



Calixarènes et composés apparentés à propriétés anti-infectieuses

Hugues Massimba Dibama

► To cite this version:

Hugues Massimba Dibama. Calixarènes et composés apparentés à propriétés anti-infectieuses. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10123 . tel-01746352

HAL Id: tel-01746352

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746352v1>

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R.S.T.M.P.

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 1

en Chimie et Physico-chimie Moléculaires

par **MASSIMBA DIBAMA Hugues**

CALIXARENES ET COMPOSES APPARENTES A PROPRIETES ANTI-INFECTIEUSES

Soutenance le 15 Novembre 2010

Membres du jury :

Rapporteurs :

Pr. Hélène PARROT-LOPEZ, Université Claude Bernard, Lyon I

Dr. Catherine JEUNESSE, Université de Strasbourg

Examineurs :

Dr Philippe C. GROS, Université Henri Poincaré, Nancy I (Membre invité)

Dr. Maxime MOURER, Université Henri Poincaré, Nancy I (Membre invité)

Pr. Jean-Bernard REGNOUF de VAINS, Université Henri Poincaré, Nancy I (Directeur de thèse)

Dr. Igor CLAROT, Université Henri Poincaré, Nancy I (co-directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de GEVSM (Groupe d'Etude du Vecteur Supramoléculaire du Médicament), UMR 7565 Nancy Université-CNRS, à la Faculté de Pharmacie de Nancy, sous la co-direction du Professeur Jean-Bernard Regnouf de Vains et du Docteur Igor Clarot.

Avant de présenter les travaux qui ont conduit à ce mémoire, je voudrais remercier celles et ceux qui en ont, d'une manière ou d'une autre, permis la réalisation.

A Madame Hélène Parrot-Lopez, Professeur de Chimie à l'Université Claude Bernard Lyon 1, et à Madame Catherine Jeunesse, HDR Maître de conférences à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg votre présence et votre participation à ce jury en tant que rapporteur sont pour moi un immense honneur. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus sincère gratitude et mon profond respect.

A Monsieur Philippe C. Gros, Directeur de recherche CNRS au groupe SOR-UMR 7565 à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, je suis très sensible à l'honneur que vous me faite en acceptant de juger ce travail. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et l'assurance de mon profond respect.

Au professeur Jean-Bernard Regnouf de Vains, je tiens à vous témoigner ma gratitude et mes plus sincères remerciements car vous m'avez accueilli dans l'équipe GEVSM, confié ce travail. Vous avez été toujours disponible dans mes moments de doutes scientifiques et humains. Merci pour vos conseils permanent et judicieux qui ont permis la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également à Igor Clarot, Maître de conférences des Universités, à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, au Laboratoire du GEVSM qui m'a co-encadré dans le volet chimie analytique de ce travail. Merci, pour ta disponibilité, tes conseils, ton soutien et ta bonne humeur.

A Maxime Mourer, Maître de conférences des Universités, à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, au Laboratoire du GEVSM, j'adresse mes sincères remerciements pour ta participation à ce jury et parce que, tes précédents travaux de thèse ont été une base de travail indispensable pour ce travail. Merci pour les discussions scientifiques, ta disponibilité, ton soutien et ta bonne humeur.

Je tiens à remercier le Professeur Alain Marsura pour m'avoir accueilli dans l'équipe en tant qu'encadrant lors de mon stage de Maîtrise. Merci également pour les enseignements et les encouragements que vous m'avez prodigué.

J'adresse mes remerciements au Professeur Chantal Finance pour avoir permis aux études de bactériologie de se réaliser, ainsi qu'à Raphaël E. Duval, Maître de conférences des Universités, à l'Université Henri Poincaré Nancy 1, au Laboratoire de Microbiologie Moléculaire du GEVSM. Merci pour ta contribution scientifique très enrichissante et ton soutien dans l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier les collaborateurs qui ont permis l'obtention des résultats des études microbiologiques :

A Stéphane Fontanay (doctorant, techniciens), ta gentillesse, ta disponibilité ainsi que tes compétences m'ont été d'un grand secours. Merci pour la réalisation des études biologiques ainsi que les discussions scientifiques échangées afin d'interpréter les résultats obtenus.

A Madame Francine Kedzierewicz, Marion Grare, Chloé Geller, Catherine Colson, Barbara Proust, sans oublier tous les stagiaires, veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements au Pr Isabelle Lartaud (Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire Faculté de Pharmacie de Nancy) pour nous avoir fourni les plasmas de rat.

Je tiens à exprimer des remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont accompagné durant ces années au sein du Laboratoire de chimie Florence Dumarçay, Stéphane Manuel, Michel Boisbrun, Ngan Tran, Yannick de Gaétano, Guillaume Poisson, Guillaume Sautrey, ainsi que les stagiaires : Jessica, Anaïs, Antonio et Laia.

Un immense merci à Eric Dubs pour ta disponibilité et l'ensemble du travail quotidien au laboratoire et à Brigitte Bonnin, merci également pour ton travail au laboratoire, ta gentillesse, ta bonne humeur qui m'a toujours permis d'aller vers l'avant.

A mes amis externe au Laboratoire, je remercie tout particulièrement Madame Christine Perdikakis, Thierry Omouessi, Louis Marie Ondzaga, Nestor Yala et Gildas Kollo, Roland Tchimina, Amégé Koku .

J'adresse une fois de plus ma gratitude à J-B Regnouf de Vains et sa famille (Valérie, Léa et Alice) pour l'accueil, la gentillesse que vous avez toujours exprimé à mon égard.

A Pierrot, Mariama, Nanou, Carlos et Mive merci également pour votre soutien.

Je remercie mes proches, particulièrement mes parents qui m'ont toujours soutenu même dans les moments difficiles.

«Lorsque tu ne sais pas où tu vas, regarde d'où tu viens»

Proverbe Africain

Introduction Générale	1
Chapitre I : Etude Bibliographique	15
I.1. Généralités	
I.1.1. Définitions	16
I.1.2. Historique	17
I.1.3. Nomenclature et représentation	19
I.1.3.1. Une conformation variable	20
I.1.4. Voies d'accès aux calixarènes	20
I.1.4.1. Synthèse en une étape : "one-step"	21
I.1.4.2. Synthèse "multi-step"	21
I.1.5. Formation des calix[4]arènes	23
I.1.6. Fonctionnalisation des calix[4]arènes	27
I.1.6.1. Fonctionnalisation des positions <i>para</i> des noyaux aromatiques	28
I.1.6.2. Fonctionnalisation des groupements hydroxyles des calix[4]arènes	28
I.1.6.2.1. Monosubstitution sur la partie basse du calix[4]arènes	29
I.1.6.2.2. Disubstitution -1,3 et 1,2	31
I.1.6.2.3. Trisubstitution	33
I.1.6.2.1. Tétrasubstitution	34
I.1.7. Le calix[4]arène en RMN ¹ H et ¹³ C	34
I.1.7.1. Détermination de la conformation par RMN ¹ H	35
I.1.7.2. Détermination de la conformation par RMN ¹³ C	36
I.1.8. Purification des calixarènes	37
I.2. Calixarènes hydrosolubles	38
I.2.1. Calix[4]arènes sulfonés	39
I.2.2. Calix[4]arènes carboxylés	40
I.2.2.1. Carboxylation sur la couronne haute	41
I.2.2.2. Carboxylation sur la couronne basse	43
I.2.3. Calix[4]arènes phosphonés	44
I.2.3.1. Phosphonation de la partie haute du calix[4]arène	45
I.2.3.2. Phosphorytion de la partie basse du calix[4]arène	46
I.2.4. Amination hydrosolubilisante	47

I.2.4.1. Amination sur la couronne haute	47
I.2.4.2. Amination sur la couronne basse	49
I.3. Calixarènes avec hétérocycles azotés	49
I. 3.1. Les calix[4]arènes pyridylés et bipyridylés	50
I.4. Des calixarènes à la biologie	55
I. 4.1. Activités antibactériennes	55
I. 4.2. Activités antivirales	65
I. 4.3. Calixarènes organisateur de principes actifs	67
I.4.4. Activité de transporteurs membranaire	69
I.4.5. Inhibiteurs d'enzymes	71
 Chapitre II : Calixarènes Guanidiniums	 85
II.1. Introduction	86
II.2. Rappel sur la stratégie de synthèse du <i>para</i> -guanidinoéthyl-Calix[4]arène (CX1)	87
II.2.1. Synthèse du tétra- <i>para</i> -(<i>boc</i> -aminoéthyl)calix[4]arène 8	87
II.2.2. Synthèse du <i>para</i> -(guanidinoéthyl-Calix[4]arène (CX1)	90
II.3. Dérivés de CX1 avec <i>n</i> groupes <i>tert</i> -butyles en <i>para</i>	93
II.3.1. Synthèse des dérivés (<i>tert</i> -butyl) _{<i>n</i>} (diméthylaminométhyl) _{4-<i>n</i>} – <i>n</i> = 2,3.	94
II.3.2. Synthèse du composé 5,11,17-tris- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-23-mono-(diméthylaminométhyl)-calix-[4]arène (17) et du 5,17-bis- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-11,23-bis-(diméthylaminométhyl)-calix[4]arène 19	94
II.3.3. Synthèse des composés 5,11,17-tris- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-23-mono-(cyanométhyl)-calix-[4]arène 20 et du 5,17-bis- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-11,23-bis-(cyanométhyl)-calix-[4]arène 21	95
II.3.4. Synthèse des chlorhydrates du 5,11,17-tris- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-23-mono-(aminoéthyl)-calix-[4]arène 22 et du 5,17-bis- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-11,23-bis-(aminoéthyl)-calix-[4]arène 23	96
II.3.5. Synthèse des dérivés Boc du 5,11,17-tris- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-23-mono-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène 24 et du 5,17-bis- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-11,23-bis-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène 25	97

II.3.6. Synthèse des sels du 5,11,17-tris- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-23-mono- (guanidinoéthyl)-calix-[4]arène 26 et du 5,17-bis- <i>para</i> -(<i>tert</i> -butyl)-11,23-bis-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène 27	98
II.3.6.1. Analyses des composés 26 et 27	98
II.4. Dérivés de CX1 sans groupes <i>para-tert</i> -butyles	104
II.4.1. Stratégie de synthèse	104
II.4.2. Synthèse des dérivés <i>para</i> -(diméthylaminométhyl)calix[4]arènes 28 , 33 et 34	105
II.4.3. Synthèse des dérivés <i>para</i> -(cyanométhyl)calix[4]arènes 29 , 35 et 39	106
II.4.4. Réduction des fonctions nitriles des mono-, bis-, et tétra-(cyanométhyl)calix[4]arènes 29 , 35 et 39	107
II.4.5. Synthèse des dérivés Boc du mono- <i>para</i> -(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène, du 5,17-bis- <i>para</i> -(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène et du 5,11,17-tris- <i>para</i> -(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène	108
II.4.6. Synthèse des trifluoroacétates du mono- <i>para</i> -(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène, du 5,17-bis- <i>para</i> -(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène et du 5,11,17-tris- <i>para</i> -(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène	112
II.4.6.1. Analyses des (guanidinoéthyl)calixarènes 32 , 38 , et 42	112
II.4.7. Conclusion	116
II.5. Nouveaux calix[4]arènes hydrosolubles bis-substitués sur la partie basse et leurs analogues monomériques	117
II.5.1. Nouveaux calix[4]arènes hydrosolubles bis-substitués sur la partie basse	117
II.5.2. Protection des fonctions amines du calix[4]arène 7	119
II.5.3. Fonctionnalisation sur la partie basse du composé 8	119
II.5.4. Déprotection des fonctions amines des composés 43 et 44	121
II.5.4.1. Analyse du composé 45	122
II.5.5. Création des fonctions guanidines	124
II.5.6. Déprotection des fonctions guanidines du composé 46	125
II.5.6.1. Analyse du composé 47	126
II.6. Synthèse des analogues monomériques	128
II.6.1. Voie d'accès aux dérivés monomères	129
II.6.2. Protection de la tyramine	129
II.6.3. Greffage des entités bi-pyridine 49 et bi-phényle 50	130
II.6.4. Déprotection des fonctions amines de 49 et 50	130
II.6.4.1. Analyse de l'ammonium 51	131

II.6.5. Création de la fonction guanidine	132
II.6.6. Déprotection du composé 52	132
II.6.6.1. Analyse du trifluoroacétate de guanidinium 53	132
II.7. Conclusion	134

Chapitre III : Nouveaux prodrogues hydrosolubles à base calixarénique et porteurs de quinolone 139

III.1. Introduction	140
III.2. Synthèse et caractérisation de calix[4]arènes hydrosolubles porteurs de quinolones <i>via</i> une liaison ester hydrolysable	143
III.2.1. Stratégie de synthèse (Schéma)	143
III.3. Création de fonctions hydrosolubilisantes sur la partie haute du calix[4]-arène	144
III.4. Incorporation du nalidixate sur la partie basse	144
III.4.1. Synthèse du bromo-propyl nalidixate 55	144
III.4.2. Greffage du bromopropyl-nalidixate sur le <i>tétra</i> -(<i>boc</i> -aminoéthyle)calix[4]arène 8 .	145
III.4.2.1. Problèmes rencontrés lors du greffage	147
III.4.2.2. Evaluation des structures - Analyses de 56 et 57	148
III.4.3. Déprotection des composés 56 et 57	151
III.4.3.1. Analyses des composés 58 et 59	152
III.4.4. Synthèse des analogues alcools	156
III.4.4.1. Synthèse du podant calixarénique hydrosoluble mono-propyl alcool 65	157
III.4.4.1.2. Analyse des composés 64 et 65	158
III.4.4.2. Tentative de synthèse de l'analogue bis-alcool 67	162
III.5. Vers une autre voie d'hydrosolubilisation des prodrogues calixaréniques mono et bis nalidixate.	163

III.6. Evaluation du caractère prodrogue des composés 58 et 59 par CLHP phase Inverse	165
III.6.1. Objectif de l'évaluation	165
III.6.2. Matériels et méthode	166
III.6.2.1. Matériels	166
III.6.2.2. Développement de la Méthode	167
III.6.3. Validation de la méthode	170
III.6.3.1. Conclusion sur la validation de la méthode	174
III.6.4. Evaluation de la qualité des prodrogues synthétisés par CLHP	175
III.6.5. Evaluation du concept prodrogue	175
III.6.5.1. Influence du pH	175
III.6.5.2. Evaluation du concept en matrices biologiques	177
III.6.5.2.1. Hydrolyse du mono- et du bis-nalidixate (58 et 59) dans le plasma de rat	178
III.6.5.3. Conclusion générale	181

Chapitre IV : Evolution du Concept vers des poly-Guanidiniums

Etoilés	185
IV.1. Introduction	186
IV.2. Synthèse du trifluoroacétate d' α -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]toluène 71	188
IV.2.1. Analyse des composés 68 , 69 , 70 et 71	189
IV.3. Synthèse des bis- $[\alpha, \alpha'$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes 75 et 79	191
IV.3.1. Synthèse des composés bis- $[\alpha, \alpha'$ -[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » 72 et « méta » 76	192
IV.3.2. Synthèse des bis- $[\alpha, \alpha'$ -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » 74 et « méta » 75	193
IV.3.3. Synthèse des bis- $[\alpha, \alpha'$ -[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » 74 et « méta » 78	194
IV.3.4. Déprotection des fonctions guanidines des composés 74 et 78 – Synthèse des bis-guanidiniums « ortho » 75 et « méta » 79	195
IV.3.4.1. Analyse des composés 75 et 79	196
IV.4. Synthèse du composé tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène 83	199
IV.4.1. Synthèse du 1,3,5-tris(bromométhyl)benzène (e)	199
IV.4.2. Synthèse du composé tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy]mésitylène 80	201

IV.4.2.1. Analyses du composé 80	200
IV.4.3. Synthèse du trifluoroacétate de tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]mésitylène 81	202
IV.4.4. Synthèse du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène 82	204
IV.4.4.1. Analyses	204
IV.4.5. Synthèse du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène 83	207
IV.4.5.1. Analyses du composé 83	207
IV.5. Synthèse du 1,2,4,5-tétrakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxyméthyl]-benzène 87 et de l'hexakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxyméthyl]-benzène 91	210
IV.5.1. Stratégie de synthèse	210
IV.5.2. Analyses des composés 87 et 91	217
IV.6. Conclusion et perspectives	220

Chapitre V : Evaluations Biologiques **221**

V.1. Cibles d'action de molécules antibactériennes	222
V.2. Généralités sur les structures constantes, vitales des bactéries	224
V.2.1. La paroi bactérienne	224
V.2.1.1. Paroi des Gram positif	225
V.2.1.1.1. Acides teichoïques (Gram +)	225
V.2.1.1.2. Le peptidoglycane	226
V.2.1.2. Paroi des Gram négatif	227
V.2.1.2.1. Membrane externe	228
V.2.2. Le cytoplasme	229
V.3. Les antibiotiques	230
V.4. Matériels et méthodes	231
V.4.1. Souches bactériennes utilisés	232
V.4.2. Détermination des CMI	232
V.4.3. Impact sur la viabilité / cytotoxicité	233
V.5. Les Résultats	233
v.5.1. Les (n)-para-(guanidinoéthyl)calix[4]arènes	233

V.5.2. Propriétés antibactériennes des prodrogues hydrosolubles	241
V.6. Evaluation des propriétés antibactériennes des guanidiniums étoilés	245
V.7. Bilan global sur les activités antibactériennes des nouvelles structures développées dans ce travail et des composés initiaux	247
Conclusion générale	251
Partie expérimentale	255

Liste des Figures et Tableaux

Introduction

Fig. 1 : Calixarènes potentiellement bio-actifs.....	4
Fig. 2 : Organisations structurales de la paroi des bactéries à Gram positif et négatif.....	5
Fig. 3 : Hypothèse II, organisation des cyclo-oligomères cationiques chargés vis-à-vis de la paroi bactérienne.....	5
Fig. 4 : Représentation du CX1/A , des CX1-bis-hétérocycles (B , C) et leurs équivalents monomériques D , E et F	7
Fig. 5 : CX1 et composés apparentés 27 , 26 , 32 , 38 , 42 et 47	9
Fig. 6 : Hydrolyse envisagée du prodrogue calixarénique.....	11

Chap. I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Généralité

Fig. 1 : Structure de base des calixarènes.....	16
Fig. 2 : Exemples de macrocycles.....	17
Fig. 3 : Polymère formo-phénolique entrecroisé.....	18
Fig. 4 : Polymère formo-phénolique linéaire.....	18
Fig. 5 : Différentes représentations du calix[4]arène.....	19
Fig. 6 : Numérotation des calixarènes a) calix[4]arène, b) calix[5]arène.....	19
Fig. 7 : Différentes conformations limites du calix[4]arène.....	20
Fig. 8 : Synthèse “one-step” du tétra-para-tert-butylcalix[4]arène... ..	21
Fig. 9 : Synthèse “multi-step” de calix[4]arènes selon Hayes et Hunter.....	22
Fig. 10 : Synthèse convergente de calix[4]arènes «3+1».....	22
Fig. 11 : Synthèse convergente de calix[4]arènes «2+2».....	23
Fig. 12 : Condensation phénol-formaldéhyde.....	23

Fig. 13 : Formation du diarylméthane.....	24
Fig. 14 : Formation de l'éther diarylique.....	24
Fig. 15 : Formation des oligomères linéaires.....	25
Fig. 16 : Cyclisation d'un oligomère linéaire.....	26
Fig. 17 : Cyclisation de deux dimères.....	26
Fig. 18 : Transformation du calix[8]arène par mitose moléculaire.....	27
Fig. 19 : Sites fonctionnalisables sur un calixarènes.....	27
Fig. 20 : Premières et principales voies de substitutions des calix[4]arènes.....	29
Tableau 1 : Résumé des voies de synthèse du calix[4]arène mono-fonctionalisé par monoalkylation sélective.....	31
Fig. 21 : Hypothèse de mécanisme réactionnel de la bis-1,3-O-alkylation du p-tert-butylcalix[4]arène.....	32
Fig. 22 : Hypothèse de mécanisme réactionnel de la tri-O-alkylation du calix[4]arène par le bithiazole.....	33
Fig. 23 : « Communication » des H des ArCH ₂ Ar dans la conformation cône en RMN ¹ H.....	35
Fig. 24 : « Communication » des H des ArCH ₂ Ar dans la conformation «1-3 alternée» en RMN ¹ H.....	36
Fig. 25 : « Communication » des H des ArCH ₂ Ar dans les conformations cône partiel et 1-2 alternée en RMN ¹ H.....	36
Tableau 2 : Influence de la conformation du calix[4]arène sur les déplacements chimiques en RMN ¹³ C.....	37

2. Calixarenes hydrosolubles

Fig. 26 : Les premiers calixarènes hydrosolubles.....	38
Fig. 27 : Fonctionnalisation hydrosolubilisantes des calixarènes via apport de charges.....	39
Fig. 28 : Voies de synthèse des dérivés sulfonés.....	39
Fig. 29 : Sites de carboxylation des calixarènes.....	40
Fig. 30 : Voies de carboxylation sur la couronne supérieure.....	41
Fig. 31 : Substitution nucléophile d'un p-chlorométhyl-calixarène.....	42
Fig. 32 : Voies de carboxylation sur la couronne inférieure.....	43

Fig. 33 : Synthèse de calix[4]arène mixte : carboxylé-sulfoné.....	44
Fig. 34 : Phosphorylation et phosphonation du calix[4]arène.....	44
Fig. 35 : Phosphonation par la triéthyl phosphite.....	45
Fig. 36 : Phosphonation via un p-halogéno-calix[n]arène.....	45
Fig. 37 : Voie de phosphonation la plus récente.....	46
Fig. 38 : Phosphorylation en couronne basse.....	46
Fig. 39 : Phosphonation en couronne basse.....	47
Fig. 40 : Synthèse de calixarènes aminés en couronne haute.....	48
Fig. 41 : Amination via la nitration.....	48
Fig. 42 : Amination à l'aide d'un azo-calixarène.....	49

3. Calixarenes avec heterocycles azotes

Fig. 43 : Exemples d'hétérocycles greffables sur les calixarènes.....	50
Fig. 44 : Calix[4]arène étherifié par des picolines.....	50
Fig. 45 : Synthèse du 1,3-Bis(bipyridyl)-méthylèneoxy-calix[4]arène.....	51
Fig. 46 : Complexe de Cuivre(I) à structure tétraédrique.....	51
Fig. 47 : Modulation du greffage en fonction de la force des bases.....	52
Fig. 48 : Quelques calix[4]arènes bipyridylés hydrosolubles.....	54

4. Des calixarenes a la biologie

Fig. 49 : Le Macrocyclon, calix[8]arène antituberculeux et le HOC-60.....	55
Fig. 50 : Différentes structures peptido-calixaréniques étudiée en tant que mimes de la vancomycine.....	56
Tableau 3 : CMI (mg/L) des peptido-calixarènes testés et de la vancomycine sur certains germes à Gram +.....	57
Fig. 51 : Structures de différentes molécules testées.....	58
Tableau 4 : CMI (mg/L) vis-à-vis des souches de références ATCC et d'isolats cliniques (présentant diverses résistances aux antibiotiques) du CX1, D, G, H et la chlorhexidine.....	60
Fig. 52 : Antibiotiques pour lesquels les isolats cliniques présentent des résis-	

tances.....	61
Tableau 5 : IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) déterminées par tests de viabilité au MMT sur les composés H, G, D et CX1	62
Fig. 53 : Calix[4]arènes bis-hétérocycliques B, C et leurs analogues mono-mériques E, F	63
Tableau 6 : CMI (mg/L) vis-à-vis des souches de références ATCC, de (B, E), (C, F) comparé au CX1, D, G et H	63
Tableau 7 : IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) déterminées par tests de viabilité au MMT sur B, E, C, F, D et CX1	64
Tableau 8 : Index de sélectivité sur les MRC-5 pour B, E, C, F, D et CX1	64
Fig. 54 : Calixarènes potentiellement antibactériens.....	65
Fig. 55 : Calix-pyrogallols à activité anti-VIH.....	66
Fig. 56 : Aminoadamantyl-calixarène.....	66
Fig. 57 : Calixarènes sulfoné et bithiazolé sulfoné.....	67
Fig. 58 : Podants calixaréniques poly- β -lactames, poly-quinolones, et mixtes.....	69
Fig. 59 : Calix[n]arènes transporteurs de cations au travers de membranes phospholipidiques.....	70
Fig. 60 : Deux calixarènes inhibiteurs des canaux VRAC, responsables du passage voltage-dépendant des ions chlorures au travers de la membrane cellulaire.....	70

Chap. II : CALIXARENES GUANIDINIUMS

Fig. 1 : Synthèse du tétra-para(boc-aminoéthyl)calix[4]arène 8	87
Fig. 2 : Proposition de mécanisme pour la réaction de Mannich.....	88
Fig. 3 : Réaction de nitrilation via la voie dite des "quinones méthide".....	88
Fig. 4 : Synthèse de la para-guanidinoéthylcalix[4]arène.....	90
Fig. 5 : Création de la fonction guanidine sur le calix[4]arène selon la méthode N°1.....	91
Fig. 6 : Greffage de la fonction guanidines sur le calix[4]arène selon la méthode N°2.....	92
Fig. 7 : Création de fonctions guanidines selon la méthode N°3.....	92

