'interactions à l'interface eau-air entre un film monomoléculaire de DMPG et le **CX1** ou le **mCX1**. Insertion du **mCX1** dans le film de DMPG, vue de côté (A). Supramolécule  $(CX1)_1(DMPG)_2$  où le **CX1** est lié de façon opposée à deux molécules de DMPG et bordé par deux molécules de DMPG non-liées, vue de côté (B). Supramolécule  $(CX1)_1(DMPG)_2$  et deux molécules de DMPG non-liées, vue de dessus (C). Les contre-ions, trifluoroacétates et sodium, ont été retirés pour clarifier. Code couleur atomique : carbones en gris ; hydrogènes en blanc ; oxygènes en rouge ; azotes en bleu ; phosphores en orange.







## Conclusion générale

Les travaux décrits dans ce mémoire s'inscrivent dans deux projets distincts. En effet, le premier projet concernait des dérivés lipophiles et amphiphiles du calix[4]arène, conçus comme des prodrogues d'anti-infectieux. Le second projet concernait un dérivé hydrophile du calix[4]arène à propriétés antibactériennes. Afin de mener à bien nos recherches, nous avons associé la chimie organique pour la synthèse de ces dérivés à visés thérapeutiques du calix[4]arène, la physico-chimie pour l'étude de leur comportement interfacial, et la chimie analytique pour étudier la réactivité aux interfaces de certains d'entre eux.

Nous nous sommes donc intéressés en premier lieu à l'emploi du tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène comme d'une plateforme organisatrice de principes actifs, dans l'optique de concevoir des prodrogues amphiphiles anti-infectieuses. Ce concept, applicable à la plupart des molécules de la pharmacopée, a été développé avec des substances modèles que sont l'acide nalidixique (antibactérien), l'aciclovir et le ganciclovir (antiviraux).

Il s'agissait d'optimiser la synthèse de certains composés déjà décrits, conçus comme des prodrogues de l'acide nalidixique, notamment par la mise au point de méthodes de purification adaptées. Des analogues ont également été préparés dans le but d'appréhender les relations entre structure et propriétés physico-chimiques. Par la suite, nous avons développé la synthèse de nouveaux dérivés prodrogues, à base du tétra-*p*-(*tert*-butyl)-calix[4]arène et d'aciclovir ou de ganciclovir. Ceci a demandé un travail complet de chimie organique, avec une analyse bibliographique et le choix d'une stratégie de synthèse, puis la mise au point des différentes étapes et la caractérisation des composés obtenus.

Les conjugués calixarène – anti-infectieux ainsi synthétisés sont insolubles en milieu aqueux. Cette caractéristique rendait délicat de tester l'activité antimicrobienne des premiers conjugués préparés au laboratoire. Notre objectif principal a donc été de contourner les contraintes liées l'insolubilité en milieu aqueux de ces conjugués calixarène – anti-infectieux. De part leur caractère amphiphile, nous avons tout d'abord étudié le comportement interfacial de ces composés. Pour cela, nous avons utilisé la technique des films monomoléculaires de Langmuir étalés à l'interface eau-air. Cette étude nous a permis de mettre en lumière certaines relations structure / propriétés interfaciales.

Le caractère hydro-insoluble et amphiphile de nos prodrogues laisse supposer une affinité de ces dernières pour les milieux hydrophobes ou interfaciaux de l'organisme, tels que certains tissus adipeux ou les membranes biologiques. Nous avons donc travaillé sur la mise au point d'une méthode permettant d'étudier la réactivité interfaciale de ces prodrogues. Pour cela, l'interface eau-air a été utilisée comme un modèle des interfaces hydrophile-hydrophobe retrouvées en milieu physiologique. Un protocole analytique, utilisant la chromatographie liquide haute performance, a ainsi été développé afin de quantifier les principes actifs libérés en milieu aqueux. Les cinétiques d'hydrolyse de nos prodrogues à l'interface eau-air ont donc pu être déterminées, et comparées à celles obtenues à d'autres interfaces (solide-liquide et liquide-liquide). Nos résultats ont montré que l'interface eau-air est un outil pour étudier la réactivité interfaciale des prodrogues considérées. La méthodologie ainsi mise au point permet en effet de suivre la libération en milieu aqueux des principes actifs greffés au calixarène étalé à l'interface eau-air en un film monomoléculaire.

Cette approche physico-chimique est applicable à d'autres prodrogues du même type, à condition d'être hydro-insolubles et amphiphiles. Nous sommes donc aujourd'hui en mesure de sélectionner des substances en fonction de leurs propriétés physiques et chimiques, ou d'ajuster ces propriétés en fonction de l'application visée. A terme, on pourrait envisager une utilisation de tels composés, comme agents thérapeutiques à effet retard.

En second lieu, nous nous sommes intéressés à un dérivé polycationique du calix[4]arène, le trifluoroacétate de tétra-*p*-(guanidinoéthyl)-calix[4]arène (CX1), présentant des propriétés antibactériennes. Son mode d'action a été auparavant partiellement étudié, et il a été montré que celui-ci implique une perturbation de la structure des parois bactériennes.

Il s'agissait donc pour nous d'apporter des informations complémentaires sur ce mécanisme d'action, notamment en étudiant les interactions mises en jeu entre le CX1 et les membranes cellulaires. Pour ce faire, la technique des films monomoléculaires de Langmuir a été employée afin de préparer des modèles de membranes lipidiques bactériennes ou eucaryotes, en utilisant les phospholipides appropriés. Nous avons ainsi mis en évidence l'existence d'interactions électrostatiques entre le CX1 et les membranes bactériennes modèles.

Par la suite, nous avons entrepris de comparer les effets du CX1 et de son équivalent monomérique, le *p*-(guanidinoéthyl)-phénol (mCX1), sur les propriétés interfaciales des films lipidiques étudiés. Inactif aux concentrations minimales inhibitrices du CX1, le mCX1 a été

utilisé comme outil d'investigation afin d'identifier certaines propriétés propres au CX1, pouvant participer à son activité antibactérienne. Nous avons ainsi mis en évidence l'existence d'interactions apolaires entre ce dernier et les membranes modèles de bactéries. D'autres résultats ont révélé un mode d'interactions électrostatiques similaire du CX1 ou du mCX1 avec les modèles bactériens, impliquant une association entre les groupes guanidinium de ces composés et les groupes phosphodiester des lipides. Les interactions apolaires mises en jeu dans le cas du CX1 sont donc un élément essentiel de son mécanisme d'action.

Nous avons ainsi montré que le CX1 n'a pas d'affinité pour les membranes modèles de cellules eucaryotes. En revanche, il est capable de s'insérer au sein des membranes modèles de cellules bactériennes, *via* des interactions électrostatiques et apolaires. Nos résultats indiquent la coexistence dans ces films monomoléculaires de lipides libres et de lipides associés au CX1. Nous avons proposé que ce phénomène ait pour conséquence les importantes modifications de propriétés physico-chimiques constatées avec les modèles bactériens. Ces derniers sont, en présence de CX1, plus fluides et moins stables, ce qui est en accord avec certaines observations faites en bactériologie.

Cette étude a donc permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions entre le CX1 et les membranes lipidiques bactériennes. Les résultats obtenus permettent de faire un lien entre ces processus et le mode d'action du CX1, et d'appréhender certaines relations structure/activité. Par cette approche physico-chimique, l'étude d'analogues du CX1 pourrait à l'avenir permettre d'approfondir nos connaissances sur ses relations structure/activité, et d'optimiser ses propriétés par les modifications structurales adéquates.



# **Partie Expérimentale**

- Section Analytique
- Section Synthèse Organique
- Section Films de Langmuir



## Caractérisation et purifications des molécules synthétisées

- Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été collectés sur un appareil Bruker DRX 400 MHz. Les spectres RMN  $^{19}\text{F}$  ont été collectés sur un appareil Bruker DRX 250 MHz. Les déplacements chimiques ont été calibrés sur la base du signal correspondant au solvant utilisé (ou de sa fraction non-deutérée), exprimé en ppm. Les valeurs ainsi fixées sont :

**RMN  $^1\text{H}$ .**  $\text{CDCl}_3$  (s,  $\text{CHCl}_3$ ) : 7,26 ppm ;  $\text{DMSO-d}_6$  (m,  $\text{DMSO-d}_5$  à  $\text{d}_0$ ) : 2,50 ppm ;  $\text{D}_2\text{O}$  (s,  $\text{DHO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) : 4,79 ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$ .**  $\text{CDCl}_3$  (t) : 77,00 ppm ;  $\text{DMSO-d}_6$  (m) : 39,50 ppm.

**RMN  $^{19}\text{F}$ .** pas de calibration.

- Les points de fusion ont été mesurés sur appareil à point de fusion capillaire ELECTROTHERMAL IA 9200.
- Les spectres FT-IR ont été collectés sur un appareil Bruker Vector 22, à l'état solide dans une matrice de KBr.
- Les spectrogrammes de masse ont été collectés par François DUPIRE au Service Commun de l'Université, à l'aide d'un appareil Micromass Platform II (Electrospray ESI).
- Les spectres UV-visible ont été collectés sur un appareil SAFAS-Monaco  $UVmc^2$ . Les valeurs de  $\lambda_{\text{max}}$  et de  $\epsilon$  sont données en nm et en  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , respectivement.
- Les analyses élémentaires ont été réalisées par Sandrine ADACH au Service Commun de l'Université, sur un appareil Thermofinnigan FlashEA.
- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur deux types de support, silice ou alumine :
  - $\text{SiO}_2$  : MACHERAY-NAGEL, ALUGRAM<sup>®</sup> G/UV<sub>254</sub>.
  - $\text{Al}_2\text{O}_3$  : MERCK, Aluminium 60 F<sub>254</sub> neutral.
- Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur ces deux types de support également :
  - $\text{SiO}_2$  : MACHERAY-NAGEL, Gel de Silice 60 M, 40-63  $\mu\text{m}$
  - $\text{Al}_2\text{O}_3$  : MERCK, Aluminium Oxyde 90 standardisé.
- Le diméthylformamide (DMF) est dégazé par bullage d'argon, séché sur  $\text{CaH}_2$  et distillé sous vide poussé à  $\sim 35$  °C, puis conservé sous argon à l'abri de la lumière.

## Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

### ➤ Informations générales.

Le système CLHP Merck Hitachi utilisé est composé d'une chaîne des modules suivants :

- Un système de quatre pompes, modèle 7100.
- Un autosamplieur équipé d'une boucle d'injection de 100  $\mu\text{L}$ , modèle 7200.
- Un four thermostat pour colonne, modèle T6300.
- Un détecteur UV à barrette de diode 200-350 nm, modèle 7450.

La colonne analytique utilisée est de type Nucléodur C18 isis phase inverse (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, USA), de dimensions 150 mm  $\times$  4,6 mm avec un diamètre interne de 3  $\mu\text{m}$ , et une granulométrie de 100  $\text{\AA}$ .

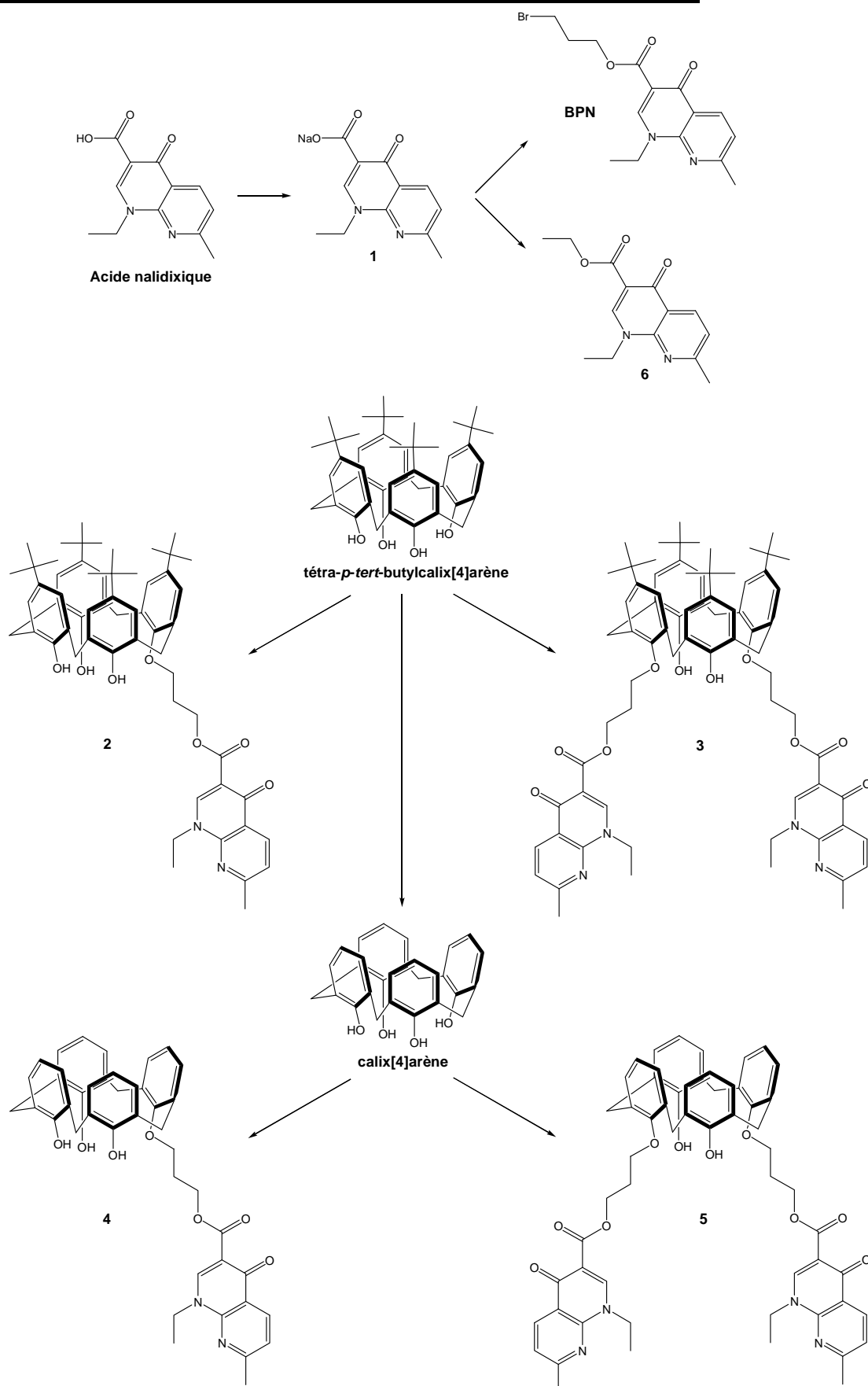
### ➤ Conditions chromatographiques.

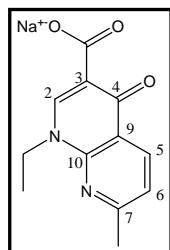
- **Chapitre III.** Phase stationnaire : colonne Nucléodur, maintenue à 40  $^{\circ}\text{C}$ . Phase mobile : tampon pH 2,5 ( $\text{HCO}_2\text{NH}_4/\text{HCO}_2\text{H}$ , 50 mM) / MeCN / MeOH 65/30/5 (v/v/v), avec un débit de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Volume d'injection : 20  $\mu\text{L}$ .
- **Chapitre IV.** Phase stationnaire : colonne Nucléodur, maintenue à 35  $^{\circ}\text{C}$ . Phase mobile :  $\text{H}_2\text{O}$  / MeOH 90/10 (v/v), avec un débit de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Volume d'injection : 20  $\mu\text{L}$ .

### ➤ Préparation des phases mobiles.

Les tampons ont été préparés par pesé du sel basique, et dissolution de celui-ci dans 800 mL d'eau distillée. Le pH, mesuré à l'aide d'un pH-mètre PHM210 MeterLab<sup>TM</sup>, est ensuite ajusté par ajout de l'acide correspondant, et le volume est complété à 1 L à l'aide d'une fiole jaugée. Les solvants organiques sont alors ajoutés au tampon aqueux, puis la phase mobile ainsi préparée est dégazée pendant 15 minutes par immersion dans un bain à ultra-son (Bransonic220).



**Synthèse des conjugués calixarène-quinolone (chapitre III)**

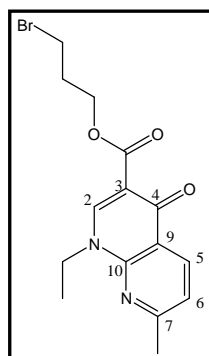
**Composé N° 1****Nalidixate de sodium.**

A une suspension d'acide nalidixique (500 mg ; 2,16 mmol ; 1 éq.) dans H<sub>2</sub>O distillé (5 mL) sous agitation magnétique à température ambiante est ajouté exactement 1 équivalent d'une solution titrée d'hydroxyde de sodium NaOH (1,270 mL ; 1,698 M ; 2,16 mmol). Le mélange est agité durant 30 min, jusqu'à solubilisation complète, puis lyophilisé pour donner un solide blanc (550 mg ; quantitatif).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) :** 1,29 (t, *J* = 7,3 Hz, 3 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 2,47 (s, 3 H, C(7)CH<sub>3</sub>) ; 4,29 (q, *J* = 7,3 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 7,15 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H, C(6)H) ; 8,25 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H, C(5)H) ; 8,40 (s, 1 H, C(2)H).

Conforme à la littérature :

Pawelczyk, E. et coll. *Crystalline alkali metal salts of nalidixic acid (1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid)*. PI 83122, **1977**.

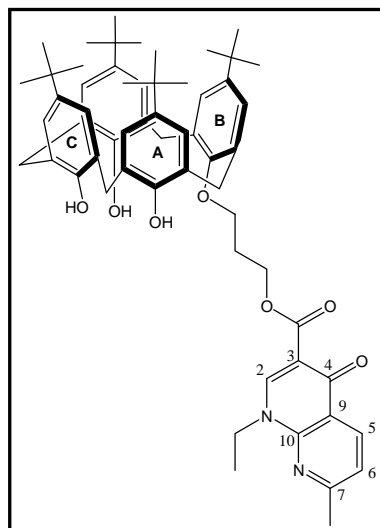
**BPN.****(3-bromo-propyl)-nalidixate.**

Une solution de nalidixate de sodium **1** (567 mg ; 2,16 mmol ; 1 éq.) et de 1,3-dibromopropane (7 mL ; 68 mmol ; 32 éq.) dans le DMF distillé sur CaH<sub>2</sub> (18 mL) est chauffée à 35 °C sous argon durant 5 heures. Après contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 95:5), le solvant est évaporé à sec sous vide poussé à ~40 °C et le résidu jaune est séché sous vide poussé. Ce résidu est repris par un mélange DCM/Et<sub>2</sub>O 4:1 (v/v) puis filtré. Au filtrat sont ajoutés 20 mL d'heptane, et la fraction volatile (DCM/Et<sub>2</sub>O) est évaporée sous vide sans chauffer. Le précipité floconneux jaune pâle est récupéré par filtration puis chromatographié sur gel de silice élué par un mélange Et<sub>2</sub>O/MeCN 9:1 (v/v), et les fractions d'intérêts sont rassemblées et évaporées à sec. Le résidu est repris dans un mélange DCM/heptane 2:1 (v/v) et le DCM est évaporé sous vide sans chauffer pour donner après filtration un solide blanc cristallin (579 mg ; 76%).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 1,51 (t, *J* = 7,0 Hz, 3 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 2,35 (quint, *J* = 6,3 Hz, 2 H, BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 2,68 (s, 3 H, C(7)CH<sub>3</sub>) ; 3,67 (t, *J* = 6,5 Hz, 2 H, BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,45 à 4,54 (m, 4 H, BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO + NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 7,26 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H, C(6)H) ; 8,63 (s, 1 H, C(2)H) ; 8,64 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H, C(5)H).

Conforme à la littérature :

Ben Salem, A. et coll. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6769-6771.

**Composé N° 2****Conjugué calixarène-mono-quinolone *tert*-butylé.  
5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25-[3-(nalidixate-oxy)-  
propoxy]-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène.**

Une suspension de tétra-*p-tert*-butylcalix[4]arène (600 mg ; 0,926 mmol ; 1,0 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (74 mg ; 0,540 mmol ; 0,58 éq.) et KI (377 mg ; 2,270 mmol ; 2,5 éq.) dans l'acétonitrile fraîchement distillé sur CaH<sub>2</sub> (70 mL) est chauffée à reflux sous argon durant 1 heure. Une solution de **BPN** (280 mg ; 0,793 mmol ; 0,9 éq.) dans l'acétonitrile distillé (17 mL) est ensuite ajouté, et le mélange est maintenu à reflux sous argon pendant 20 heures. Après contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 95:5), le solvant est évaporé à sec, et le résidu jaune pâle est

trituré dans le DCM (5 mL), puis filtré sur Célite® et rincé par 3x5 mL de DCM. Le filtrat est évaporé et le résidu est chromatographié sur gel de silice élué par un mélange DCM/MeCN 85:15 (v/v) pour donner 335 mg d'un solide vitreux (46%).

Le produit est traité par MeCN (1,5 mL). Après une première solubilisation, un abondant précipité blanc apparaît, et 1 mL de MeCN supplémentaire est ajouté. Ce précipité blanc est récupéré par filtration, rincé par MeCN (1 mL), puis séchés sous vide poussé à 45 °C (243 mg ; 73% précipitation).