Fig. 8 : Synthèse du N, N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamidine 15	93
Fig. 9 : Incorporation d'une fonction diméthylaminométhyle sur le tris-(p-tert-butyl)calix[4]arène 16	94
Fig. 10 : Incorporation de deux fonctions diméthylaminométhyle sur le bis-(p-tert-butyl)calix[4]arène 18	95
Fig. 11 : Synthèse des dérivés mono- et bis-nitriles 20 et 21	96
Fig. 12 : Réduction des dérivés mono- et bis-(cyanométhyl)-calix[4]arènes 20 et 21	97
 Fig. 13 : Première étape de la synthèse des calix[4]arènes « mixte –para-tert- butyl / para-guanidinoéthyl ».....	97
Fig. 14 : Déprotection en milieu acide des composés 24 et 25	98
Fig. 15 : Représentation schématique du tris-para-(tert-butyl)-mono-guanidinoéthyl-calix[4]arène 26	99
Fig. 16 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆ , TA) du composé 26	100
Fig. 17 : Spectre ¹³ C (100 MHz, DMSO-D ₆) du composé 26	101
Fig. 18 : Représentation schématique du composé 27	101
Fig. 19 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, TA) du composé 27	102
Fig. 20 : Spectre RMN ¹³ C (100 MHz, TA) du composé 27	103
Tableau 1 : Valeurs des analyses élémentaires des composés 26 , 27	103
Fig. 21 : Stratégie de synthèse des composés 32 , 38 et 42	104
Fig. 22 : Synthèse des composés 33 et 34	106
Fig. 23 : Spectres RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , TA) des composés 29 , 35 et 39	108
Fig. 24 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆ , TA) de 30	108
Fig. 25 : Synthèse des [di(Boc)-guanidinoéthyl]calixarènes 31 , 37 et 41	109
Fig. 26 : RMN ¹ H comparative des calixarènes mono-di(Boc)-guanidinoéthylé 31 , bis-(di(Boc)-guanidinoéthylé 37 et tris-di(Boc)-guanidinoéthylé, 41	109
Fig. 27 : RMN ¹ H comparative de la partie aromatique des composés 31 , 37 et 41	110
Fig. 28 : RMN ¹³ C du dérivé bis-(di(Boc)-guanidinoéthyl)calix[4]arène 37	111
Fig. 29 : Seconde voie d'obtention du composé 41	111

Fig. 30 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) des composés 32 (a), 38 (b) et 42 (c)...	113
Fig. 31 : RMN ^{13}C des dérivés calixaréniques 32 et 38	114
Fig. 32 : RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TA) du dérivé tris-(di(Boc)- guanidinoéthyl) calix[4]arène 42	115
Tableau 2 : Analyses élémentaires de 32 , 38 et 42	115
Fig. 33 : Spectre de masse du composé 42 en électrospray mode positif.....	116
Fig. 34 : Stratégie de synthèse des composés bipyridyle 47 et biphényle 44 calix[4]arène.....	118
Fig. 35 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) des composés 43 et 42	120
Fig. 36 : Hypothèse de dégradation de dérivés 4-phényl-benzylether aromatiques en milieu acide.....	122
Fig. 37 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) du composé 45	123
Fig. 38 : Spectre électrospray mode positif du composé 45	124
Fig. 39 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) du composé 46	125
Fig. 40 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) du composé 47	126
Fig. 41 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, APT, $\text{DMSO}-\text{D}_6$, TA) du composé 47	127
Fig. 42 : Spectre de masse électrospray mode positif du composé 47	128
Fig. 43 : Stratégie de synthèse des monomères bipyridiné et biphénylé.....	129
Fig. 44 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA), de 49 et 50	130
Fig. 45 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA), de 49 et 50	131
Fig. 46 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) de 53	133
Fig. 47 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) de 53	133

Chap. III : NOUVEAUX PRODRUGES HYDROSOLUBLES A BASE CALIXARENIQUES ET PORTEUR DE QUINOLONE

Fig. 1 : Podants calixaréniques poly- β -lactames, poly-quinolones, et mixtes.....	140
Fig. 2 : Synthèse et hydrolyse <i>in vivo</i> d'une prodrogue.....	141
Fig. 3 : Représentation schématique de prodrogue hydrosoluble à base calixarénique (exemple pour deux principes actifs incorporés).....	142
Fig. 4 : Stratégie de synthèse des prodrogues hydrosolubles.....	143
Fig. 5 : Synthèse du sel de sodium de l'acide nalidixique 54	144

Fig. 6 : Synthèse du bromo-propyl ester de quinolones.....	145
Fig. 7 : Modèle de calixarène-prodrogue hydrosoluble.....	145
Fig. 8 : Synthèse des composés 56 et 57	146
Tableau 1 : Stœchiométries employés et rendements obtenus pour 1 équivalent de calixarène ainsi que les podants 56 et 57	146
Fig. 9 : Réaction de trans-estérification sur 56	147
Fig. 10 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) du composé 56	149
Fig. 11 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) du composé 57	150
Tableau 2 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C des ArCH_2Ar des podants 56 et 57	150
Fig. 12 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TA) des composé 56 et 57	151
Fig. 13 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) des composés a) 58 et b) 59	154
Fig. 14 : Représentation schématique des mono- et bis-nalidixate 58 et 59	154
Fig. 15 : Spectre RMN ^1H (100 MHz, D_2O , TA) du composé 59	155
Fig. 16 : Spectres de masse en électrospray mode positif de 58 et 59	156
Fig. 17 : Hypothèse d'hydrolyse du prodrogue 58	157
Fig. 18 : Synthèse du composé 65	158
Tableau 3 : Analyses élémentaires des composés 64 et 65	158
Fig. 19 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) de 64 et 65 dans respectivement CDCl_3 et D_2O	159
Fig. 20 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, TA) de 64 et 65 dans respectivement CDCl_3 et D_2O	160
Fig. 21 : Spectre de masse en électrospray mode positif de 64 et 65	161
Fig. 22 : Hypothèse de synthèse de l'analogue bis-alcool 67	162
Fig. 23 : Hypothèse de synthèse de l'analogue bis-alcool 67	162
Fig. 24 : Spectres RMN ^1H des dérivés guanidino- 60 et 62 (400 MHz, TA).....	163
Fig. 25 : Spectre RMN ^{13}C du composé 60	16
Fig. 26 : Chromatogramme ($\lambda = 254 \text{ nm}$) obtenu pour l'acide nalidixique (NAL) dans la phase mobile (11 $\mu\text{g/mL}$).....	167
Fig. 27 : Chromatogramme ($\lambda = 254 \text{ nm}$) du mono-nalidixate 58 avant hydrolyse.....	168

Fig. 28 : Chromatogrammes du témoin acide nalidixique (A) et du blanc plasmatique (B) dans la phase mobile.....	170
Tableau 3 : Evaluation statistiques de la linéarité des témoins T1 et T2 entre 1 - 20 $\mu\text{g/mL}$	172
Tableau 4 : Précision obtenue pour la validation de la méthode à partir du témoin acide nalidixique et acide nalidixique sur plasma.....	173
Fig. 29 : Chromatogramme représentant le rapport signal sur bruit.....	174
Fig. 30 : Influence du pH sur la cinétique du mono- 58 et bis-nalidixate 59	177
Fig. 31 : Chromatogrammes ($\lambda = 254 \text{ nm}$) obtenus pour les prodrogues 58 , 59 dans le plasma de rat (à $t = 0$ et $t = 24 \text{ h}$) et les spectres UV de NAL (a), 65 (b) et le composé 58 (c).....	179
Fig. 32 : Cinétique de libération de l'acide nalidixique à 37°C dans le plasma de rat pour 58 et 59	180

Chap. IV : EVOLUTION DU CONCEPT VERS DES POLY-GUANIDINIUMS ETOILES

Fig. 1 : Evolution du concept du calix[4]arène vers un benzène.....	186
Fig. 2 : Exemple de récepteur pyrrole tricationique de guanidinocarbonyl et les trois substrats tricarboxylates [3].....	187
Fig. 3 : Les 12 possibilités d'homo-fonctionnalisation du benzène (en gras : celles atteintes dans ce projet : six composés poly-guanidiniums étoilés recherchés.....	188
Fig. 4 : Stratégie d'obtention du trifluoroacétate d' α -[para-(guanidinoéthyl)phénoxy] toluène 71	189
Fig. 5 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, TA) des composés a) 68 b) 69 c) 70 et d) 71	190
Fig. 6 : Spectre de masse en électrospray mode positif de 71	191
Fig. 7 : Stratégie de synthèse des bis- $[\alpha,\beta$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]] xylènes 75 et 79	191
Fig. 8 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , TA) des composés ortho 72 et méta 76	192
Fig. 9 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, D ₂ O, TA) des composés 73 et 77	193
Fig. 10 : Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , TA) des composés 74 et 78	195

Fig. 11 : Spectres RMN ^1H (400 MHz, D_2O) des bis- $[\alpha, \alpha'$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » 75 et « méta » 79	196
Fig.12 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) du composé ortho 75	197
Fig. 13 : Spectres de masse en électrospray mode positif des bis- $[\alpha, \alpha'$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » 75 et « méta » 79	199
Fig. 14 : Stratégie de synthèse du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha''$ -[para-(guanidinoéthyl)phénoxy]] mésitylène 83	198
Fig.15 : Bromation radicalaire du mésitylène (d).....	200
Fig. 16 : Couplage de la boc-tyramine 48 sur le 1,3,5-tris(bromométhyl)benzène 80	201
Fig. 17 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha''$ -[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy]]mésitylène 80	201
Fig. 18 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 80	202
Fig.19 : Synthèse du trifluoroacétate de tris- $[\alpha, \alpha', \alpha''$ -[para-(aminoéthyl)phénoxy]]mésitylène 81	203
Fig. 20 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O) du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha''$ -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]]mésitylène 81	203
Fig. 21 : Synthèse du composé 82 selon la méthode N°2.....	204
Fig. 22 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O) du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha''$ -[para(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]]mésitylène 82	205
Fig. 23 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) du composé 82	205
Fig. 24 : Spectres de masse en électrospray mode positif du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha''$ -[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]]mésitylène 82	206
Fig. 25 : Synthèse du composé 83	207
Fig. 26 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha''$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]]mésitylène 83	208
Fig. 27 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) du composé 83	208
Fig. 28 : Spectre électrospray en mode positif du composé 83	209
Tableau 1 : Analyses élémentaires des lots de 83	209
Fig. 29 : Poly-guanidiniums étoilés 87 et 91	210
Fig. 30 : Spectres RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) des composés 84 et 88	211

Fig. 31 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) du composé 84	212
Fig. 32 : Synthèse des trifluoroacétates du 1,2,4,5-tétrakis-[para-(aminoéthyl)phénoxyméthyl]benzène 85 et de l'hexakis-[para-(aminoéthyl)phénoxyméthyl]benzène 89	212
Fig. 33 : Spectres RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) des composés 85 et 89	213
Fig. 34 : Spectres RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$) du composé 85	214
Fig. 35 : Synthèse du 1,2,4,5-tétrakis-[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)phénoxyméthyl] benzène 86 et de l'hexakis-[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)- phénoxyméthyl]benzène 90	215
Fig. 36 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) des composés a) 86 et b) 90	215
Fig. 37 : Spectres RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TA) du composé 90	216
Fig. 38 : Synthèse du 1,2,4,5-tétrakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxyméthyl]benzène 87 et de l'hexakis-[para-(guanidinoéthyl)phénoxyméthyl]benzène 91	217
Fig. 39 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) des composés a) 87 et b) 91	218
Fig. 40 : Spectre RMN ^{13}C du composé 87 (100 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$,TA).....	218
Fig. 41 : Spectre électrospray mode positif du composé 87 . Présentation par parties.....	219
Fig. 42 : Spectre électrospray mode positif du composé 91	220

Chap. V : EVALUATIONS BIOLOGIQUES

Fig. 1 : L'approche développée au GEVSM.....	222
Fig. 2 : Représentation d'une préorganisation de CX1/13 et son analogue monomérique D [5].....	223
Fig. 3 : Structure du CX1 et son analogue monomérique D	224
Fig. 4 : Schéma descriptif des enveloppes bactériennes [13].....	225
Fig. 5 : Structure chimique de l'acide téichoïque [14].....	226
Fig. 6 : Structure chimique de l'acide lipotéichoïque [15].....	226
Fig. 7 : Structure du peptidoglycane [16].....	227
Fig. 8 : Structure de la membrane externe.....	228
Fig. 9 : Structure d'un lipopolysaccharide [17].....	229

Fig. 10 : Cible d'action des principaux antibiotiques.....	230
Fig. 11 : Exemples de quinolones.....	231
Tableau 1 : CMI en $\mu\text{g/mL}$ sur souches de références ATCC des composés 26 , 27 , 32 , 38 , 42 et du CX1 / 13	234
Tableau 2 : CMI en $\mu\text{g/mL}$ et ($\mu\text{mol/L}$) avec le calixarène bis-bipyridine 47 et son monomère 53 , en comparaison avec divers analogues, l'hexamidine G et la synthaline A H . [6].....	237
Tableau 3 : Test de viabilité au MTT (a) test au LDH) sur les cellules MRC-5 après 24 heures d'incubation [6].....	239
Tableau 4 : Détermination de l'indice de sélectivité (IS) à 24 heures, pour les composés 43 et 57 comparés aux composés analogues [6].....	239
Fig. 12 : schéma théorique de la dégradation du prodrogue 58	241
Tableau 5 : Valeurs de CMI en $\mu\text{mole/L}$ ($\mu\text{g/mL}$) des composés 58 , 59 , 65 et NAL sur les 5 souches bactériennes de références [20].....	241
Tableau 6 : Comparaison des CMI ($\mu\text{g/mL}$) de 58 , NAL et 65 avec les valeurs théoriques libérées de NAL et 65 pour une hydrolyse à 100%.....	242
Tableau 7 : Comparaison des CMI ($\mu\text{g/mL}$) de 59 et NAL avec les valeurs théoriques libérées de NAL pour une hydrolyse à 100%.....	243
Tableau 8 : Valeurs de CMI en $\mu\text{g/mL}$ et en ($\mu\text{mole/L}$) obtenues pour les 6 composés de la famille des guanidiniums étoilés 71 , 75 , 79 , 83 , 87 et 91 sur les différentes souches bactériennes testées.....	246
Tableau 9 : Bilan des CMI en $\mu\text{g/mL}$ des composés de cette étude. Détermination d'un score.....	248

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, on note l'émergence des infections liées aux soins (ILS). En effet, les cas des ILS ou infections nosocomiales (IN) sont devenus une préoccupation majeure, car il est possible de s'infecter aussi bien en pratique de ville qu'en milieu hospitalier.

Selon une enquête de prévalence réalisée sur les IN ou ILS menée en 2006 par Coignard et al.,[1] pour le RAISIN (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de la surveillance des infections Nosocomiales), une idée du risque nosocomial est perçue. Cette enquête révèle un taux de prévalence des IN à 4.97% en France. Elle révèle également que les IN les plus fréquentes sont les infections urinaires (IU) > infections respiratoires > les infections du site opératoire. Les bactéries sont à 60% responsables des IN : *Escherichia coli* (24,7%) > *Staphylococcus aureus* (18,9%) > *Pseudomonas aeruginosa* (10%) > *Enterococcus spp.* (6%).

Malgré les efforts entrepris pour combattre les IN, des germes de plus en plus résistants apparaissent, face aux médicaments actuellement commercialisés : ce sont les "Bactéries Multi-Résistantes" (BMR).

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique [2].

Sont classées BMR :

- SARM : *Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline
- GISA : « Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* »
- EBLSE : Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu
- EBCASE : Entérobactéries productrices de céphalosporinase hyperproduite
- PAR : *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant
- ABR : *Acinetobacter baumannii* multirésistant
- ERG : Entérocoques Résistants aux Glycopeptide

Dès lors, l'importance des infections nosocomiales et l'émergence des bactéries multi-résistances devraient contraindre la recherche à développer sans cesse de nouvelles molécules antibactériennes. Ce qui est loin d'être le cas, nous tendons plutôt vers une impasse thérapeutique.

C'est dans ce contexte (croissance de ILS, recrudescence de BMR et pénurie d'antibiotiques) qu'au sein du GEVSM, une de nos thématiques est le développement d'une approche thérapeutique antimicrobienne faisant appel à l'utilisation des calixarènes (macrocycles synthétiques fonctionnalisables, organisatrices et modulables).

Les calixarènes sont des macrocycles aromatiques constitués de n unités phénoliques ($n = 4$ à 16), *para*-substituées ou non, reliées entre elles par des ponts méthyléniques. Le calix[4]arène ($n = 4$) a été choisie comme plate-forme et support de l'architecture de base pour toutes nos études. Sa structure spatiale permet l'organisation dans l'espace de tous groupements ou fonctions qui lui seront greffés. Sa cavité ou la présence de ses quatre groupements hydroxyles lui confère des propriétés de complexant.

Cependant, si l'intérêt de ces structures est démontré particulièrement dans le domaine de la chimie et de la physico-chimie à en juger par la nombreuse littérature qui y est consacrée, très peu de travaux concernent des applications dans le domaine bio-médical.

La majorité des travaux concernant l'utilisation des calixarènes dans le domaine bio-médicale a été développé sous la forme de brevet. Ainsi, sur le plan thérapeutique certains calixarènes présentent des propriétés antivirales sur les virus enveloppés (HSV et VIH) [3, 4a,b], ils présentent aussi des activités antithrombotiques [5], antifongiques et anticancéreux [4a,b]. D'autres brevets montrent l'intérêt des calixarènes pour leurs activités antifibrotiques (inhibiteur de la lysyl-oxidase) [6].

Quelques publications portent sur l'évaluation de l'activité antibiotique des calixarènes. Le macrocyclon (dérivé poly-oxy-éthylé de calixarène) est l'exemple le plus ancien de dérivé calixarénique capable de perturber le mécanisme lipidique par

inhibition du triglycéride lipase et d'une phospholipase, inhibant la croissance bactérienne de *Mycobacterium tuberculosis* [7a,b].

L'évaluation de l'activité antibactérienne des calixarènes apparaît dans quelques brevets [8] et sous forme de publications [9]. C'est sous cette forme notamment qu'Ungaro et coll., développèrent une nouvelle classe de calixarènes fonctionnalisés sur la couronne haute par des peptides cycliques. L'activité antibactérienne de ces calixarènes a été comparée à celle de la vancomycine sur différentes bactéries à Gram+ et à Gram- [9] (Fig. 1).

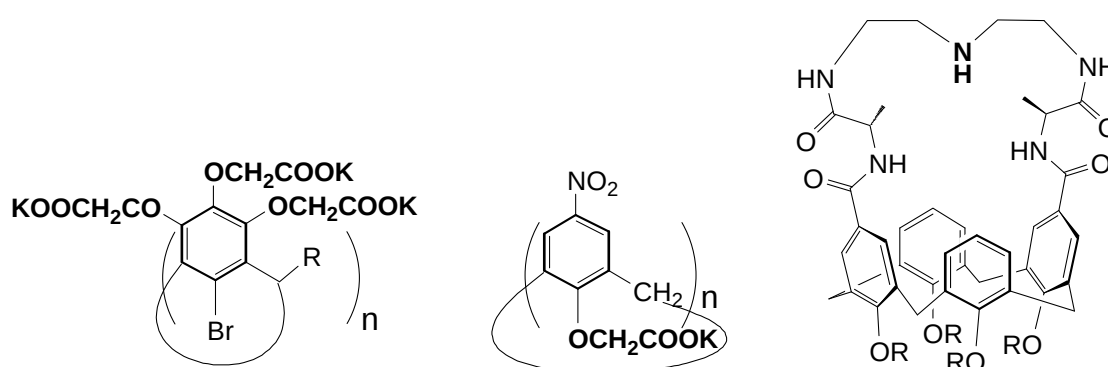


Fig. 1 : Calixarènes potentiellement bio-actifs [10,11].

❖ Calixarènes antibactériens: notre approche

L'approche qui a toujours été à la base de nos recherches au sein du laboratoire, fait intervenir deux hypothèses de mode d'action supposé des molécules que nous développons.

- Hypothèse I :

Les Composés calixaréniques permettent *via* diverses fonctionnalisations, d'obtenir des systèmes à caractère amphiphile. Au contact de la paroi bactérienne, ces structures s'insèrent dans la membrane plasmique (Gram - et Gram +) ou dans la membrane externe (Gram -) en causant une désorganisation de la structure membranaire (Fig. 2).

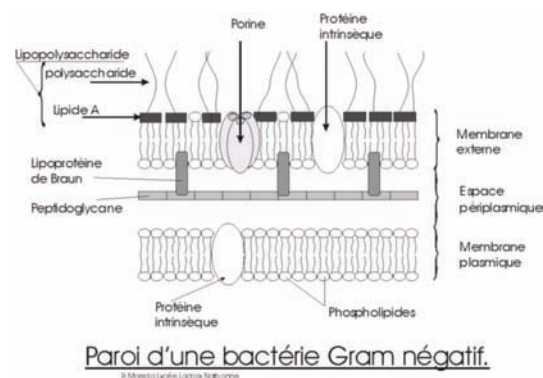
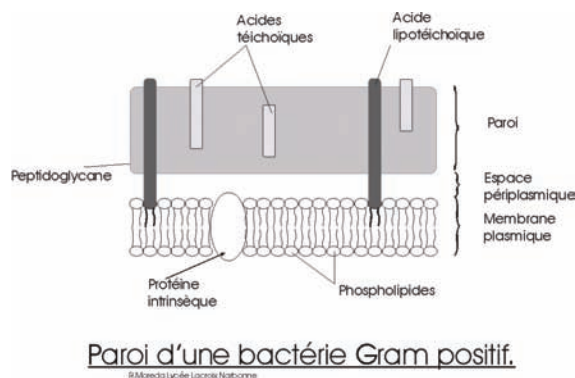
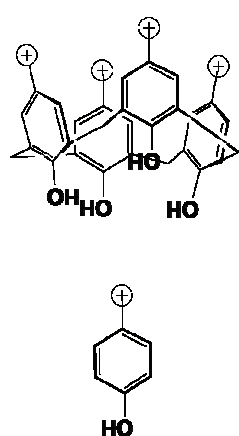


Fig. 2 : Organisations structurales de la paroi des bactéries à Gram positif et négatif [12].

- Hypothèse II :

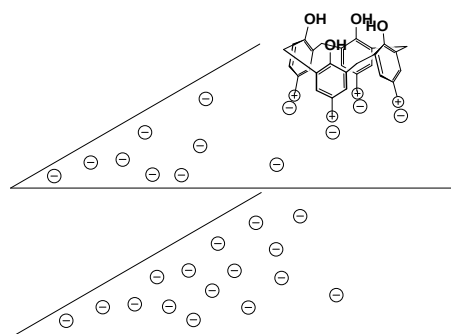
Les bactéries présentent une charge globale nette de surface négative. L'apport de contre-cations organisés pourrait modifier les propriétés ioniques de surface, résultant ainsi en la neutralisation ou la désorganisation contrôlée de la paroi bactérienne (Fig. 3).



A priori :

Monomère cationique sans effet sur l'organisation des entités anioniques

Cyclo-oligomère cationique (4 charges contraintes stériquement) avec effet sur l'organisation des entités anioniques



Choix des cations: $\oplus$ = groupement ammonium ou guanidiniums

Fig. 3 : Hypothèse II, organisation des cyclo-oligomères cationiques chargés vis-à-vis de la paroi bactérienne.

Suivant ces deux hypothèses, une partie des travaux développés dans ce manuscrit reposent sur :

1) L'apport de contre charges positives préorganisées sur une plate-forme de type calix[4]arénique puis benzénique. Ensuite il s'agit de comparer les propriétés antibactériennes de dérivés calixaréniques et benzéniques, plate-formes organisatrices de fonctions ioniques diverses et de leur monomère phénolique constitutif (cas des calixarènes), sur les différentes souches bactériennes de références : *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 & ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212.

L'ensemble de mon travail de thèse est présenté dans ce manuscrit en 5 chapitres. Le premier est une étude bibliographique. Dans cette étude nous présentons l'histoire des calixarènes, puis il nous a fallu reprendre les voies de synthèse menant aux calixarènes hydrosolubles, développées par mes prédécesseurs afin de les adapter à la réalisation des molécules recherchées. Nous avons également étudié la littérature existante sur les podands Calixarène-Hétérocycles Azotés, et enfin, nous avons fait le point sur l'emploi des calixarènes principalement dans le domaine bio-médical. Notre contribution dans ce domaine vient s'ajouter aux travaux qui seront présentés au chapitre I (calixarènes bio-actifs) [10,11], où nous avons développé des calixarènes poly-cationiques antibactériens et de nouvelles prodrogues à base calixarénique.

Le développement du projet calixarènes poly-ioniques a débuté au laboratoire durant la thèse de N. Psychogios (2003), dédié à la recherche de nouveaux agents anti infectieux, notamment actifs sur les virus enveloppés (HSV). Il a également développé les premiers podants calixaréniques porteurs d'unités bis-hétérocycliques et soluble dans l'eau grâce à l'incorporation de fonctionnalités ioniques de type sulfonates, carboxylates ou phosphonates [13,14,15].

M. Mourer (thèse 2006), lui succède en poursuivant le développement des calix[4]ènes anioniques [16]. L'évaluation des propriétés antivirales fut menée à la fois au sein du GEVSM (HSV) et en collaboration (HIV ; Dr A.M. Aubertin, Inserm U 778, Strasbourg). Certains composés de cette famille ont présenté de très intéressantes propriétés antivirales sur virus HSV et HIV [17].

Les travaux de thèse de M. Mourer ont aussi permis de développer en parallèle, une série de composés appartenant à la famille des calix[4]arènes cationiques obtenus par incorporation de fonctions *para*-guanidinoéthyles [18] (Fig. 4).

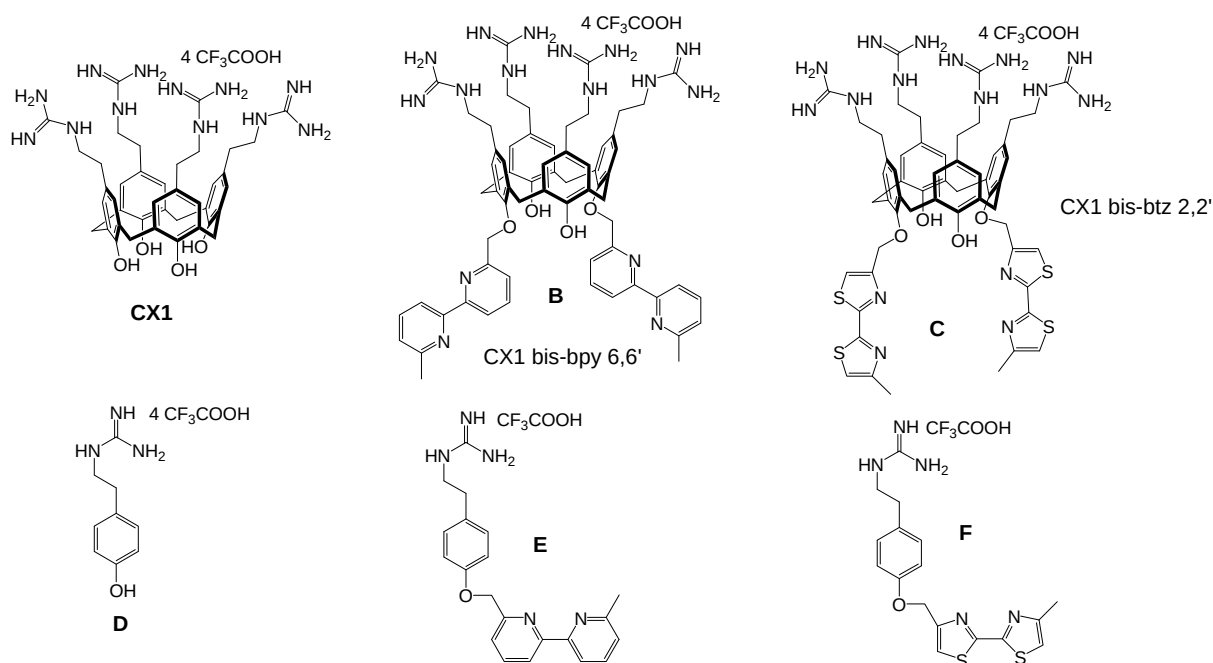


Fig. 4 : Représentation du CX1/A, des CX1-bis-hétérocycles (B, C) et leurs équivalents monomériques D, E et F [18,19].

En effet, l'approche menée au laboratoire fait intervenir une hypothèse du mode d'action supposé des structures macromoléculaires vis-à-vis des bactéries. Les bactéries présentent une charge globale nette de surface négative ; opposer à cette charge, un ensemble de charge positives organisées avec un haut degré de contrainte stérique (rapprochement et orientation homogène) autour d'une structure moléculaire rigide, telle un calixarène, peut résulter en un effet délétère par désorganisation de la paroi bactérienne, là où le simple monomère phénolique

constitutif n'aurait pas d'effet. C'est ce qui a été observé au travers des premiers résultats microbiologiques obtenus avec le calix[4]arène hydrosoluble tétra-*para*-guanidinoéthyle **CX1** et les calix[4]arènes hydrosolubles porteurs d'unités bis-hétérocycles **B** et **C** (fig.4). Le gain d'activité antibactérienne observé en passant du monomère *para*-guanidinoéthylphénol **D** au tétra-*para*-guanidinoéthylcalix[4]arène **CX1** nous a conforté dans la deuxième hypothèse du mode d'action supposé de nos structures.

Plusieurs têtes de série ont été extraites de ces premières évaluations, c'est le cas du *para*-guanidinoéthyl-calix[4]arène (**CX1**). Ce composé présente de très intéressantes propriétés antibactériennes sur les deux souches de références à Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) mais aussi sur trois souches à Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Le **CX1**, a fait et continue de faire l'objet d'investigations plus poussées, notamment pour la compréhension de son mode d'action [20-24]. L'ensemble de ces investigations a fait l'objet d'une thèse soutenue par M. Grare (2009).

Les objectifs qui m'ont été proposés dans cette thématique ont été d'une part, de poursuivre la synthèse du **CX1** (fig.1), avec l'exigence de garantir une reproductibilité (en terme de quantité et qualité) des lots devant servir à la poursuite des études microbiologiques, fort consommatrices de substance ; d'autre part, de développer la recherche de nouveaux composés permettant une meilleure appréhension de la relation "structure-activité" ; enfin, d'élargir nos investigations à d'autres structures organisatrices.

❖ Dans le chapitre II, nous avons tout d'abord développé deux types de composés calix[4]aréniques. Le premier concerne des calix[4]arènes comportant à la fois des groupements guanidinoéthyle ($n = 1$ ou 2) et des groupements tertibutyle (3 ou 2) (composés **26** et **27** Fig. 5). Le second groupe concerne des calix[4]arènes comportant uniquement des groupements guanidinoéthyle, en nombre variant de 1 à 3 (**32**, **38** et **42** fig.5).

L'évaluation des propriétés antibactériennes de ces composés devrait nous informer quant à l'intérêt des quatre fonctions guanidiniums sur le calix[4]arène, et sur le rôle des groupements tertibutyles hydrophobes.

Nous avons ensuite complété les études engagées sur les calixarènes hydrosolubles bis-hétérocycle (**B** et **C**). Notre objectif a été la synthèse de plusieurs nouveaux dérivés structuralement ressemblants parmi lesquels le «CX1 bis-bipyridine 5,5'» **47** et le «CX1 bis-biphényle», ainsi que leur analogues monomériques.

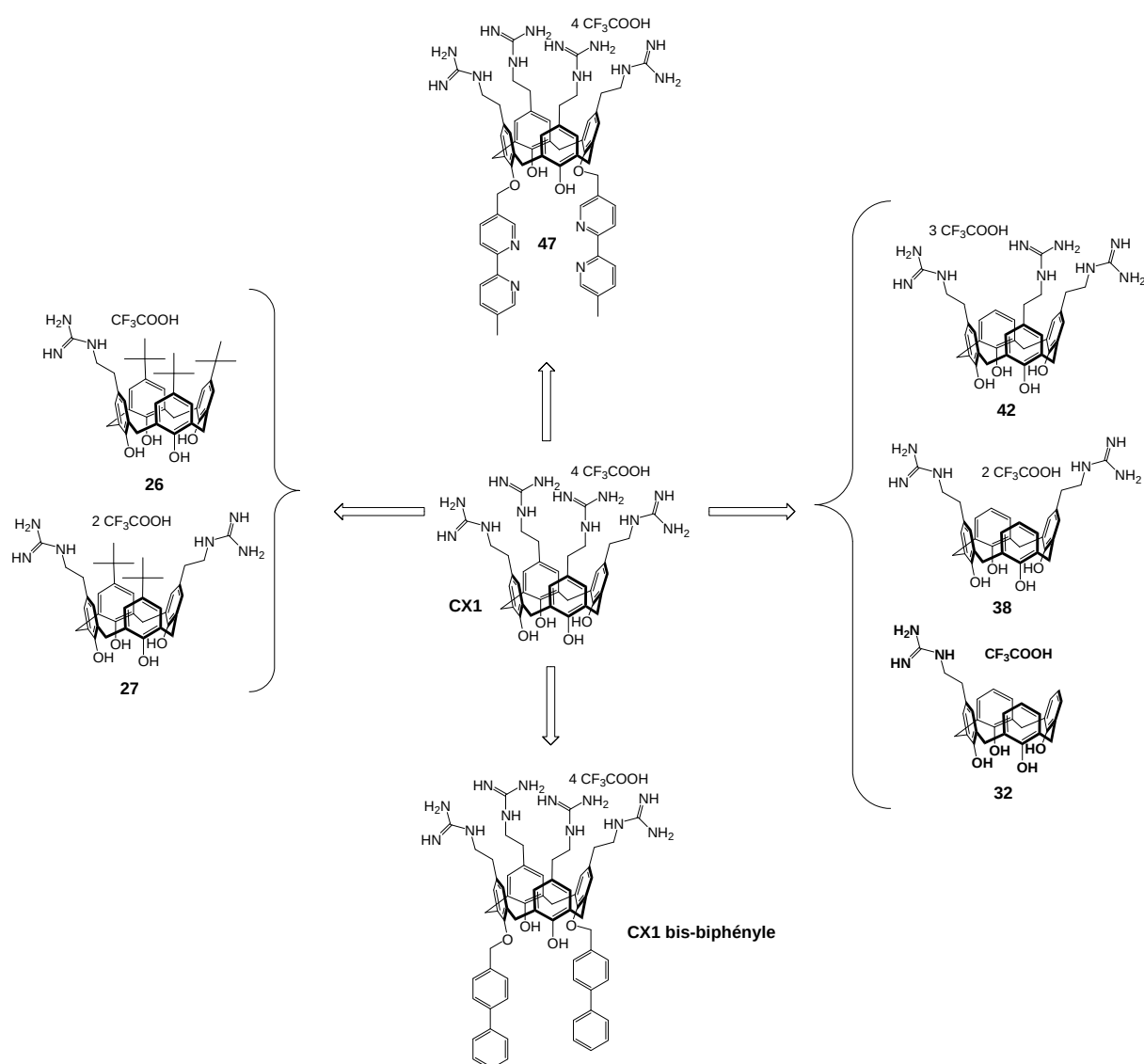


Fig. 5 : CX1 et composés apparentés 27, 26, 32, 38, 42 et 47.

Nos attentes étaient d'établir une corrélation entre la présence (hétérocycle) ou l'absence (biphényle) d'atome d'azotes sur les hétérocycles et d'éventuelles activités biologiques générées par ces podands.

❖ Le troisième chapitre concerne le développement d'une nouvelle approche, initiée durant la thèse d'A. Ben Salem (2004), dédiée à la création de prodrogues calixaréniques de principes actifs antibactériens connus.

Sont exploitées dans ce projet les propriétés organisatrices du macrocycle calix[4]arène, mises à profit pour transporter divers principes actifs appartenant, dans les travaux initiaux, aux familles d'antibiotiques pénicillines et quinolones. On ainsi été initialement préparés divers podants intégrant sur la partie basse du calixarène, *via* une attache de type ester labile donc hydrolysable, une ou deux pénicillines G ou V, ou des quinolones ; dans le cas des dérivés doublement substitués, les agents antibactériens sont uniques (pénicilline **a**/pénicilline **a**, quinolone **a**/quinolone **a**) [25,26], ou mixtes (pénicilline **a**/pénicilline **b**, quinolone **a**/quinolone **b**, ou pénicilline **a**/quinolone **a**), générant ainsi de nouveaux prodrogues potentiels ou dispenseurs mono- ou multidrogues. Dans ce dernier cas, il était recherché une attaque simultanée, synergique, de deux cibles bactériennes, la DD-carboxypeptidase nécessaire à la réticulation du peptidoglycane des parois (pénicilline), et la topoisomérase ou ADN gyrase (quinolone) [27].

Les premiers composés préparés par A. Ben Salem ont été conçus hydrophobes pour permettre une administration par voie orale et espérer une hydrolyse après absorption. Cette hydrophobie résultant en une absence de solubilité dans l'eau, même en présence d'un co-solvant (DMSO) dans les proportions maximales autorisées (2-3%), les évaluations de leurs activités antibactériennes par les méthodes standard (disques imprégnés sur géloses en boîte de Pétri, microméthodes en phase solubles) se sont avérées inefficaces jusqu'à présent.

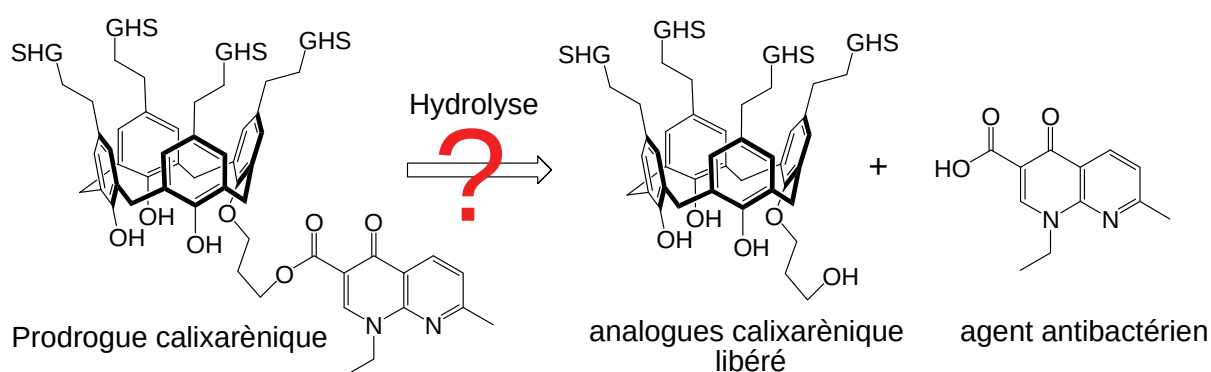
Il m'a donc été confié le soin d'apporter un caractère hydrosoluble à ces prodrogues.

La stratégie d'hydrosolubilisation que nous avons choisie repose sur la chimie des ammoniums et guanidiniums bien développée et « maitrisée » au laboratoire sur les calixarènes de type CX1.

- avec l'espoir que

- la jonction calixarène-principe actif soit stable durant les étapes conduisant à l'introduction des fonctions ammonium et guanidinium.

- l'activité du principe actif soit à *minima* récupérée (hydrolyse effective et libération totale de l'agent antibactérien) ou cumulée-additive / multiplicative à l'activité propre du calixarène libéré, analogue proche du CX1 antibactérien (Fig. 6).



GHS = Groupe Hydrosolubilisant = ammoniums ou guanidiniums

Fig.6 : Hydrolyse envisagée du prodrogue calixarénique.

❖ Le quatrième chapitre porte sur la synthèse et la caractérisation d'une nouvelle famille de composés : les **poly-guanidiniums étoilés**, espérés eux aussi à activité antibactérienne. Le développement de cette nouvelle famille s'est fait en accord avec l'approche « organisation spatiale de fonctions actives » engagée avec les calixarènes de type CX1. Dans cette nouvelle famille, la plate-forme organisatrice est un cycle benzénique autour duquel nous avons greffé de 1 à 6 bras guanidinoéthylbenzène.

❖ Le cinquième chapitre est consacré à la détermination du potentiel antibactérien et les interprétations des valeurs de CMI (concentration minimale inhibitrice) de nos structures vis-à-vis de souches bactériennes de références.

Une dernière partie dans ce manuscrit, présente la description détaillée des modes opératoires utilisés pour l'obtention de nos composés ainsi que, leurs caractérisations physico-chimiques.

Pour des raisons pratique, toutes les références citée dans chacun des sous-chapitres chimie, biologie sont indexées à la fin par ordre d'apparition. Ainsi, des références identiques peuvent apparaître dans plusieurs listes bibliographiques.

Références bibliographiques

- 1) http://www.invs.sante.fr/publications/2009/enquete_prevalence_infections_nosocomiales/enquete_prevalence_infections_nosocomiales_vol1.
Site visité le 02/09/2010
- 2) <http://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/nosoco/bacteries/maitbact.htm>
Site visité le 02/09/2010
- 3) K.M. Hwang, Y.M. Qi, S.Y. Liu, W. Choy, J. Chen; "Inhibition and treatment of infection by enveloped virus with calix(n)arene compounds"; *Patent*, WO 94/03164, **1994**.
- 4) a) S. J. Harris, "Calixarene-based compounds having antibacterial, antifungal, anti-HIV activity"; *Patent* WO 95/19974, **1995**. b) S. J. Harris, "Anti-viral compounds". *Patent* Patent WO 02/44121, **2002**.
- 5) K.M. Hwang, Y.M. Qi, S.Y. Liu, T.C. Lee, W. Choy, J. Chen; "Antithrombotic treatment with calix(n)arene compounds"; *Patent*, WO 94/03165, **1994**.
- 6) D. Hulmes, A. Coleman, E. Aubert-Foucher; "Use of calix(n)arene for treating fibrotic diseases" (CNRS, Fr) *Patent* WO 0007585, **2000**.
- 7) a) J. W. Cornforth, P. D'Arcy Hart, G. A Nicholls, R. J. W Rees, J. A Stock; *Br. J. Pharmacology* **1955**, *10*, 73-86. b) P. D'Arcy Hart, A. J. Armstrong, E. Brodaty, *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 1491-1493.
- 8) T. Yo, K. Fujiwara, M. Otsuka; JP 10203906, **1998**.
- 9) A. Casnati, E. Di Modugno, M. Fabbi; N. Pelizzi, A. Pochini, F. Sansone, G. Tarzia, R. Ungaro; "Synthesis, Antimicrobial Activity and Binding Properties of calix[4]arene based Vancomycin Mimics" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2699-2704.
- 10) A. de Fatima, S. A. Fernandes, A. A. Sabino "Calixarenes as New Platforms for Drug Design" *Curr. Drug Discov. Technol.* **2009**, *6*, 151-170.

- 11) R. V. Rodik, V. I. Boyko, V. I. Kalchenko, "Calixarenes in Bio-Medical Researches"; *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1630-1655.
- 12) R. Moreda -Lycée Lacroix – Narbonne ; schémas disponibles sur le site académique de Montpellier au format 1024x800 : page [Microbiologie](#) du site de Montpellier.
- 13) N. Psychogios, J.-B. Regnoul-de-Vains; "A new water-soluble ligand based on a calix[4]arene substituted by 2,2'-bipyridine chelating units"; *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2799-2800.
- 14) N. Psychogios, J.-B. Regnoul-de-Vains; "A new water-soluble calix[4]arene podand incorporating p-sulfonate groups and 2,2'-bipyridine chelating units"; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 77-80.
- 15) N. Psychogios, J.-B. Regnoul-de-Vains; "A new water-soluble calix[4]arene podand incorporating p-phosphonate groups and 2,2'-bipyridine units"; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7691-7693.
- 16) M. Mourer, J.-B. Regnoul-de-Vains; "New water-soluble calix[4]arene-based bipyridine podands incorporating carboxylate groups"; *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*(12), 1895-99.
- 17) M. Mourer, N. Psychogios, G. Laumond, A.M. Aubertin, J.-B. Regnoul-de-Vains; "Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands"; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 36-45.
- 18) M. Mourer, R.E Duval, C. Finance, J.-B. Regnoul-de-Vains; "Functional organisation and gain of Activity: The case of the antibacterial tetra-*para*-guanidinoethyl-calix[4]arene". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2960-3.
- 19) M. Mourer, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R.E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnoul-de-Vains; "p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation". *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496-5509.
- 20) M. Grare, M. Mourer, J.-B. Regnoul-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Towards new antibacterial drugs. Interest of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene". *Pathol. Biol.* **2006**, *54*, 470-476.
- 21) M. Grare, M. Mourer, S. Fontanay, J.-B. Regnoul-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "*In vitro* activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria"; *J. Antimicrob Chemother* **2007**, *60*, 575-581.
- 22) M. Grare, E. Dague, M. Mourer, J.-B. Regnoul-de-Vains, C. Finance, J.-F.L. Duval, R.E. Duval; "Microelectrophoresis and atomic force microscopy: new tools to explore mechanism of action of antibacterial compounds". *Pathologie Biologie.* **2007**, *55*, 465-471.
- 23) M. Grare, S. Fontanay, H. Massimba Dibama, M. Mourer, J.-B. Regnoul-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Time-kill curves and evolution of membrane

permeability after *para*-guanidinoethyl-calix[4]arene exposure". *Pathologie Biologie*. **2010**, 46, 46-51.

- 24)** M. Grare, H. Massimba Dibama, S. Lafosse, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics hexamidine and chlorhexidine". *Clin Microbiol Infect*. **2010**, 16 (5), 432-8.
- 25)** A. Ben Salem, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Synthesis and characterisation of a new podand based on a calixarene and a β -lactam". *Tetrahedron Lett*. **2001**, 42, 7033-36.
- 26)** A. Ben Salem, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Towards a new family of calixarene-based podands incorporating quinolone arms. Example of nalidixic acid". *Tetrahedron Lett*. **2003**, 44, 6769-71.
- 27)** A. Ben Salem, J.-B. Regnouf-de-Vains, résultats non publiés.

Chapitre. I

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. Généralités

I.2. Calixarènes hydrosolubles

I.3. Calixarènes avec hétérocycles azotés

I.1. Des calixarènes à la biologie

I.1. Généralités

I.1.1. Définitions

La chimie supramoléculaire constitue un domaine scientifique largement interdisciplinaire, incluant les propriétés chimiques, physiques et biologiques d'espèces chimiques plus complexes que les molécules elles-mêmes.

La reconnaissance moléculaire et les processus d'association sont fondamentaux et universel dans les systèmes biologiques. Les interactions mises en jeu sont non covalentes (liaisons de coordination, interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, les liaisons de Van der Waals...).

Ces processus incluent également, les complexes de coordination issus de l'auto-assemblage entre les ligands polydentés et les ions métalliques. Afin de comprendre et de mimer les différents processus "hôte-invité", l'architecture et la synthèse de composés macrocycliques ont été largement étudiées.

Un macrocycle peut se définir comme une macromolécule cyclique ou une partie cyclique macromoléculaire d'une macromolécule. La chimie macrocyclique a connu son essor à partir des années 60 [1]. Parmi ces macrocycles, les calixarènes sont souvent utilisés comme plate-forme organisatrice de groupements de reconnaissance moléculaire dans l'espace. Ainsi, différentes modifications peuvent être effectuées à la fois sur le petit et le grand col du calixarène, permettant ainsi la construction d'édifices multivalents bien définis.

Les calixarènes sont des composés macrocycliques, constitués de n unités phénoliques reliées entre elles par des ponts méthyléniques ou sulfuriques en position-2,6. Ainsi, on définit une partie haute, une partie basse et une cavité (Fig. 1).

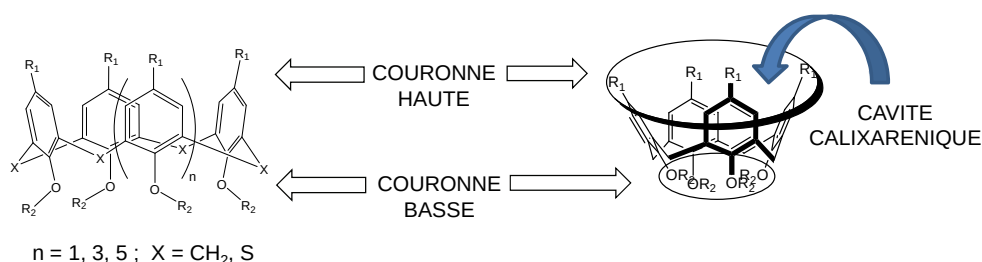


Fig. 1 : Structure de base des calixarènes.

Les calixarènes comme d'autres macrocycles (cyclodextrines, éthers couronnes, les porphyrines...etc) (Fig. 2) appartiennent à une famille de composés majeurs qui jouent aussi le rôle de molécules hôtes dans plusieurs applications dont le domaine biologique.

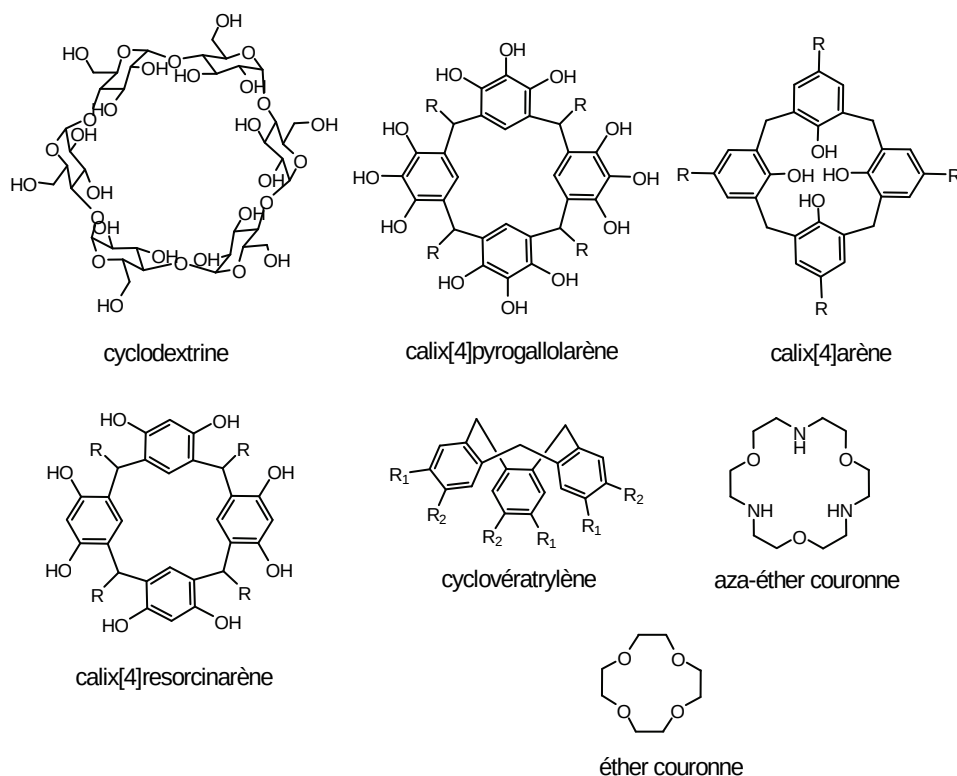


Fig. 2 : Exemples de macrocycles.

I.1.2. Historique

L'évolution de la chimie des résines phénoliques repose essentiellement sur des grandes dates aux quelles on associe des noms:

➤ En 1872, Adolph Von Baeyer [2] décrit pour la première fois, la synthèse d'une résine phénolique issue de la condensation d'un phénol sur le formaldéhyde en milieux acide fort. Mais, la purification et la caractérisation n'ont pu se faire qu'une trentaine d'années plus tard par Léo Baekeland, qui met au point la Bakélite (résine formo-phénolique essentielle sur le plan industriel).

➤ En 1940, Niederl et Vogel [3] proposent une description des résines polyphé-

noliques (Fig. 3).