**P<sub>f</sub>** : 118 °C

**IR (KBr)** : large 3324,0 (ν(O-H) : ArOH) ; 2960,4 (ν<sub>as</sub>(CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 2868,5 (ν<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>) : ArCH<sub>2</sub>Ar + propyl) ; 1735,9 et 1696,2 (ν(C=O) : ester) ; 1641,5 et 1612,0 (ν(C=O) : cétone) ; 1485,4 (δ(CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 1440,7 (δ(CH<sub>2</sub>) : nalidixate + propyl) ; 1207,6 (ν(C=C) et ρ(CH<sub>3</sub>) : nalidixate et calixarène).

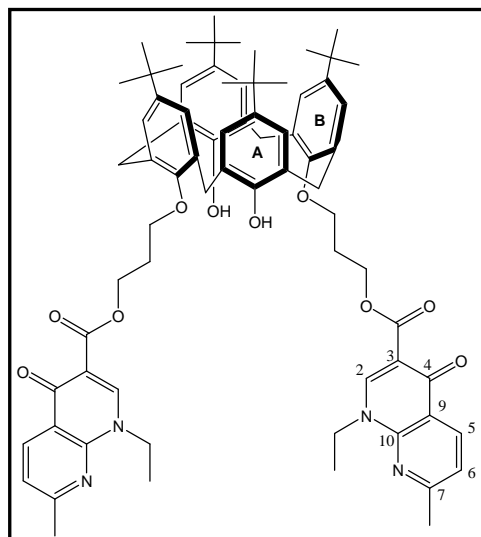
**UV-Vis (DCM)** : 259 (27841) ; 281 (22170) ; 329 (14084).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 1,18 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 1,20 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 1,22 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 1,43 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 2,61 à 2,65 (m, 5 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO + C(7)CH<sub>3</sub>) ; 3,40 (1/2 AB, *J* = 13,1 Hz, 2 H, Ar(**A**)CH<sub>ax</sub>H<sub>eq</sub>Ar(**B**)) ; 3,43-4,27 (AB, *J* = 13,6 Hz, 4 H, Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 4,34 à 4,42 (m, 6 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> + Ar(**A**)CH<sub>ax</sub>H<sub>eq</sub>Ar(**B**) + OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,81 (t, *J* = 6,2 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 6,98 (AX, *J* = 2,3 Hz, 2 H, ArH<sub>m</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 7,03 (AX, *J* = 2,3 Hz; 2 H, ArH<sub>m</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 7,05 (s, 2 H, ArH<sub>m</sub> **C**) ; 7,07 (s, 2 H, ArH<sub>m</sub> **B**) ; 7,23 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H, C(6)H) ; 8,64 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H, C(5)H) ; 8,70 (s, 1 H, C(2)H) ; 9,53 (s, 2 H, ArOH **A**) ; 10,12 (s, 1 H, ArOH **C**).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 15,15 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 25,03 (C(7)CH<sub>3</sub>) ; 29,26 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 31,20 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 31,44 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 31,47 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 32,10 (Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 32,95 (Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 33,87 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 33,98 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 34,19 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 46,54 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 61,35 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 73,58 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 111,83 (C(3)) ; 121,05 (C(6)) ; 121,51 (C(9)) ; 125,58 (ArC<sub>m</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 125,65 (ArC<sub>m</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**) + C<sub>m</sub> **C**) ; 126,42 (C<sub>m</sub> **B**) ; 127,43 (ArC<sub>o</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 128,05 (C<sub>o</sub> **C**) ; 128,32 (ArC<sub>o</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 133,43 (C<sub>o</sub> **B**) ; 136,80 (C(5)) ; 143,05 (C<sub>p</sub> **A**) ; 143,63 (C<sub>p</sub> **C**) ; 147,65 (C<sub>i</sub> **C**) ; 148,16 (C<sub>p</sub> **B**) ; 148,45 (C<sub>i</sub> **A**) ; 148,61 (C(10)) ; 148,91 (C(2)) ; 149,09 (C<sub>i</sub> **B**) ; 162,54 (C(7)) ; 165,41 (CO ester) ; 174,68 (C(4) cétone).

**Analyse élémentaire** : calculée pour C<sub>59</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (921,21) : C 76,92% ; H 7,88% ; N 3,04%. Mesurée : C 76,57% ; H 7,80% ; N 3,54%.

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 921,21. Mesure *m/z* : 922,41 [**M**+H]<sup>+</sup>.



## Composé N° 3

**Conjugué calixarène-bis-quinolone *tert*butylé.  
5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25,27-bis-[3-(nalidixate-  
oxy)-propoxy]-26,28-bis-hydroxy-calix[4]arène.**

Une suspension de tétra-*p-tert*-butylcalix[4]arène (225 mg ; 0,346 mmol ; 1,0 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (107 mg ; 0,770 mmol ; 2,2 éq.) et KI (164 mg ; 0,989 mmol ; 2,8 éq.) dans l'acétonitrile fraîchement distillé sur CaH<sub>2</sub> (20 mL) est chauffée à reflux sous argon durant 1 heure. Une solution de **BPN** (257 mg ; 0,728 mmol ; 2,1 éq.) dans l'acétonitrile distillé (15 mL) est ensuite ajouté, et le mélange est maintenu à reflux sous argon pendant 22 heures. Après contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ;

DCM/MeOH 95:5), le solvant est évaporé à sec, et le résidu jaune pâle est trituré dans le DCM (5 mL), puis filtré sur Célite® et rincé par 3x5 mL de DCM. Le filtrat est évaporé et le résidu est chromatographié sur gel de silice neutralisée par NEt<sub>3</sub> élué par un mélange DCM/Et<sub>2</sub>O/MeCN 4:4:2 (v/v/v) pour donner 226 mg d'un solide vitreux (67%).

Le produit est repris dans le DCM (1 mL) et Et<sub>2</sub>O est lentement ajouté jusqu'à l'apparition de petits grains. Après un repos de 30 min à température ambiante, les cristaux blanc formés sont récupérés par filtration puis séchés sous vide poussé (126 mg ; 56% cristallisation).

**P<sub>f</sub>** : 132 °C

**IR (KBr)** : large 3394,4 (ν(O-H) : ArOH) ; 2958,1 (ν<sub>as</sub>(CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 2868,4 (ν<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>) : ArCH<sub>2</sub>Ar + propyl) ; 1734,4 et 1694,2 (ν(C=O) : ester) ; 1639,5 et 1613,6 (ν(C=O) : cétone) ; 1486,8 (δ(CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 1440,8 (δ(CH<sub>2</sub>) : nalidixate + propyl) ; 1207,7 (ν(C=C) et ρ(CH<sub>3</sub>) : nalidixate et calixarène).

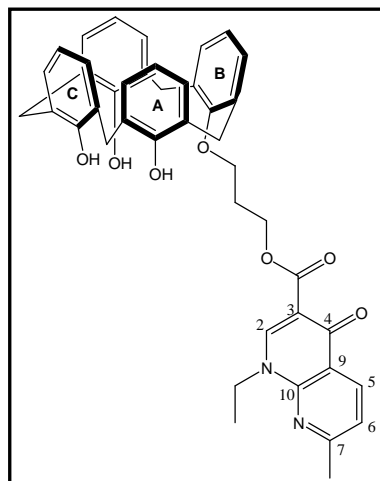
**UV-Vis (DCM)** : 254 (29800) ; 290 (12900) ; 332 (19990).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 1,00 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 1,24 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 1,38 (t, *J* = 7,2 Hz, 6 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 2,52 (quint, *J* = 6,0 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 2,61 (s, 6 H, C(7)CH<sub>3</sub>) ; 3,28-4,30 (AB, *J* = 12,8 Hz, 8 H, ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 4,19 (t, *J* = 6,0 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,32 (q, *J* = 7,2 Hz, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 4,86 (t, *J* = 6,0 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 6,82 (s, 4 H, ArH<sub>m</sub> **B**) ; 6,97 (s, 4 H, ArH<sub>m</sub> **A**) ; 7,17 (d, *J* = 8,1 Hz, 2 H, C(6)H) ; 7,78 (s, 2 H, ArOH **A**) ; 8,58 (d, *J* = 8,1 Hz, 2 H, C(5)H) ; 8,60 (s, 2 H, C(2)H).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 15,55 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 25,38 (C(7)CH<sub>3</sub>) ; 29,71 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 31,43 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 32,09 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 32,18 (ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 34,17 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 34,37 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 46,89 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 61,95 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 72,93 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 112,34 (C(3)) ; 121,22 (C(6)) ; 121,73 (C(9)) ; 125,43 (C<sub>m</sub> **A**) ; 125,99 (C<sub>m</sub> **B**) ; 127,98 (C<sub>o</sub> **A**) ; 133,15 (C<sub>o</sub> **B**) ; 137,06 (C(5)) ; 141,74 (C<sub>p</sub> **A**) ; 147,32 (C<sub>p</sub> **B**) ; 149,18 (C(10)) ; 148,96 (C(2)) ; 150,00 (C<sub>i</sub> **B**) ; 151,15 (C<sub>i</sub> **A**) ; 162,77 (C(7)) ; 165,51 (CO ester) ; 175,12 (C(4) cétone).

**Analyse élémentaire** : calculée pour C<sub>74</sub>H<sub>88</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (1193,51) : C 74,47% ; H 7,43% ; N 4,69%. Mesurée : C 74,50% ; H 7,36% ; N 4,71%.

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 1193,5. Mesure *m/z* : 1194,4 [**M**+H]<sup>+</sup>.

**Composé N° 4****Conjugué calixarène-mono-quinolone.****25-[3-(nalidixate-oxy)-propoxy]-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène.**

Une suspension de calix[4]arène (218 mg ; 0,510 mmol ; 1,0 éq.),  $K_2CO_3$  (42 mg ; 0,310 mmol ; 0,6 éq.) et KI (196 mg ; 1,180 mmol ; 2,3 éq.) dans l'acétonitrile fraîchement distillé sur  $CaH_2$  (20 mL) est chauffée à reflux sous argon durant 1 heure. Une solution de **BPN** (200 mg ; 0,570 mmol ; 1,1 éq.) dans l'acétonitrile distillé (20 mL) est ensuite ajouté, et le mélange est maintenu à reflux sous argon pendant 22 heures.

Après contrôle CCM ( $SiO_2$  ; DCM/MeOH 95:5), le solvant est

évaporé à sec, et le résidu jaune pâle est trituré dans le DCM (3 mL), puis filtré sur Célite® et rincé par 2x3 mL de DCM. Le filtrat est évaporé et le résidu est chromatographié sur gel de silice neutralisée par  $NEt_3$  élué par un gradient DCM/ $Et_2O$ /MeCN 1:1:0,2 => 1:1:2 (v/v/v) pour recycler le dérivé **5** (83 mg ; 17%) et donner 188 mg encore impur du composé **4**. Une seconde purification par chromatographie sur gel de silice élué par un gradient DCM/MeCN 9:1 => 8:2 (v/v) donne 140 mg d'un solide vitreux (41%).

Le produit est repris dans le DCM (2 mL) puis précipité par ajout de  $Et_2O$  (6 mL). Le solide blanc est filtré, subi plusieurs lavage par trituration dans le pentane, puis est séché sous vide poussé (120 mg ; 84% précipitation).

**P<sub>f</sub>** : 205 °C

**IR (KBr)** : large 3308,9 ( $\nu(O-H)$  : ArOH) ; 2934,4 ( $\nu_{as}(CH_2)$  :  $ArCH_2Ar$  + propyl) ; 2869,1 ( $\nu_s(CH_2)$  :  $ArCH_2Ar$  + propyl) ; 1734,1 et 1691,1 ( $\nu(C=O)$  : ester) ; 1635,8 et 1611,1 ( $\nu(C=O)$  : cétone) ; 1441,9 ( $\delta(CH_2)$  : nalidixate + propyl) ; 1254,2 et 1210,7 ( $\nu(C=C)$  +  $\rho(CH_3)$  : nalidixate + calixarène).

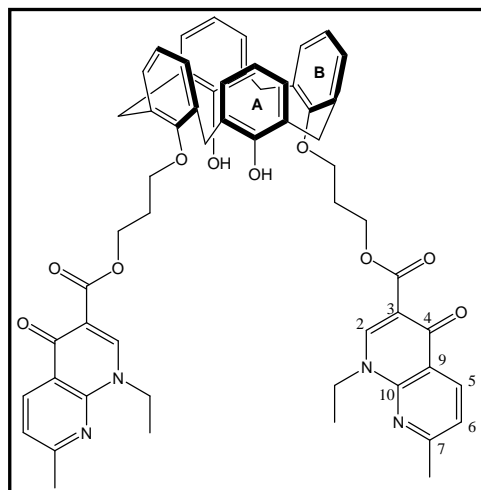
**UV-Vis (DCM)** : 258 (19243) ; 280 (10217) ; 336 (13432).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 1,42 (t,  $J = 7$  Hz, 3 H,  $NCH_2CH_3$ ) ; 2,62 à 2,66 (m, 5 H,  $C(7)CH_3$  +  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 3,45 (1/2AB,  $J = 13$  Hz, 2 H,  $Ar(A)CH_{ax}H_{eq}Ar(B)$ ) ; 3,46-4,27 (AB,  $J = 14$  Hz, 4 H,  $Ar(A)CH_2Ar(C)$ ) ; 4,38 à 4,41 (m, 6 H,  $NCH_2CH_3$  +  $Ar(A)CH_{ax}H_{eq}Ar(B)$  +  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 4,85 (t,  $J = 6$  Hz, 2 H,  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 6,63 à 6,69 (m, 3 H,  $ArH_p C$  +  $ArH_p A$ ) ; 6,85 (t,  $J = 8$  Hz, 1 H,  $ArH_p B$ ) ; 6,98 à 7,07 (m, 8 H,  $ArH_m A$  +  $ArH_m B$  +  $ArH_m C$ ) ; 7,24 (d,  $J = 8$  Hz, 1 H,  $C(6)H$ ) ; 8,63 (d,  $J = 8$  Hz, 1 H,  $C(5)H$ ) ; 8,68 (s, 1 H,  $C(2)H$ ) ; 9,35 (s, 2 H, ArOH A) ; 9,64 (s, 1 H, ArOH C).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 15,07 ( $NCH_2CH_3$ ) ; 25,03 ( $C(7)CH_3$ ) ; 29,31 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 31,34 ( $Ar(A)CH_2Ar(B)$ ) ; 31,86 ( $Ar(A)CH_2Ar(C)$ ) ; 46,56 ( $NCH_2CH_3$ ) ; 61,64 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 73,71 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 111,74 ( $C(3)$ ) ; 120,77 ( $C_p A$ ) ; 121,10 ( $C(6)$ ) ; 121,49 ( $C(9)$ ) ; 121,94 ( $C_p C$ ) ; 126,18 ( $C_p B$ ) ; 128,21 ( $C_m C$ ) ; 128,33 ( $C_m B$ ) ; 128,37 ( $C_m A$ ) ; 128,72 ( $C_o A$ ) ; 129,34 ( $C_o C$ ) ; 134,10 ( $C_o B$ ) ; 136,76 ( $C(5)$ ) ; 148,58 ( $C(2)$ ) ; 148,91 ( $C(10)$ ) ; 149,05 ( $C_i C$ ) ; 150,87 ( $C_i A$ ) ; 151,20 ( $C_i B$ ) ; 162,60 ( $C(7)$ ) ; 165,64 (CO ester) ; 174,62 ( $C(4)$  cétone).

**Analyse élémentaire** : calculée pour  $C_{43}H_{40}N_2O_7$  (696,79) : C 74,12% ; H 5,79% ; N 4,02%. Mesurée : C 74,05% ; H 5,82% ; N 4,08%.

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 696,3. Mesure m/z : 719,3 [**M**+Na]<sup>+</sup> ; 1415,5 [**2M**+Na]<sup>+</sup>.

**Composé N° 5**
**Conjugué calixarène-bis-quinolone.**  
**25,27-bis-[3-(nalidixate-oxy)-propoxy]-26,28-bis-**  
**hydroxy-calix[4]arène.**

Une suspension de calix[4]arène (172 mg ; 0,405 mmol ; 1,0 éq.),  $K_2CO_3$  (61 mg ; 0,445 mmol ; 1,1 éq.) et KI (169 mg ; 1,011 mmol ; 2,5 éq.) dans l'acétonitrile fraîchement distillé sur  $CaH_2$  (25 mL) est chauffée à reflux sous argon durant 1 heure. Une solution de **BPN** (300 mg ; 0,849 mmol ; 2,1 éq.) dans l'acétonitrile distillé (20 mL) est ensuite ajouté, et le mélange est maintenu à reflux sous argon pendant 28

heures. Après contrôle CCM ( $SiO_2$  ; DCM/MeOH 95:5), le solvant est évaporé à sec, et le résidu jaune pâle est trituré dans le DCM (3 mL), puis filtré sur Célite® et rincé par 2x3 mL de DCM. Le filtrat est évaporé et le résidu repris dans 1,5 mL de DCM est précipité par ajout de  $Et_2O$  (15 mL) puis filtré. Ce précipité est chromatographié sur gel de silice neutralisée par  $NEt_3$  élué par un mélange DCM/ $Et_2O$ /MeCN 1:4:5 (v/v/v) pour donner 232 mg d'un solide vitreux (59%).

Le produit est repris dans un mélange DCM/MeCN, le DCM est évaporé sous vide sans chauffer, et le précipité blanc semi-cristallin formé est filtré puis séché sous vide poussé (193 mg ; 83% précipitation).

**P<sub>f</sub>** : 225 °C

**IR (KBr)** : large 3441,0 ( $\nu(O-H)$  : ArOH) ; 2928,9 ( $\nu_{as}(CH_2)$  :  $ArCH_2Ar$  + propyl) ; 2867,2 ( $\nu_s(CH_2)$  :  $ArCH_2Ar$  + propyl) ; 1734,8 et 1694,8 ( $\nu(C=O)$  : ester) ; 1638,2 et 1612,9 ( $\nu(C=O)$  : cétone) ; 1442,8 ( $\delta(CH_2)$  : nalidixate + propyl) ; 1254,3 et 1212,5 ( $\nu(C=C)$  +  $\rho(CH_3)$  : nalidixate + calixarène).

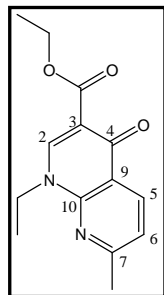
**UV-Vis (DCM)** : 257 (34605) ; 286 (13731) ; 336 (24264).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 1,21 (t,  $J = 7$  Hz, 6 H,  $NCH_2CH_3$ ) ; 2,58 (q,  $J = 6$  Hz, 4 H,  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 2,62 (s, 6 H,  $C(7)CH_3$ ) ; 3,35-4,33 (AB,  $J = 13$  Hz, 8 H,  $ArCH_2Ar$ ) ; 4,23 (t,  $J = 6$  Hz, 4 H,  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 4,32 (q,  $J = 7$  Hz, 4 H,  $NCH_2CH_3$ ) ; 4,89 (t,  $J = 6$  Hz, 4 H,  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 6,58 (t,  $J = 7$  Hz, 2 H,  $ArH_p$  **A**) ; 6,72 (t,  $J = 8$  Hz, 2 H,  $ArH_p$  **B**) ; 6,88 (d,  $J = 8$  Hz, 4 H,  $ArH_m$  **B**) ; 6,98 (d,  $J = 7$  Hz, 4 H,  $ArH_m$  **A**) ; 7,18 (d,  $J = 8$  Hz, 2 H,  $C(6)H$ ) ; 8,16 (s, 2 H,  $ArOH$  **A**) ; 8,57 (d,  $J = 8$  Hz, 2 H,  $C(5)H$ ) ; 8,58 (s, 2 H,  $C(2)H$ ).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 15,10 ( $NCH_2CH_3$ ) ; 25,03 ( $C(7)CH_3$ ) ; 29,31 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 31,35 ( $ArCH_2Ar$ ) ; 46,55 ( $NCH_2CH_3$ ) ; 61,52 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 72,82 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 111,78 ( $C(3)$ ) ; 118,94 ( $C_p$  **A**) ; 120,86 ( $C(6)$ ) ; 121,32 ( $C(9)$ ) ; 125,42 ( $C_p$  **B**) ; 127,94 ( $C_o$  **A**) ; 128,35 ( $C_m$  **A**) ; 128,97 ( $C_m$  **B**) ; 133,27 ( $C_o$  **B**) ; 136,63 ( $C(5)$ ) ; 148,52 ( $C(2)$ ) ; 148,72 ( $C(10)$ ) ; 151,60 ( $C_i$  **B**) ; 153,28 ( $C_i$  **A**) ; 162,42 ( $C(7)$ ) ; 165,21 ( $CO$  ester) ; 174,68 ( $C(4)$  cétone).

**Analyse élémentaire** : calculée pour  $C_{58}H_{56}N_4O_{10}$ , 0,2  $CH_2Cl_2$  (986,07) : C 70,89% ; H 5,77% ; N 5,68%. Mesurée : C 70,66% ; H 5,82% ; N 5,72%.