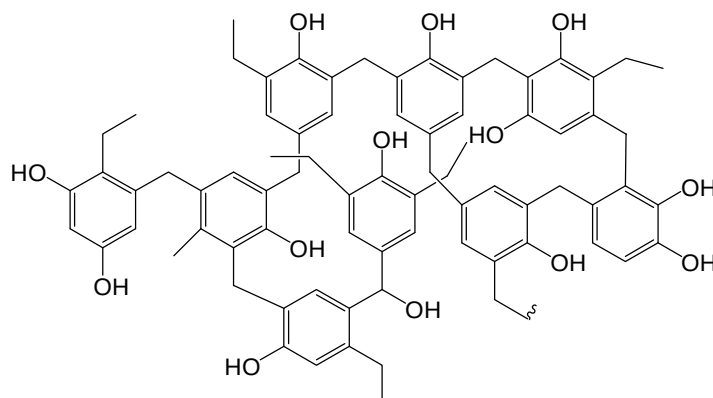


Fig. 3 : *Polymère formo-phénolique entrecroisé.*

➤ En 1944, Zinke et Ziegler [4] étudient la condensation du formaldéhyde avec un *p*-alkylphénol évitant ainsi la condensation sur les positions *para* des groupements hydroxyles. De ce fait, ils obtiennent un polymère linéaire car la condensation a lieu uniquement en position ortho (Fig. 4).

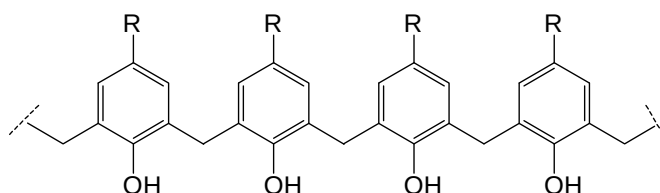


Fig. 4 : *Polymère formo-phénolique linéaire.*

➤ La description véritablement détaillée de cette chimie n'est faite que dans les années 80 avec C. D. Gutsche [5]. Il montre que la condensation du formaldéhyde avec un *p*-alkylphénol conduit à des oligomères cycliques de différentes tailles, avec l'isolement d'un tétramère, hexamère, et d'un octamère cyclique. Ainsi le terme calixarène est introduit pour la première fois par Gutsche (1978), pour désigner le tétramère cyclique précédemment décrit par Zinke et Ziegler.

I.1.3. Nomenclature et représentation

Gutsche utilise le terme “calixarène” [6] pour désigner ces molécules en forme de cratère (calice), le suffixe «arène» s’inspirerait des unités phénoliques. Ainsi, un macrocycle composé de quatre entités phénoliques sera nommé : calix[4]arène. Le nombre d’unité dont il est constitué est représenté entre crochet, lesquels sont affectés du préfixe «calix» et du suffixe «arène» (Fig. 5).

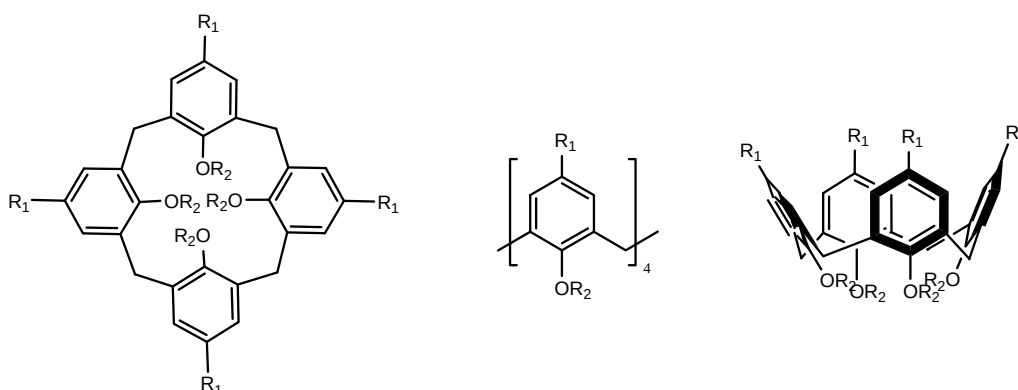


Fig. 5 : Différentes représentations du calix[4]arène.

La nomenclature IUPAC est le plus souvent remplacé par une écriture d’usage moins lourde pour de tels composés. Voici en exemple, la nomenclature officielle pour le *p-tert*-butylcalix[4]arène et une numérotation associée aux structures calixaréniques (Fig.6) :Pentacyclo[19.3.1.1^{3,7}.1^{9,13}.1^{15,19}]octacos-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecaene-25,26,27,28-tetraol-5,11,17,23-tetrakis(1,1-dimethylethyl).

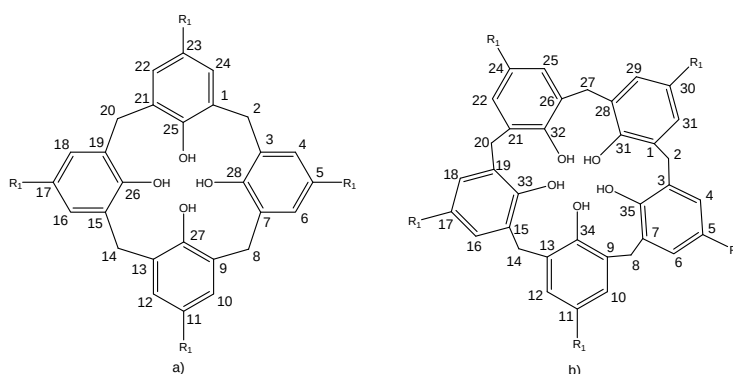


Fig. 6 : Numérotation des calixarènes a) calix[4]arène, b) calix[5]arène.

Une grande partie du travail que nous allons présenter dans ce mémoire repose essentiellement sur l'utilisation de la plateforme calixarénique dérivée de 4 phénol : le calix[4]arène.

I.1.3.1. Une conformation variable

Les calix[4]arènes présentent une mobilité conformationnelle en solution. La figure 7 donne la représentation spatiale de quatre isomères de différentes conformations limites. Ces quatre conformères résultent de la libre rotation autour des liaisons σ des groupements ArCH_2Ar . La présence des groupements hydroxyles, orientés tous dans le même sens génèrent de ce fait une couronne de liaisons hydrogène permettant à la conformation cône d'être la plus stable.

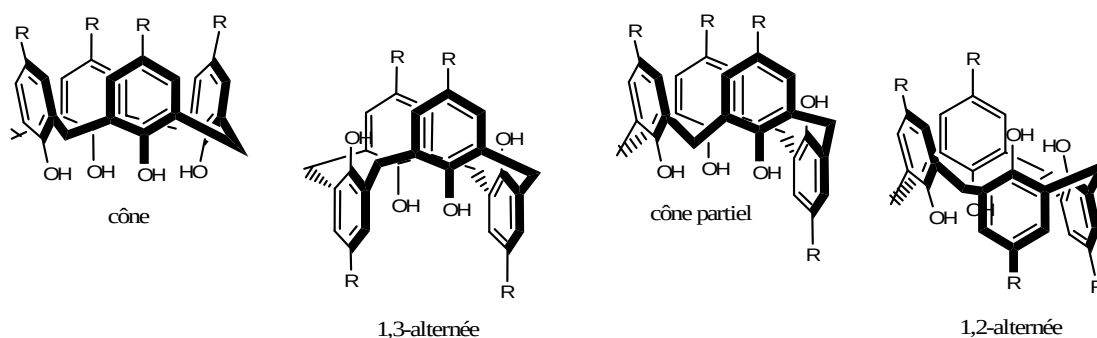


Fig. 7 : Différentes conformations limites du calix[4]arène.

I.1.4. Voies d'accès aux calixarènes

Deux procédés permettent d'accéder plus simplement aux calixarènes :

- ❖ La synthèse "one-step", directe avec un bon rendement
- ❖ La synthèse "multi-step", aux rendements moindres, mais autorisant l'accès à une grande variété de calixarènes.

I.1.4.1. Synthèse en une étape : “one-step”

Cette synthèse en une étape a été principalement décrite par Gutsche. C'est une méthode à catalyse basique [7-10] (Fig. 8); elle consiste à mettre en présence du *p*-*t*-butyl-phénol, du formaldéhyde à 37% et 0.03 à 0.04 équivalents de NaOH. Le mélange porté à 110-120°C, donne un précurseur contenant un mélange d'oligomères linéaires de *p*-*tert*-butyl-phénol. Ce mélange est chauffé dans le diphenyl-éther à 259°C pendant 2 heures pour donner, après refroidissement et recristallisation, un mélange d'oligomères cycliques possédant de 4 à 8 unités phénoliques avec une majorité de tétramère.

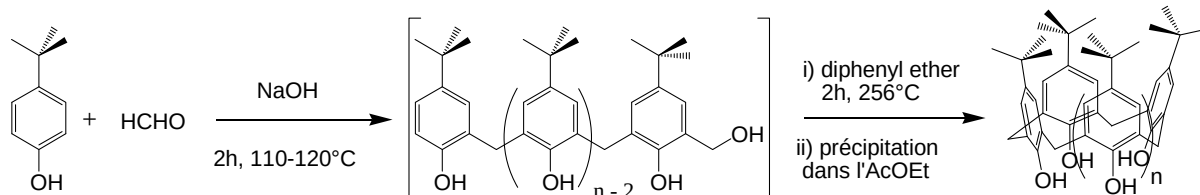


Fig. 8 : Synthèse “one-step” du tétra-para-*tert*-butylcalix[4]arène.

D'autres procédés en une étape existent, ils ont recourt à la catalyse acide [11], avec des rendements médiocres, ou des conditions neutres [12] mais sans avoir les performances de la méthode par catalyse basique.

I.1.4.2. Synthèse “multi-step”

Ces méthodes donnent des rendements, plus faibles que la synthèse dite “one-step”. Toutefois, elles permettent l'accession à des calixarènes de toutes tailles et un meilleur contrôle sur la substitution en *para* des groupements du cyclomère à former. En 1956, Hayes et Hunter ont développé une méthode séquentielle [13,14] procédant par additions successives de nouvelles unités sur des chaînes linéaires. Ils font intervenir un *o*-bromométhyl-phénol condensé sur d'autres phénols (Fig. 9), avant de terminer la cyclisation de la molécule avec un rendement de 28%.

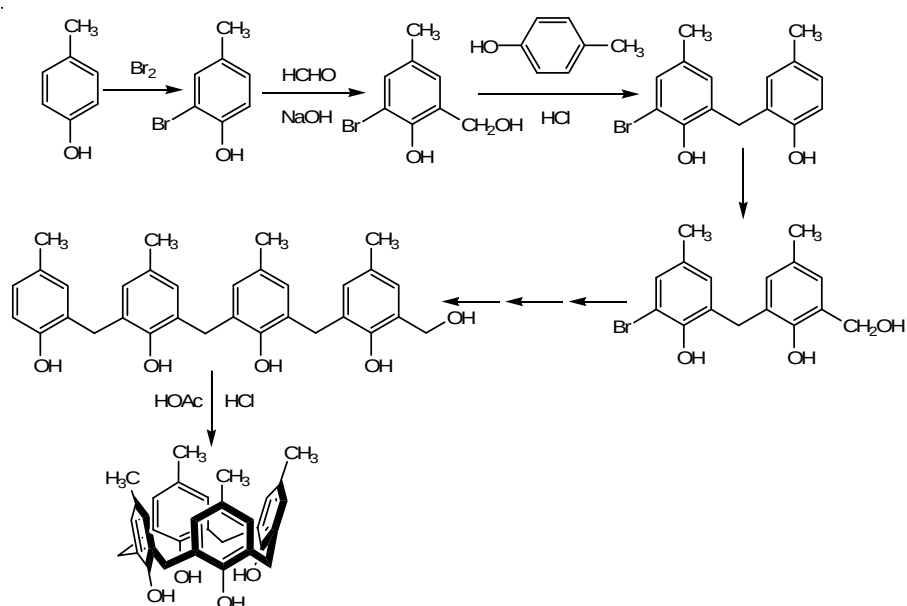


Fig. 9 : Synthèse “multi-step” de calix[4]arènes selon Hayes et Hunter [13,14].

D'autres techniques ont également été développées. La méthode dite convergente en est une. C'est Böhmer [15,16] qui a le plus détaillé le développement de cette stratégie. Elle est plus courte que la méthode linéaire et donne des rendements de l'ordre de 10 à 20%.

➤ La méthode convergente « 3+1 » [17] : consiste à fonctionnaliser un phénol en bis-*o*-hydroxyméthylphénol. Le condenser sur d'autres unités phénoliques en un trimère. La réaction se termine par une cyclisation, qui est due à l'ajout d'un bis-*o*-halométhyl-phénol, ce qui permet d'obtenir un calixarène porteur de plusieurs groupements différent en *para*. Le rendement varie de 3 à 15% (Fig. 10).

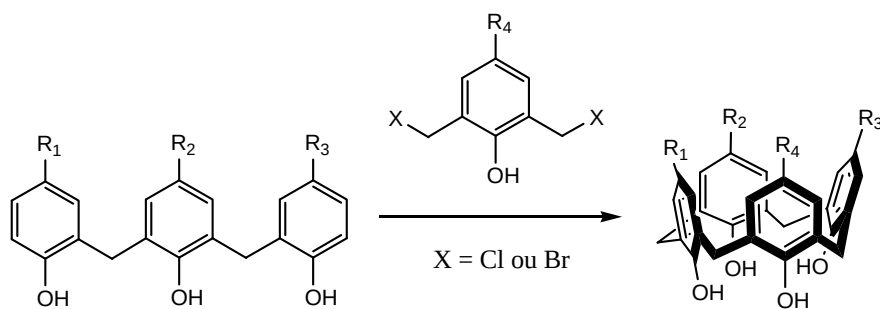


Fig. 10 : Synthèse convergente de calix[4]arènes «3+1» [17].

➤ La méthode convergente « 2+2 » [15] : C'est la condensation de deux dérivés bis-phénoliques (Fig. 11), l'un des deux étant activé sous la forme bis-o-o-halogénométhyle

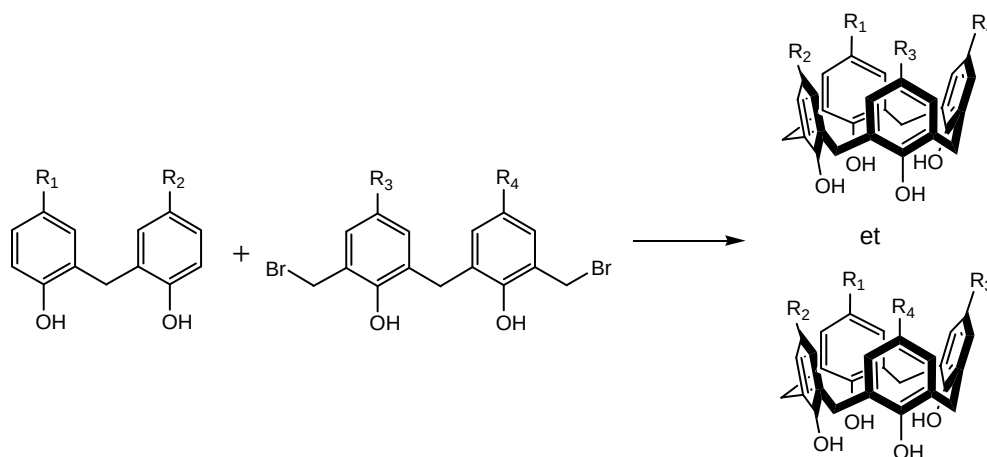


Fig. 11 : Synthèse convergente de calix[4]arènes «2+2» [15].

I.1.5. Formation des calix[4]arènes

Le mécanisme de formation de ces macrocycles comprend deux grandes étapes :

- La première étape est la formation, d'une oligomère linéaire issue de la condensation en milieu basique du phénol et du formaldéhyde. Il se forme donc l'ion phénate, qui va réagir avec le groupe carbonyle du formaldéhyde pour donner un hydroxyméthylphénol [18] suivant le mécanisme d'addition nucléophile d'après la figure 12.

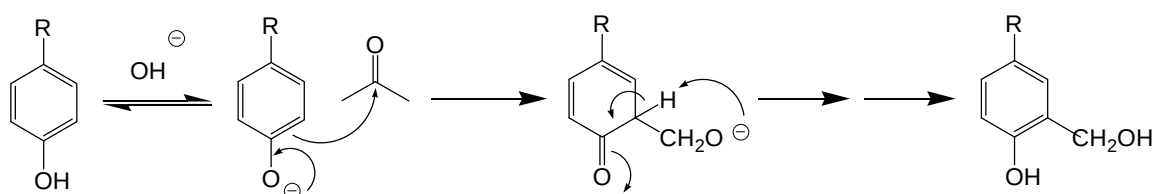


Fig. 12 : Condensation phénol-formaldéhyde [5a].

L'évolution de la réaction dépend des conditions, dans les quelles on se place. Ainsi, dans des conditions dites douces [18], la réaction s'arrête à ce stade (Fig. 12). Par contre, si la réaction se fait dans conditions plus énergiques, plus dures (*p*-tert-butyl-phénol, HCHO, 50°C, 4 jours) [5a]; on abouti à la formation d'un diarylméthane (Fig. 13) et parfois un éther diarylique (Fig. 14).

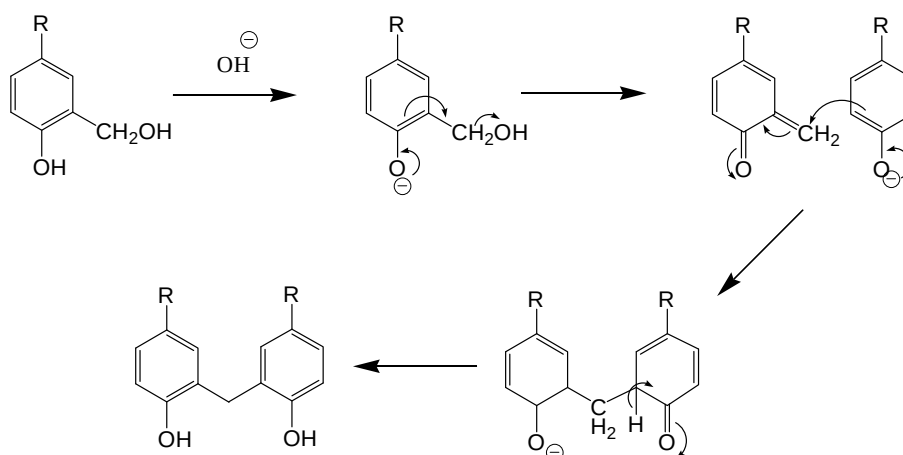


Fig. 13 : Formation du diarylméthane [5a].

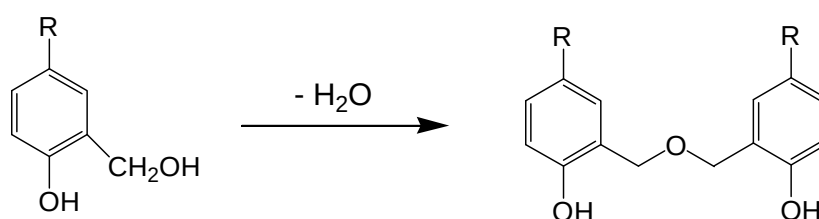


Fig. 14 : Formation de l'éther diarylique.

On observe également que les conditions très basiques sont favorables à la formation prédominante du diarylméthane.

Toute fois, cette tendance est inversée en milieu acide ou neutre. Le mécanisme de formation des oligomères linéaires est envisagé par le passage par un intermédiaire, de type *o*-quinométhide [19], qui va réagir en ortho d'un ion phénate par réaction de type Michaël [20,21] (Fig. 15).

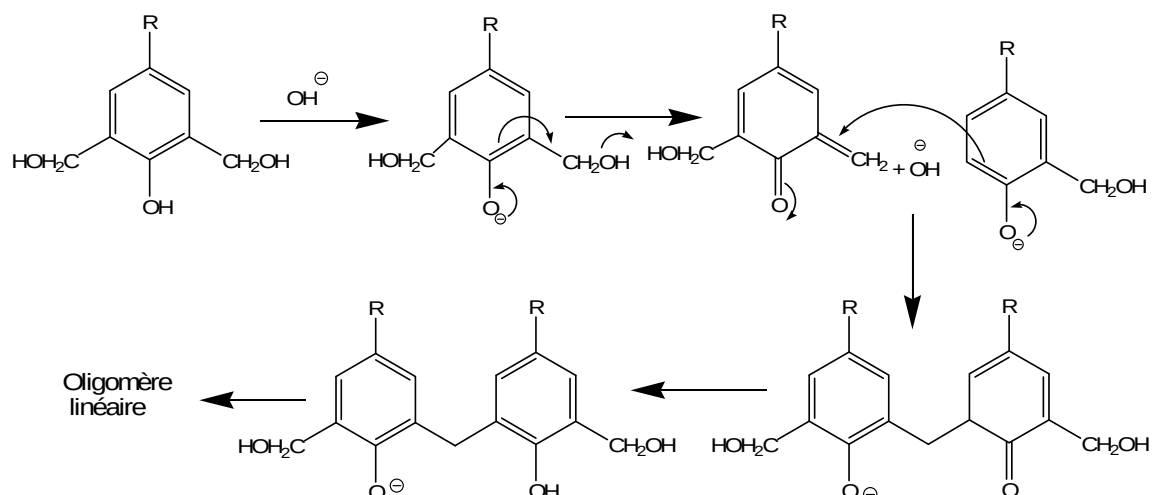


Fig. 15 : Formation des oligomères linéaires.

• Cyclisation des oligomères linéaires

Le mécanisme de transformation des oligomères linéaires, en calixarène souffre encore d'imprécision. Pour ce qui concerne le *p*-*tert*-butylcalix[4]arène, Vocanson et coll. [22] ont montré qu'il se forme au cours des premières étapes un ensemble d'oligomères linéaires hydroxyméthylés et dihydroxyméthylés comprenant 1 à 4 noyaux phénoliques.

Gutsche et coll. [23,24,25] proposent deux hypothèses pour la formation du calix[4]arène.

❖ la première hypothèse suppose que, le précurseur de ce macrocycle est un tétramère linéaire, mono ou dihydroxyméthylé. Ce tétramère linéaire existant en conformation zig-zag à l'état solide [20,21] subit un rapprochement de ses extrémités favorisé par une température élevée et la présence d'une base. Ce pseudo calix[4]arène subit ensuite une cyclisation par départ d'eau (cas du tétramère monohydroxyméthylé) et de formaldéhyde (cas du tétramère dihydroxyméthylé) (Fig. 16).

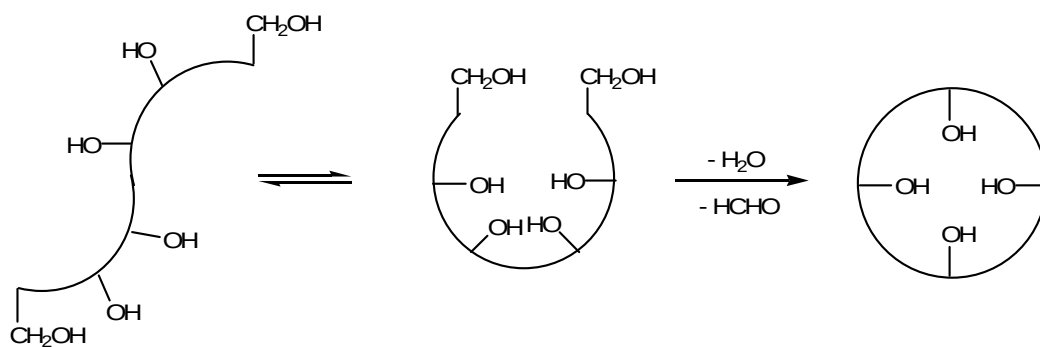


Fig. 16 : Cyclisation d'un oligomère linéaire.

❖ Dans la deuxième hypothèse, deux dimères linéaires dihydroxyméthylés réagissent par formation de liaisons hydrogènes, intermoléculaires stabilisantes (entre les groupes hydroxyle) pour donner un dimère appelé «hémicalix[4]arène»; ce dernier pourrait se cycliser par départ d'eau et de formaldéhyde (Fig. 17).

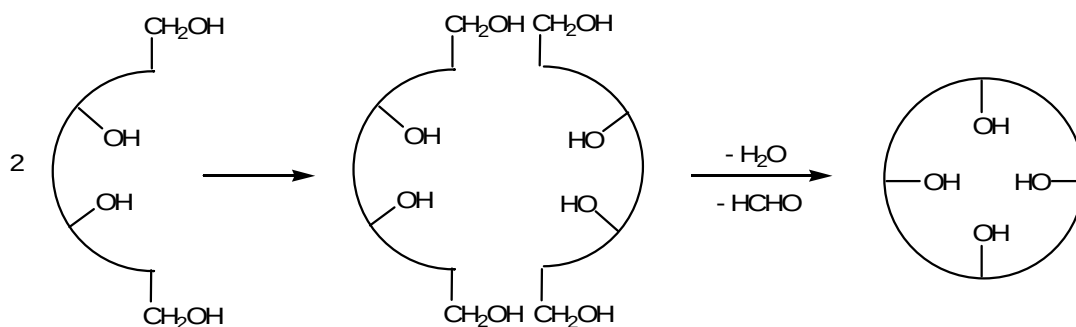


Fig. 17 : Cyclisation de deux dimères.

Cependant, Gutsche réalise des expériences complémentaires où il démontre que du calix[4]arène se forme à partir de calix[8]arène, chauffé à reflux dans du diphénylèthère et en présence de soude. Ce processus appelé «mitose moléculaire» est représenté par le schéma ci-dessous (Fig. 18).

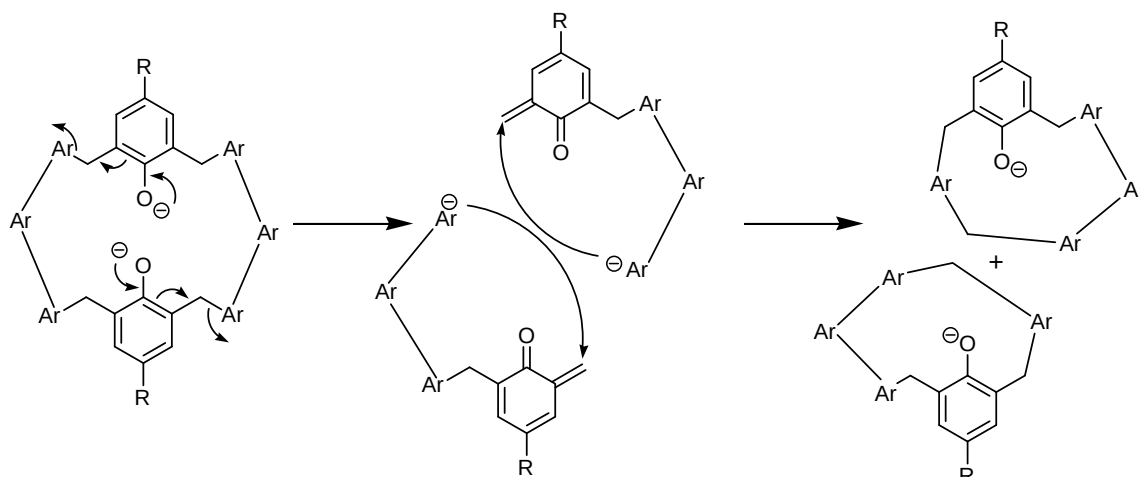


Fig. 18 : Transformation du calix[8]arène par mitose moléculaire.