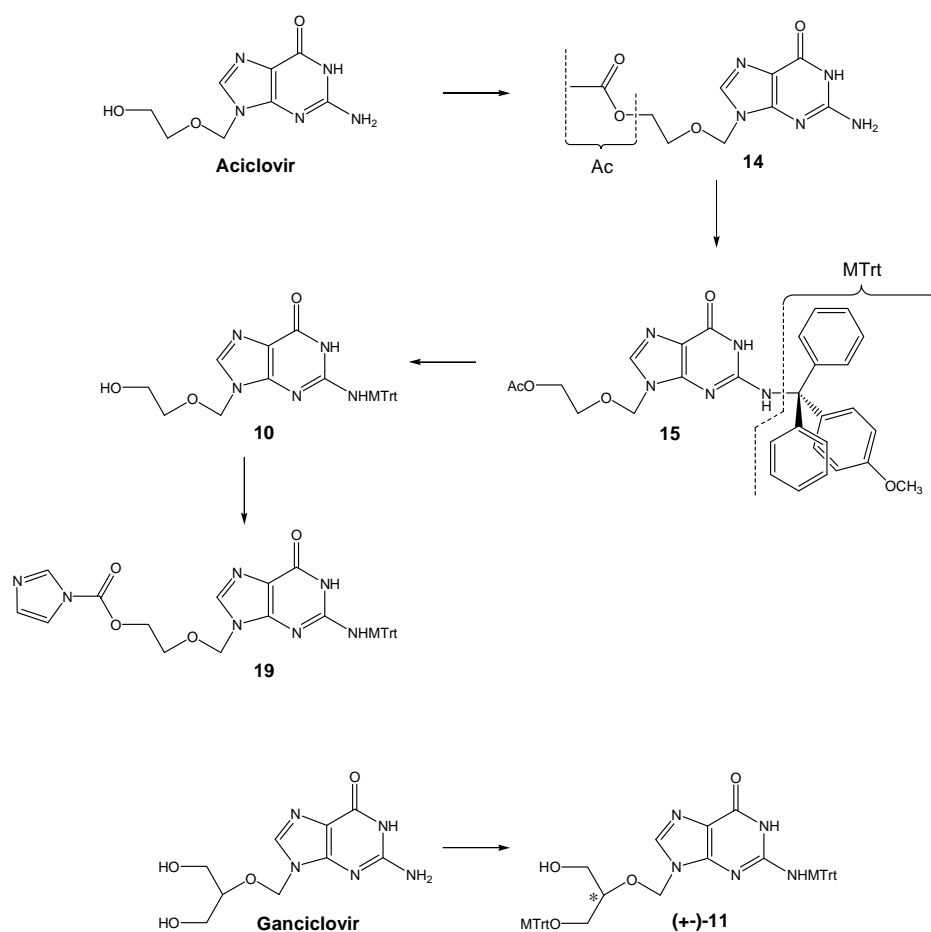
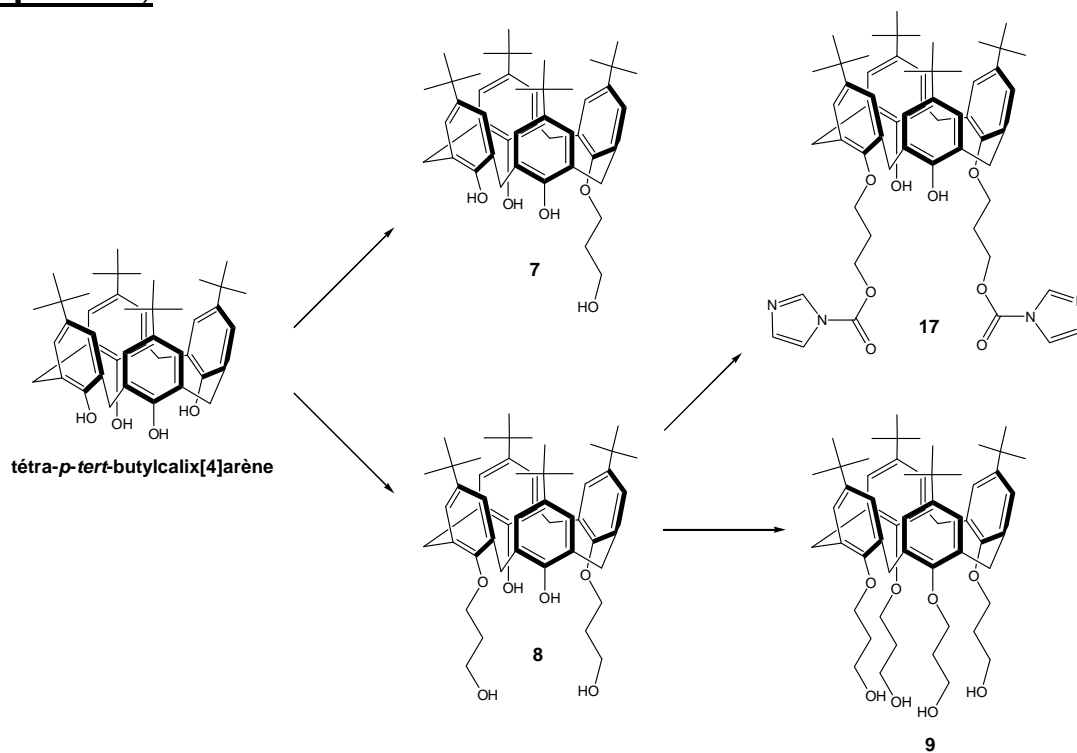
**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 968,4. Mesure m/z : 991,4 [**M**+Na]<sup>+</sup>.

**Composé N° 6****Ethyl-nalidixate.**

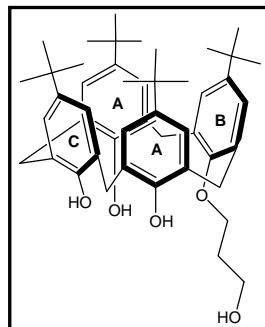
Une solution de nalidixate de sodium **1** (120 mg ; 0,445 mmol ; 1 éq.) et d'iodure d'éthyle (0,18 mL ; 2,225 mmol ; 5 éq.) dans le DMF distillé sur  $\text{CaH}_2$  (5 mL) est chauffée à 35 °C sous argon durant 1,5 heure. Après contrôle CCM ( $\text{SiO}_2$  ; DCM/MeOH 95:5), le solvant est évaporé à sec sous vide poussé à ~40 °C. Le résidu huileux jaune pâle est repris au DCM, évaporé et séché sous vide poussé. Le résidu est de nouveau repris dans le DCM (8 mL) puis filtré. Le filtrat est évaporé à sec pour donner une huile jaune très pâle qui cristallise par trituration dans  $\text{Et}_2\text{O}$  (5 mL). Ce solide blanc est filtré, rincé par 2x2 mL de  $\text{Et}_2\text{O}$  et séché sous vide poussé pour donner 75 mg de produit pur (65%).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :** 1,41 (t,  $J = 6,8$  Hz, 3 H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ) ; 1,49 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) ; 2,65 (s, 3 H,  $\text{C}(7)\text{CH}_3$ ) ; 4,40 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) ; 4,48 (q,  $J = 6,8$  Hz, 2 H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ) ; 7,23 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H,  $\text{C}(6)\text{H}$ ) ; 8,61 (s, 1 H,  $\text{C}(2)\text{H}$ ) ; 8,64 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H,  $\text{C}(5)\text{H}$ ).

## Synthèse des conjugués calixarène-aciclovir et calixarène-ganciclovir (chapitre IV)





**Composé N° 7****Calixarène mono-*O*-(3-hydroxy-propyle).****5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25-(3-hydroxypropoxy)-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène.**

Dans un ballon de 250 mL, sont réunis *p-tert*-butylcalix[4]arène (1,22 g ; 1,87 mmol ; 1,00 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,14 g ; 1,03 mmol ; 0,55 éq.) et KI (1,00 g ; 6,02 mmol ; 3,22 éq.). Le tout est mis à dessécher sous vide poussé pendant 1 heure et mis sous argon. De l'acétonitrile fraîchement distillé sur CaH<sub>2</sub> (110 mL) est alors ajouté pour constituer une suspension qui est chauffée à reflux sous argon et agitation magnétique durant 1 heure. Le 3-bromopropanol (0,18 mL ; 2,06 mmol ; 1,10 éq.) est ensuite additionné au mélange, prenant rapidement un aspect laiteux. Après 24 heures dans ces conditions, un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 95:5) montre l'apparition d'un produit majoritaire et l'acétonitrile est évaporé. 20 mL de DCM sont ajoutés au résidu solide et la suspension ainsi obtenue est filtrée sur célite avec rinçage par 2x20 mL de DCM. Le filtrat est évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice éluee par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 99,5:0,5 pour donner 523 mg d'un solide blanc (40%).

Le composé **7** peut être obtenu si nécessaire sous la forme d'une poudre par trituration dans un mélange pentane/Et<sub>2</sub>O 3:1 (v/v) et filtration.

**P<sub>f</sub>** : >230 °C.

**IR (KBr)** : fin 3566,1 et larges 3294,3 + 3159,8 (ν(O-H) : PhOH et PrOH) ; 2959,9 (ν<sub>as</sub>(CH<sub>3</sub>) : *Tert*-butyl) ; 2869,7 (ν<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>) : ArCH<sub>2</sub>Ar + propyl) ; 1485,2 + 1462,5 (δ(CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 1203,4 (ν(C=C) et ρ(CH<sub>3</sub>) : calixarène et *tert*-butyl) ; 1046,6 (ν(C-O) : PrOH).

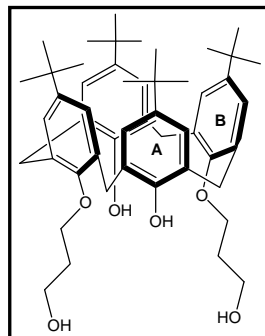
**UV-Vis (DCM)** : 280 (7889) ; épaulement 287 (7082).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 1,194 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 1,218 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 1,232 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 2,272 (m, *J* = 5,8 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 3,459-4,255 (AB, *J* = 13,6 Hz, 4 H, Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 3,459-4,314 (AB, *J* = 13,6 Hz, 4 H, Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 3,566 (t, *J* = 6,2 Hz, 1 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 4,174 (t, *J* = 5,9 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 4,273 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 7,001 (d, *J* = 2,4 Hz, 2 H, ArH<sub>m</sub> **A**) ; 7,062 (s, 2 H, ArH<sub>m</sub> **C**) ; 7,086 (d, *J* = 2,4 Hz, 2 H, ArH<sub>m</sub> **A**) ; 7,096 (s, 2 H, ArH<sub>m</sub> **B**) ; 9,780 (s, 2 H, ArOH **A**) ; 10,262 (s, 1 H, ArOH **C**).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 29,016 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 31,196 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 31,444 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 31,466 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 31,780 (Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 31,874 (Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 33,923 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 34,025 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 34,229 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 58,801 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 73,748 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 125,735 ; 125,830 (C<sub>m</sub> **A**) ; 125,808 (C<sub>m</sub> **C**) ; 126,552 (C<sub>m</sub> **B**) ; 127,419 ((C<sub>o</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 127,988 (C<sub>o</sub> **C**) ; 128,258 ((C<sub>o</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 133,340 (C<sub>o</sub> **B**) ; 143,482 (C<sub>p</sub> **A**) ; 143,817 (C<sub>p</sub> **B**) ; 147,492 (C<sub>i</sub> **C**) ; 148,061 (C<sub>i</sub> **A**) ; 148,345 (C<sub>p</sub> **C**) ; 148,914 (C<sub>i</sub> **B**).

**Analyse élémentaire** : calculée pour C<sub>47</sub>H<sub>62</sub>O<sub>5</sub>, 0,5 C<sub>5</sub>H<sub>12</sub> (743,07) : C 80,01% ; H 9,22%. Mesurée : C 80,21% ; H 9,17%.

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 706,46. Mesure *m/z* : 729,45 [**M**+Na]<sup>+</sup> ; 707,47 [**M**+H]<sup>+</sup>.

**Composé N° 8****Calixarène bis-*O*-(3-hydroxy-propyle).****5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25,27-bis-(3-hydroxypropoxy)-26,28-bis-hydroxy-calix[4]arène.**

Dans un ballon de 250 mL, sont réunis *p-tert*-butylcalix[4]arène (2,00 g ; 3,09 mmol ; 1 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,02 g ; 7,36 mmol ; 2,4 éq.) et KI (2,50 g ; 15,06 mmol ; 4,9 éq.). Le tout est mis à dessécher sous vide poussé pendant 1 heure et mis sous argon. De l'acétonitrile fraîchement distillé sur CaH<sub>2</sub> (100 mL) est alors ajouté pour constituer une suspension qui est chauffée à reflux sous argon et agitation magnétique durant 1 heure. Le 3-bromopropanol (0,8 mL ; 9,15 mmol ; 2,96 éq.) est ensuite additionné au mélange, prenant rapidement un aspect laiteux. Après 16 heures dans ces conditions, un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 95:5) montre l'apparition d'un produit majoritaire et l'acétonitrile est évaporé. 50 mL de DCM sont ajoutés au résidu solide et la suspension ainsi obtenue est filtrée sur célite avec rinçage par 3x50 mL de DCM. Le filtrat est évaporé et le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice éluée par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 98:2 pour donner 1,28 g d'un solide blanc (54%).

**P<sub>f</sub>** : >230 °C

**IR (KBr)** : large 3405,7 (ν(O-H) : PhOH et PrOH) ; 2959,7 (ν<sub>as</sub>(CH<sub>3</sub>) : *Tert*-butyl) ; 2869,0 (ν<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>) : ArCH<sub>2</sub>Ar + propyl) ; 1485,7 (δ(CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 1204,4 (ν(C=C) et ρ(CH<sub>3</sub>) : calixarène et *tert*-butyl) ; 1053,1 (ν(C-O) : PrOH).

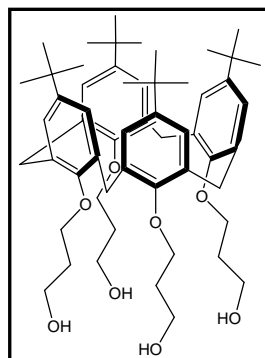
**UV-Vis (DCM)** : large 284 (7118).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 0,988 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> A) ; 1,282 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> B) ; 2,202 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 3,364-4,203 (AB, *J* = 13,1 Hz, 8 H, ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 4,127 (m, 8 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH et OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 4,366 (t, *J* = 5,4 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 6,853 (s, 4 H, ArH<sub>m</sub> A) ; 7,056 (s, 4 H, ArH<sub>m</sub> B) ; 7,740 (s, 2 H, ArOH).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 30,977 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> A) ; 31,663 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> B) ; 31,867 (ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 33,114 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 33,814 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> B) ; 33,974 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> A) ; 61,258 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 75,527 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 125,144 (C<sub>m</sub> B) ; 125,662 (C<sub>m</sub> A) ; 127,317 (C<sub>o</sub> B) ; 132,465 (C<sub>o</sub> A) ; 141,841 (C<sub>p</sub> B) ; 147,200 (C<sub>p</sub> A) ; 149,453 (C<sub>i</sub> A) ; 150,328 (C<sub>i</sub> B).

**Analyse élémentaire** : calculée pour C<sub>50</sub>H<sub>68</sub>O<sub>6</sub> (765,07) : C 78,49% ; H 8,96%. Mesurée : C 78,66% ; H 8,91.

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 764,50. Mesure *m/z* : 787,49 [**M**+Na]<sup>+</sup> ; 765,51 [**M**+H]<sup>+</sup>.

**Composé N° 9****Calixarène tétra-*O*-(3-hydroxy-propyle).****5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25,26,27,28-tétra-(3-hydroxypropoxy)-calix[4]arène.**

A une solution du composé **8** (293 mg ; 0,38 mmol ; 1 éq.) et de KI (400 mg ; 2,41 mmol ; 6 éq.) dans le DMF dégazé et distillé sur CaH<sub>2</sub> (15 mL), est ajouté une suspension d'hydrure de sodium (23 mg ;

0,96 mmol ; 2,5 éq.) dans le *n*-hexane (environ 2 mL). Le mélange sous argon est chauffé sous agitation magnétique à 35 °C. Après 30 minutes et apparition d'un précipité blanc, le 3-bromopropanol (0,1 mL ; 1,15 mmol ; 3 éq.) est ajouté au mélange réactionnel, et maintenu dans les mêmes conditions durant 5 heures. Un équivalent supplémentaire de 3-bromopropanol (35 µL ; 0,40 mmol) est ajouté, et le mélange est encore gardé 2 heures à 35 °C sous argon et agitation. Finalement, un mélange légèrement trouble et jaune pâle est obtenu. Un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 90:10) confirme la disparition du produit de départ au profit d'un composé majoritaire nettement plus polaire, et d'un composé minoritaire de polarité intermédiaire. Le DMF est alors évaporé, et l'huile obtenue séchée sous vide poussé jusqu'à se solidifier. Après addition de 15 mL de DCM, la suspension ainsi obtenue est filtrée sur célite, avec un rinçage par 3x10 mL de DCM, et le filtrat est évaporé à sec. Le brut est alors chromatographié sur gel de silice élué par un gradient DCM/MeOH 95:5 => DCM/MeOH 90:10, pour donner 142 mg d'un solide jaune pâle (42%).

**P<sub>f</sub>** : >230 °C

**IR (KBr)** : 3374,2 (ν(O-H) : PrOH) ; 2958,2 (ν<sub>as</sub>(CH<sub>3</sub>) : *Tert*-butyl) ; 2871,8 (ν<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>) : ArCH<sub>2</sub>Ar + propyl) ; 1477,9 (δ(CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 1195,0 (ν(C=C) et ρ(CH<sub>3</sub>) : calixarène et *tert*-butyl) ; 1054,6 (ν(C-O) : PrOH).

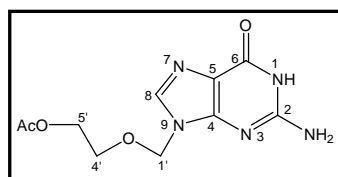
**UV-Vis (DCM)** : large 277 (3292).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 1,036 (s, 36 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 2,108 (quint, *J* = 6,8 Hz, 8 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 3,103-4,304 (AB, *J* = 12,3 Hz, 8 H, ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 3,608 (q, *J* = 6,2 Hz, 8 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 3,864 (t, *J* = 7,5 Hz, 8 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 4,460 (t, *J* = 5,0 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 6,778 (s, 8 H, ArH<sub>m</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 30,320 (ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 31,137 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 33,076 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 33,426 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 58,253 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 72,478 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ; 124,567 (C<sub>m</sub>) ; 133,295 (C<sub>o</sub>) ; 143,401 (C<sub>p</sub>) ; 153,280 (C<sub>i</sub>).

**Analyse élémentaire** : calculée pour C<sub>56</sub>H<sub>80</sub>O<sub>8</sub>, NaI (1031,12) : C 65,23% ; H 7,82%. Mesurée : C 65,12% ; H 7,79%.

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 880,59. Mesure *m/z* : 903,57 [**M**+Na]<sup>+</sup>.



#### Composé N° 14

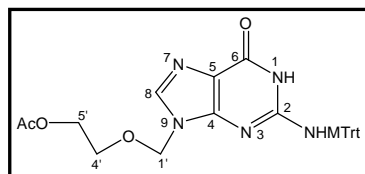
#### 5'-O-acétate-aciclovir.

L'aciclovir (1,023 g ; 4,54 mmol ; 1,00 éq.) est mis en suspension dans l'anhydride acétique (35 mL) en présence de *N,N*-diméthylaminopyridine (115 mg ; 0,94 mmol ; 0,02 éq.). Ce mélange est maintenu sous forte agitation et à température ambiante durant 5 jours. La suspension est alors filtrée sur fritté et le solide blanc est lavé par 20 mL de MeOH. Un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 85:15) du solide confirme sa pureté. Après séchage sous vide poussé, on obtient 1,153 g d'une poudre blanche (95%).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 1,959 (s, 3 H, CH<sub>3</sub> Ac) ; 3,660 (t, 2 H, *J* = 4,5 Hz, C(4')H<sub>2</sub>) ; 4,071 (t, 2 H, *J* = 4,5 Hz, C(5')H<sub>2</sub>) ; 5,350 (s, 2 H, C(1')H<sub>2</sub>) ; 6,487 (s, 2 H, C(2)NH<sub>2</sub>) ; 7,811 (s, 1 H, C(8)H) ; 10,610 (s, 1 H, N(1)H).

Conforme à la littérature :

Martin, J. C. et coll. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1384-1389. et *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 671-675.

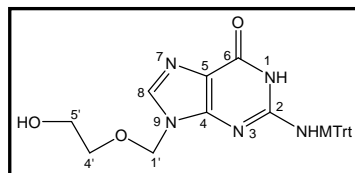
**Composé N° 15****2-*N*-(*p*-anisyldiphénylméthyl)-5'-*O*-acétate-aciclovir.**

A une solution du composé **14** (500 mg ; 1,86 mmol ; 1,0 éq.) sont ajoutées la triéthylamine (0,7 mL ; 5,05 mmol ; 2,7 éq.) et la *N,N*-diméthylaminopyridine (70 mg ; 0,56 mmol ; 0,3 éq.). Sous agitation magnétique, ce mélange laiteux est chauffé sous argon à 35 °C, puis le chlorure de *p*-anisyldiphénylméthane (870 mg ; 2,82 mmol ; 1,5 éq.) y est additionné. Au bout de 27 heures, on peut observer que le mélange est devenu quasi limpide, et un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 85:15) confirme la disparition du produit de départ au profit d'un nouveau composé moins polaire. 10 mL de MeOH sont ajoutés au milieu, puis le DMF est évaporé pour donner un résidu huileux orangé. Celui-ci est repris par le DCM (50 mL) et lavé par une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL). La phase organique, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et filtrée sur coton, est alors évaporée à sec pour obtenir un solide gras. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice élué par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 95:5 pour donner 935 mg d'un solide jaune pâle (93%).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 1,948 (s, 3 H, CH<sub>3</sub> Ac) ; 3,070 (t, *J* = 4,2 Hz, 2 H, C(4')H<sub>2</sub>) ; 3,711 (s, 3 H, NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 3,758 (t, *J* = 4,2 Hz, 2 H, C(5')H<sub>2</sub>) ; 4,867 (s, 2 H, C(1')H<sub>2</sub>) ; 6,859-7,327 (m, 14 H, aromatiques NHMTrt) ; 7,697 (s, 1 H, C(2)NHMTrt) ; 7,713 (s, 1 H, C(8)H) ; 10,646 (s, 1 H, N(1)H).

Conforme à la littérature :

Martin, J. C. et coll. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1384-1389. et *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 671-675.

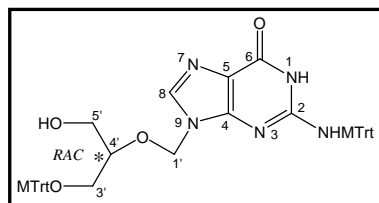
**Composé N° 10****2-*N*-(*p*-anisyldiphénylméthyl)-aciclovir.**

Le composé **15** (935 mg ; 1,73 mmol) est dissout dans 13 mL de MeOH. Une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium 25% (5 mL) est alors ajoutée, et le mélange est maintenu sous agitation magnétique à température ambiante. Après 3 jours, un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 90:10) confirme la totale disparition de l'acétate de départ au profit d'un nouveau produit plus polaire. Le solvant est évaporé et le résidu est chromatographié sur gel de silice élué par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 90:10 pour donner 860 mg de l'aciclovir *N*(2)-tritylé désiré (solide blanc ; 95%).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 3,125 (m, 2 H, C(4')H<sub>2</sub>) ; 3,453 (m, 2 H, C(5')H<sub>2</sub>) ; 3,701 (s, 3 H, NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 4,938 (s, 2 H, C(1')H<sub>2</sub>) ; 6,722 (d, *J* = 9,0 Hz, 2 H, NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub> C<sub>o</sub>H)) ; 7,107-7,344 (m, 13 H, aromatiques NHMTrt + C(8)H) ; 7,804 (s large, 1 H, C(2)NHMTrt) ; 11,406 (s large, 1 H, N(1)H).

Conforme à la littérature :

Martin, J. C. et coll. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1384-1389. et *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 671-675.

**Composé N° 11****(+)-2,3'-*N,O*-bis-(*p*-anisyldiphénylméthyl)-ganciclovir.**

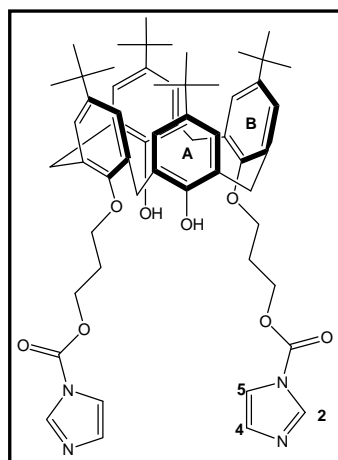
Le ganciclovir (394 mg ; 1,54 mmol ; 1,000 éq.) est mis en suspension dans le DMF dégazé à l'argon et distillé sur CaH<sub>2</sub> (5 mL). La triéthylamine (0,65 mL ; 4,69 mmol ; 3,000 éq.) et la *N,N*-diméthylaminopyridine (5 mg ; 0,04 mmol ; 0,025 éq.) sont ajoutés, et le mélange sous agitation magnétique est chauffé à 40 °C sous argon. Le chlorure de *p*-anisyldiphénylméthane (1,020 g ; 3,30 mmol ; 2,100 éq.) est alors ajouté par portion, et le mélange devenant presque limpide prend une teinte orange-rouille. Au bout de 2,5 heures d'agitation sous argon à 40 °C, un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 90:10) montre la formation de trois produits de polarité croissante, dont l'intermédiaire est majoritaire. Du MeOH (1 mL) est alors ajouté au milieu réactionnel avant d'évaporer le DMF sous vide poussé. Le résidu huileux repris dans le DCM (50 mL) est lavé par une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL), et la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis filtrée sur coton. Après évaporation du filtrat, le solide brut obtenu est chromatographié sur gel de silice élué par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 90:10 pour donner 626 mg du ganciclovir désiré *N*(2)-*O*(3')-bis-tritylé (solide blanc ; 50%).

Le produit peut être obtenu sous forme d'une poudre blanche par précipitation lors de l'ajout d'un excès d'Et<sub>2</sub>O à une solution saturée d'un mélange DCM/MeOH 20:80.

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :** 2,578-2,752 (ABM, 2 H, *J* = 6,8 ; 9,8 Hz, C(3')H<sub>2</sub>) ; 2,896-3,040 (ABM, 2 H, *J* = 4,0 ; 5,8 ; 7,6 Hz, C(5')H<sub>2</sub>) ; 3,447 (m, 1 H, C(4')H) ; 3,583 (s, 3 H, NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 3,756 (s, 3 H, OC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 4,410 (t, 1 H, *J* = 5,2 Hz, C(5')H<sub>2</sub>OH) ; 4,922-5,023 (AB, *J* = 11,2 Hz, 2 H, C(1')H<sub>2</sub>) ; 6,726 (d, 4 H, *J* = 8,6 Hz, OC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 6,885 (d, 4 H, *J* = 8,6 Hz, NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 7,028 à 7,310 (m, 20 H, aromatiques OMTTrt et NHMTTrt) ; 7,662 (s, 1 H, C(2)NHMTTrt) ; 7,773 (s, 1 H, C(8)H) ; 10,665 (s, 1 H, N(1)H).

Conforme à la littérature :

Martin, J. C. et coll. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1384-1389. et *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 671-675.

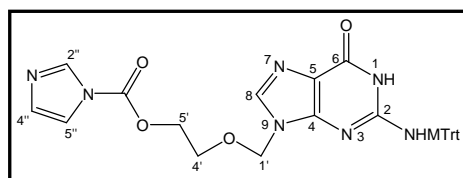
**Composé N° 17****5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25,27-bis-[3-oxo-(1-*N*-carboxylimidazole)-propoxy]-26,28-bis-hydroxy-calix[4]arène.**

Dans un ballon de 25 mL, le calixarène **8** (200 mg ; 0,26 mmol ; 1 éq.) et le *N,N'*-carbonyldiimidazole (137 mg ; 0,84 mmol ; 3,2 éq.) sont desséchés sous vide poussé durant 30 à 45 minutes. Le vide est cassé à l'argon, et les réactifs sont solubilisés dans de l'acétonitrile fraîchement distillé sur CaH<sub>2</sub> (5 mL). Après 10 minutes d'agitation à température ambiante et sous argon, un abondant précipité blanc apparaît, puis disparaît après encore 10 minutes. Au bout d'une heure au total, un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 96:4) confirme la totale disparition de **8** au profit d'un nouveau composé plus polaire. Le solvant est évaporé, et le résidu solide est repris dans le DCM (7,5 mL) pour être lavé par H<sub>2</sub>O (10 mL). La phase

organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée sur coton, et évaporée à sec. Le résidu alors est purifié par chromatographie sur gel de silice élué par un gradient DCM 100%  $\Rightarrow$  DCM/MeOH 98:2 pour donner 245 mg d'un solide vitreux (98%).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :** 0,987 (s, 18 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **A**) ; 1,282 (s, 18 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **B**) ; 2,494 (quint,  $J = 6,0$  Hz, 4 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOIm}$ ) ; 3,350-4,227 (AB,  $J = 12,9$  Hz, 8 H,  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ) ; 4,141 (t,  $J = 6,0$  Hz, 4 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOIm}$ ) ; 4,986 (t,  $J = 6,0$  Hz, 4 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOIm}$ ) ; 6,848 (s, 4 H,  $\text{ArH}_m$  **A**) ; 7,052 (s large, 6 H,  $\text{C}(4)\text{H} + \text{ArH}_m$  **B**) ; 7,439 (s large, 4 H,  $\text{C}(2)\text{H} + \text{C}(5)\text{H}$ ) ; 8,164 (s, 2 H,  $\text{ArOH}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :** 29,288 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOIm}$ ) ; 30,979 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **A**) ; 31,600 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **B**) ; 31,643 ( $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ) ; 33,814 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **B**) ; 33,992 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **A**) ; 64,965 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOIm}$ ) ; 71,611 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOIm}$ ) ; 117,089 ( $\text{C}(4)$ ) ; 125,222 ( $\text{C}_m$  **B**) ; 125,729 ( $\text{C}_m$  **A**) ; 127,406 ( $\text{C}_o$  **B**) ; 130,664 ( $\text{C}(5)$ ) ; 132,453 ( $\text{C}_o$  **A**) ; 137,036 ( $\text{C}(2)$ ) ; 141,874 ( $\text{C}_p$  **B**) ; 147,458 ( $\text{C}_p$  **A**) ; 148,6016 ( $\text{CO}$  carbamate) ; 149,142 ( $\text{C}_i$  **A**) ; 150,410 ( $\text{C}_i$  **B**).



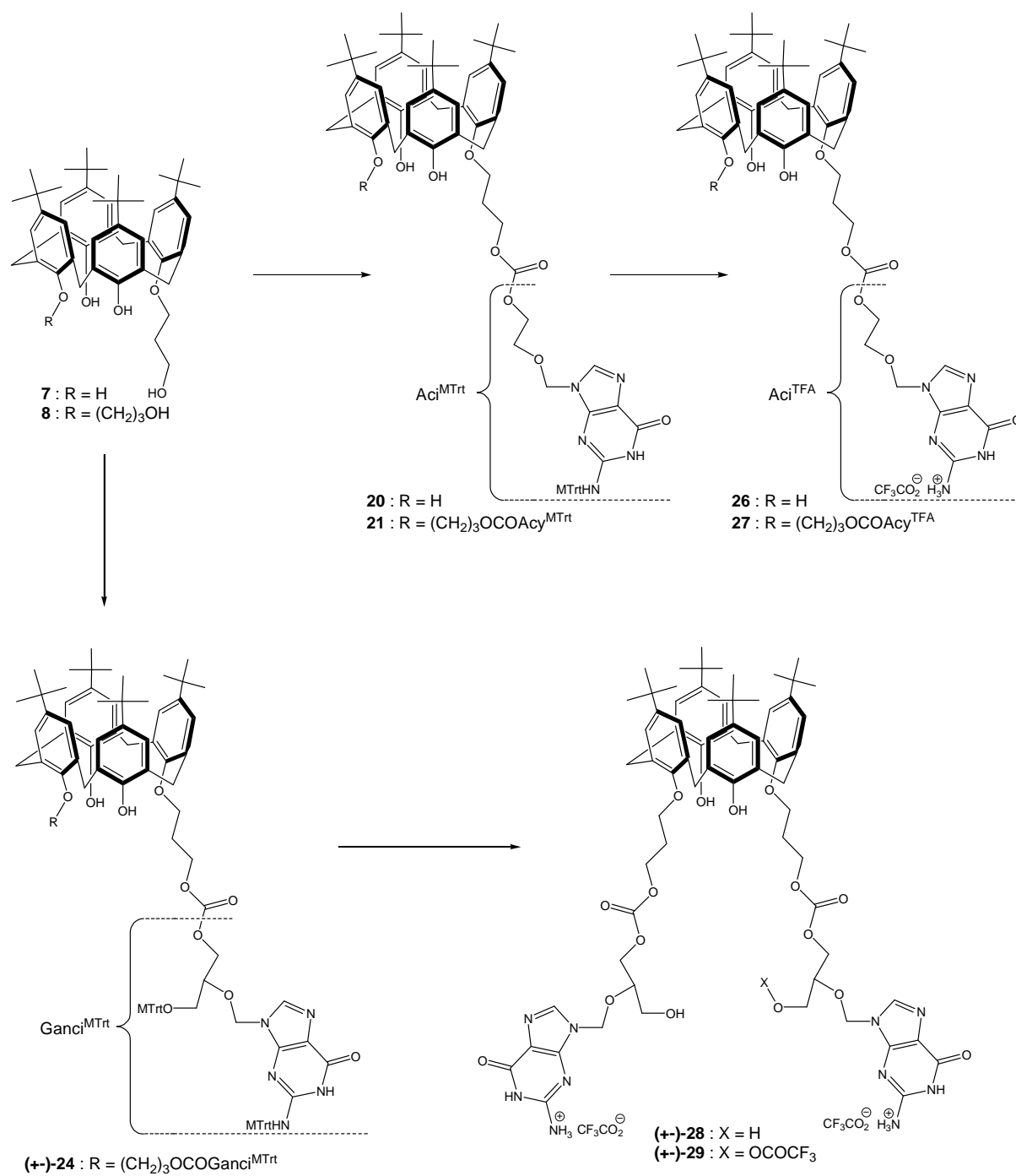
### Composé N° 19

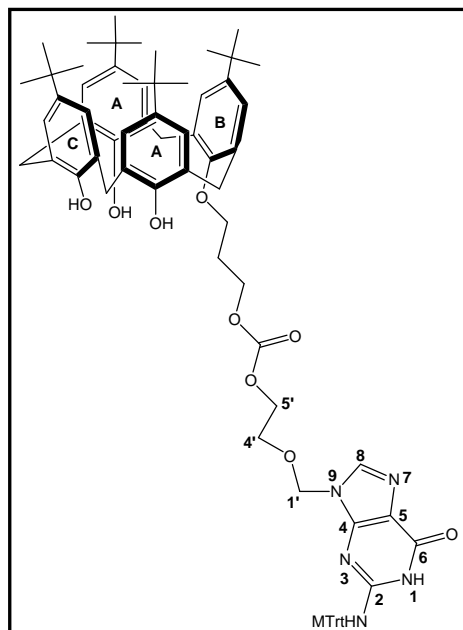
#### 2-*N*-(*p*-anisyl)diphénylméthyl)-5'-*O*-(1-*N*-carbonylimidazole)-aciclovir.

Dans un ballon de 25 mL, le composé **10** (151 mg ; 0,30 mmol ; 1 éq.) et le *N,N'*-carbonyldiimidazole (122 mg ; 0,75 mmol ; 2,5 éq.) sont desséchés sous vide poussé durant 30 à 45 minutes. Le vide est cassé à l'argon, et les réactifs sont solubilisés dans de l'acétonitrile fraîchement distillé sur  $\text{CaH}_2$  (7 mL). Après 3 heures d'agitation à température ambiante et sous argon, un contrôle CCM ( $\text{SiO}_2$  ; DCM/MeOH 85:15) confirme la totale disparition de **10** au profit d'un nouveau composé moins polaire. Le solvant est évaporé, et le résidu solide est repris dans le DCM (20 mL) pour être lavé par  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL). La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée sur coton, et évaporée à sec. Le résidu solide blanc, instable sur colonne de chromatographie, est analysé sans purification supplémentaire (173 mg ; 97%).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :** 3,202 (m, 2 H,  $\text{C}(4')\text{H}_2$ ) ; 3,699 (s, 3 H,  $\text{NHC}(\text{Ph})_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 4,180 (m, 2 H,  $\text{C}(5')\text{H}_2$ ) ; 4,854 (s, 2 H,  $\text{C}(1')\text{H}_2$ ) ; 6,712 (d,  $J = 9,3$  Hz, 2 H,  $\text{NHC}(\text{Ph})_2(\text{PhOCH}_3 \text{ C}_o\text{H})$ ) ; 7,007 (s large, 1 H,  $\text{C}(4'')\text{H}$ ) ; 7,053 (s large, 1 H,  $\text{C}(5'')\text{H}$ ) ; 7,108 à 7,380 (m, 13 H, aromatiques  $\text{NHMTTrt} + \text{C}(8)\text{H}$ ) ; 8,046 (s large, 1 H,  $\text{C}(2)\text{NHMTTrt}$ ) ; 8,093 (s, 1 H,  $\text{C}(2'')\text{H}$ ) ; 11,802 (s large, 1 H,  $\text{N}(1)\text{H}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :** 55,137 ( $\text{C}(\text{Ph})_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 66,337 ( $\text{C}(5')\text{H}_2$ ) ; 66,803 ( $\text{C}(4')\text{H}_2$ ) ; 70,438 ( $\text{C}(\text{Ph})_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 71,641 ( $\text{C}(1')\text{H}_2$ ) ; 112,917 ; 126,559 ; 127,602 ; 128,899 ; 130,230 ; 137,095 ; 144,816 ; 158,152 ( $\text{MTTrt}$ ) ; 116,851 ( $\text{C}(5)$ ) ; 117,091 ( $\text{C}(4'')$ ) ; 130,719 ( $\text{C}(5'')$ ) ; 136,883 ( $\text{C}(2'')$ ) ; 137,197 ( $\text{C}(8)$ ) ; 148,495 ( $\text{CO}$  carbamate) ; 150,941 ( $\text{C}(4)$ ) ; 151,739 ( $\text{C}(2)$ ) ; 159,056 ( $\text{C}(6)\text{O}$ ).





## Composé N° 20

**Conjugué calixarène-mono-aciclovir *N*-tritylé.  
5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25-[3-[(5'-*O*-(2-*N*-*p*-  
anisyl)diphénylméthyl-aciclovir))-oxycarbonyl]-  
propoxy]-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène.**

A une solution du calix[4]arène **7** (520 mg ; 0,73 mmol ; 1,00 éq.) dans l'acétonitrile fraîchement distillé sur CaH<sub>2</sub> (10 mL), est ajouté le *N,N'*-carbonyldiimidazole (125 mg ; 0,77 mmol ; 1,05 éq.). Le mélange réactionnel est maintenu sous argon et agitation magnétique durant 1 heure. La disparition du calixarène de départ au profit d'une nouvelle entité est confirmée par CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 95:5). Le synthon aciclovir **10** (440 mg ; 0,88 mmol ; 1,20 éq.) est alors ajouté au milieu, suivi par la 1,1,3,3-tétraméthylguanidine (0,64 mL ; 5,15 mmol ; 7,00 éq.) faisant apparaître une légère

coloration jaune. Après 15 heures dans ces conditions, le solvant est évaporé et le résidu huileux dissout dans le DCM (50 mL) est lavé par une solution aqueuse d'acide citrique 5% (50 mL). La phase organique est séchée par Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée sur coton et évaporée. Le résidu solide est chromatographié sur gel de silice élué par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 96:4 permet d'obtenir 151 mg du conjugué calixarène-aciclovir **20** (17%).

Le solide blanc est trituré dans le *n*-pentane (5 mL), passé dans un bain à ultra-son et filtré sur fritté pour donner 133 mg d'un solide blanc.

**P<sub>f</sub>** : 180 °C

**IR (KBr)** : 3346,1 ( $\nu$ (O-H) +  $\nu$ (N-H) : ArOH et NH) ; 2958,3 ( $\nu_{as}$ (CH<sub>3</sub>) : *Tert*-butyl) ; 2869,9 ( $\nu_s$ (CH<sub>2</sub>)) ; 1749,8 ( $\nu$ (C=O) : carbodiester) ; 1690,7 et 1568,1 (*Amide I et II* : Guanine) ; 1484,4 ( $\delta$ (CH<sub>3</sub>) : *tert*-butyl) ; 1257,3 et 1205,1 ( $\nu$ (C=C) +  $\rho$ (CH<sub>3</sub>) : calixarène et guanine + *Tert*-butyl) ; 1033,9 ( $\nu$ (C-O) : Alkyl-O).