I.1.6. Fonctionnalisation des calix[4]arènes

Les calix[4]arènes sont le plus souvent utilisés, comme plate-forme pour la construction d'édifices supramoléculaires. Le *p*-tert-butylcalix[4]arène, en dépit de son architecture cyclique attrayante, présente peu d'aptitude à la reconnaissance moléculaire [26-28] du fait de la petite taille de sa cavité.

De ce fait, de nombreuses modifications chimiques ont été effectuées. Les deux sites qui sont chimiquement les plus modifiés sont :

- les positions *para*, pour les substitutions électrophile (SO_3H , NO_2 , COCH_3 , Br, CN, COOH).
- Les positions hydroxyles par estérification ou éthérification (OC(O)R ; OR).

Le calix[4]arène peut également subir des modifications, au niveau des ponts méthyléniques et des positions méta des noyaux aromatiques (Fig. 19). Ces modifications se font par synthèse multi-étape [29,12].

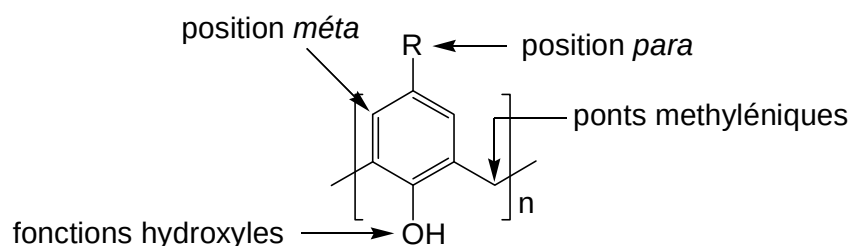


Fig. 19 : Sites fonctionnalisables sur un calixarènes.

I.1.6.1. Fonctionnalisation des positions *para* des noyaux aromatiques

Les groupes tert-butyles peuvent être enlevés d'une façon complète [30] ou sélective [31,32] en protégeant en outre, les OH des phénols non concernés. C'est une réaction de transalkylation, qui se fait en présence d'AlCl₃, dans un solvant aromatique tel que le toluène.

Les calix[4]arènes détertiobutylés ainsi obtenus, conduisent à des substitutions électrophiles : acylation, halogénéation, chlorométhylation, aminométhylation, sulfonation, nitration...etc. La sulfonation [33,34] et la nitration [35] peuvent être aussi conduites par ipso-substitution des groupements tert-butyles par l'acide sulfurique ou nitrique.

I.1.6.2. Fonctionnalisation des groupements hydroxyles des calix[4]arènes

La structure cônique du calixarène non substitué est favorisée par l'existence de fortes liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les groupes hydroxyles libres [36]. Cette conformation n'est plus nécessairement préservée en présence du calixarène tétra-O-alkyle [37], dès lors que de telles interactions n'existent plus.

Cette observation a permis d'expérimenter de multiples procédures d'estérification ou d'éthérification visant à contrôler la fonctionnalisation non seulement régios-[38-49] mais également stéréo-[49-54] sélective.

En outre, il a été démontré que par la mise en œuvre d'un effet d'ion support ("effet template") [51,54,55], relatif à la nature et à la force de la base utilisée, il était possible à façon et de manière stéréospécifique d'incorporer différents substituants sur la partie basse du calixarène (particulièrement en forme cône). Le nombre et la position des sites substitués dépendent aussi du choix du solvant, de la température, du temps de réaction et du ratio molaire entre les réactifs et la base. Toute fois, la réactivité et la taille du substrat halogéné jouent aussi un rôle non négligeable dans ce type de réaction.

Gutsche [5a,5b] (Fig. 20) à résumé les principales voies de substitution dans un schéma présentant l'éventail de possibilités qu'elles offrent. Nous rappellerons ci-après les éléments relatifs à la monosubstitution et à la disubstitution en positions 1 et 3 qui ont fait l'objet de toutes nos attentions durant ce travail de thèse.

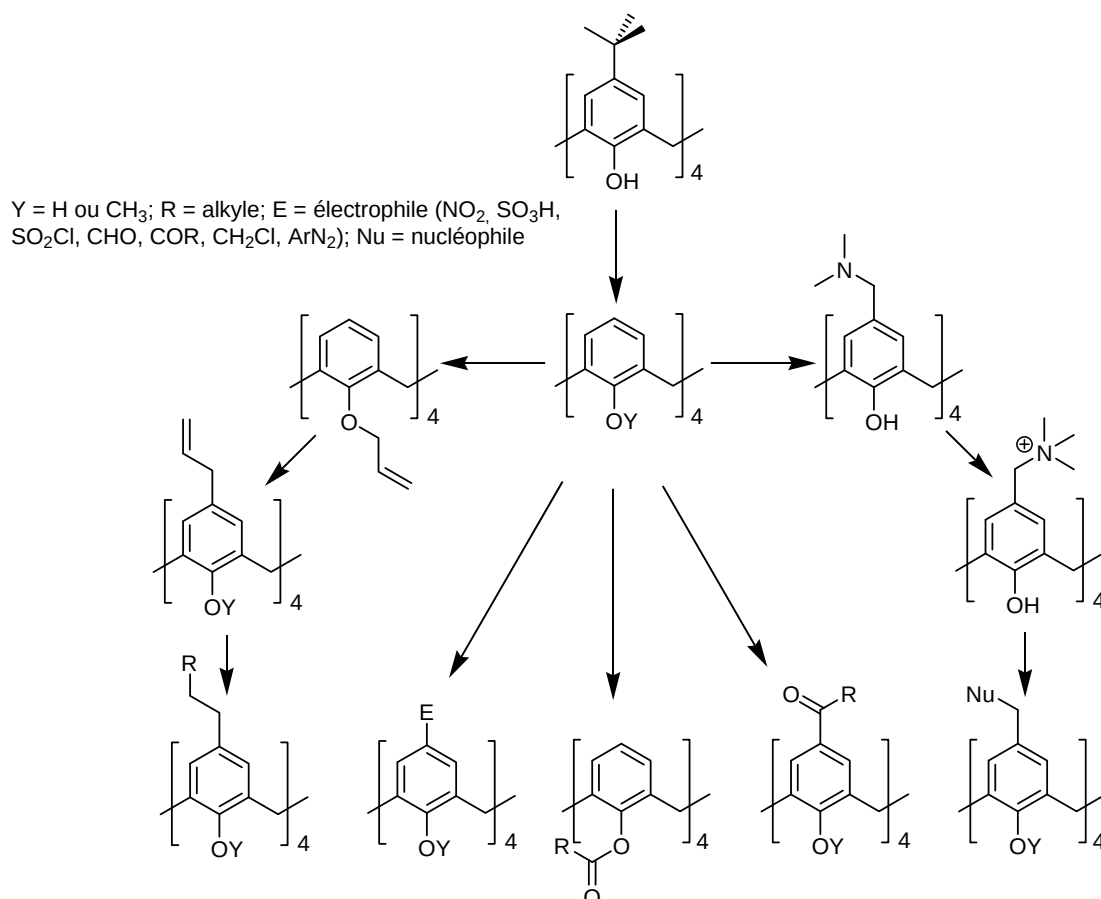


Fig. 20 : Premières et principales voies de substitutions des calix[4]arènes.

I.1.6.2.1. Monosubstitution sur la partie basse du calix[4]arène

Plusieurs méthodes font état de la synthèse des calix[4]arènes monosubstitués, sur la partie basse. Certaines font intervenir des techniques de protection-déprotection [44,56,57] à partir de calixarènes bis-1,3- ou tétraalkylés et traités à l'iodotriméthylsilane ((CH₃)₃Sil) avec une stœchiométrie précise. Mais, nombreuses sont les méthodes qui concernent l'éthérification de la plate-forme par voie directe (Tableau 1), même s'il est particulièrement difficile d'éviter la formation des espèces

poly-fonctionnalisés. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature une méthode générale limitant le processus de fonctionnalisation à l'espèce monosubstituée.

- Les méthode 1 et 2 : elles sont basées sur l'emploi de carbonates alcalins dans l'acétonitrile et mettent en jeu les différents pka des protons hydroxyles du calixarène. Reinhoudt [58] et Regnouf de Vains [59] emploient respectivement le carbonate de potassium (K_2CO_3) et l'hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$) dans l'acétonitrile.

Toute fois, si l'emploi de $NaHCO_3$ aboutit à une plus grande sélectivité (71%) que l'utilisation de K_2CO_3 (43%), il a été observé la formation de composé bis 1,3 fonctionnalisé ("distal") en quantité non négligeable.

- La méthode 3 : Elle s'est longtemps basée sur l'utilisation d'une base forte (NaH) dans un solvant apolaire, le toluène [57]. Pappalardo développe un procédé utilisant l'hydruure de sodium (NaH) dans le toluène. Il observe la formation d'un mélange équilibré de composés mono-, bis-1,3- et -1,2-, tris- et tétra-substitués en utilisant NaH dans la DMF (solvant polaire dissociant les paires d'ion $O^- \dots Na^+$) rendant ainsi les anions phénoxydes disponibles [60]. Il déduit que le toluène réduit considérablement la réactivité de ces oxyanions. Shinkaï [47,61] déduit que cet effet de solvant, conjugué aux propriétés d'acidité des protons hydroxyles et à la réactivité de l'électrophile, l'imite énergétiquement la fonctionnalisation du calixarène au stade de la monosubstitution.

- Méthode 4 : Griegg [62] et Shinkaï [47] utilisent le dihydroxyde de baryum octahydrate ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$) associé à l'oxyde de barium BaO dans la DMF à température ambiante comme procédé de mono O-alkylation du calixarène par diverses fonctions alkyles, benzyles [47] ou bipyridyles [62].

Des quatre méthodes, la méthode 1 est la plus sélective, dans la mesure où elle mène principalement au composé monosubstitué avec un rendement de 71% (produit isolé). Même si le rendement de mono fonctionnalisation (36%) par la méthode 2 est limité, celle-ci reste intéressante puisqu'elle permet une séparation plus facile par chromatographie sur colonne (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$, 99:1).

Méthode	Base	Nombre d'éq.	Solvant	Température.	Tp (h)	%Mono isolé	% Autres isolés	Ref
1	NaHCO ₃	1 éq.	MeCN	Reflux	24	71	7 % bis-1,3	[58]
2	K ₂ CO ₃	0,6 éq.	MeCN	Reflux	18	43	16% bis-1,3	[59]
3	NaH	2 éq.	Toluène	Reflux	4	50	19% bis-1,3	[47,57] [60,61]
4	Ba(OH) _{2,8} H ₂ O BaO	1,1 éq.	DMF	Ambiante	28	36	18% tris	[62, 57]

Tableau 1 : Résumé des voies de synthèse du calix[4]arène mono-fonctionnalisé par monoalkylation sélective.

I.1.6.2.2. Disubstitution-1,3 et 1,2

❖ Disubstitution-1,3

Bon nombre d'auteurs; Ungaro et Reinhoudt [38,42], shinkai [52], Pappalardo [63], Beer [64], Ziessel [65] ainsi que Regnouf de Vains [59] décrivent plusieurs procédés de synthèse de calix[4]arènes-1,3 disubstitué par des groupements alkyls, aryls, hétéro ou bis-hétéroaryls (picoline, quinoline, bipyridines). Et, l'utilisation de carbonates alcalins (Na₂CO₃ ou K₂CO₃) dans l'acétone ou l'acétonitrile en présence d'un excès électrophile s'est révélée efficace, car les produits disubstitués ont été synthétisés de manières très sélectives (Fig. 21).

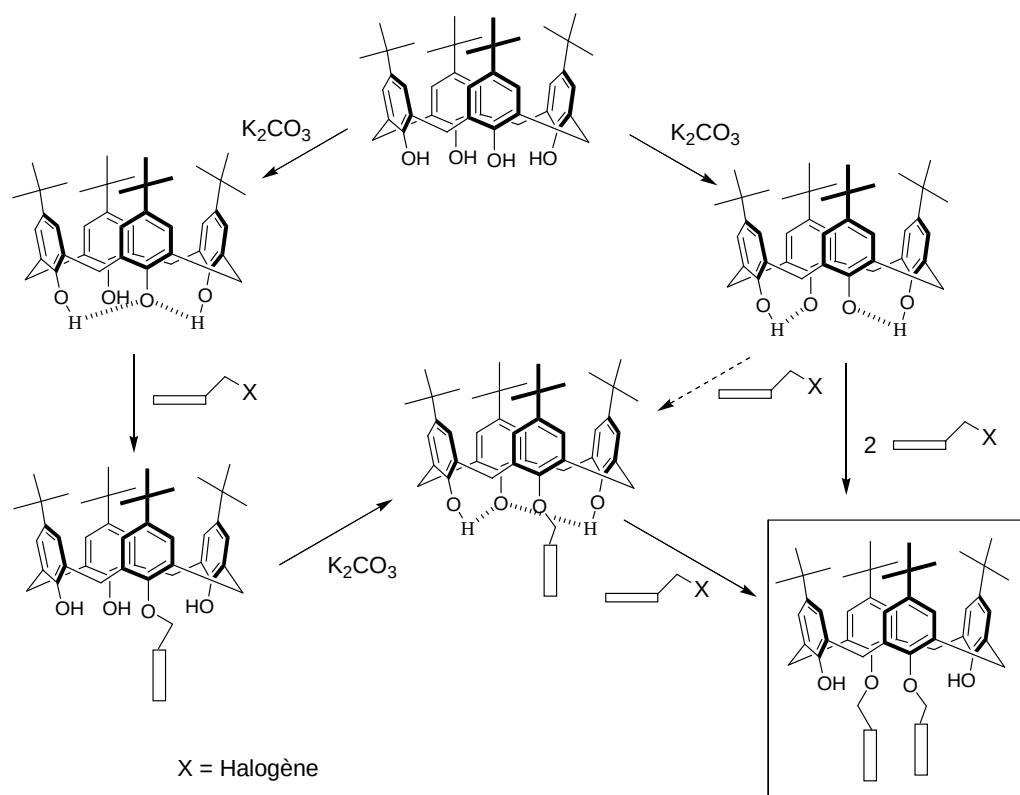


Fig. 21 : Hypothèse de mécanisme réactionnel de la bis-1,3-O-alkylation du *p*-tert-butylcalix[4]arène.

❖ Disubstitution 1,2

En 1989, Pappalardo [60] isole pour la première fois un calix[4]arène bis-1,2-fonctionnalisé en faisant réagir le chlorhydrate de la 2-(chlorométhyl)-pyridine sur le *p*-tert-butylcalix[4]arène, en présence d'un excès de NaH dans la DMF anhydre.

Depuis, plusieurs procédures de disubstitution 1,2 [42,44,46] ont été développées. Certaines sont issues des processus de "protection-déprotection" [47,66] Reinhoudt [44] a démontré que les calix[4]arènes 1,2-di-O-alkylés correspondaient en général aux produits cinétiques des réactions de tétrafonctionnalisation et pouvaient être isolé avec des rendements de 5 à 55%, selon la nature des électrophiles, les ratios molaires en base et en agent alkylant, la température ainsi que le solvant utilisé (MeCN ou DMF).

Shinkai [67] fait réagir 2,2 équivalents de bromométhylbenzène dans l'acétonitrile, en présence de 2 équivalents de NaH. Il obtient un mélange de calix[4]arènes mono et polysubstitués (bis-1,2-, bis-1,3-, tris et tétra). Dans les mêmes conditions mais avec 5 équivalents de NaH, il obtient un mélange de composés bis-1,2- (58%) et tétrasubstitué (22%), sans dérivé mono ni bis-1,3-fonctionnalisé.

Regnouf-de-Vains [65] fait une adaptation de la méthode mise en au point par Pappalardo [63], (DMF anhydre, 5 équivalents de base, 2,2 équivalents d'agent alkylant, 60°C pendant 1 heure) pour greffer deux motifs bipyridyles sur deux noyaux phénoliques adjacents. Il isole ainsi le produit bis-1,2- (36%).

I.1.6.2.3. Trisubstitution

Nous avons trouvé dans la littérature plusieurs procédures, qui consistent à synthétiser le macrocycle trisubstitué en deux étapes, à partir des composés préfonctionnalisés 1,3- [53] ou 1,2- [63,61] traité par l'hydruure de sodium ou par le carbonate de césium (Cs_2CO_3) dans la DMF.

Mais, la seule voie d'accès directe pour ce type de podant est l'usage de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, associé à 8 équivalents de BaO dans la DMF [36,37,47] qui préserve le calixarène fonctionnalisé dans la conformation cône par le fort "effet template" du cation Ba^{2+} (Fig. 22). La stabilité de l'isomère cône est obtenue grâce aux fortes interactions de Ba^{2+} avec un phénoxyde de sorte que la réaction s'arrête au niveau de la trisubstitution [47].

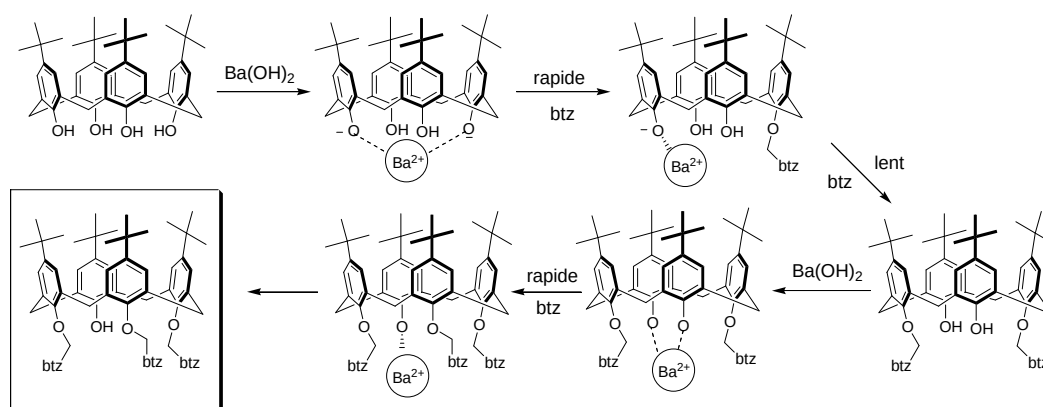


Fig. 22 : Hypothèse de mécanisme réactionnel de la tri-O-alkylation du calix[4]arène par le bithiazole.

I.1.6.2.4. Tétrastitution

C'est en théorie, la plus simple des fonctionnalisations du calixarène; car elle ne présente pas de difficultés du point de vue de la régiosélectivité. Toute fois, une base assez forte (NaH ou tBuOK) est nécessaire pour déprotoner les quatre sites hydroxyles. Gustche [53,65] a décrit la formation du calixarène tétra anionique par traitement de la couronne phénolique en présence de NaH dans la DMF, ce tétraanionique existant sous forme de cône et la coalescence d'inversion conformationnelle ayant lieu à 80°C. Lorsque l'électrophile est suffisamment réactif (bromure d'allyle), l'utilisation d'une base moins forte K_2CO_3 en excès (10 équivalents) suffit pour donner lieu à la tétrastitution [68,69]. Avec une base de type K_2CO_3 , les calix[4]arènes tétrastitués sont obtenus majoritairement dans la conformation cône [68,69].

L'utilisation de Cs_2CO_3 dans l'acétone conduit à des produits tétrastitués en conformation cône partiel dans le cas où le groupement partant est plus petit que le tosylé ou l'iodure [52].

I.1.7. Le calix[4]arène en RMN¹H et ¹³C

Les études par RMN du proton et du carbone 13 ont permis de mieux comprendre les propriétés structurales de ces composés. Nous avons vu que le calix[4]arène, grâce à la libre rotation des liaisons *sigma* des ponts méthyléniques, adoptait quatre conformations différentes, la conformation cône étant la plus stable.

Cette conformation permet l'obtention de spectres RMN de proton simplifiés, une évaluation très précise de l'organisation spatiale nos fonctionnalités localisation des charges par exemple), nécessaire pour une bonne corrélation "structure activité". Nous avons donc l'obligation, à chaque étape de synthèse, de nous assurer que la conformation cône était conservée. Les outils d'analyses dont nous disposons sont la RMN de proton et du carbone 13. Ces techniques d'analyse étant les plus simples d'accès et les plus courantes, nous allons en rappeler quelques points.

I.1.7.1. Détermination de la conformation par RMN ^1H

Soit à considérer un calix[4]arène non substitué (ni sur le col supérieur, ni sur le col inférieur), la symétrie C_{4v} de la molécule simplifie l'interprétation du spectre RMN du protons. La structure du squelette calixarénique est déterminée par les signaux correspondant aux protons des ponts méthyléniques.

❖ Conformation cône

On observe la formation d'un système AB (8 H), tous les noyaux sont orienté dans le même sens (orientation *syn*) (Fig. 23). Les deux protons d'un même pont méthylénique (ArCH_2Ar) sont dans un environnement chimique différent avec des déplacements chimiques différents : Ils sont dits diastéréotopiques. Le couplage de ces deux groupes de protons (4 Hax et 4 Héq) crée un système AB (intégrant 8 H).

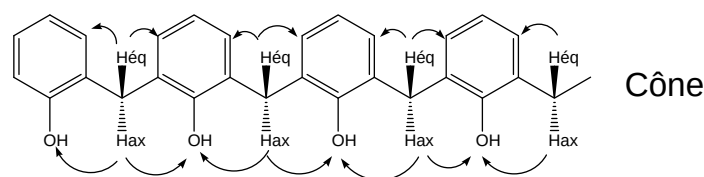


Fig. 23 : « Communication » des H des ArCH_2Ar dans la conformation cône en RMN ^1H .

❖ Conformation 1-3 alternée

Les noyaux phénoliques adjacents sont orientés de façon «anti» (c-à-d inversés les uns par rapport aux autres) (Fig. 24), de façon à ce que chaque proton d'un pont méthylénique voit à la fois un groupement hydroxyle et un proton phénolique. Les protons des ponts méthyléniques se trouvent donc dans un même environnement chimique, donc le même déplacement chimique. Les 8 protons des ponts méthyléniques (4 Hax et 4 Héq) sont alors identiques, ils sortent sous la forme d'un singulet.

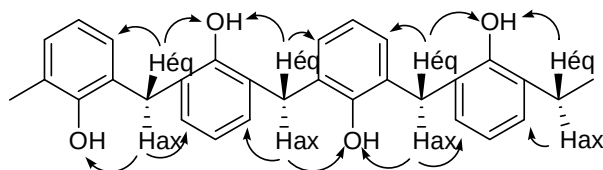


Fig. 24 : « Communication » des H des ArCH_2Ar dans la conformation «1-3 alternée» en RMN ^1H .

❖ Conformation cône partiel et 1-2 alternée

Les conformations cône partiel et 1-2 alterné ont pour spécificité, que deux des quatre ponts méthyléniques entourés de noyaux phénoliques en configuration «syn» alors que les deux autres sont entourés de noyaux en configuration «anti» (Fig. 25). On a alors une modification du spectre RMN. Quatre protons ArCH_2Ar , encadré par des noyaux «syn» sortent sous la forme d'un doublet. Les quatre autres protons entourés par des noyaux «anti» quand à eux sortent sous la forme d'un singulet.

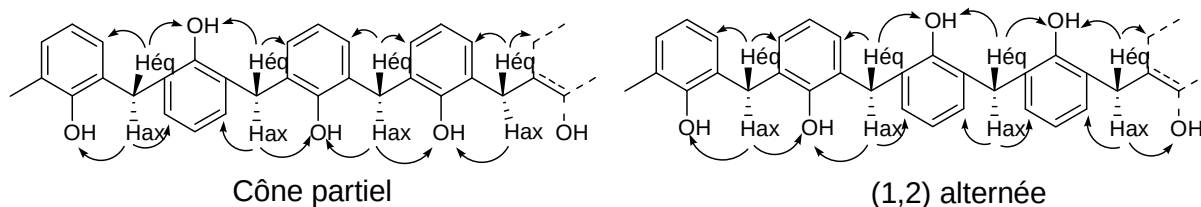


Fig. 25 : « Communication » des H des ArCH_2Ar dans les conformations cône partiel et 1-2 alternée en RMN ^1H .

I.1.7.2. Détermination de la conformation par RMN ^{13}C

Les analyses RMN ^{13}C qui ont été effectuées sur les calixarènes permettent d'abord de parfaire la caractérisation des ligands tant dans la partie aromatique que dans la partie alkyle. La RMN ^{13}C nous permet surtout de confirmer, la nature conique du squelette calixarénique selon la méthode empirique de de Mendoza et coll [70].

Selon ces travaux, les déplacements chimiques des carbones des ponts méthyléniques (ArCH_2Ar), se situent entre 31 et 34 ppm (Tab. 2) dans la conformation cône. Les carbones secondaires des ponts éthers OCH_2R sont localisés entre 72 et 78 ppm dans la même conformation.

Conformations	Orientation des noyaux adjacents	ArCH_2Ar équivalents	δ des ArCH_2Ar (ppm)
Cône	Syn.	4	30 – 33
(1-3) alternée	Anti	4	36 – 38
(1-2) alternée	Syn	2	30 – 38
	Anti	2	36 – 38
Cône partiel	Syn.	2	30 – 33
	Anti	2	36 – 38

Tableau 2 : Influence de la conformation du calix[4]arène sur les déplacements chimiques en RMN ^{13}C .