**UV-Vis (DCM)** : 232 (35211) ; épaulement 266 (20878) ; 279 (23295).

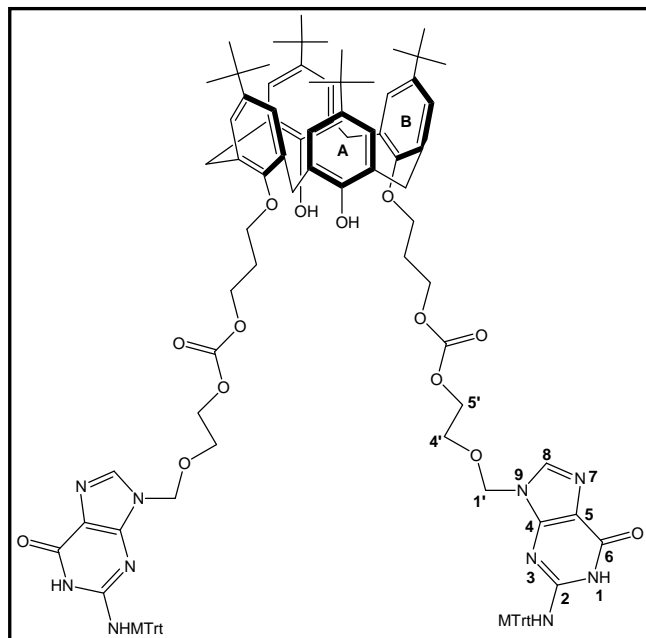
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 1,145 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 1,157 (s, 27 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**, **C**) ; 2,405 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 3,105 (m, 2 H, C(4')H<sub>2</sub>) ; 3,467-4,055 (AB, *J* = 13,3 Hz, 4 H, Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 3,507-4,215 (AB, *J* = 12,6 Hz, 4 H, Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 3,858 (m, 2 H, C(5')H<sub>2</sub>) ; 4,146 (t, *J* = 6,1 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,578 (t, *J* = 6,3 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,856 (s, 2 H, C(1')H<sub>2</sub>) ; 6,845 (d, *J* = 9,0 Hz, 2 H, *MTrt*) ; 7,096 (d, *J* = 2,2 Hz, 2 H, ArH<sub>m</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 7,120 (s, 2 H, ArH<sub>m</sub> **C**) ; 7,183-7,292 (16 H, *MTrt*, ArH<sub>m</sub>(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**), ArH<sub>m</sub> **B**) ; 7,652 (s, 1 H, C(8)H) ; 7,697 (s, 1 H, C(2)NH*MTrt*) ; 9,261 (s, 2 H, ArOH **A**) ; 9,712 (s, 1 H, ArOH **C**) ; 10,621 (s, 1 H, N(1)H).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 28,826 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 30,867 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 31,122 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 31,195 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 31,509 (large, ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 33,645 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 33,682 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 34,017 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 54,899 (C(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 64,451 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 66,354 (C(5')H<sub>2</sub>) ; 66,820 (C(4')H<sub>2</sub>) ; 69,526 (C(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 71,290 (C(1')H<sub>2</sub>) ; 72,974 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 112,850 ; 125,464 ; 126,047 ; 126,478 ; 127,564 ; 127,878 ; 128,009 ; 128,432 ; 129,307 ; 129,817 ; 133,514 ; 136,583 ; 142,715 ; 144,771 ; 157,670 (*MTrt*, (C<sub>o</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**), (C<sub>o</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**), C<sub>o</sub> **B**, C<sub>o</sub> **C**, (C<sub>m</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**), C<sub>m</sub> **B**, C<sub>p</sub> **A**, C<sub>p</sub> **B**, C<sub>p</sub> **C**) ; 116,503 (C(5)) ; 125,296 (C<sub>m</sub> **C**) ; 127,404 ((C<sub>m</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 137,720 (C(8)) ; 147,856 (C<sub>i</sub> **C**) ; 148,001 (C<sub>i</sub> **A**) ; 149,030 (C<sub>i</sub> **B**) ; 149,963 (C(4)) ; 151,020 (C(2)) ; 154,396 (O(CO)O) ; 156,467 (C(6)O).



**Analyse élémentaire** : calculée pour  $C_{76}H_{87}N_5O_{10}$  (1031,12) : C 74,18% ; H 7,13% ; N 5,69%. Mesurée : C 73,99% ; H 7,04% ; N 5,60%.

**ES-MS ( $ES^+$ )** : Masse exacte calculée :  $M = 1229,65$ . Mesure  $m/z$  : 1230,65 [ $M+H$ ] $^+$ .



### Composé N° 21

#### Conjugué calixarène-bis-aciclovir *N*-tritylé.

#### 5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25,27-bis-[3-[(5'-*O*-(2-*N*-*p*-anisyl)diphénylméthyl-aciclovir))-oxycarbonyl]-propoxy]-26,28-bis-hydroxy-calix[4]arène.

A une solution du calix[4]arène **8** (200 mg ; 0,26 mmol ; 1 éq.) dans l'acétonitrile fraîchement distillé sur  $CaH_2$  (5 mL), est ajouté le *N,N'*-carbonyldiimidazole (135 mg ; 0,83 mmol ; 3,2 éq.). Le mélange réactionnel est maintenu sous argon et agitation magnétique durant 1 heure. La disparition du calixarène de départ au

profit d'une nouvelle entité est confirmée par CCM ( $SiO_2$  ; DCM/MeOH 95:5). Après évaporation du solvant, le résidu huileux est dissout dans 10 mL de DCM et lavé par 10 mL d'eau distillée. La phase organique est séchée sur  $Na_2SO_4$ , filtrée sur coton et évaporée à sec. Le carbamate intermédiaire **17** (solide vitreux) est séché sous vide poussé pendant 30 minutes. Le synthon aciclovir **10** (285 mg ; 0,57 mmol ; 2,2 éq.) est ajouté au carbamate **17** et le tout est dissout dans 5 mL d'acétonitrile fraîchement distillé sur  $CaH_2$ . Le mélange est agité magnétiquement sous argon jusqu'à complète solubilisation (environ 5 minutes), et la 1,1,3,3-tétraméthylguanidine (0,25 mL ; 1,99 mmol ; 7,6 éq.) y est ajoutée. Au bout de 20 heures, un contrôle CCM ( $SiO_2$  ; DCM/MeOH 90:10) montre la disparition de l'intermédiaire **17** au profit d'un mélange de plusieurs produits dont un majoritaire. Le solvant est alors évaporé et le résidu huileux obtenu est dissout dans 25 mL de DCM pour être lavé par 25 mL d'une solution aqueuse d'acide citrique 5%. Après décantation et séparation, la phase aqueuse est extraite par 10 mL de DCM, et les phases organiques rassemblées sont séchées sur  $Na_2SO_4$ . La phase organique est filtrée sur coton puis évaporée à sec pour obtenir environ 500 mg d'un résidu solide blanc. Une purification par chromatographie sur gel de silice éluee par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 95:5 permet d'obtenir 238 mg du conjugué calixarène-aciclovir **21** (50%).

Le produit **21** pure est précipité par ajout d'un excès d' $Et_2O$  à une solution saturée dans le DCM.

**P<sub>f</sub>** : 207 °C

**IR (KBr)** : large 3401,7 ( $\nu(O-H)$  +  $\nu(N-H)$ ) : ArOH et NH) ; 2958,2 ( $\nu_{as}(CH_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 2870,3 ( $\nu_s(CH_2)$ ) ; 1748,4 ( $\nu(C=O)$ ) : carbodiester) ; 1687,5 et 1570,9 (*Amide I et II* : Guanine) ; 1464,3 ( $\delta(CH_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 1260,8 ( $\nu(C=C)$  +  $\rho(CH_3)$ ) : calixarène et guanine + *Tert*-butyl) ; 1033,4 ( $\nu(C-O)$ ) : Alkyl-O).

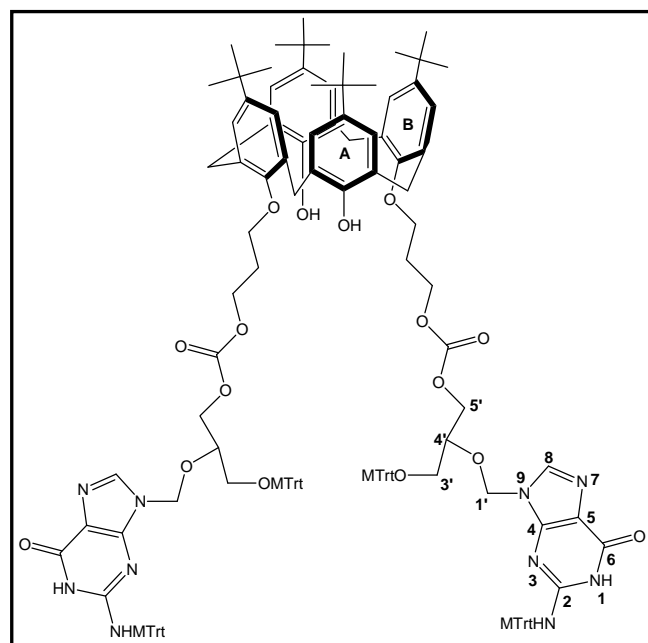
**UV-Vis (DCM)** : 233 (52626) ; épaulement 265 (35690) ; 280 (36292).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) :** 1,120 (s, 18 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **B**) ; 1,149 (s, 18 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **A**) ; 2,330 (s large, 4 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ ) ; 3,058 (s large, 4 H,  $\text{C}(4')\text{H}_2$ ) ; 3,422-4,133 (AB,  $J = 12,4$  Hz, 8 H,  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ) ; 3,668 (s, 6 H,  $\text{NHC}(\text{Ph})_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 3,815 (s large, 4 H,  $\text{C}(5')\text{H}_2$ ) ; 4,016 (s large, 4 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ ) ; 4,634 (s large, 4 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ ) ; 4,822 (s, 4 H,  $\text{C}(1')\text{H}_2$ ) ; 6,836 (d, 4 H,  $J = 8,9$  Hz,  $\text{C}(\text{Ph } C_o\text{H})_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 7,128-7,280 (m, 20 H,  $\text{MTrt} + \text{ArH}_m$  **A** +  $\text{ArH}_m$  **B**) ; 7,633 (s, 2 H,  $\text{C}(8)\text{H}$ ) ; 7,709 (s, 2 H,  $\text{C}(2)\text{NHMTTrt}$ ) ; 8,497 (s, 2 H,  $\text{ArOH}$ ) ; 10,626 (s, 2 H,  $\text{N}(1)\text{H}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) :** 28,838 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ ) ; 30,887 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **B**) ; 31,193 ( $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ) ; 31,368 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **A**) ; 33,599 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **A**) ; 34,052 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  **B**) ; 54,934 ( $\text{C}(\text{Ph})_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 64,332 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ ) ; 66,286 ( $\text{C}(5')\text{H}_2$ ) ; 66,899 ( $\text{C}(4')\text{H}_2$ ) ; 69,545 ( $\text{C}(\text{Ph})_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 71,383 ( $\text{C}(1')\text{H}_2$ ) ; 72,280 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ ) ; 112,899 ( $\text{C}(\text{Ph } C_o)_2(\text{PhOCH}_3)$ ) ; 126,549 ; 127,628 ; 128,488 ; 129,866 ; 144,791 ; 157,712 ( $\text{MTrt}$ ) ; 116,530 ( $\text{C}(5)$ ) ; 125,338 ( $\text{C}_m$  **A**) ; 125,732 ( $\text{C}_m$  **B**) ; 127,321 ( $\text{C}_o$  **A**) ; 133,162 ( $\text{C}_o$  **B**) ; 137,500 ( $\text{C}(8)$ ) ; 141,430 ( $\text{C}_p$  **A**) ; 147,307 ( $\text{C}_p$  **B**) ; 149,334 ( $\text{C}_i$  **B**) ; 150,027 ( $\text{C}_i$  **A**) ; 150,092 ( $\text{C}(4)$ ) ; 151,062 ( $\text{C}(2)$ ) ; 154,481 ( $\text{O}(\text{CO})\text{O}$ ) ; 156,523 ( $\text{C}(6)\text{O}$ ).

**Analyse élémentaire :** calculée pour  $\text{C}_{108}\text{H}_{118}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$ , 1,5  $\text{H}_2\text{O}$  (1839,17) : C 70,53% ; H 6,63% ; N 7,62% ; O 15,22%. Mesurée : C 70,78% ; H 6,24% ; N 7,79% ; O 15,89%.

**ES-MS ( $\text{ES}^+$ ) :** Masse exacte calculée :  $\text{M} = 1810,87$ . Mesure  $m/z$  : 1812, 89 [ $2\text{M}+2\text{H}$ ] $^{2+}$  ; 906,94 [ $\text{M}+2\text{H}$ ] $^{2+}$ .



#### Composé N° 24

**Conjugué calixarène-bis-ganciclovir  $N,O$ -tritylé.**

**5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25,27-bis-[3-[(5'-*O*-((+)-2,3'- $N,O$ -bis-(*p*-anisyl)diphénylméthyl)-ganciclovir))-oxycarbonyl]-propoxy]-26,28-bis-hydroxy-calix[4]arène.**

A une solution du calix[4]arène **8** (250 mg ; 0,33 mmol ; 1 éq.) dans l'acétonitrile fraîchement distillé sur  $\text{CaH}_2$  (7 mL), est ajouté le  $N,N'$ -carbonyldiimidazole (162 mg ; 1,00 mmol ; 3 éq.). Le mélange réactionnel, limpide et incolore, est maintenu sous argon et agitation

magnétique durant 1 heure. La disparition du calixarène de départ au profit d'une nouvelle entité est confirmée par CCM ( $\text{SiO}_2$  ;  $\text{DCM}/\text{MeOH}$  95:5). Après évaporation du solvant, le résidu huileux est dissout dans 25 mL de  $\text{DCM}$  et lavé par 125 mL d'eau distillée. La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrée sur coton et évaporée à sec. Le carbamate intermédiaire **17** (solide vitreux) est séché sous vide poussé pendant 30 minutes.

Le synthon ganciclovir (+-)-**11** (454 mg ; 0,57 mmol ; 2,2 éq.) est ajouté au carbamate **17** et le tout est dissout dans 5 mL d'acétonitrile fraîchement distillé sur  $\text{CaH}_2$ . Le mélange est agité magnétiquement sous argon et la 1,1,3,3-tétraméthylguanidine (0,25 mL ; 1,99 mmol ; 7,6 éq.) y est ajoutée, conduisant à une complète solubilisation. Au bout de 21 heures, un contrôle CCM ( $\text{SiO}_2$  ;  $\text{DCM}/\text{MeOH}$  90:10) montre la disparition de l'intermédiaire **17** au

profit d'un mélange de plusieurs produits dont un très majoritaire et plus polaire que **11**. Le solvant est alors évaporé et le résidu huileux obtenu est dissout dans 20 mL de DCM pour être lavé par 20 mL d'une solution aqueuse d'acide citrique 5%. Après décantation et séparation, la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée sur coton puis évaporée à sec pour obtenir environ 700 mg d'un résidu solide blanc. Une purification par chromatographie sur gel de silice éluee par un gradient DCM 100% => DCM/MeOH 95:5 permet d'obtenir 443 mg du conjugué calixarène-gancivlovir **24** (71%). Un contrôle CCM révèle la présence de deux entités, le diastéréoisomère (**R,R**)-**24** (et son énantiomère (**S,S**)-**24**) et le diastéréoisomère *méso* (**R,S**)-**24**. L'équivalence d'intensité relative des taches révélées par UV-254 nm suggère un mélange équimolaire en diastéréoisomères (**R,R**)-(S,S) et *méso*. Le mélange **24** est trituré dans Et<sub>2</sub>O (20 mL), ultra-soniqué et filtré.

**P<sub>f</sub>** : 155 et 170 °C.

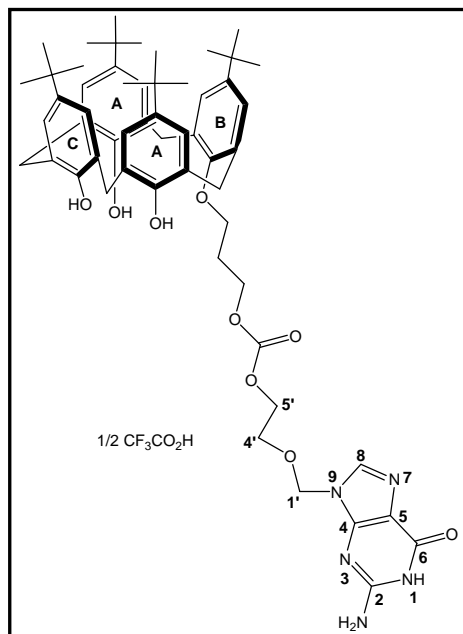
**IR (KBr)** : large 3443,7 ( $\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H})$ ) : ArOH et NH) ; 2958,3 ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 2867,4 ( $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ ) ; 1749,1 ( $\nu(\text{C=O})$ ) : carbodiester) ; 1686,2 et 1570,9 (*Amide I et II* : Guanine) ; 1462,8 ( $\delta(\text{CH}_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 1254,4 ( $\nu(\text{C=C}) + \rho(\text{CH}_3)$ ) : calixarène et guanine + *Tert*-butyl) ; 1032,9 ( $\nu(\text{C-O})$ ) : Alkyl-O).

**UV-Vis (DCM)** : 233 (77366) ; épaulement 265 (40505) ; 279 (40594).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 1,073 à 1,168 (m, 36 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 2,322 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 2,533-2,664 (ABM, 4 H, C(3')H<sub>2</sub>) ; 3,381-4,092 (ABM, *J* = 9,3 ; 11,4 Hz, 8 H, ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 3,518 (s, 6 H, NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 3,554 (m, 2 H, C(4')H) ; 3,650-3,663 (ABM, 4 H, C(5')H<sub>2</sub>) ; 3,720 (s, 6 H, OC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 4,006 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,586 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,885-5,017 (AB, *J* = 11,6 Hz, 2 H, C(1')H<sub>2</sub>) ; 6,669 (d, 4 H, *J* = 8,7 Hz, OC(Ph C<sub>o</sub>H)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 6,849 (d, 4 H, *J* = 8,9 Hz, NHC(Ph C<sub>o</sub>H)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 6,959 à 7,296 (m, 20 H, aromatiques *OMTrt* et *NHMTrt*) ; 7,692 (s, 2 H, C(8)H) ; 7,708 (s, 2 H, C(2)*NHMTrt*) ; 8,467 (m, 2 H, ArOH) ; 10,656 (s, 2 H, N(1)H).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 28,527 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 30,552 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> B) ; 30,885 double (ArCH<sub>2</sub>Ar) ; 31,037 double (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> A) ; 33,514 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> A) ; 33,959 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> B) ; 54,529 (NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 54,715 (OC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 62,195 et 62,356 (C(3')H<sub>2</sub>) ; 64,108 et 64,602 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 66,627 et 66,818 (C(5')H<sub>2</sub>) ; 69,555 (NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 70,213 (C(1')H<sub>2</sub>) ; 71,950 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 75,076 (C(4')H) ; 85,194 (OC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 112,438 (OC(Ph C<sub>o</sub>)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 112,854 (NHC(Ph C<sub>o</sub>)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub>)) ; 116,627 (C(5)) ; 124,967 large (C<sub>m</sub> A) ; 125,344 large (C<sub>m</sub> B) ; 126,053 et 126,484 (C<sub>o</sub> A) ; 127,144 + 127,193 ; 127,419 + 127,486 large + 127,555 ; 128,083 + 128,171 ; 129,492 large ; 144,804 large (aromatiques *NHMTrt* et *OMTrt*) ; 133,942 et 134,731 (C<sub>o</sub> B) ; 137,413 (C(8)) ; 141,396 et 143,109 (C<sub>p</sub> A) ; 143,838 et 144,035 (C<sub>p</sub> B) ; 149,285 et 149,671 (C<sub>i</sub> B) ; 150,014 (C<sub>i</sub> A) ; 150,976 (C(4)) ; 151,121 (C(2)) ; 154,250 (O(CO)O) ; 155,803 (C(6)O) ; 157,568 (NHC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub> C<sub>p</sub>)) ; 158,603 (OC(Ph)<sub>2</sub>(PhOCH<sub>3</sub> C<sub>p</sub>)).

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : **M** = 2415,13. Mesure *m/z* : 1208,56 [**M**+2H]<sup>2+</sup>.



## Composé N° 26

**Conjugué calixarène-mono-aciclovir.**  
**5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25-[3-[(5'-*O*-aciclovir)-oxycarbonyl]-propoxy]-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène, trifluoroacétohydrate.**

A une solution de **20** (121 mg ; 0,098 mmol ; 1 équ.) dans le DCM distillé sur CaH<sub>2</sub> (8 mL), est ajouté le triisopropylsilane (0,4 mL ; 1,960 mmol ; 20 équ.). Sous agitation magnétique, 0,4 mL d'acide trifluoroacétique sont ajoutés au mélange limpide et incolore, conduisant à une intense coloration orange qui s'estompe progressivement. Le mélange redevient incolore après 20 minutes, un contrôle CCM (SiO<sub>2</sub> ; DCM/MeOH 90:10) confirmant la disparition du calixarène de départ au profit d'un produit plus polaire avec apparition d'un composé apolaire en front de solvant. Le DCM est alors

évaporeré et plusieurs cycles reprise au DCM/évaporation sont effectués afin de co-évaporer l'acide trifluoroacétique et le triisopropylsilane en excès. Une purification par chromatographie sur gel de silice éluée par un gradient rapide DCM 100% => DCM/MeOH 95:5 permet d'obtenir 81 mg d'un solide vitreux (82%).

Ce dernier est solubilisé dans MeCN (2 mL) puis entreposé au réfrigérateur (4 °C) durant 24 h. Après passage dans un bain à ultra-son et filtration, le conjugué **26** est obtenu sous la forme d'une fine poudre blanche semi-cristalline (~40% cristallisation).

**P<sub>f</sub>** : 170 °C

**IR (KBr)** : large 3448,5 ( $\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H})$ ) : ArOH, NH et NH<sub>2</sub>) ; 2959,5 ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 2871,9 ( $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ ) ; 1747,2 ( $\nu(\text{C=O})$ ) : carbodiester) ; large 1634,0 (*Amide I et II* +  $\nu(\text{C=O})$ ) : amide Guanine + CF<sub>3</sub>(C=O)O) ; 1484,2 ( $\delta(\text{CH}_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 1264,5 et 1201,8 ( $\nu(\text{C=C}) + \rho(\text{CH}_3)$ ) : calixarène et guanine + *Tert*-butyl) ; 1037,1 ( $\nu(\text{C-O})$ ) : Alkyl-O).

**UV-Vis (DCM)** : 232 (25748) ; épaulement 256 (17266) ; 277 (17665).

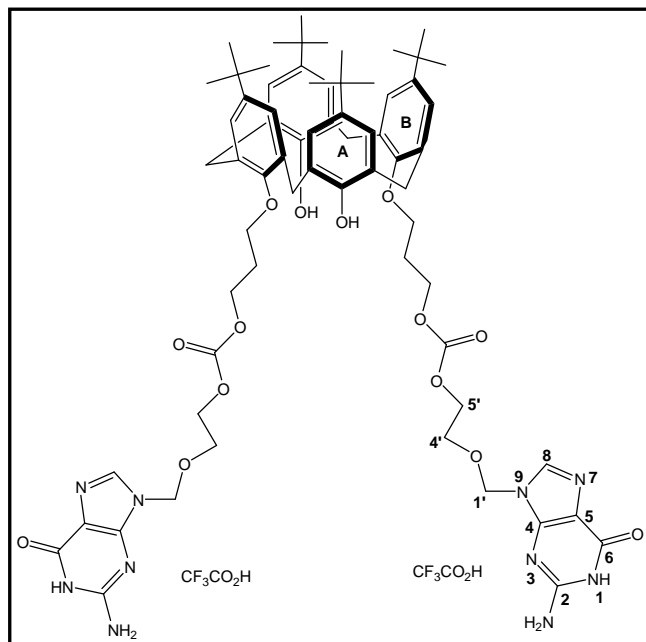
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 1,152 et 1,155 (s+s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B** et **C**) ; 1,162 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 2,387 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 3,487-4,077 (AB, *J* = 13,3 Hz, 4 H, Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 3,521-4,205 (AB, *J* = 13,2 Hz, 4 H, Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 3,704 (m, 2 H, C(4')H<sub>2</sub>) ; 3,915 (très large, H<sup>+</sup>) ; 4,131 (t, *J* = 6,1 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 4,201 (m, 2 H, C(5')H<sub>2</sub>) ; 4,558 (t, *J* = 6,3 Hz, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 5,353 (s, 2 H, C(1')H<sub>2</sub>) ; 6,595 (s large, 2 H, C(2)NH<sub>2</sub>) ; 7,101 (d, *J* = 2,3 Hz, 2 H, (ArH<sub>m</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 7,124 (s, 2 H, ArH<sub>m</sub> **C**) ; 7,224 (d, *J* = 2,3 Hz, 2 H, (ArH<sub>m</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 7,257 (s, 2 H, ArH<sub>m</sub> **B**) ; 8,007 (s, 1 H, C(8)H) ; 9,209 (s, 2 H, ArOH **A**) ; 9,720 (s, 1 H, ArOH **C**) ; 10,760 (s, 1 H, N(1)H).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : 28,775 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 30,874 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) et Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**) ; 31,108 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 31,195 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 31,487 (Ar(**A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**)) ; 33,652 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **A**) ; 33,689 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **C**) ; 34,032 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> **B**) ; 64,465 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 66,259 (C(5')) ; 66,529 (C(4')) ; 72,034 (C(1')) ; 73,011 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO) ; 115,183 (C(5)) ; 125,311 ((C<sub>m</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 125,457 ; 125,508 ((C<sub>m</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**) et C<sub>m</sub> **C**) ; 126,077 (C<sub>m</sub> **B**) ; 127,382 ((C<sub>o</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**B**)) ; 127,878 ; 127,980 ((C<sub>o</sub> **A**)CH<sub>2</sub>Ar(**C**) et C<sub>o</sub> **C**) ; 133,499 (C<sub>o</sub> **B**) ; 137,568 (C(8)) ; 142,774 (C<sub>p</sub> **A**) ; 143,481 (C<sub>p</sub> **C**) ; 146,616 (C<sub>p</sub> **B**) ; 147,899 (C<sub>i</sub> **C**) ; 147,943 (C<sub>i</sub> **A**) ; 148,986 (C<sub>i</sub> **B**) ; 151,144 (C(4)) ; 154,126 (C(2)) ; 154,476 (O(CO)O) ; 156,233 (C(6)O).

**RMN <sup>19</sup>F (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : -74,755 (s, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

**Analyse élémentaire** : calculée pour  $C_{56}H_{71}N_5O_9$ , 0,5  $CF_3CO_2H$  (1015,20) : C 67,44% ; H 7,10% ; N 6,90%. Mesurée : C 67,71% ; H 7,05% ; N 7,05%.

**ES-MS ( $ES^+$ )** : Masse exacte calculée :  $M = 1014,52$ . Mesure  $m/z$  : 958,53 [ $M-0,5CF_3CO_2H+H$ ] $^+$ .



### Composé N° 27

**Conjugué calixarène-bis-aciclovir.**  
**5,11,17,23-tétra-(*tert*-butyl)-25,27-bis-**  
**[3-[(5'-*O*-aciclovir)-oxycarbonyl]-**  
**propoxy]-26,28-bis-hydroxy-**  
**calix[4]arène, bis-**  
**trifluoroacétohydrate.**

A une solution de **21** (102 mg ; 0,056 mmol ; 1 éq.) dans le DCM distillé sur  $CaH_2$  (5 mL), est ajouté le triisopropylsilane (1,0 mL ; 4,881 mmol ; 87 éq.). Sous agitation magnétique, 0,3 mL d'acide trifluoroacétique sont ajoutés au mélange limpide et incolore, conduisant à une intense coloration

orange qui s'estompe progressivement. Le mélange redevient incolore après 15 minutes, un contrôle CCM ( $SiO_2$  ; DCM/MeOH 90:10) confirmant la disparition du calixarène de départ au profit d'un produit plus polaire caractérisé par son long étalement, et avec apparition d'un composé apolaire en front de solvant. Le DCM est alors évaporé et plusieurs cycles reprise au DCM/évaporation sont effectués afin de co-évaporer l'acide trifluoroacétique et le triisopropylsilane en excès. Le résidu est trituré dans le *n*-pentane (5 mL) et passé dans un bain à ultra-son. Enfin, une filtration sur fritté permet d'obtenir 78 mg du conjugué **27** sous la forme d'une poudre blanche cristalline (93%).

**P<sub>f</sub>** : 175 °C

**IR (KBr)** : large 3366,1 + épaulement 3134,2 ( $\nu(O-H) + \nu(N-H)$ ) : ArOH, NH et  $NH_2$  ; 2959,8 ( $\nu_{as}(CH_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 2871,3 ( $\nu_s(CH_2)$ ) ; large bande 1747,2 à 1603,3 ( $\nu(C=O)$ ) + Amide I et II : carbodiester + amide Guanine +  $CF_3(C=O)O$ ) ; 1483,3 ( $\delta(CH_3)$ ) : *tert*-butyl) ; 1266,7 et 1201,5 ( $\nu(C=C) + \rho(CH_3)$ ) : calixarène et guanine + *Tert*-butyl) ; 1040,6 ( $\nu(C-O)$ ) : Alkyl-O).

**UV-Vis (DCM)** : 233 (28464) ; 259 (28657) ; épaulement 280 (23630).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** : 1,123 (s, 18 H,  $C(CH_3)_3$  B) ; 1,163 (s, 18 H,  $C(CH_3)_3$  A) ; 2,298 (quint,  $J = 6,0$  Hz, 4 H,  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 3,428-4,109 (AB,  $J = 12,6$  Hz, 8 H,  $ArCH_2Ar$ ) ; 3,663 (m, 4 H,  $C(4')H_2$ ) ; 3,950 (très large,  $H^+$ ) ; 3,986 (m, 4 H,  $C(5')H_2$ ) ; 4,146 (t,  $J = 6,0$  Hz, 4 H,  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 4,607 (t,  $J = 6,0$  Hz, 4 H,  $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 5,331 (s, 4 H,  $C(1')H_2$ ) ; 6,601 (s large, 4 H,  $C(2)NH_2$ ) ; 7,134 (s, 4 H,  $ArH_m$  A) ; 7,145 (s, 4 H,  $ArH_m$  B) ; 8,000 (s, 2 H,  $C(8)H$ ) ; 8,468 (s, 2 H, ArOH) ; 10,775 (s, 2 H,  $N(1)H$ ).

**RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** : 28,773 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 30,887 ( $C(CH_3)_3$  B) ; 31,128 ( $ArCH_2Ar$ ) ; 31,376 ( $C(CH_3)_3$  A) ; 33,599 ( $C(CH_3)_3$  A) ; 34,052 ( $C(CH_3)_3$  B) ; 64,398 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 66,242 ( $OCH_2CH_2CH_2OCO$ ) ; 66,541 ( $C(4')$ ) ; 72,075 ( $C(1')$ ) ;

72,287 (C(5')) ; 115,116 (C(5)) ; 125,346 (C<sub>m</sub> A) ; 125,739 (C<sub>m</sub> B) ; 127,300 (C<sub>o</sub> A) ; 133,118 (C<sub>o</sub> B) ; 137,400 (C(8)) ; 141,452 (C<sub>p</sub> A) ; 147,292 (C<sub>p</sub> B) ; 149,312 (C<sub>i</sub> B) ; 150,063 (C<sub>i</sub> A) ; 151,179 (C(4)) ; 154,168 (C(2)) ; 154,525 (O(CO)O) ; 156,523 (C(6)O).

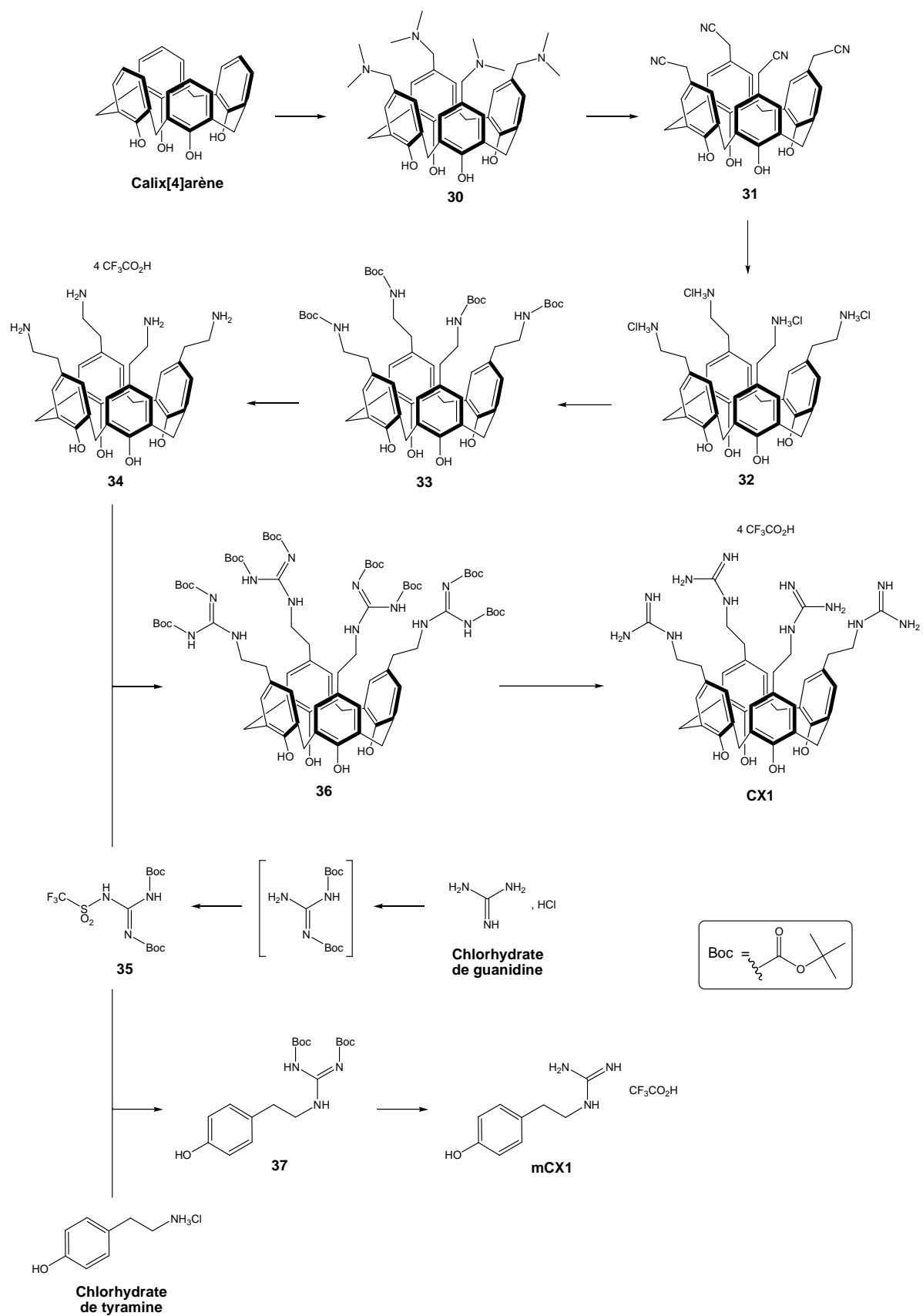
**RMN <sup>19</sup>F (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : -74,771 (s, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

**Analyse élémentaire** : calculée pour C<sub>72</sub>H<sub>88</sub>F<sub>6</sub>N<sub>10</sub>O<sub>18</sub>, 0,25 C<sub>5</sub>H<sub>12</sub> (1513,55) : C 58,13% ; H 6,06% ; N 9,25%. Mesurée : C 58,25% ; H 6,09% ; N 9,41%.

**ES-MS (ES<sup>+</sup>)** : Masse exacte calculée : M = 1494,62. Mesure m/z : 634,32 [M-2CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sup>2+</sup>.

---

## Synthèse du CX1 et du mCX1 (chapitre V)



Les composés **CX1**, **mCX1** ont été synthétisés selon les procédures mises au point par Maxime Mourer, sans modifications particulières.

Ainsi, toutes les analyses étaient conformes à la littérature :

- ✓ Thèse Mourer, M. *Calixarènes Hydrosolubles à Propriétés Antivirales et Antibactériennes*. Université Henry Poincaré Nancy I, Nancy, France, **2006**.
- ✓ Mourer, M.; Duval, R. E.; Finance, C. et Regnouf de Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2960-2963.
- ✓ Mourer, M.; Dibama, H. M.; Fontanay, S.; Grare, M.; Duval, R. E.; Finance, C. et Regnouf de Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496-5509.

En fin de synthèse, les composés **CX1** et **mCX1** ont été caractérisés par analyse élémentaire dans le but de s'assurer de leur masse moléculaire :

- ✓ **Analyse élémentaire CX1** : calculée pour  $C_{48}H_{56}F_{12}N_{12}O_{12}$ ,  $H_2O$  (1239,03) : C 46,53% ; H 4,72% ; N 13,57%. Mesurée : C 46,43% ; H 4,81% ; N 13,33%.

⇒ Bon pour le service !

- ✓ **Analyse élémentaire mCX1** : calculée pour  $C_{11}H_{14}F_3N_3O_3$  (293,24) : C 45,05% ; H 4,81% ; N 14,33%. Mesurée : C 44,83% ; H 4,73% ; N 14,24%.

⇒ Bon pour le service !



## **Matériels et méthodes relatifs aux films de Langmuir**

### ➤ **Substances.**

1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC, 99%), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DMPE, 99%) et 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-(1-glycerol) sel de sodium (DMPG, 99%) proviennent de Sigma-Aldrich. 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine sel de sodium (DMPS, 99%) provient de Avanti Polar Lipids. Le chloroforme et le méthanol (~99.9%), utilisés pour la préparation des solutions de phospholipides ou de calixarènes, proviennent de Sigma-Aldrich. Les solutions aqueuses utilisées comme sous-phase ont été préparées avec de l'eau Milli-Q, caractérisée par une tension de surface de  $72,8 \text{ mN m}^{-1}$  à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (pH 5,6). Les tampons carbonate  $50 \text{ mM}$  pH 10 ont été préparés à l'aide de  $\text{NaHCO}_3$  et de  $\text{NaOH}$ , qualité analytique.

### ➤ **Balance de Langmuir et microscopie BAM.**

Les isothermes de compression  $\Pi$ -A et  $\Delta V$ -A ont été mesurées à l'aide d'un appareillage contrôlé par ordinateur KSV 2000 Langmuir balance, couplé avec un microscope KSV Optrel BAM 300 (KSV Instruments Ltd, Helsinki, Finland). La source électromagnétique était un laser standard HeNe,  $10 \text{ mW}$ ,  $\lambda = 633 \text{ nm}$ , d'une résolution spatiale de  $2 \text{ }\mu\text{m}$ . Une cuve hydrophobe en Téflon<sup>®</sup> ( $6,5 \text{ cm} \times 58 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ , monobloc) munie de deux barrières hydrophiles en Delrin<sup>®</sup> (compression symétrique) a été utilisée pour la mesure des isothermes de compression. La pression de surface  $\Pi$  fut mesurée à l'aide d'une électrobalance et d'une lame de Wilhelmy en platine (périmètre  $3,94 \text{ cm}$ ) plongée d'un tiers dans la sous-phase. Le potentiel de surface  $\Delta V$  fut mesuré à l'aide d'une électrode vibrante KSV Spot 1 placée  $3 \text{ mm}$  au dessus de la surface, et d'une contre-électrode d'acier immergée dans la sous-phase. L'ensemble de ces appareillages ont été isolés dans une cage de Plexiglas<sup>®</sup>, et la température de la cuve fut maintenu à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  par un thermostat à circulation d'eau.

Avant chaque expérience, la cuve et les barrières étaient nettoyées avec un papier de qualité optique KIMTECK, imbibé de chloroforme puis d'éthanol, et finalement par de l'eau Milli-Q. La lame Pt de Wilhelmy était également rincée par de l'eau Milli-Q, de l'éthanol puis du chloroforme, pour être finalement chauffée au rouge. Avant formation d'un film de Langmuir, la surface de la sous-phase était méticuleusement nettoyée par aspiration à l'aide d'une pompe munie d'une pipette Pasteur. Après mise en place de la lame Pt de Wilhelmy et des électrodes, la stabilité du signal de  $\Delta V$  était vérifiée avant chaque expérience, puis remis à zéro. Lorsque la variation de  $\Pi$  ne dépassait pas  $0,2 \text{ mN m}^{-1}$  durant un rapide resserrement des barrières, un film de Langmuir pouvait être formé à l'interface eau-air à partir d'une solution chloroformique (DMPC, dérivés de calixarène) ou chloroform/méthanolique 3:1 v/v max en MeOH (DMPE, DMPG, DMPS) à l'aide d'une microsiringue (Hamilton Co., USA). Les solutions étaient de concentration comprise entre  $0,6$  et  $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ . Un délai d'équilibration

du système de 15 minutes était respecté, et la compression pouvait commencer à la vitesse de  $5 \text{ mm min}^{-1}$  par le mouvement symétrique des deux barrières.

Un ordinateur PC équipé d'un logiciel KSV fut utilisé pour contrôler les expériences, et chacune d'entre elles furent répétées au moins trois fois. La marge d'erreur standard admise était de  $\pm 0,5 \text{ \AA}^2$  pour la mesure de  $A$ ,  $\pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$  pour  $\Pi$ , et  $\pm 0,005 \text{ V}$  pour  $\Delta V$ .

Les paramètres au point de collapse des films monomoléculaires ont été déterminés graphiquement, à partir des isothermes de compression correspondantes.

### ➤ Spectroscopie PM-IRRAS.

Une cuve de Téflon<sup>®</sup> ( $7,5 \text{ cm} \times 36,5 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$ , monobloc) munie de deux barrières hydrophiles en Delrin<sup>®</sup> (compression symétrique) a été utilisée pour comprimer les films de Langmuir à la pression de surface d'étude. Les barrières furent surmontées à l'arrière d'une plaque de polystyrène pour limiter l'évaporation de la sous-phase au cours des expériences. Les autres conditions expérimentales sont décrites dans le paragraphe précédent.

Les spectres PM-IRRAS ont été collectés à l'aide d'un appareil KSV PMI 550 Instrument (KSV Instruments Ltd, Helsinki, Finland). Celui-ci est composé d'un spectromètre infrarouge à transformé de Fourier équipé d'une unité de modulation de polarisation (PM), installé d'un côté d'un goniomètre, et d'un détecteur MCT de l'autre côté du goniomètre. L'angle d'incidence du laser pouvait ainsi être choisi entre  $40^\circ$  et  $90^\circ$ , les mesures ayant été faites à l'angle de  $75^\circ$ . L'unité PM, constitué d'un monocristal ZnSe piézoélectrique IR-transparent, a été couplé à un modulateur photoélastique modulant de façon continu à une fréquence de  $74 \text{ kHz}$  la polarisation du laser entre la  $s$ - ( $\perp$  au plan d'incidence) et la  $p$ -polarisation ( $\parallel$  au plan d'incidence). La gamme spectrale était comprise entre  $800$  et  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , avec une résolution de  $8 \text{ cm}^{-1}$ .

Après nettoyage de l'interface eau-air par aspiration, un premier spectre  $S(W)$  était collecté (blanc, 6000 scans à 10 scans par seconde ; 10 minutes d'acquisition). Le film était alors préparé et comprimé à la pression d'étude comme décrit précédemment. Après quelques minutes de stabilisation, un spectre de mesure  $S(f)$  pouvait être collecté et normalisé par le signal blanc  $S(w)$  selon l'équation  $\Delta S / S = [S(f) - S(W)] / S(w)$ . Dans la région du moyen infrarouge, la longueur d'onde à laquelle la retardation de demi-onde prenait place pouvait être sélectionnée à  $1500 \text{ cm}^{-1}$  ou  $2900 \text{ cm}^{-1}$ . Certaines bandes d'absorption étant parfois plus visibles à l'une ou l'autre de ces longueurs d'onde, selon le cas, tous les spectres dans une condition donnée ont été collectés pour chacune des deux longueurs d'onde de retardation.