Cette méthode de détermination conformationnelle est d'autant plus intéressante que les déplacements chimiques des carbones sont indépendants de la nature des substituants placés sur le squelette calixarénique, que ce soit en *para* ou en *ipso* sur les noyaux phénoliques.

I.1.8. Purification des calixarènes

C'est une étape cruciale pour l'obtention de composés qui feront l'objet d'études biologiques. Elle se fait par chromatographie sur colonne, sur disque (chromatotron), par simple cristallisation, ou par chromatographie liquide haute performance (CLHP) [5a,5b] pour les petites quantités. Ainsi, les p-tert-butyl-calix[n]arènes à $n = 4, 6, 7, 8$ sont séparables par chromatographie liquide en phase inverse [71], sur colonne C18 avec comme éluant, l'acétonitrile et le tert-butyl-éther.

Plus récemment, la chromatographie en fluide supercritique (SFC) a été mise en œuvre dans le même but [72].

Pour ce qui concerne nos composés hydrosolubles, nous serons amenés à développer d'autres conditions chromatographiques analytiques.

I.2. CALIXARENES HYDROSOLUBLES

Dans la recherche de nouveaux calixarènes à visées thérapeutiques, l'hydrosolubilisation est une étape importante pour notre projet. Nous rappelons dans ce chapitre, les différentes voies synthétiques élaborées pour amener les calixarènes en phase aqueuse.

Le premier calixarène hydrosoluble fut synthétisé par Shinkai [73] en 1984, il s'agissait d'un dérivé sulfoné en *para* des noyaux phénoliques. Mais la première étude des propriétés complexantes des calixarènes en milieux aqueux fut établie par la mise au point du calix[4]arène-*tétra-p*-sulfonate de sodium et de son dérivé *per-O*-hexylé (Fig. 26).

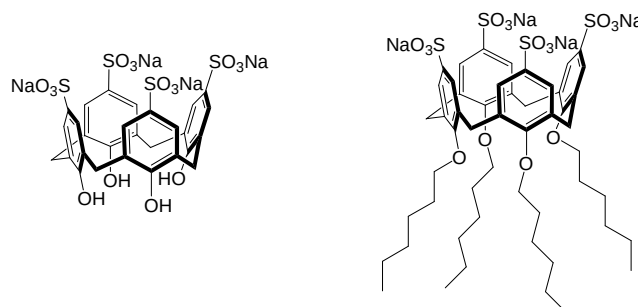


Fig. 26 : Les premiers calixarènes hydrosolubles.

L'adjonction de groupements chargé sur le calixarènes ont été tentées (Fig. 27), tant en *para* des noyaux phénoliques (couronne haute) qu'au niveau des groupements hydroxyles (couronne basse).

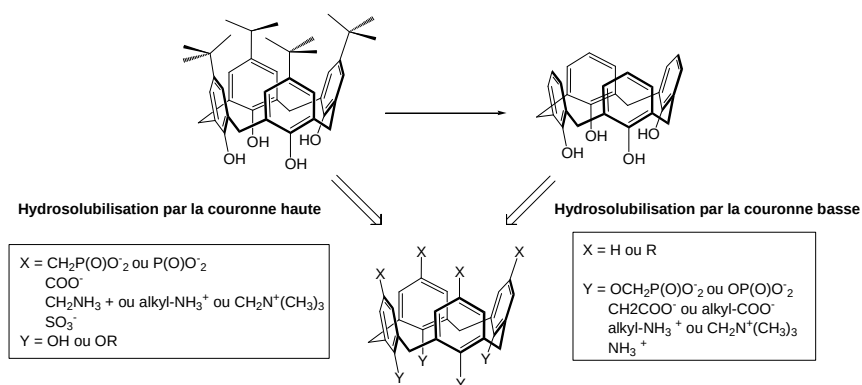


Fig. 27 : Fonctionnalisations hydrosolubilisantes des calixarènes via apport de charges.

I.2.1. Calix[4]arènes sulfonés

La sulfonation [73] est un des premiers procédés mis en œuvre pour parvenir à la solubilisation des calixarènes. La fonctionnalisation a lieu sur la couronne supérieure du calix[4]arène.

Il existe trois voies permettant d'accéder aux dérivés calixaréniques sulfonés (Fig. 28).

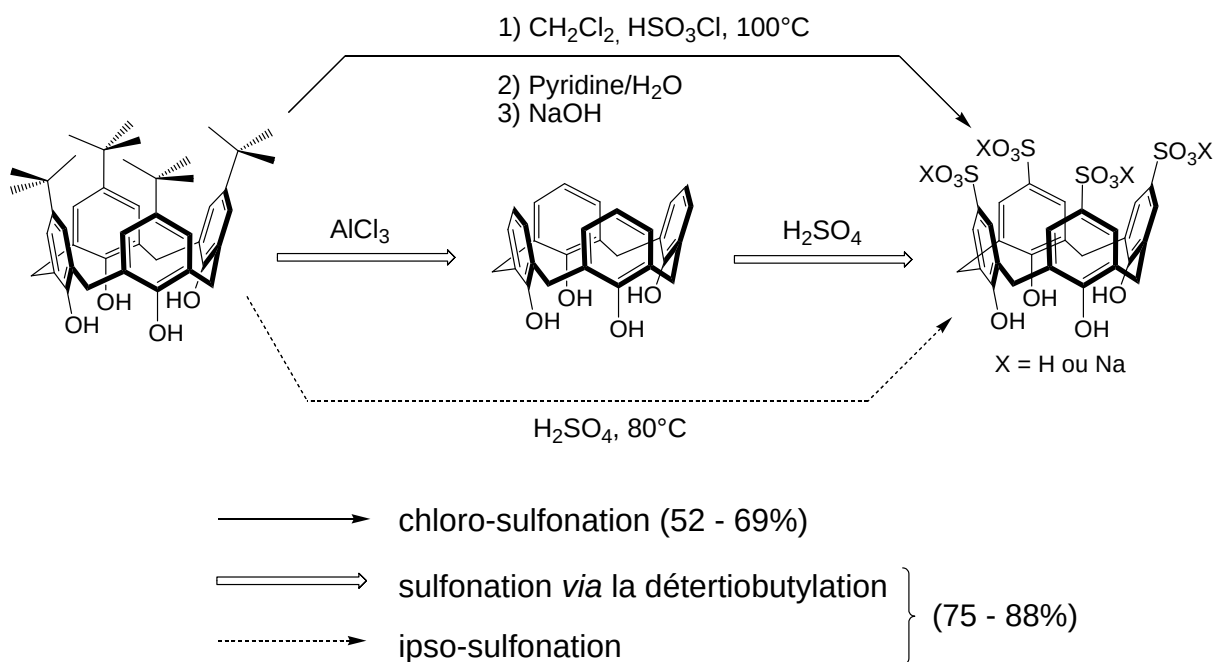


Fig. 28 : Voies de synthèse des dérivés sulfonés.

a) Sulfonation *via* la détertiobutylation

Cette méthode fut développée par Shinkai et coll [73] en 1984, elle permet la sulfonation en *para* du calixarène, en passant par une étape de détertiobutylation puis une réaction en présence d'acide sulfurique concentré à 100°C (Fig. 28).

b) Ipso-sulfonation

C'est Regnouf-de-Vains [33] qui développe cette méthode : le calixarène *tert*-butylé est traité en milieu sulfurique concentré à 80°C. Par cette voie, il s'affranchit de l'étape de détertiobutylation. Ce qui induit une baisse du coût de production dans le cadre d'une production industrielle (Fig. 28).

c) Chloro-sulfonation

Cette stratégie de synthèse consiste à traiter le calixarène en présence de l'acide chlorosulfonique. On obtient un dérivé chlorosulfonylé [74,75], qui à son tour subit une hydrolyse dans un mélange pyridine/H₂O puis une salification en milieu basique (Fig. 28).

1.2.2. Calix[4]arènes carboxylés

La carboxylation est, comme la sulfonation, une voie permettant d'accéder aux calixarènes hydrosolubles, par incorporation de ce groupement tant sur la partie haute que sur la partie basse du macrocycle (Fig. 29).

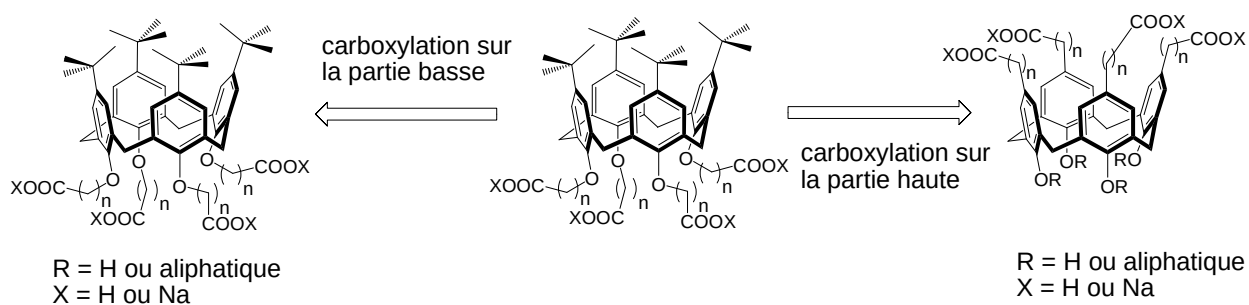


Fig. 29 : Sites de carboxylation des calixarènes.

I.2.2.1. Carboxylation sur la couronne haute

C'est Gutsche et coll. [76] qui mettent au point la première synthèse de calixarène carboxylés en *para*. Le calixarène subit tout d'abord une bromation radicalaire en *para* en présence de NBS (**b** Fig. 30), puis le *p*-bromo-calix[4]arène obtenu est traité successivement par le butyllithium et le dioxyde de carbone pour donner l'acide calix[4]arène tétra-*p*-carboxylique (**f** Fig. 30).

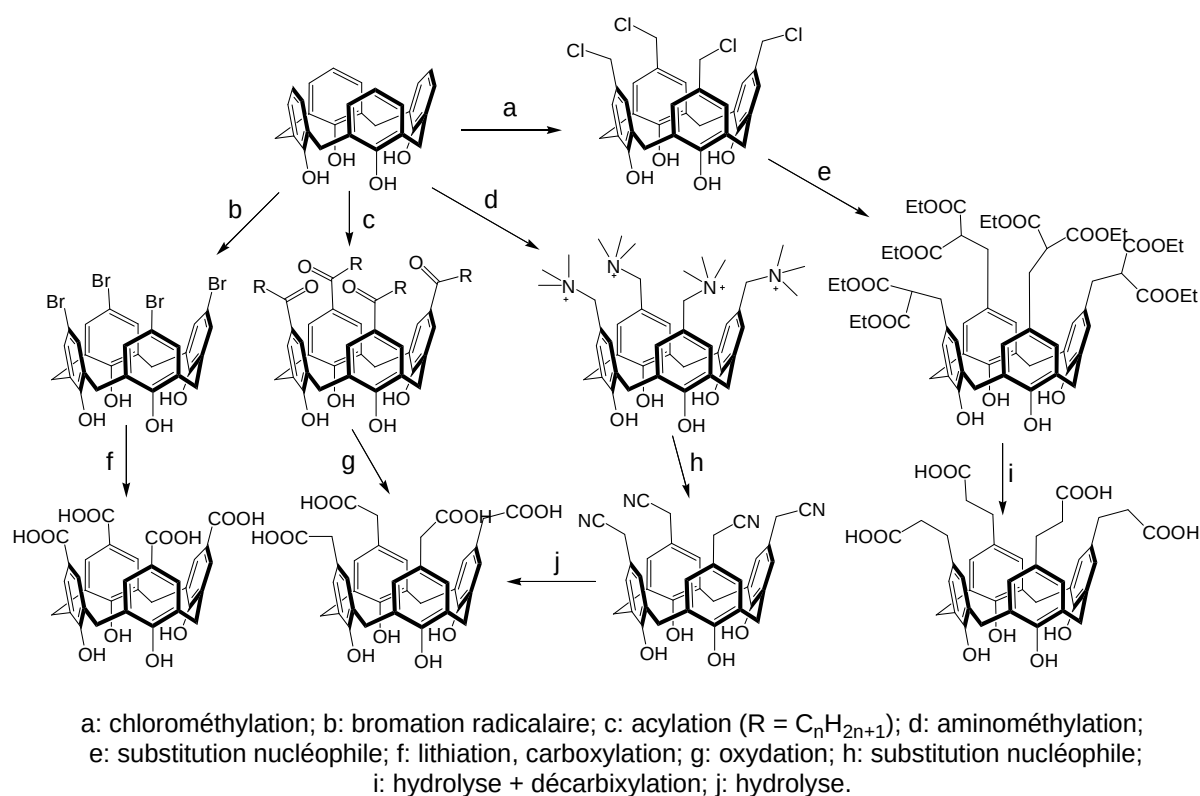


Fig. 30 : Voies de carboxylation sur la couronne supérieure.

En 1988, une autre méthode d'obtention des calixarènes *para* carboxylés est développée par Gutsche et coll [77]. Cette voie est dite des «quinones méthides» (Fig. 31).

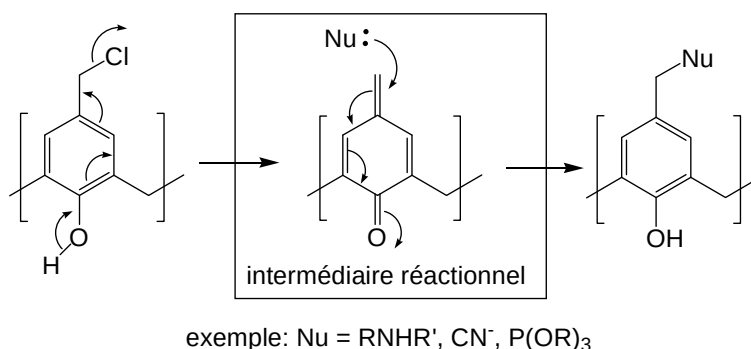


Fig. 31 : Substitution nucléophile d'un *p*-chlorométhyl-calixarène.

Quatre étapes sont requises pour l'obtention de dérivés carboxylés à partir du calixarène :

- 1) Aminométhylation en présence de formaldéhyde, et d'une amine secondaire (réaction de Mannich). Cette réaction permet l'obtention de l'amine tertiaire (**d** Fig. 31).
- 2) L'amine tertiaire (**d** Fig. 31) est facilement alkylée par l'iodure de méthyle pour donner un dérivé ammonium quaternaire propice à l'élimination sous l'action d'un nucléophile.
- 3) Addition du cyanure sur l'ammonium quaternaire pour donner le *per*-cyanométhyl-calixarène (**h** Fig. 31)
- 4) La dernière étape est une hydrolyse des fonctions nitriles pour former l'acide calixarène acétique correspondant (**j** Fig. 31) [78].

Une troisième voie de carboxylation est l'oxydation de fonctions préalablement greffées en *para*, telles que des groupements formyl [79] ou cétones [80,81]. En 1985 Gutsche suit la même voie, pour réaliser l'oxydation de *p*-acétyl-calixarène en acide correspondant (**g** Fig. 31).

En 1990 [79], une autre voie est développée. Elle utilise l'oxydation ménagée par un sel (hypobromite ou chlorite), qui produit l'oxygène natif, d'une *p*-cétone ou *p*-formyl calix[4]arène.

La dernière méthode consiste en une aminométhylation (**d** Fig. 31) [77] ou chlorométhylation (**a** Fig. 31) [82] en *para* du calixarène, suivie d'une addition de malonate d'éthyle sodé qui aboutit à un octa-ester (**e** Fig. 31). Ce dernier, traité à chaud par l'acide sulfurique donne l'acide calix[n]arène propionique (**i** Fig. 31) [83].

I.2.2.2. Carboxylation sur la couronne basse

Comme nous l'avons vu précédemment (chap 1.6), les groupements hydroxyles des calixarènes sont très réactifs. Ils présentent de ce fait, des sites d'encrage faciles d'accès pour de nombreux groupements, notamment des chaînes porteuses de fonctions carboxylées de type ester. L'obtention de ces composés est envisagée selon deux voies de greffage.

➤ Une substitution nucléophile de l'halogène d'un acide carboxylique α -halogéné (en excès), en présence d'une base forte [73c]. Il se forme dans ces conditions, le calixarène *per*-substitué en chaîne O-alkylcarboxylées, ainsi qu'un polyester acétique. Ce dernier est ensuite hydrolysé pour donner le produit attendu (Fig. 32).

➤ Une autre voie, beaucoup moins consommatrice du réactif de substitution à été développée, utilisant des esters α -halogénés [84]. Les conditions de greffage (base forte) sont identiques et sans risque de réaction de polymérisation.

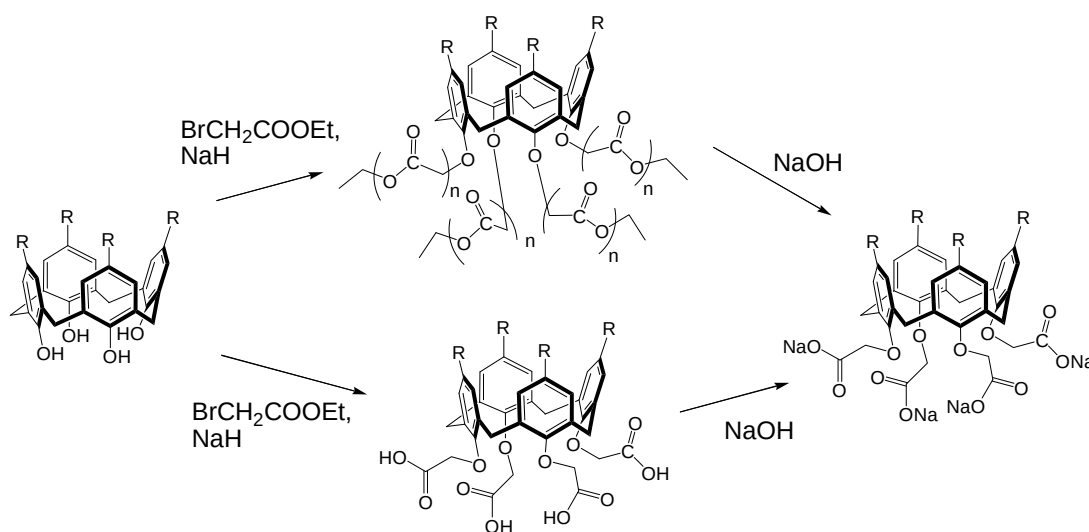


Fig. 32 : Voies de carboxylation sur la couronne inférieure.

➤ Ungaro et coll. développent la synthèse de structure calixarénique mixte, c-à-d comportant des fonctions carboxylates en couronne basse et des fonctions sulfonates en couronne haute (Fig. 33) [85,86,87]. Ils ont recours aux esters α -halogénés pour carboxyler la couronne inférieure, puis à une sulfonation à l'aide de H_2SO_4 pour la fonctionnalisation de la couronne supérieure.

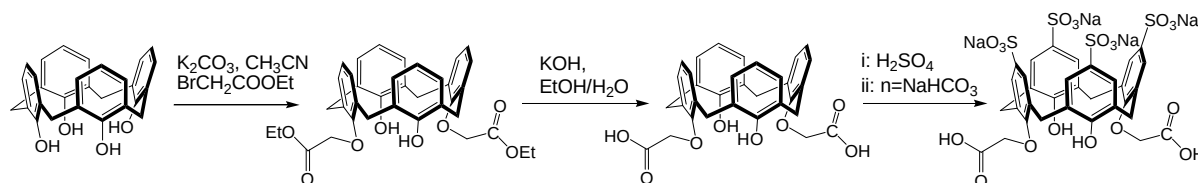


Fig. 33 : Synthèse de calix[4]arène mixte : carboxylé-sulfoné.

I.2.3. Les calix[4]arènes phosphonés

A l'instar de la sulfonation ou de la carboxylation, l'introduction des fonctions phosphonées sur l'une ou l'autre des deux couronnes du calixarène conduit à des composés hydrosolubles. Toutefois, cette voie d'hydrosolubilisation reste peu exploitée. Les stratégies qui ont été développées concernent autant l'introduction des groupements phosphonés, en *para* des noyaux phénoliques (composés p-phosphoniques) que sur les fonctions hydroxyles aboutissant aux composés phosphoriques (Fig. 34).

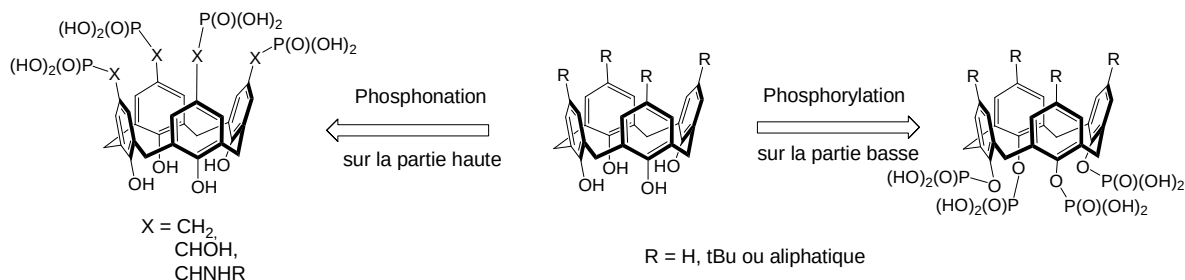


Fig. 34 : Phosphorylation et phosphonation du calix[4]arène.

I.2.3.1. La phosphonation de la partie haute du calix[4]arène.

La première méthode décrite en 1989 [82-89] (**b** Fig 35) consiste à phosphoner un *p*-chlorométhyl-calix[*n*]arène à l'aide de triéthyl phosphite à reflux (**a** Fig. 35). L'ester phosphoné obtenu est alors hydrolysé en présence de bromo-triméthyl-silane (BTMS), l'acide obtenu est alors neutralisé pour donner le sel correspondant (**c** Fig. 35) [90].

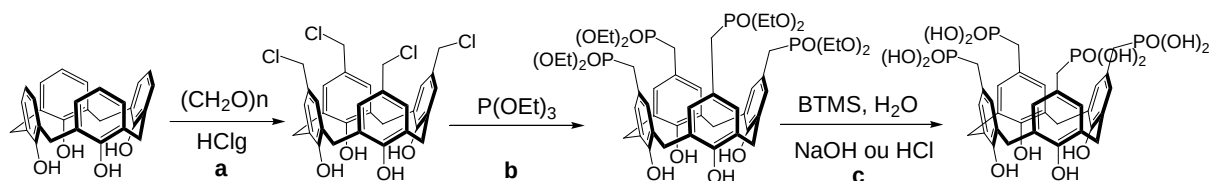


Fig. 35 : Phosphonation par la triéthyl phosphite [90].

❖ En 1992 Kalchenko et al. [91] réalisent la *p*-phosphonation des calixarènes via une *p*-halogénéation du calix[4]arène (**d** Fig 36). Ce dernier est par la suite transformé en *per-p*-phosphonoester correspondant (**e** Fig 36), sous l'action d'une trialkyl-phosphite à reflux dans le benzonitrile. Le *per-p*-phosphonoester peut ensuite être hydrolysé à l'aide de BTMS pour donner l'acide phosphonique (**f** Fig 36).

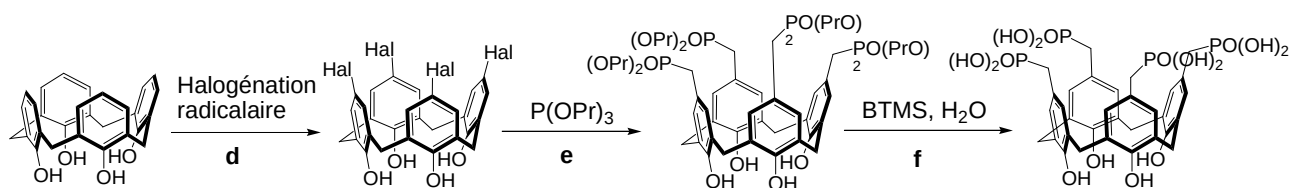


Fig. 36 : Phosphonation via un *p*-halogéno-calix[*n*]arène [91].

❖ La dernière voie de synthèse passe par la formation du *p*-formyl-calix[*n*]arène (**g** Fig. 37) [92]. Ce dernier réagit avec le composé trialkyl-phosphite pour donner l'ester phosphoné (**h** Fig. 37) puis des composés hydroxyméthyl-phosphorés (**i** Fig. 37). Mais l'aldéhyde peut également être transformé en une imine (**j** Fig. 37), phosphonable par l'action de trialkylphosphite et du sodium (**k** Fig. 37). Dans ce cas,

le calixarène amino-méthyl-phosphoné est obtenu aussi par l'action du BTMS sur le dérivé phosphoné (I Fig. 37).

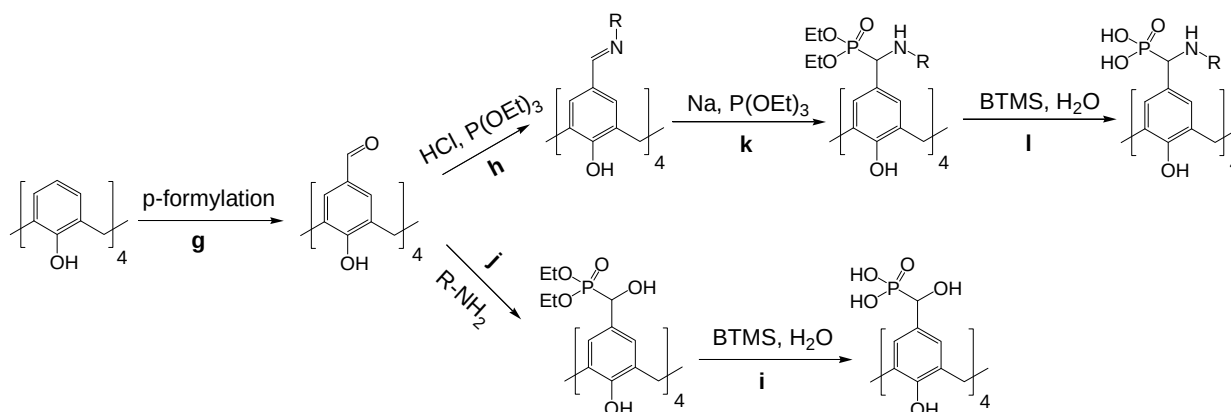


Fig. 37 : Voie de phosphonation la plus récente [92].

1.2.3.2. La phosphorylation de la partie basse du calix[4]arène.

La technique qui a été développée [23] pour la phosphorylation en couronne basse permet également d'apporter une hydrosolubilisation de la structure calixarénique. Le calixarène réagit avec un ester chloro-phosphonique, un composé ester est obtenu puis hydrolysé à l'aide de BTMS (Fig. 38).

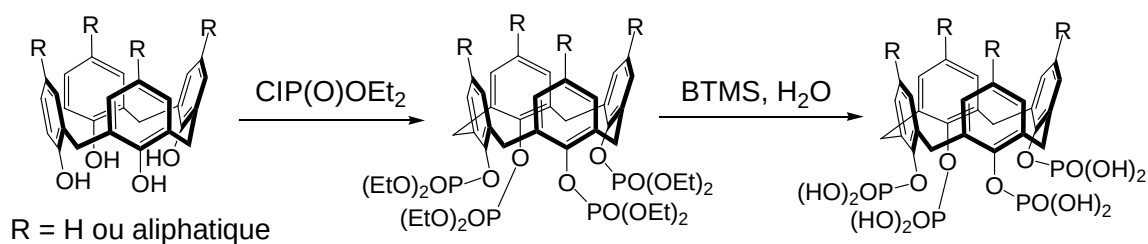


Fig. 38 : Phosphorylation en couronne basse [93].

D'autres groupements phosphonés ont été introduits sur les calixarènes par des bras méthyléniques, éthyléniques ou propyléniques de type (bromo-alkyldiéthyl) phosphonate [94]. (Fig. 39)

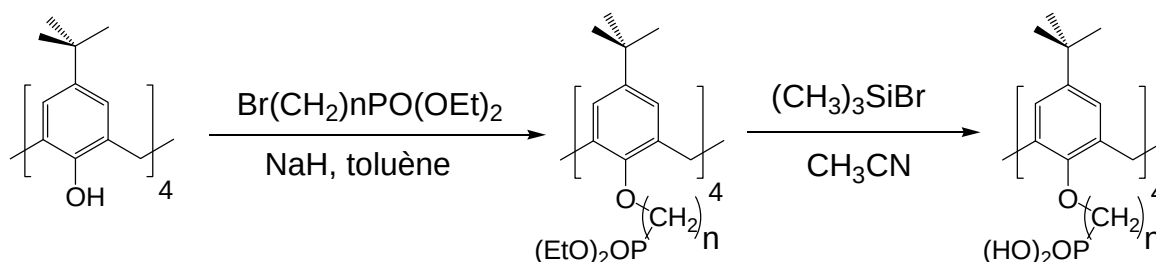


Fig. 39 : Phosphonation en couronne basse [94].

I.2.4. Amination hydrosolubilisante

Cette voie d'hydrosolubilisation se définit comme le greffage de fonction NR_2 en *para* des noyaux phénoliques [77,95] ou par une réaction d'aminodéhydroxylation [96,97] des fonctions phénoliques. Elle se distingue des précédentes voies par sa capacité à apporter aux calixarènes un caractère hydrosoluble à pH acide, par protonation.

I.2.4.1. Amination sur la couronne haute

L'amination des calixarènes en couronne haute peut se faire par plusieurs voies (Fig. 40)

- Celle où une amine secondaire réagit sur le composé intermédiaire *p*-chlorométhylcalix[4]arène pour donner le *p*-diméthylaminométhylcalix[4]arène.
- Soit par réaction directe de Mannich [95] sur le calix[4]arène en présence de formaldéhyde et d'une amine secondaire. On obtient, comme dans la première voie, le *p*-diméthylaminométhylcalix[4]arène. Ce dernier est transformé en dérivé ammonium quaternaire par réaction avec l'iodure de méthyle [95]. Le dérivé ammonium, par une réaction d'élimination, se transforme en quinoneméthide. Cette dernière va à son tour subir une addition nucléophile de l'ion cyanure pour donner le dérivé *p*-cyanométhylé [77], aisément réductible en *p*-aminoéthylcalix[4]arène (7 fig. 40), en présence de BH_3 :THF dans le THF [77].

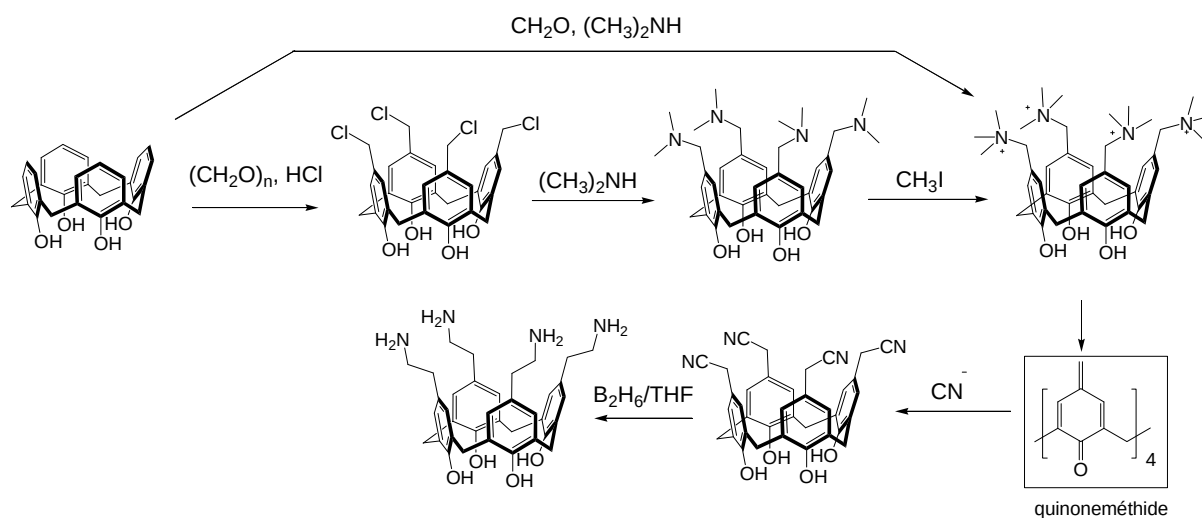


Fig. 40 : Synthèse de calixarènes aminés en couronne haute.

➤ Une autre voie repose sur la nitration directe du calixarène détertibutylé [80], ou par voie *ipso*, du calixarène tertibutylé [98]. Le composé nitré ainsi obtenu subit une dernière étape de réduction (Ni Raney/NH₂NH₂ [99] ou SnCl₂ [100]) pour donner l'amine aromatique correspondante (Fig. 41).

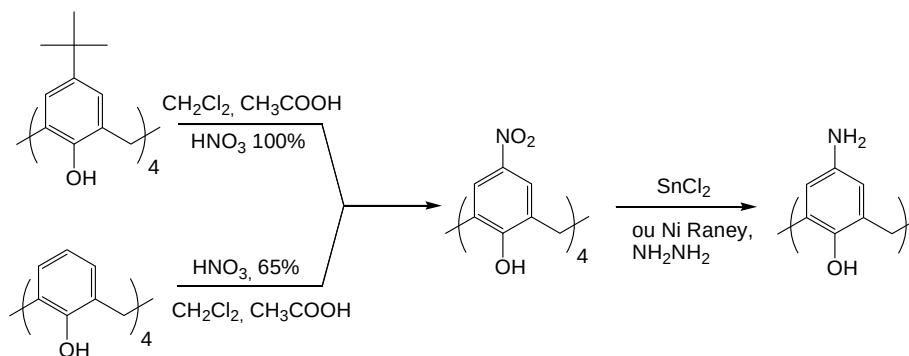


Fig. 41 : Amination via la nitration.

➤ La dernière voie envisagée est le couplage diazoïque, en présence du sel de p-carboxybenzènediazonium (Fig. 42). Il se forme un composé azo, qui est réduit par un mélange soude/hydrosulfite de sodium donnant ainsi l'amine attendue. [101]

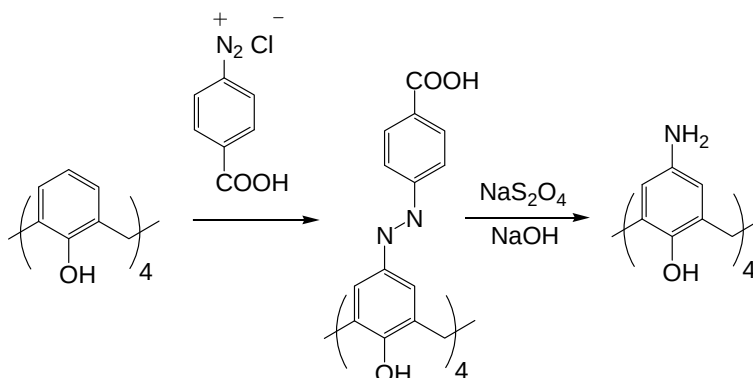


Fig. 42 : Amination à l'aide d'un azo-calixarène [101].

I.2.4.2. Amination sur la couronne basse

C'est une aminodéhydrogénation, au cours de laquelle les groupements amines remplacent les hydroxyles phénoliques. C'est Shinkai [96] en 1992 qui développe cette méthode. L'obtention de l'amine passe par une spirodienone (intermédiaire oxydé) [97], qui est réduite et convertie en imine sous l'action de l'amidure NH_2^- avec NH_3 comme solvant.

I.3. CALIXARENES AVEC HETEROCYCLES AZOTES

Du fait de leurs propriétés complexantes d'ions métalliques, les systèmes hétérocycliques azotés ont fait l'objet d'un certain nombre d'investigations, avec pour objectif la génèse de nouveaux systèmes chélatants au pouvoir coordonnant maîtrisé par l'organisation spatiale des hétérocycles. Parmi ces derniers, le laboratoire s'est particulièrement intéressé aux motifs 2,2'-bipyridines (diméthylées en 6- et 6'-, ou en 5- et 5'-), ainsi qu'aux motifs 2,2'-bithiazoles (diméthylé en 4- et 4'-). (Fig. 43). Nous rappelons ici les principaux travaux de greffage sur la partie basse du calix[4]arène par des hétérocycles de type pyridine, bipyridine et bithiazole.

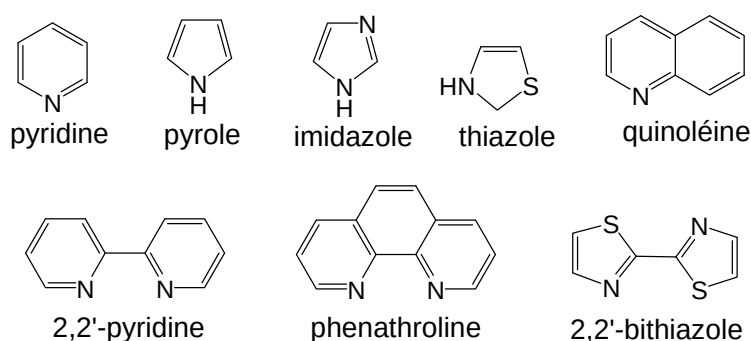


Fig. 43 : Exemples d'hétérocycles greffables sur les calixarènes.

I.3.1. Les calix[4]arènes pyridylés et bipyridylés

Les premiers calixarènes greffés en partie basse par des hétérocycles, sont développés à la fin des années 80. En effet, en 1989, Pappalardo et coll. désirent élargir les propriétés chélatantes des calixarènes aux ions de métaux de transition. Par ces travaux [50, 63], ils présentent la synthèse de dérivés mono-, di-, tri- et tétra-substitués sur les fonctions phénoliques par des motifs 2-picoline. (Fig. 44)

Ces travaux présentent également un autre intérêt, car ainsi, la méthodologie de « fonctionnalisation régiosélective pilotée par la force des bases » ou « base strenght driven regioselective alkylation » a été développée. [63]

La base déprotonante utilisé dans ce procédé est le NaH, avec des ratios calixarène/ 2-chlorométhylpyridine variables en fonction des différentes entités recherchées.

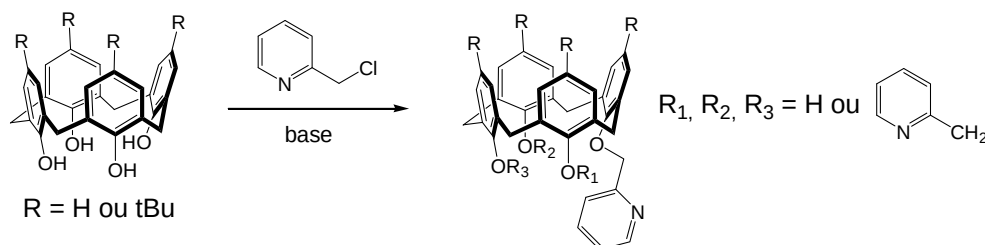


Fig. 44 : Calix[4]arène étherifié par des picolines [50].

Les premières bipyridylation du calix[4]arène ont été décrites par Beer et coll. en 1992 [102]. Ils greffent deux groupements bipyridines sur les fonctions hydroxyles du calixarène, en position distale (1,3), en présence d'une base faible, le K_2CO_3 [102] (Fig. 45).

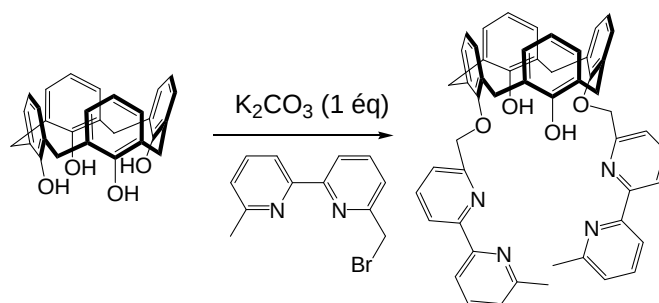


Fig. 45 : Synthèse du 1,3-Bis(bipyridyl)-méthylèneoxy-calix[4]arène.

Ces calixarènes porteurs d'unités bipyridiniques, se sont révélés intéressants, car présentant de très bonnes propriétés de complexation des ions Cu^+ et Ag^+ en phase organique.

Regnouf de Vains et coll., [103] ont pu vérifier par diffraction des RX la structure tétraédrique du complexe mononucléaire (ML) $[CuL]PF_6$, avec $L = 1,3$ -(bis-bipyridyl)-2,4-(bis-picolyl)-tétra-*p*-tert-butyl-calix[4]arène (Fig. 46).

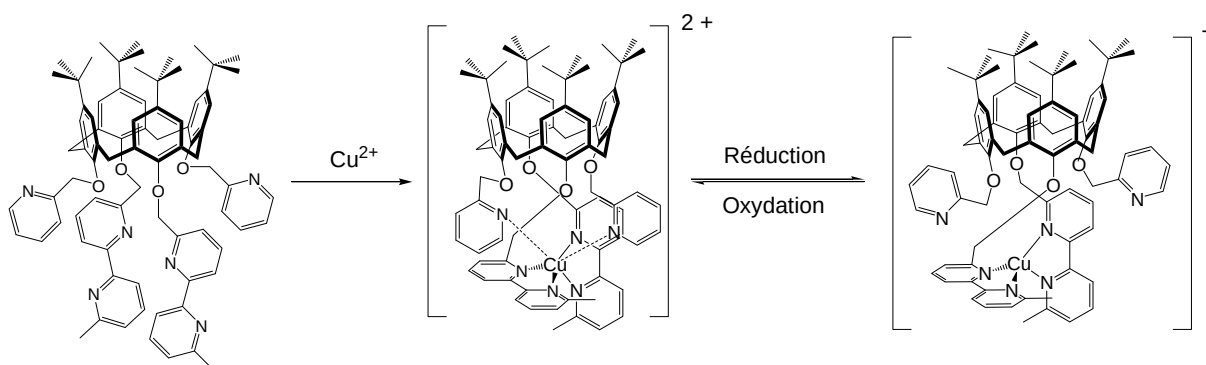


Fig. 46 : Complexe de Cuivre(I) à structure tétraédrique.

Regnouf-de-Vains [59] confirme donc comme Beer [102], le greffage de groupements bipyridines en position 1,3 sur les fonctions hydroxyles du calixarène. Mais il adapte et développe en même temps la stratégie de Pappalardo et al. [50,63],

pour moduler le nombre et le positionnement de bipyridines sur la plate-forme calixarénique. En jouant sur la force des bases utilisées et le solvant (Fig. 47), il parvient à greffer régio-sélectivement les groupements bipyridines en positions 1, 1-2, 1-3, 1-2-3, 1-2-3-4 [59].

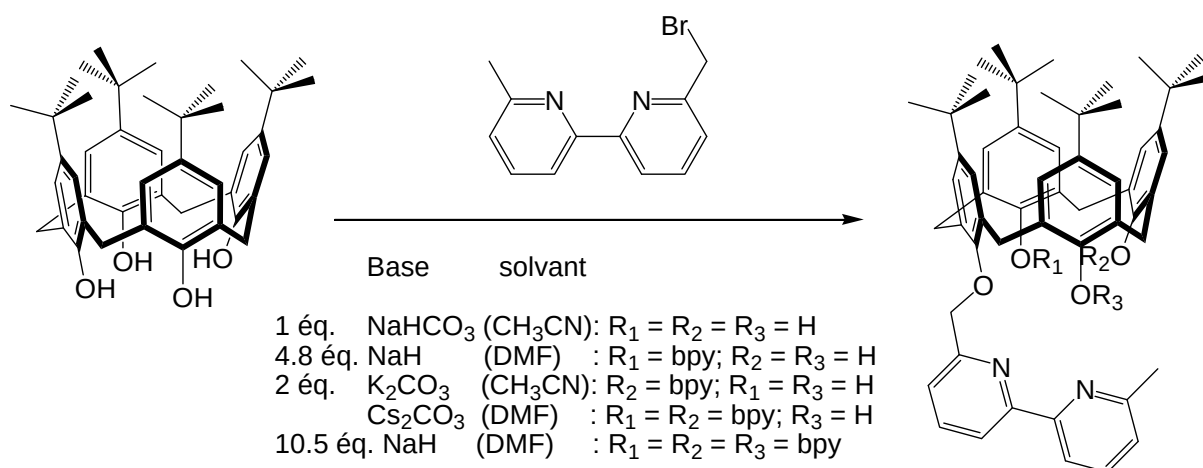


Fig. 47 : Modulation du greffage en fonction de la force des bases.

Les dérivés calixaréniques tri- et tétra-substitués ont permis d'envisager la coordination en mode octaédrique d'autres ions de métaux de transition.

Regnouf de Vains a testé cette possibilité, en greffant sur la couronne basse deux bipyridines et deux pyridines en positions alternées, le but étant de réaliser un ligand versatile susceptible de coordonner les ions Cu^+ ou Cu^{2+} au cours d'un processus redox, en faisant intervenir le potentiel de modulation de la sphère de coordination liée au passage d'un état d'oxydation à l'autre (tétraèdre pour le cuivre(I), octaèdre pour le cuivre(II)). Toutefois, la préparation du complexe de Cu^{2+} de ce ligand n'a pas pu être réalisée, bien que son existence ait pu être démontrée par spectrométrie de masse, car ce ligand présente un fort pouvoir stabilisant du cuivre(I), entraînant, même en présence de solvant anhydre, l'autoréduction du cuivre(II). Cette capacité de complexer ces deux états d'oxydation du cuivre a pu être cependant démontrée avec le système bithiazole.

Les greffages de bipyridines ne sont pas limités à l'emploi de l'unité 6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine; en effet, plusieurs études ont aussi porté sur le greffage de 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine. Les premiers composés synthétisés par Ziessel [65] ont été utilisés pour complexer les cations lanthanides Eu(II) et Tb(II) et étudier leurs propriétés de luminescence.

Grigg et al [104] développent une série de ligands mono-bipyridyle intégrant un greffage en position 4-, pour étudier les complexes de Ru(II)(bipy)₃ correspondants en tant que sondes luminescentes sensibles au pH.

En 1995, Sabbatini et al. [105], comparent les propriétés de complexes de lanthanides obtenus avec des ligands calixaréniques porteurs soit de la 6,6'-diméthyl-, soit de la 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine et démontrent une meilleure complexation par ces derniers, liée à des phénomènes conformationnels et d'encombrement stérique.

Notons enfin le travail réalisé par Regnouf de Vains et coll [88-110], qui ont transposé des études de calix[4]arènes bis-hétérocycliques complexant de cations métalliques en phase organique, vers la complexation en phase aqueuse. Leur approche repose sur l'introduction de différentes fonctions hydrosolubilisantes, phosphonates [88], sulfonates [106] ou carboxylates [110] sur la partie haute des calixarènes, ou de fonctions carboxylates greffées directement sur les motifs bipyridine [107, 108] (Fig. 48).

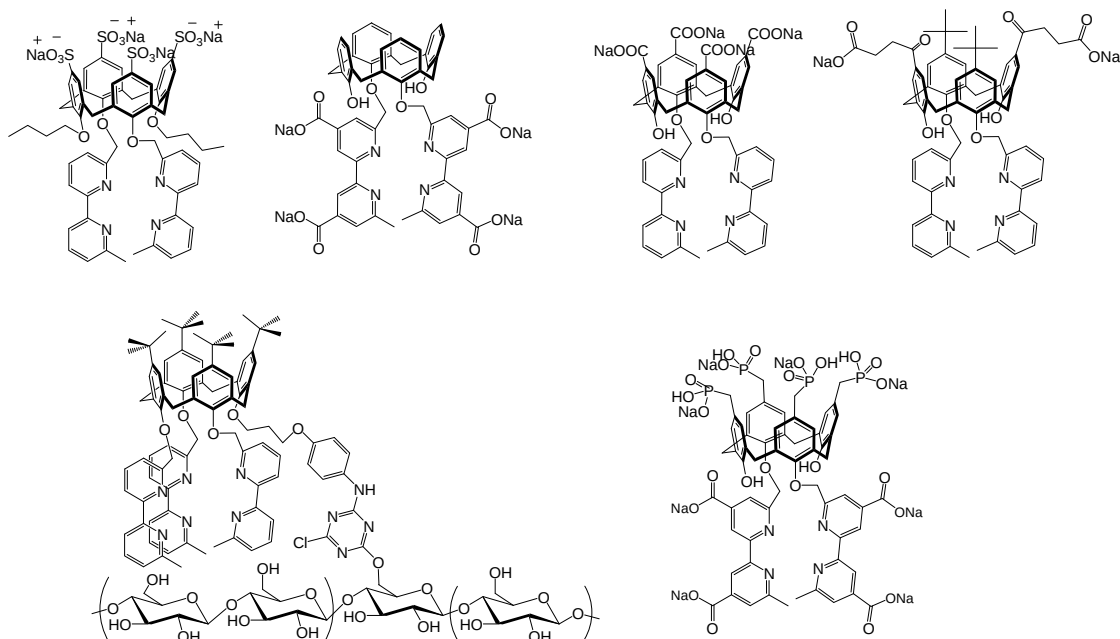


Fig. 48 : Quelques calix[4]arènes bipyridylés hydrosolubles.

Une autre voie de transposition en phase aqueuse des propriétés complexantes de podands calixarènes-hétérocycles a été développée par Engrand et al. [109], consistant au greffage de ces entités chélatantes sur un polymère Dextran hydrosoluble.

Le développement de calixarènes bipyridylés hydrosolubles a fait l'objet d'un travail mené par M. Mourer au laboratoire (thèse 2006) [111] qui utilise la plate-forme calixarénique porteuse de groupement hydrosolubilisant cationiques de type ammonium et guanidinium insérés sur la couronne haute. Ces composés ont été développés dans l'hypothèse d'une activité anti-infectieuse, et seront présentés plus loin.

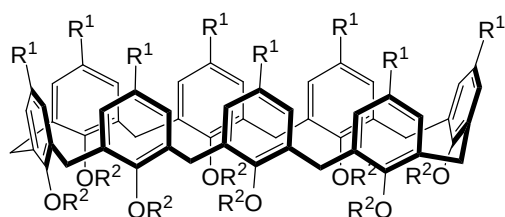
I.4. DES CALIXARENES A LA BIOLOGIE

Grace à leurs propriétés originales (conformation, rigidité, réactivité), les calixarènes ont depuis quelques années, trouvé un champ d'application dans de nombreux domaines de la chimie; cependant, en thérapeutique, peu de travaux ont été développés.

Deux récentes publications, celles de De Fátima [112] et de Kalchenko [113], font état des avancées sur le développement des calixarènes comme agents potentiellement attractifs sur le plan thérapeutique ou biomédical. Les calix[4]arènes sont ainsi présentés comme des entités chimiques biologiquement actives et / ou pouvant servir de molécule hôte à la vectorisation de principes actifs.

I.4.1. Activités Antibactériennes

Les propriétés antibiotiques des calixarènes ont été révélées, au travers des études menées dès 1955 par D'Arcy Hart et Conforth sur le Macrocydon (Fig. 49). C'est un dérivé poly-oxy-éthylé du calix[8]arène, probablement polymérisé, conçu comme analogue cyclique du phényl éther correspondant (Triton WR-1339), surfactant non ionique et évalué en tant qu'agent anti-tuberculeux [114].



Macrocydon : $R^1 = C_8H_{17}$ et $R^2 = (CH_2CH_2O)_n-H$
ou n est une moyenne 12,5

HOC-60 : $R^2 = (CH_2CH_2O)_{59}C_2H_5$

Fig.49 : Le Macrocydon, calix[8]arène antituberculeux et le HOC-60 [114].

Les récentes études ont démontré que le Macrocydon après avoir été absorbé par les macrophages, *via* endocytose, va perturber le métabolisme lipidique. Cela

suppose que l'activité anti-mycobactérienne s'exprime en inhibant la triglycérider lipase et une phospholipase extracellulaire, bloquant de ce fait, la multiplication bactérienne.