La correction de la ligne de base ainsi que la déconvolution des spectres dans les régions d'intérêt ont été effectuées à l'aide du logiciel OriginPro<sup>®</sup> v7.0383 (OriginLab Corp., Northampton, USA).

➤ **Cinétiques d'adsorption (chapitre VI, exclusivement).**

Ces expériences ont été réalisées sur le même appareillage que les isothermes de compression, décrit précédemment. La cuve a été équipée de deux agitateurs magnétiques (1 cm) en rotation à 250 tours  $\text{min}^{-1}$ , et espacés d'environ 15 cm des bords de part et d'autre des deux extrémités de la cuve. Un film de Langmuir était préparé à la surface d'une sous-phase de volume  $V = 330 \text{ mL}$ , puis comprimé à la pression de surface  $\Pi_0 = 30 \text{ mN m}^{-1}$ . Après 10 minutes d'équilibration, 1,00 mL d'une solution concentrée en la substance d'intérêt fut injecté dans la sous-phase de part et d'autres des deux barrières, à l'aide d'une microseringue (Hamilton Co., USA). L'évolution de la pression de surface fut alors suivie en fonction du temps et enregistré à l'aide de l'ordinateur équipé du logiciel KSV.

➤ **Hydrolyse des prodrogues à l'interface eau-air (chapitre IV et V, exclusivement).**

Ces études ont été réalisées dans des boîtes de Pétri calibrées en verre borosilicaté ( $\varnothing = 18,5 \text{ cm}$  ;  $268,8 \text{ cm}^2$  soit  $268,8 \cdot 10^{16} \text{ \AA}^2$  ; profondeur : 3 cm). Celles-ci étaient à demi remplies par 120 mL d'une solution tampon ( $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50 mM, pH 10) fraîchement préparée. Celle-ci a été préparée par dissolution de  $\text{NaHCO}_3$  (4,200 g) dans 800 mL d'eau distillée, le pH fut ajusté à l'aide d'un pH-mètre PHM210 MeterLab<sup>TM</sup> et d'une solution de  $\text{NaOH} \sim 2 \text{ M}$ , et le volume complété à 1 L à l'aide d'une fiole jaugée. Le film de Langmuir de la substance d'intérêt était déposé à l'aide d'une microseringue (Hamilton Co., USA), de façon obtenir une aire moléculaire  $A$ , choisie en fonction de l'isotherme de compression correspondante. Après 10 minutes d'équilibration, les boîtes furent recouverte (couvercle de verre borosilicaté) et maintenues à l'abri de la lumière par une boîte de carton à température ambiante  $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , ou dans une étuve thermostatée à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .



## Références Bibliographiques

- (1) Ben Salem, A. *Calix[4]arènes Organiseurs de Principes Actifs Antibiotiques. Synthèse et Caractérisation*. Chimie et Physico-chimie Moléculaires, Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France, **2003**.
- (2) Ben Salem, A. et Regnouf-de-Vains, J. B. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7033-7036.
- (3) Ben Salem, A. et Regnouf-de-Vains, J.-B. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6769-6771.
- (4) Massimba Dibama, H. *Calixarènes et Composés Apparentés à Propriétés Anti-Infectieuses*. Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France, **2010**.
- (5) Massimba Dibama, H.; Clarot, I.; Fontanay, S.; Salem, A. B.; Mourer, M.; Finance, C.; Duval, R. E. et Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2679-2682.
- (6) Korchowicz, B.; Ben Salem, A.; Corvis, Y.; Regnouf de Vains, J.-B.; Korchowicz, J. et Rogalska, E. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 13231-13242.
- (7) Mourer, M. *Calixarènes Hydrosolubles à Propriétés Antivirales et Antibactériennes*. Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France, **2006**.
- (8) Mourer, M.; Duval, R. E.; Finance, C. et Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2960-2963.
- (9) Grare, M.; Mourer, M.; Regnouf de Vains, J.-B.; Finance, C. et duval, R. E. *Pathologie Biologie* **2006**, *54*, 470-476.
- (10) Mourer, M.; Dibama, H. M.; Fontanay, S.; Grare, M.; Duval, R. E.; Finance, C. et Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496-5509.
- (11) Grare, M.; Mourer, M.; Fontanay, S.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Finance, C. et Duval, R. E. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 575-581.
- (12) Grare, M.; Dague, E.; Mourer, M.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Finance, C.; Duval, J. F. L.; Duval, R. E. et Gaboriaud, F. *Pathol. Biol.* **2007**, *55*, 465-471.
- (13) Grare, M.; Massimba Dibama, H.; Lafosse, S.; Ribon, A.; Mourer, M.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Finance, C. et Duval, R. E. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 432-438.
- (14) Grare, M.; Fontanay, S.; Massimba Dibama, H.; Mourer, M.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Finance, C. et Duval, R. E.

- Pathol. Biol.* **2010**, 58, 46-51.
- (15) Brezesinski, G. et Mohwald, H.  
*Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, 100-102, 563-584.
- (16) Korchowiec, B.; Paluch, M.; Corvis, Y. et Rogalska, E.  
*Chem. Phys. Lipids* **2006**, 144, 127-136.
- (17) Korchowiec, B.; Korchowiec, J.; Hato, M. et Rogalska, E.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, 1808, 2466-2476.
- (18) Corvis, Y.; Barzyk, W.; Brezesinski, G.; Mrabet, N.; Badis, M.; Hecht, S. et Rogalska, E.  
*Langmuir* **2006**, 22, 7701-7711.
- (19) Barzyk, W.; Campagna, S.; Wieclaw, K.; Korchowiec, B. et Rogalska, E.  
*Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, 343, 104-110.
- (20) Gravier, J.; Korchowiec, B.; Schneider, R. et Rogalska, E.  
*Chem. Phys. Lipids* **2009**, 158, 102-109.
- (21) Czapla, K.; Korchowiec, B. et Rogalska, E.  
*Langmuir* **2010**, 26, 3485-3492.
- (22) Brock, T. D., *Biology of Microorganisms*. 2nd ed.; Prentice-Hall: Upper Saddle River, NJ (USA), **1974**; pages.
- (23) Verkleij, A. J.; Zwal, F. A.; Roelofsen, B.; Comfurius, P.; Kastelijn, D. et Van Deenen, L. L. M.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1973**, 323, 178-193.
- (24) Gutsche, D. C., *Calixarenes Revisited*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **1998**; 233 pages.
- (25) Asfari, Z.; Böhmer, V.; Harrowfield, J. et Vicens, J., *Calixarenes 2001*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht / Boston / London, **2001**; 683 pages.
- (26) Sliwa, W. et Kozłowski, C., *Calixarenes and Resorcinarenes*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2009**; 316 pages.
- (27) Mandolini, L. et Ungaro, R., *Calixarenes In Action*. Imperial College Press: London, UK, **2000**; 271 pages.
- (28) Lumetta, G. J.; Rogers, R. D. et Gopalan, A. S., *Calixarenes for Separations*. American Chemical Society: Washington, USA, **2000**; 366 pages.
- (29) Vicens, J. et Harrowfield, J., *Calixarenes in the Nanoworld*. Springer: Dordrecht, The Netherlands, **2007**; 395 pages.
- (30) von Baeyer, A.  
*Ber.* **1872**, 5, 280.
-

- (31) Baekeland, L. H.; U.S. Patent 942,699, October, **1908**.
- (32) Zinke, A. et Ziegler, E.  
*Ber.* **1944**, 77, 264.
- (33) Niederl, J. B. et Vogel, H. J.  
*J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2512.
- (34) Gutsche, D. C. et Muthukrishnan, R.  
*J. Org. Chem.* **1978**, 43, 4905.
- (35) Gutsche, D. C., *Calixarenes*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **1989**; 223 pages.
- (36) Gutsche, D. C.; Iqbal, M. et Stewart, D.  
*J. Org. Chem.* **1986**, 51, 742.
- (37) Dhawan, B.; Chen, S.-I. et Gutsche, D. C.  
*Makromol. Chem.* **1987**, 188, 921.
- (38) Jaime, C.; De Mendoza, J.; Prados, P.; Nieto, P. M. et Sanchez, C.  
*J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3372-3376.
- (39) Groenen, L. C.; Van Loon, J. D.; Verboom, W.; Harkema, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Pochini, A.; Ugozzoli, F. et Reinhoudt, D. N.  
*J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2385-2392.
- (40) Conforth, J. W.; D'Arcy Hart, P.; Nichols, G. A.; Rees, R. J. W. et Stock, J. A.  
*Br. J. Pharmacol.* **1955**, 10, 73-86.
- (41) Conforth, J. W.; Morgan, E. D.; Potts, K. T. et Rees, R. J. W.  
*Tetrahedron* **1973**, 29, 1659-1667.
- (42) Boyd, D. H.; Stewart, S. M.; Somner, A. R.; Crofton, J. W. et Rees, R. J.  
*Tubercle* **1959**, 40, 369-376.
- (43) Colston, M. J.; Hailes, H. C.; Stavropoulos, E.; Herve, A. C.; Herve, G.; Goodworth, K. J.; Hill, A. M.; Jenner, P.; Hart, P. D. et Tascon, R. E.  
*Infect. Immun.* **2004**, 72, 6318-6323.
- (44) Hwang, K. M.; Qi, Y. M.; Liu, S.-Y.; Choy, W. et Chen, J.; *Inhibition and treatment of infection by enveloped virus with calix[n]arene compounds*. WO 94/03164, **1994**.
- (45) Hwang, K. M.; Qi, Y. M.; Liu, S.-Y.; Choy, W. et Chen, J.; *Antithrombotic treatment with calix[n]arene compounds*. WO 94/03165, **1994**.
- (46) Harris, S. J.; *Preparation of calixarene-based compounds having antibacterial, antifungal, anticancer, and anti-HIV activity*. 1995-IE8 9519974, 19950124., **1995**.
- (47) Hulmes, D.; Coleman, A. W. et Aubert-Foucher, E.; *Use of calix[n]arenes for treating fibrotic diseases*. WO 00/07585, **2000**.
-

- (48) de Fatima, A.; Fernandes, S. A. et Sabino, A. A.  
*Curr. Drug Discovery Technol.* **2009**, *6*, 151-170.
- (49) Rodik, R. V.; Boyko, V. I. et Kalchenko, V. I.  
*Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1630-1655.
- (50) da Silva, E.; Lazar, A. N. et Coleman, A. W.  
*J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2004**, *14*, 3-20.
- (51) Perret, F. et Coleman, A. W.  
*Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7303-7319.
- (52) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I. et Lee, R. E.  
*Nature Reviews Microbiology* **2011**, *9*, 62-75.
- (53) Mourer, M.; Psychogios, N.; Laumond, G.; Aubertin, A.-M. et Regnouf-de-Vains, J.-B.  
*Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 36-45.
- (54) Williams, D. H. et Bardley, B.  
*Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 1172-1193.
- (55) Casnati, A.; Fabbi, M.; Pelizzi, N.; Pochini, A.; Sansone, F. et Ungaro, R.  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2699-2704.
- (56) Casnati, A.; Sansone, F. et Ungaro, R.  
*Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 246-254.
- (57) Motornaya, A. E.; Alimbarova, L. M.; Shokova, E. A. et Kovalev, V. V.  
*Pharm. Chem. J.* **2006**, *40*, 68-72.
- (58) Geraci, C.; Consoli, G. M. L.; Galante, E.; Bousquet, E.; Pappalardo, M. et Spadaro, A.  
*Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 751-758.
- (59) Consoli, G. M. L.; Granata, G.; Galante, E.; Cunsolo, F. et Geraci, C.  
*Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3245-3249.
- (60) Consoli, G. M. L.; Granata, G.; Garozzo, D.; Mecca, T. et Geraci, C.  
*Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7974-7977.
- (61) Consoli, G. M. L.; Granata, G.; Lo Nigro, R.; Malandrino, G. et Geraci, C.  
*Langmuir* **2008**, *24*, 6194-6200.
- (62) Consoli, G. M. L.; Granata, G.; Galante, E.; Di Silvestro, I.; Salafia, L. et Geraci, C.  
*Tetrahedron* **2007**, *63*, 10758-10763.
- (63) Consoli, G. M. L.; Galante, E.; Daquino, C.; Granata, G.; Cunsolo, F. et Geraci, C.  
*Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6611-6614.
- (64) Vovk, A. I.; Kononets, L. A.; Tanchuk, V. Y.; Cherenok, S. O.; Drapailo, A. B.; Kalchenko, V. I. et Kukhar, V. P.
-



- Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 483-487.
- (65) Paquet, V.; Zumbuehl, A. et Carreira, E. M.  
*Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1460-1463.
- (66) Harris, S. J.; *Anti-viral compounds*. WO 02/44121, **2002**.
- (67) Coveney, D. et Costello, B.; *Preparation of alkylated pyrogallol calixarene type compounds as anti-viral compounds*. 2003-722060  
20050113454, 20031125., **2005**.
- (68) Coleman, A. W.; Baggetto, L. G.; Lazar, A. N.; Michaud, M. H. et Magnard, S.;  
*Derivatives of calixarenes as anticancer agent*. 2006-3406  
2899900, 20060418., **2007**.
- (69) Coveney, D. et Castello, B.; EP1367044, **2003**.
- (70) Kral, V.; Cigler, P.; Konvalinka, J.; Koziak, M.; Prejdova, J.; Gruner, B.; Plesek, J. et  
Lepsik, M.; WO 05/073240, **2005**.
- (71) Mutihac, L.  
*Curr. Drug Discovery Technol.* **2008**, *5*, 98-104.
- (72) Helttunen, K. et Shahgaldian, P.  
*New J. Chem.* **2010**, *34*, 2704-2714.
- (73) Stoikov, I. I.; Repejkov, S. A.; Antipin, I. S. et Konovalov, A. I.  
*Heteroat. Chem.* **2000**, *11*, 518-527.
- (74) Fernandes, S. A.; Cabeca, L. F.; Marsaioli, A. J. et Paula, E.  
*J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *57*, 395-401.
- (75) Nault, L.; Cumbo, A.; Pretot, R. F.; Sciotti, M. A. et Shahgaldian, P.  
*Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2010**, *46*, 5581-5583.
- (76) Rodik, R. V.; Klymchenko, A. S.; Jain, N.; Miroshnichenko, S. I.; Richert, L.;  
Kalchenko, V. I. et Mely, Y.  
*Chem.--Eur. J.* **2011**, *17*, 5526-5538.
- (77) Langmuir, I.  
*J. Am. Chem. Soc.* **1917**, *39*, 1848-1906.
- (78) Langmuir, I.  
*Tech. Mod.* **1936**, *28*, 85-87.
- (79) Langmuir, I. et Blodgett, K. B.  
*Kolloid-Z.* **1935**, *73*, 258-263.
- (80) Blodgett, K. B. et Langmuir, I.  
*Phys. Rev.* **1937**, *51*, 964-982.
-

- (81) Gaines, G. L., *Insoluble monolayers at liquid-gaz interfaces*. Interscience Publishers: New York, USA, **1966**; pages.
- (82) Corvis, Y. *Auto-assemblage d'une protéine fongique, l'hydrophobine SC3, aux interfaces. Applications à l'élaboration de surfaces catalytiques*. Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France, **2005**.
- (83) Davies, J. T. et Rideal, E. K., *Interfacial Phenomena, 2nd ed.* **1963**; 480 pages.
- (84) Kelvin, L.  
*Philos. Mag.* **1898**, 46, 82-120.
- (85) Taylor, D. M.  
*Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, 87, 183-203.
- (86) Vogel, V. et Moebius, D.  
*J. Colloid Interface Sci.* **1988**, 126, 408-420.
- (87) Vogel, V. et Moebius, D.  
*Thin Solid Films* **1988**, 159, 73-81.
- (88) Hénon, S. et Meunier, J.  
*Rev. Sci. Instrum.* **1991**, 62, 936-939.
- (89) Hénon, S. *Microscopie a l'angle de Brewster : transitions de phases et défauts d'orientation dans des films monomoléculaires*. Université Paris VI, Paris, France, **1993**.
- (90) Hönig, D. et Möbius, D.  
*J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 4590-4592.
- (91) Li, J.; Chen, Z.; Wang, X.; Brezesinski, G. et Mohwald, H.  
*Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 3059-3062.
- (92) <http://www.ksvnima.com>
- (93) Blaudez, D.; Buffeteau, T.; Cornut, J. C.; Desbat, B.; Escafre, N.; Pezolet, M. et Turllet, J. M.  
*Applied Spectroscopy* **1993**, 47, 869-874.
- (94) Blaudez, D.; Buffeteau, T.; Cornut, J. C.; Desbat, B.; Escafre, N.; Pezolet, M. et Turllet, J. M.  
*Thin Solid Films* **1994**, 242, 146-150.
- (95) Blaudez, D.; Turllet, J.-M.; Dufourcq, J.; Bard, D.; Buffeteau, T. et Desbat, B.  
*Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1996**, 92, 525-530.
- (96) Dicko, A.; Bourque, H. et Pezolet, M.  
*Chem. Phys. Lipids* **1998**, 96, 125-139.
- (97) Pinazo, A.; Wen, X.; Liao, Y.-C.; Prosser, A. J. et Franses, E. I.  
*Langmuir* **2002**, 18, 8888-8896.
-

- (98) Cornut, I.; Desbat, B.; Turlet, J. M. et Dufourcq, J.  
*Biophys. J.* **1996**, *70*, 305-312.
- (99) Hubner, W. et Blume, A.  
*Chem. Phys. Lipids* **1998**, *96*, 99-123.
- (100) Casal, H. L.; Mantsch, H. H. et Hauser, H.  
*Biochemistry* **1987**, *26*, 4408-4416.
- (101) Castano, S.; Delord, B.; Février, A.; Lehn, J.-M.; Lehn, P. et Desbat, B.  
*Langmuir* **2008**, *24*, 9598-9606.
- (102) Higuchi, T. et Stella, V., *Pro-Drugs as Novel Drug Delivery Systems*. American Chemical Society: Washington, USA, **1975**; pages.
- (103) Roche, E. B., *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*. American Pharmaceutical Association: Washington, USA, **1977**; pages.
- (104) Baker, D. C.; Haskell, T. H. et Putt, S. R.  
*J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1218-1221.
- (105) Wechter, W. J.; Gish, D. T.; Greig, M. E.; Gray, G. D.; Moxley, T. E.; Kuentzel, S. L.; Gray, L. G.; Gibbons, A. J.; Griffin, R. L. et Neil, G. L.  
*J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 1013-1017.
- (106) Hamamura, E. K.; Prystasz, M.; Verheyden, J. P. H.; Moffatt, J. G.; Yamaguchi, K.; Uchida, N.; Sato, K.; Nomura, A. et Shiratori, O.  
*J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 667-674.
- (107) Hirsch, S. R.; Gains, R.; Rohde, P. D.; Stevens, B. C. et Wing, J. K.  
*Br Med J* **1973**, *1*, 633-637.
- (108) Wiles, D. H. et Gelder, M. G.  
*Br J Clin Pharmacol* **1979**, *8*, 565-570.
- (109) Sasaki, H.; Kakutani, T.; Hashida, M. et Sezaki, H.  
*J. Pharm. Pharmacol.* **1985**, *37*, 461-465.
- (110) Deverre, J. R.; Gulik, A.; Letourneux, Y.; Couvreur, P. et Benoit, J. P.  
*Chem. Phys. Lipids* **1991**, *59*, 75-81.
- (111) Pech, B.; Proust, J. E.; Bouligand, Y. et Benoit, J. P.  
*Pharm. Res.* **1997**, *14*, 37-41.
- (112) Kawakami, S.; Nishida, K.; Mukai, T.; Yamamura, K.; Kobayashi, K.; Sakaeda, T.; Nakamura, J.; Nakashima, M. et Sasaki, H.  
*J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 2113-2120.
- (113) Jin, Y.; Tong, L.; Ai, P.; Li, M. et Hou, X.  
*Int. J. Pharm.* **2006**, *309*, 199-207.
- (114) Jin, Y.; Xin, R.; Ai, P. et Chen, D.
-

- Int. J. Pharm.* **2008**, *350*, 330-337.
- (115) Jin, Y.; Ai, P.; Xin, R.; Tian, Y.; Dong, J.; Chen, D. et Wang, W.  
*Int. J. Pharm.* **2009**, *368*, 207-214.
- (116) Jin, Y.; Xin, R.; Tong, L.; Du, L. et Li, M.  
*Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 867-876.
- (117) Jin, Y.; Xing, L.; Tian, Y.; Li, M.; Gao, C.; Du, L.; Dong, J. et Chen, H.  
*Int. J. Pharm.* **2009**, *381*, 40-48.
- (118) Jin, Y.; Qi, N.; Tong, L. et Chen, D.  
*Int. J. Pharm.* **2010**, *386*, 268-274.
- (119) Gong, X.; Moghaddam, M. J.; Sagnella, S. M.; Conn, C. E.; Danon, S. J.; Waddington, L. J. et Drummond, C. J.  
*Colloids Surf., B* **2011**, *85*, 349-359.
- (120) Lalanne, M.; Andrieux, K.; Paci, A.; Besnard, M.; Re, M.; Bourgaux, C.; Ollivon, M.; Desmaele, D. et Couvreur, P.  
*Int. J. Pharm.* **2007**, *344*, 62-70.
- (121) Ludwig, P. S.; Schwendener, R. A. et Schott, H.  
*Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 494-504.
- (122) Wang, Y.; Xin, D.; Liu, K.; Zhu, M. et Xiang, J.  
*Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2214-2221.
- (123) Shen, Y.; Jin, E.; Zhang, B.; Murphy, C. J.; Sui, M.; Zhao, J.; Wang, J.; Tang, J.; Fan, M.; Van Kirk, E. et Murdoch, W. J.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4259-4265.
- (124) Vemula Praveen, K.; Cruikshank Gregory, A.; Karp Jeffrey, M. et John, G.  
*Biomaterials* **2009**, *30*, 383-393.
- (125) Sansone, F.; Segura, M. et Ungaro, R., Calixarenes in Bioorganic and Biomimetic Chemistry. In *Calixarenes 2001*, Asfari, Z., Ed. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht / Boston / London, 2001; pp 496-512.
- (126) Zadnard, R. et Schrader, T., Amino-Acid, Peptide and Protein Sensing. Calixarenes in Monolayers. In *Calixarenes in the Nanoworld*, Vicens, J.; Harrowfield, J., Eds. Springer: Dordrecht, 2007; pp 287-309.
- (127) Rudkevich, D. M., Self-Assembly in Solution. In *Calixarenes 2001*, Asfari, Z., Ed. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht / Boston / London, 2001; pp 155-180.
- (128) Böhmer, V. et Shivanyuk, A., Calixarenes in Self-Assembly Phenomena. In *Calixarenes In Action*, Mandolini, L.; Ungaro, R., Eds. Imperial College Press: London, 2000; pp 203-240.

- (129) Sliwa, W. et Kozlowski, C., Part III: Supramolecular Calixarene Structures and Related Systems. In *Calixarenes And Resorcinarenes*, Sliwa, W.; Kozlowski, C., Eds. WILEY-VCH: Weinheim, 2009; pp 181-256.
- (130) Lucke, A.; Stirling, C. J. M. et Böhmer, V., Mono- and Multi-Layers. In *Calixarenes 2001*, Asfari, Z., Ed. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht / Boston / London, 2001; pp 612-626.
- (131) Moridi, N.; Elend, D.; Danylyuk, O.; Suwinska, K. et Shahgaldian, P. *Langmuir* **2011**, dx.doi.org/10.1021/la201629a.
- (132) van der Heyden, A.; Regnouf de Vains, J.-B.; Warszynski, P.; Dalbavie, J.-O.; Zywocinski, A. et Rogalska, E. *Langmuir* **2002**, *18*, 8854-8861.
- (133) He, W.; Liu, F.; Ye, Z.; Zhang, Y.; Guo, Z.; Zhu, L.; Zhai, X. et Li, J. *Langmuir* **2001**, *17*, 1143-1149.
- (134) Vollhardt, D.; Gloede, J.; Weidemann, G. et Rudert, R. *Langmuir* **2003**, *19*, 4228-4234.
- (135) Shi, H.-J.; Shi, X.-F.; Yao, T.-M. et Ji, L.-N. *Chin. J. Chem.* **2008**, *26*, 170-174.
- (136) Liu, F.; Lu, G.-Y.; He, W.-J.; Liu, M.-H.; Zhu, L.-G. et Wu, H.-M. *New J. Chem.* **2002**, *26*, 601-606.
- (137) Liu, F.; Lu, G.-y.; He, W.-j.; Liu, M.-h. et Zhu, L.-g. *Thin Solid Films* **2002**, *414*, 72-77.
- (138) Guo, X.; Lu, G.-Y. et Li, Y. *Thin Solid Films* **2004**, *460*, 264-268.
- (139) Dormann, J. M. et Wolf, H.-U.; *Calixarenes for use as excipient for an active substance to enhance drug targeting*. 2003-EP5830 2003105904, 20030604., **2003**.
- (140) Spagnul, A.; Rebiere, F.; Phan, G.; Bouvier-Capely, C. et Fattal, E.; *Cosmetic and pharmaceutical formulations of calixarene molecules*. 2009-EP67416 2010070049, 20091217., **2010**.
- (141) Shahgaldian, P.; Gualbert, J. et Coleman, A. W. *J. Supramol. Chem.* **2003**, *2*, 459-466.
- (142) Shahgaldian, P. et Coleman, A. W. *Langmuir* **2003**, *19*, 5261-5265.
- (143) Fabrega, A.; Madurga, S.; Giralt, E. et Vila, J. *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 40-61.
- (144) Ball, P. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 17-24.
-

- (145) Achari, A. et Neidle, S.  
*Acta Cryst.* **1976**, B32, 600-602.
- (146) Huber, C. P.  
*Acta Cryst.* **1980**, B36, 497-499.
- (147) Dei, L.; Casnati, A.; Lo Nostro, P. et Baglioni, P.  
*Langmuir* **1995**, 11, 1268-1272.
- (148) Davis, F.; O'Toole, L.; Short, R. et Stirling, C. J. M.  
*Langmuir* **1996**, 12, 1892-1894.
- (149) Fezoua-Boubegiten, Z.; Desbat, B.; Brisson, A. et Lecomte, S.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, 1798, 1204-1211.
- (150) Allouche, M.; Castano, S.; Colin, D.; Desbat, B. et Kerfelec, B.  
*Biochemistry* **2007**, 46, 15188-15197.
- (151) Lavoie, H.; Desbat, B.; Vaknin, D. et Salesse, C.  
*Biochemistry* **2002**, 41, 13424-13434.
- (152) Faull, J. D. et Gupta, V. K.  
*Thin Solid Films* **2003**, 440, 129-137.
- (153) Mohammed-Ziegler, I. et Billes, F.  
*J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, 58, 19-42.
- (154) Korchowicz, B.; Orlof, M.; Sautrey, G.; Ben Salem, A.; Korchowicz, J.; Regnouf-de-Vains, J.-B. et Rogalska, E.  
*J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 10427-10435.
- (155) Katsyuba, S.; Chernova, A.; Schmutzler, R. et Grunenberg, J.  
*Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2002**, 67-71.
- (156) Katsyuba, S.; Chernova, A. et Schmutzler, R.  
*Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 714-719.
- (157) Katsyuba, S.; Kovalenko, V.; Chernova, A.; Vandyukova, E.; Zverev, V.; Shagidullin, R.; Antipin, I.; Solovieva, S.; Stoikov, I. et Konovalov, A.  
*Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2558-2565.
- (158) Katsyuba, S. A.; Zvereva, E. E.; Chernova, A. V.; Shagidullin, A. R.; Solovieva, S. E.; Antipin, I. S. et Konovalov, A. I.  
*J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2008**, 60, 281-291.
- (159) Furer, V. L.; Borisoglebskaya, E. I.; Zverev, V. V. et Kovalenko, V. I.  
*Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, 62A, 483-493.
- (160) Furer, V. L.; Borisoglebskaya, E. I. et Kovalenko, V. I.  
*J. Mol. Struct.* **2006**, 825, 38-44.
- (161) Dyck, M.; Kerth, A.; Blume, A. et Loesche, M.
-

- J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 22152-22159.
- (162) Bi, X.; Flach, C. R.; Perez-Gil, J.; Plasencia, I.; Andreu, D.; Oliveira, E. et Mendelsohn, R.  
*Biochemistry* **2002**, *41*, 8385-8395.
- (163) Bakhshiev, N. G.  
*Opt. Spectrosc.* **2006**, *101*, 388-394.
- (164) Wu, W.; Wang, H.-S. et Ozaki, Y.  
*Vib. Spectrosc.* **2009**, *50*, 285-288.
- (165) Smith, R. D. *Stability of Sparingly Soluble Monolayers at the Air-Water Interface*. Washington University, Seattle, USA, **1977**.
- (166) Wang, C.; Micic, M.; Ensor, M.; Daunert, S. et Leblanc, R. M.  
*Langmuir* **2007**, *23*, 7602-7607.
- (167) Capan, I.; Capan, R.; Tanrisever, T. et Can, S.  
*Mater. Lett.* **2005**, *59*, 2468-2471.
- (168) International Conference on Harmonisation (ICH). <http://www.ich.org>
- (169) Bansal, S. et DeStefano, A.  
*AAPS J.* **2007**, *9*, E109.
- (170) DeSilva, B.; Smith, W.; Weiner, R.; Kelley, M.; Smolec, J.; Lee, B.; Khan, M.; Tacey, R.; Hill, H. et Celniker, A.  
*Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1885.
- (171) Turk, E.  
*Chemical & Engineering News* **1998**, *76*, 6.
- (172) In [Online]. <http://www.futura-sciences.com>.
- (173) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. et Wlateral, P., *Molecular Biology of the Cell (4th ed.)*. Garland Science: **2002**; 1616 pages.
- (174) Périgaud, C.; Gosselin, G. et Imbach, J.-L.  
*Nucleosides, nucleotides and nucleic acids* **1992**, *11*, 903-945.
- (175) Hosseini, A.; Taylor, S.; Accorsi, G.; Armaroli, N.; Reed, C. A. et Boyd, P. D. W.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15903-15913.
- (176) Martin, J. C.; McGee, D. P. C.; Jeffrey, G. A.; Hobbs, D. W.; Smee, D. F.; Matthews, T. R. et Verheyden, J. P. H.  
*J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1384-1389.
- (177) Prisbe, E. J.; Martin, J. C.; McGee, D. P. C.; Barker, M. F.; Smee, D. F.; Duke, A. E.; Matthews, T. R. et Verheyden, J. P. H.  
*J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 671-675.
-

- (178) Chmielewski, M. K.; Marchan, V.; Cieslak, J.; Grajkowski, A.; Livengood, V.; Muench, U.; Wilk, A. et Beaucage, S. L.  
*J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10003-10012.
- (179) Saha, A. K.; Rapoport, H. et Schultz, P.  
*J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4856-4859.
- (180) Pirrung, M. C. et Bradley, J.-C.  
*J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1116-1117.
- (181) Gutsche, D. C. et Lin, G. L.  
*Tetrahedron* **1986**, *42*, 1633-1640.
- (182) Georgiev, M. E.; Mague, T. J. et Roundhill, M. D.  
*Supramol. Chem.* **1993**, *2*, 53-60.
- (183) Nam, C. K.; Kim, M. J. et Kim, S. D.  
*Bull. Korean Chem. Soc.* **1995**, *16*, 186-189.
- (184) Nam, C. K.; Ko, W. S. et Kim, M. J.  
*Bull. Korean Chem. Soc.* **1998**, *19*, 345-348.
- (185) Shang, S.; Khasnis, V. D.; Burton, M. J.; Santini, J. C.; Fan, M.; Small, C. A. et Lattman, M.  
*Organometallics* **1994**, *13*, 5157-5159.
- (186) Fan, M.; Zhang, H. et Lattman, M.  
*Organometallics* **1996**, *15*, 5216-5219.
- (187) Izatt, R. M.; Lamb, J. D.; Hawkins, R. T.; Brown, P. R.; Izatt, S. R. et Christensen, J. J.  
*J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1782.
- (188) Izatt, S. R.; Hawkins, R. T.; Christensen, J. J. et Izatt, R. M.  
*J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 63.
- (189) Ho, J.; Al-Deen, F. M. N.; Al-Abboodi, A.; Selomulya, C.; Xiang, S. D.; Plebanski, M. et Forde, G. M.  
*Colloids Surf., B* **2011**, *83*, 83-90.
- (190) Goodwin, A. P.; Lam, S. S. et Frechet, J. M. J.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6994-6995.
- (191) Zhang, L.; Song, L.; Liu, Z.; Li, H.; Lu, Y.; Li, Z. et Ma, S.  
*Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 915-922.
- (192) Utagawa, E.; Sekine, M. et Seio, K.  
*J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7668-7677.
- (193) Kim, D.-K.; Lee, N.; Kim, Y.-W.; Chang, K.; Kim, J.-S.; Im, G.-J.; Choi, W.-S.; Jung, I.; Kim, T.-S.; Hwang, Y.-Y.; Min, D.-S.; Um, K. A.; Cho, Y.-B. et Kim, K. H.  
*J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3435-3441.
-



- (194) Raviolo, M. A.; Williams, P. A. M.; Etcheverry, S. B.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Gualdesi, M. S. et Brinon, M. C.  
*J. Mol. Struct.* **2010**, 970, 59-65.
- (195) Li, S.; Lin, Y.; Cao, J. et Zhang, S.  
*J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4067-4072.
- (196) Pereira, F. S.; Ribeiro de Azevedo, E.; da Silva, E. F.; Bonagamba, T. J.; da Silva Agostini, D. L.; Magalhaes, A.; Job, A. E. et Perez Gonzalez, E. R.  
*Tetrahedron* **2008**, 64, 10097-10106.
- (197) Dubowchik, G. M. et Radia, S.  
*Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5257-5260.
- (198) Garland, P. B. et Serafinowski, P. J.  
*Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 451-459.
- (199) Hancock, R. E. W. et Knowles, D.  
*Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, 1, 493-494.
- (200) Leeb, M.  
*Nature* **2004**, 431, 892-893.
- (201) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). System Report. Data summary from January 1992 through June 2004.; *Am. J. Infect. Control*; **2004**; 32; 470-485.
- (202) Kratzer, C.; Tobudic, S.; Graninger, W.; Buxbaum, A. et Georgopoulos, A.  
*J. Hosp. Infect.* **2006**, 63, 316-322.
- (203) Matsuzaki, K.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1999**, 1462, 1-10.
- (204) Feichtinger, K.; Heather, L. S.; Baker, T. J.; Matthews, K. et Goodman, M.  
*J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8432-8439.
- (205) Feichtinger, K.; Zapf, C.; Sings, H. L. et Goodman, M.  
*J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3804-3805.
- (206) Baker, T. J.; Tomioka, M.; Goodman, M.; Mergott, D. G. et Rroush, W. R.  
*Org. Synth.* **2000**, 78, 91-96.
- (207) bactérie <http://www.microbio.karbonedesign.com>
- (208) cellule <http://www.vi.sualize.us>
- (209) Epand, R. M. et Vogel, H. J.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1999**, 1462, 11-28.
- (210) Godballe, T.; Nilsson, L. L.; Petersen, P. D. et Jensen, H.  
*Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 77, 107-116.
- (211) Shai, Y.
-

- Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1999**, 1462, 55-70.
- (212) Volinsky, R.; Kolusheva, S.; Berman, A. et Jelinek, R.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, 1758, 1393-1407.
- (213) Vaara, M.  
*Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, 9, 571.
- (214) Wu, M. et Hancock, R. E. W.  
*J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 29-35.
- (215) Janout, V.; Jing, B.; Staina, I. V. et Regen, S. L.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4436-4437.
- (216) Sakai, N. et Matile, S.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14348-14356.
- (217) Hauser, S. L.; Johanson, E. W.; Green, H. P. et Smith, P. J.  
*Org. Lett.* **2000**, 2, 3575-3578.
- (218) Schug, K. A. et Lindner, W.  
*Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* **2005**, 105, 67-113.
- (219) Onda, M.; Yoshihara, K.; Koyano, H.; Ariga, K. et Kunitake, T.  
*J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8524-8530.
- (220) Ariga, K. et Kunitake, T.  
*Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 371-378.
- (221) Pantos, A.; Tsogas, I. et Paleos, C. M.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2008**, 1778, 811-823.
- (222) Blume, A.  
*Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1979**, 557, 32-44.
- (223) Mukhopadhyay, P.; Monticelli, L. et Tieleman, D. P.  
*Biophys. J.* **2004**, 86, 1601-1609.
- (224) Watry, M. R.; Tarbuck, T. L. et Richmond, G. L.  
*J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 512-518.
- (225) Phillips, M. C.; Graham, D. E. et Hauser, H.  
*Nature* **1975**, 254, 154-155.
- (226) Blank, M.  
*J. Phys. Chem.* **1962**, 66, 1911-1918.
- (227) Hubner, W.; Mantsch, H. H. et Kates, M.  
*Biochimica et Biophysica Acta* **1991**, 1066, 166-174.
- (228) Lafrance, D.; Marion, D. et Pezolet, M.  
*Biochemistry* **1990**, 29, 4592-4599.
-

- (229) Chem3D<sup>®</sup> Ultra, CambridgeSoft Corporation: 2003. Les structures ont été optimisées dans le vide par minimisation de l'énergie potentiel de surface (puit de potentiel local), selon un calcul de champ de force MM2 avec un gradient RMS minimum de 0,010. Par conséquent, les résultats sont totalement dépendants de la structure initialement dessinée.
- (230) Binder, H.; Kohler, G.; Arnold, K. et Zschornig, O.  
*Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, 2, 4615-4623.
- (231) Adams, J. M. et Small, R. W. H.  
*Acta Crystallographica, Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1976**, B32, 832-835.
- (232) Li, S.; Su, Y.; Luo, W. et Hong, M.  
*J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 4063-4069.
- (233) Tang, M.; Waring, A. J. et Hong, M.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11438-11446.
- (234) Pohle, W.; Gauger, D. R.; Fritzsche, H.; Rattay, B.; Selle, C.; Binder, H. et Böhlig, H.  
*J. Mol. Struct.* **2001**, 563-564, 463-467.

## **Publications scientifiques**

*The Mechanism of Metal Cation Binding in Two Nalidixate Calixarene Conjugates. A Langmuir Film and Molecular Modeling Study.* Korchowiec, Beata; Orlof, Monika.; **Sautrey, Guillaume**; Ben Salem, Adel; Korchowiec, Jacek; Regnouf de Vains, Jean-Bernard; Rogalska, Ewa. *Journal of Physical Chemistry B* (2010), *114*, 10427-10435.

*Organosoluble Calixarene-based quinolone carriers. Syntheses, evaluation and model hydrolytic studies at the air-water interface.* **Sautrey, Guillaume**; Clarot, Igor; Ben Salem, Adel; Rogalska, Ewa; Regnouf de Vains, Jean-Bernard. *Accepted à New Journal of Chemistry*, DOI:10.1039/C1NJ20636B (IF 2010 2.631).

*Membrane activity of tetra-para-guanidinoethylcalix[4]arene as a possible reason for its antibacterial properties.* **Sautrey, Guillaume**; Orlof, Monika; Korchowiec, Beata; Regnouf de Vains, Jean-Bernard; Rogalska, Ewa. *Journal of Physical Chemistry B* (2011), *115*, 15002-15012.

*Molecular drug-organiser: Synthesis, characterization and biological evaluation of penicillin V and/or nalidixic acid calixarene-based podands.* Ben Salem, Adel; **Sautrey, Guillaume**; Fontanay, Stéphane; Duval, Raphaël; Regnouf de Vains, Jean-Bernard. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2011), *19*, 7534-7540.

## **Communications**

- ✓ 4<sup>th</sup> International Workshop on Vibrational Spectroscopy of Thin Films. 03-05 juin 2009, Postdam (Allemagne). Présentation d'un poster en langue anglaise.
- ✓ Congrès de la Société Française de Chimie Grand-Est 6. 20-21 mai 2010 SFC, Strasbourg (France). Présentation orale en langue française. Présentation d'un poster en langue anglaise.
- ✓ Journée de l'Ecole Doctorale SESAMES. Octobre 2010, Metz (France). Présentation orale en langue anglaise.

## **Formations complémentaires**

Rédaction d'articles scientifiques en langue anglaise (une journée). Initiation au management (20 h). Initiation à la comptabilité (20 h)

**Mots clés :** Calixarènes, Couches de Langmuir-Blodgett, Promédicaments, Phospholipides, Antiinfectieux, Modèles de Membrane, Films de Langmuir, PM-IRRAS.

**Résumé :** Le travail suivant est consacré d'une part à l'emploi du calix[4]arène comme une plate-forme organisatrice de principes actifs pour la conception de nouvelles prodrogues. Ce concept a été développé avec des substances antibactériennes ou antivirales, choisies comme modèles. Les conjugués calixarène – anti-infectieux ainsi synthétisés sont amphiphiles et insolubles dans l'eau. Leur comportement interfacial a été étudié *via* l'interface eau-air, mima d'une interface hydrophile-hydrophobe physiologique, à l'aide de la technique des films monomoléculaires de Langmuir. Nos résultats indiquent que ces prodrogues étalées à l'interface eau-air peuvent libérer leurs principes actifs dans la sous-phase. La méthodologie développée pour ces études de réactivité interfaciale pourrait à l'avenir être appliquée à d'autres prodrogues à base de calix[4]arène.

Un second projet a concerné le trifluoroacétate de tétra-*p*-(guanidinoéthyl)-calix[4]arène (CX1). Ce composé présente des propriétés antibactériennes à large spectre, couplées à une faible toxicité cellulaire. Nos travaux ont visé à mieux comprendre son mode d'action, lié à une perturbation des parois bactériennes, par une approche physico-chimique. La technique de Langmuir a donc été employée afin d'étudier les interactions entre le CX1 et des films monomoléculaires de phospholipides étalés à l'interface eau-air, utilisés comme modèles de membrane bactérienne. Nos résultats nous ont permis de proposer un mode d'organisation des membranes bactériennes sous l'influence du CX1. Nous avons ainsi apporté des précisions sur son mécanisme d'action qui pourraient être utiles dans le développement de nouveaux calixarènes antibactériens.