Le HOC-60 est un dérivé du Macrocydon, avec des chaînes polyoxyéthyléniques beaucoup plus longues. Il présente la faculté d'activer la multiplication bactérienne *via* la stimulation de ces mêmes enzymes [115-117]. Malheureusement, le mécanisme d'action exact de ces composés reste cependant mal appréhendé. L'étude de ces composés reste toute fois d'actualité, car la tuberculose reste encore une des principales causes de mortalité parmi les maladies infectieuses sévissant dans certaines régions du monde (Afrique, Asie...etc).

D'autres études menées par Casnati et al., ont porté sur les propriétés antibiotiques de calixarènes pontés en couronne haute par des motifs peptidiques (**a-d** Fig. 50), en

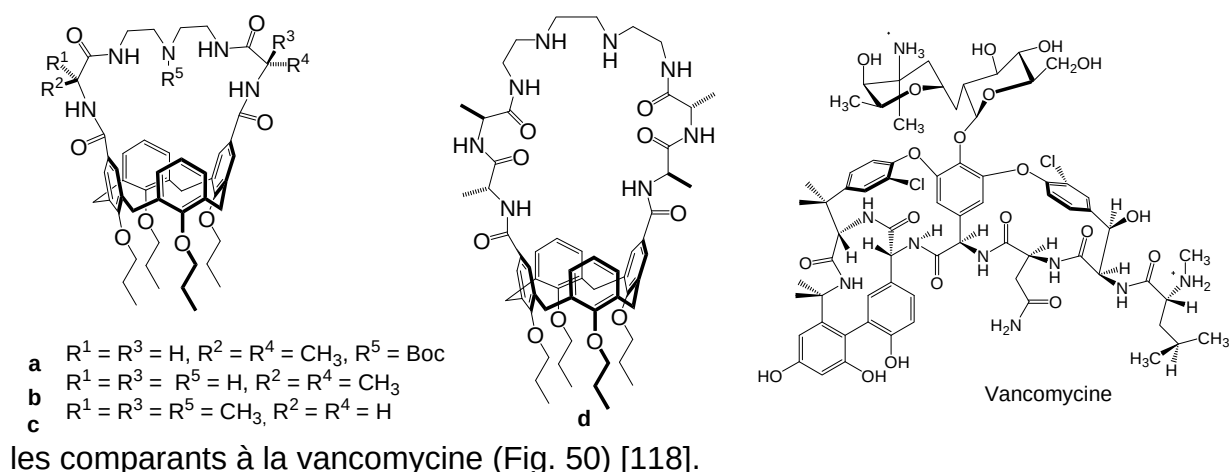


Fig. 50 : Différentes structures peptido-calixaréniques étudiée en tant que mimes de la vancomycine.

Isolée en 1950, la vancomycine [119] est produite par des microorganismes (*Amycolatopsis orientalis*) et a été cliniquement utilisée en 1959. Son mécanisme d'action est connu, le squelette peptidique se complexe à la partie terminale [L-lysyl-D-alanyl-D-alanine] d'un mucopeptide précurseur de la paroi bactérienne. Cette

fixation par liaison *hydrophobe* inhibe alors la synthèse de la paroi ce qui entraîne la lyse de la cellule.

Les résultats des tests menés par Casnati et coll (Tableau 3) [118] montrent, au travers des concentrations minimales inhibitrices (CMI), des activités “modérées” à “bonnes” (4 à 8 mg/L) pour les peptidocalixarènes diastéréoisomères présentés en figure 50 (**b et c**). Ils présentent une activité légèrement inférieure à celle de la vancomycine (2 mg/L). On note par contre l'absence d'activité, aussi bien pour la vancomycine que pour les peptidocalixarènes testés, sur la souche Gram négative *E. coli* 1852 (MIC < 128 mg/L) [118]

Germes (Gram +)	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI, mg/L)		
	Vancomycine	Composé b	Composé c
<i>S. aureus</i> 663	2	8	8
<i>S. aureus</i> 853	2	16	8
<i>S. aureus</i> 1131	2	4	4
<i>S. epidermidis</i>	2	4	8
<i>B. cereus</i>	2	4	NT

S. aureus 663 = sensible à la pénicilline, *S. aureus* 853 = résistant à la pénicilline, *S. aureus* 1131 = résistant à la méthicilline, NT = non testé.

Tableau 3 : CMI (mg/L) des peptido-calixarènes testés et de la vancomycine sur certains germes à Gram +.

Les mêmes travaux ont montré que certaines modifications structurales des structures **b** et **c**, par protection de la fonction amine centrale par un groupe tert-butoxycarbonyl (a Fig. 50), ou par l'agrandissement de la chaîne peptidique (**4 d** Fig. 50), entraînait une perte considérable de l'activité antibactérienne : entre 32 et 64 mg/L pour le composé **a** et 32 mg/L pour le composé **d** [118].

Ce projet se base sur une hypothèse initiale de mode d'action, qui repose :

1) sur une interaction entre la paroi bactérienne réputée porteuse d'une charge globale négative, et un ensemble de charges positives organisées et

contraintes sur un support moléculaire plus ou moins rigide, Dans le cas du CX1, le calix[4]arène joue le rôle d'organisateur spatial de groupes chargés positivement de type guanidinium (Fig. 51).

2) sur un effet supramoléculaire lié à la proximité contrainte de ces cations, générant une activité biologique non rencontrée avec les cations indépendants.

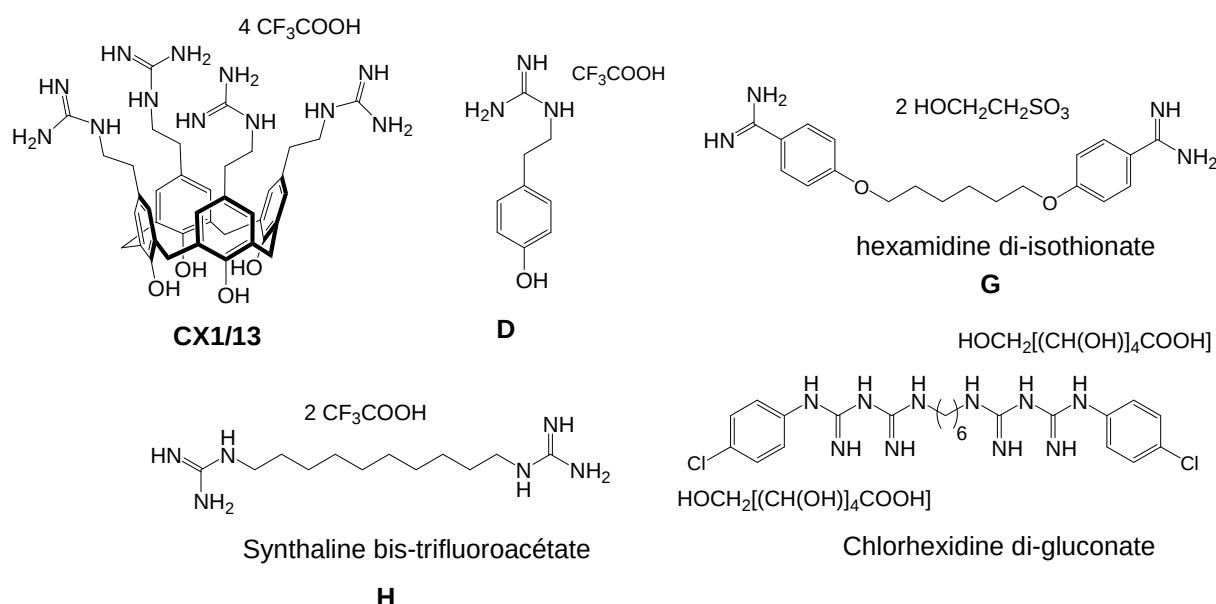


Fig. 51 : Structures de différentes molécules testées [120].

Dans le cadre de ce projet, les propriétés antibactériennes du tétra-*para*-guanidinoéthylcalix[4]arène CX1 ont été évaluées face à son analogue monomérique, le *para*-guanidinoéthylphénol ainsi que face à l'hexamidine (Hexomédine®), antiseptique bis-amidinique très utilisé, choisi comme référence dans cette étude du fait de sa relative ressemblance fonctionnelle, sur cinq souches bactériennes de référence : 2 Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 3 Gram positif, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et ATCC 29213, et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. En parallèle,

les effets des trois composés sur la viabilité de cellules eucaryotes MRC-5 en culture ont été évalués en utilisant un test MTT (ou bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium ou sel de tétrazolium).

Les résultats obtenus lors de cette étude confirment l'absence d'activité antibactérienne du composé monomérique (**D** Fig. 53) (CMI $\geq$ 512 mg/L) et montrent une activité du CX1 comparable à celle de l'hexamidine, à la fois sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (CMI = 4 mg/L pour *E. coli*, 8 mg/L pour les deux souches de *S. aureus*) et un peu moindre sur *E. faecalis* et *P. aeruginosa* (CMI = 32 mg/L) [9,10,11,14].

En même temps, les composés monomériques et calixaréniques n'induisent que peu de modification de la viabilité des cellules MRC-5 et ce jusqu'à 168 heures pour des concentrations atteignant 10^{-4} mol/L, alors que l'hexamidine présente un effet considérable et évoluant au cours du temps, et ce, à des concentrations 100 à 1000 fois moindres.

Cette étude tend à confirmer l'hypothèse initiale faite sur l'importance de l'organisation du *para*-guanidinoéthylphénol en son tétramère cyclique **CX1** pour la genèse d'une activité antibactérienne comparable à celle d'un antiseptique très utilisé.

A la suite de cette première étude, le **CX1** (tétraganidinoéthyl, cyclique), son monomère (guanidinoéthyl, **D**), l'hexamidine (bis-amidine linéaire, commercial, **G**), la chlorhexidine (bis-biguanidinium linéaire, commercial), et la Synthaline A (bis-guanidinium non commercial, **H**), ont été re-évalués sur les souches de référence citées plus haut, et sur un ensemble de souches d'origine clinique (Isolats cliniques) présentant diverses résistances aux antibiotiques, et certaines Bactéries Multirésistantes (BMR).[122,125] Les résultats de ces évaluations sont donnés dans le Tableau 4.

Concentration Minimale Inhibitrice (CMI, mg/L)					
Souches de références	CX1	D	G	Chlorhexidine	H
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	512	8	<1	64
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8	512	4	<2	64
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8	512	<1	<1	16
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	32	≥512	2	<1	256
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	32	≥512	32	4	128
Isolats cliniques					
<i>EcR1</i>	2	512	8	<1	64
<i>MRSA</i>	8	512	2	<1	64
<i>EfR1</i>	8	>512	2	8-16	256
<i>EfR2</i>	64	>512	4	<1-2	>256
<i>PaR1</i>	64	>512	64	4-16	256

Tableau 4 : CMI (mg/L) vis-à-vis des souches de références ATCC et d'isolats cliniques (présentant diverses résistances aux antibiotiques) du **CX1**, **D**, **G**, **H** et la chlorhexidine.

Type de résistance :

❖ *EcR1* : souche d'*Escherichia coli* présentant une pénicillinase de haut niveau, résistant à l'amoxicilline et à la ticarcilline. Isolée d'une hémoculture périphérique (Prélèvement effectué sur un cathéter par exemple, ces derniers étant responsables d'un grand nombre d'IN).

❖ MRSA : souche de *Staphylococcus aureus* possédant le gène *mecA* conférant une résistance à l'ensemble des β -lactamines (résistance à la méticilline et à la pénicilline). Isolé d'une hémoculture périphérique.

❖ EfR1 : souche d'*Enterococcus faecium* possédant des gènes *vanB*, conférant une résistance à la vancomycine. Isolé d'un prélèvement rectal réalisé dans le cadre d'une recherche de BMR (Bactérie Multi-Résistantes).

❖ EfR2 : souche d'*Enterococcus faecalis* possédant le gène *vanA*, conférant une résistance à la vancomycine et la *teicoplanine*. Isolé d'un prélèvement rectal réalisé dans le cadre d'une recherche de BMR

❖ PaR1 : souche de *Pseudomonas aeruginosa* présentant une résistance par efflux (Mécanisme de transport actif membranaire s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques) à la ticarcilline et à l'aztréonam. Isolée d'une hémoculture périphérique.

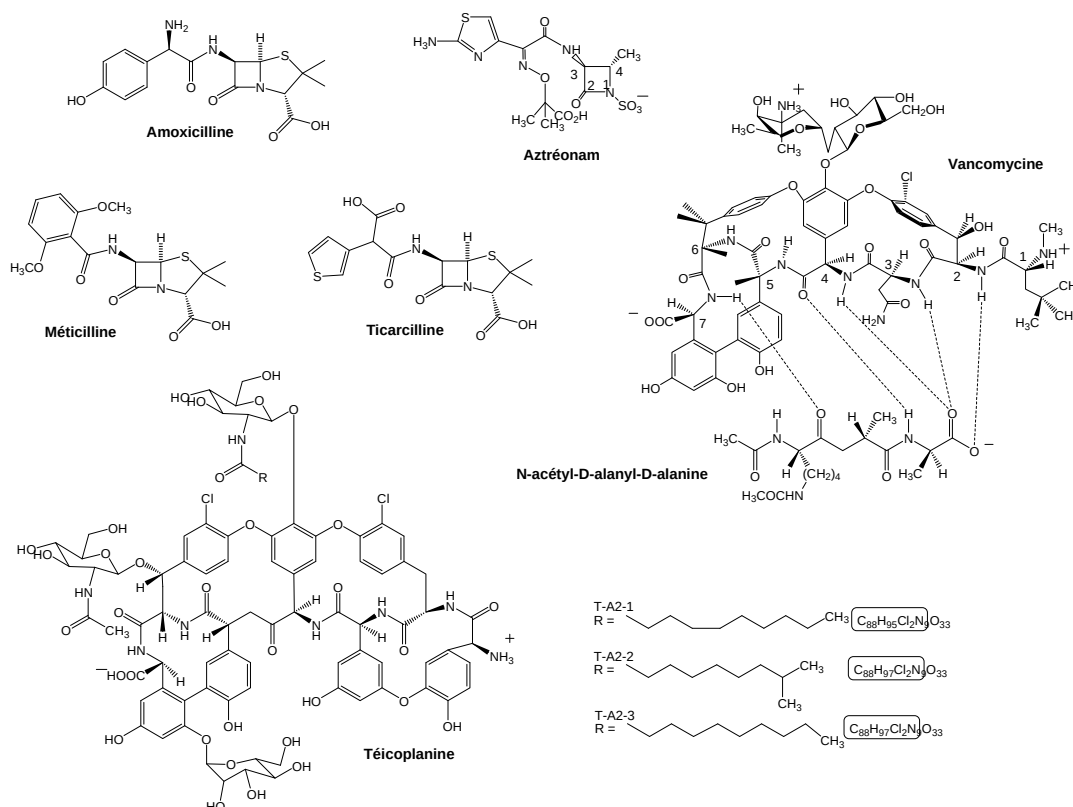


Fig. 52 : Antibiotiques pour lesquels les isolats cliniques présentent des résistances [126].

L'ensemble des résultats microbiologiques corrobore l'hypothèse que l'apport de contre charges positives préorganisées par le calix[4]arène et mis en interaction avec la bactérie (présentant une charge globale nette de surface négative), entraîne soit une neutralité ou une désorganisation qui pourrait résulter en un effet délétère pour la bactérie.

Les faibles valeurs de CMI obtenues montrent le rôle clé de la préorganisation spatiale du monomère *para*-guanidinoéthylphénol en un tétramère cyclique (*para*-guanidinoéthylcalix[4]arène, **CX1**) pour la génèse d'une activité antibactérienne [9].

De plus, par comparaison avec l'hexamidine (**G**), et la synthaline A (**H**), choisies comme références, le *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène apparaît comme celui conjuguant l'activité antibactérienne la plus intéressante associé à une absence de cytotoxicité sur les cellules HaCaT et MRC-5 [121,122,111].

IC50 en µg/mL	CX1	D	G	H
24 h	256<	256<	32-64	128-256
48 h	256<	256<	16-32	8-16
168 h	128-256	16-32	4-8	<1

Tableau 5 : IC_{50} (µg/mL) déterminées par tests de viabilité au MMT sur les composés **H**, **G**, **D** et **CX1** [121,122,111].

Toutefois, il reste à préciser/confirmer la ou les cibles d'action de ce composé. Les travaux de Grare et coll (thèse 2009) [120,121,122,125] sont un début de compréhension sur ces questionnements. Les premières études dans ce sens ont été menées sur la cinétique d'action du CX1, et l'évolution de la perméabilité membranaire [124]. Une autre étude a permis de montrer par l'étude des modifications des caractéristiques électrophorétiques des bactéries et par les images

obtenues par AFM (Atomic Force Microscopy), que le **CX1** entraîne des altérations de la paroi de *P. aeruginosa* avec une perte accrue de la perméabilité de la paroi.

Une étude similaire a été menée sur les souches de référence avec les dérivés de CX1 porteurs de bis-hétérocycles, c'est à dire les calixarènes *tétra*-guanidinoéthyl bis-bipyridylé (**B** Fig. 53) et bis-bithiazolé (**C** Fig. 53), ainsi que leurs monomères respectifs (**E** et **F** Fig. 53) [126].

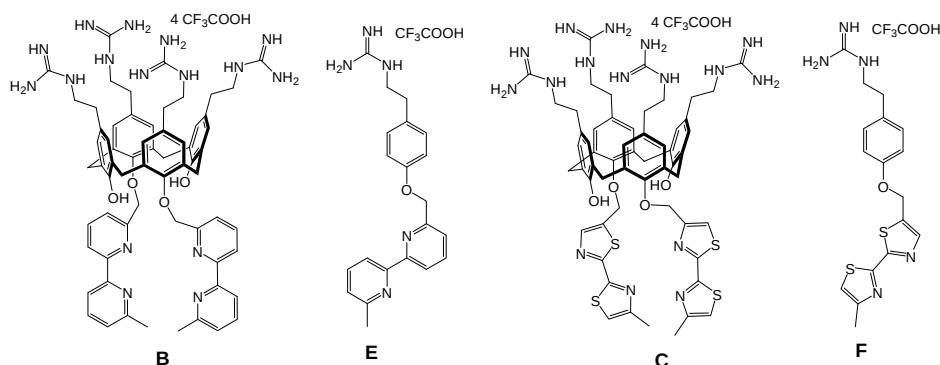


Fig. 53 : Calix[4]arènes bis-hétérocycliques **B**, **C** et leurs analogues monomériques **E**, **F**.

Le Tableau 6 résume les résultats ainsi obtenus en présentant les CMI (mg/L) ainsi déterminées sur les souches de références. Dans cette étude, les CMI obtenues sont comparées à celles de l'hexamidine, de la synthaline et à celles du **CX1** [111].

Germes	B	E	C	F	CX1	D	H	G
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16	128	16	64	4	512	64	8
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16	16	8	16	8	512	64	4
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	16	8	16	8	8	512	16	<1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	16	64	8	64	32	≥512	256	2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	16	128	16	128	32	≥512	128	32

Tableau 6 : CMI (mg/L) vis-à-vis des souches de références ATCC, de (**B**, **E**), (**C**, **F**) comparé au **CX1**, **D**, **G** et **H** [16].

En parallèle, les composés calixaréniques bis-hétérocycles et leurs équivalents monomériques ont subis des tests de toxicité cellulaire, réalisés sur des cellules MRC-5.

IC ₅₀ en µg/mL	CX1	D	B	E	C	F
24 h	256<	256<	16-32	32-64	16-32	64-128
48 h	256<	256<	16-32	16-32	16-32	32-64
168 h	128-256	16-32	16-32	2-4	16-32	8-16

Tableau 7 : IC₅₀ (µg/mL) déterminées par tests de viabilité au MMT sur **B, E, C, F, D** et **CX1** [111].

La détermination des CMI et IC₅₀ a permis de calculer les index de sélectivité (IS). Ils ont été calculés par le rapport entre l'IC₅₀ (après 24 h d'exposition des cellules MRC-5 aux composés étudiés Tab. 7) et la CMI à 24 h (Tab. 6). Ces IS sont présentés sur le tableau 8 [111].

	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>E. faecalis</i> ATCC29212
CX1	>64	>8	>32	>32	>8
D	>0.5	0.5	>0.5	>0.5	> 0.5
B	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
E	0.25-0.5	0.25-0.5	2-4	4-8	0.5-1
C	1-2	1-2	2-4	1-2	2-4
F	1-2	0.5-1	4-8	8-16	1-2

Tableau 8 : Index de sélectivité sur les MRC-5 pour **B, E, C, F, D** et **CX1** [111].

Les résultats obtenus dans cette étude montrent, que l'apport de groupement bis-hétérocycliques sur le para-guanidinoéthylcalix[4]arène ne modifie pas de façon

considérable les valeurs de CMI, avec quelques activités parfois meilleures que celles du CX1, mais aussi moins bonnes autrement, selon les souches. Cependant, nous observons une augmentation assez importante de la toxicité cellulaire, donnant un Index de Sélectivité bien moins intéressant que celui calculé pour le **CX1**.

Pour les composés monomériques (**E** et **F** Fig. 53), nous constatons que l'apport de bis-hétérocycles entraîne une bien meilleure activité antibactérienne en regard du dérivé monomérique "nu" (**D** Fig. 53). Toutefois, ces résultats doivent être relativisés, du fait de leur toxicité cellulaire élevée qui donne des indices de sélectivités peu intéressants.

❖ En 2002, Lamartine et coll publient les résultats de screening de 57 composés sur certaines bactéries pathogènes des plantes [127]. Mais leur activité s'est révélée inexistante pour la plupart des composés sur *Corynebacterium*, à l'exception de quatre d'entre eux, hydrosolubles sulfonés (Fig. 54).

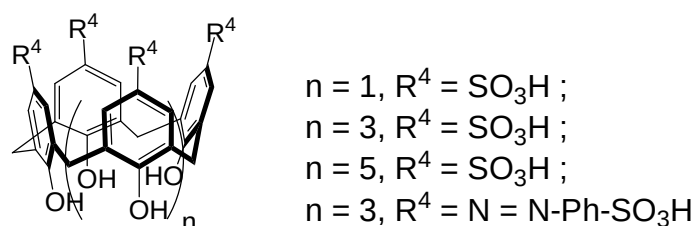


Fig. 54 : Calixarènes potentiellement antibactériens [127].

I.4.2. Activités antivirales

Très peu de travaux ont été développés dans ce domaine, essentiellement sous forme de brevets [128-132].

Un screening de plus de deux cents dérivés calixaréniques plus ou moins purifiés sur leurs activités anti-bactériennes, anti-VIH et anti-mycotiques est présenté dans un brevet de 1995 [128].

Les activités anti VIH-1 les plus fortes et les index thérapeutiques (rapport entre la concentration active et la concentration toxique) ont été trouvés pour des dérivés de type pyrogallol-calixarènes tri-oxy-acétylés.

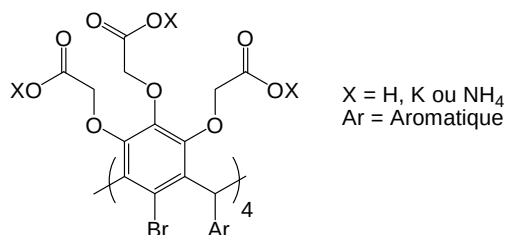


Fig. 55 : Calix-pyrogallols à activité anti-VIH [128,129].

Un second brevet [129], publié par le même auteur en 2002 sur le même thème précise les modes d'actions et l'activité relative des plus performants de ces produits vis-à-vis du VIH-1 et 2 en les comparant avec celle de l'AZT, antiviral de référence dans le traitement du sida. Ces molécules semblent agir en empêchant la fusion membranaire entre la particule virale et la cellule hôte. Harris présente aussi un essai clinique employant trois de ces molécules comme virucide anti-VIH dans les spermicides, qui montrent une efficacité et un index thérapeutique meilleur que celui d'autres spermicides couramment employés pour leurs propriétés antiseptiques.

Les calixarènes sulfonés possèdent eux aussi un pouvoir antiviral [133] sur les virus enveloppés, dont le mécanisme supposé est lié à l'interaction des charges ioniques du podant avec les membranes virales.

Certains dérivés calixaréniques ont également montré un intérêt potentiel dans le traitement de la thrombose [134] et des pathologies de type fibrose [135].

En 2006, Motornaya et coll publient la synthèse et l'évaluation des propriétés anti-herpétiques d'aminoadamantyl-calix[4]arènes (Fig. 56) [136].

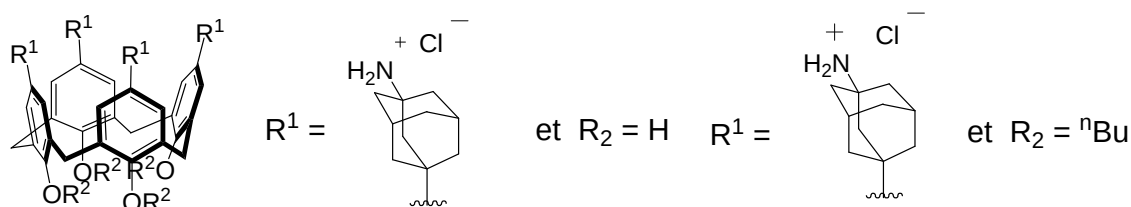


Fig. 56 : Aminoadamantyl-calixarène.

Très récemment, Regnouf de Vains, Mourer et coll [137] ont publié la synthèse et la caractérisation de 9 dérivés calixaréniques (Fig. 57) incorporant sur la couronne haute, diverses fonctions hydrosolubilisantes (carboxylates, sulfonates et phosphonates). Six d'entre eux sont substitués en position distale (1,3) par des groupements 2,2'-bithiazole. Les 9 composés ont été testés comme agent anti-HIV sur trois lignées cellulaires (PBMC, MT4 et CEM-SS) infectées respectivement par trois souches virales de VIH-1 (souche Bal, souche Lai et la souche III-b).

Les résultats obtenus sur l'ensemble des structures ont permis d'isoler la famille des calix[4]arènes sulfonates comme ayant les meilleures activités anti-virales, plus particulièrement le composé bithiazolé sulfoné, avec un indice de sélectivité supérieur à 45.

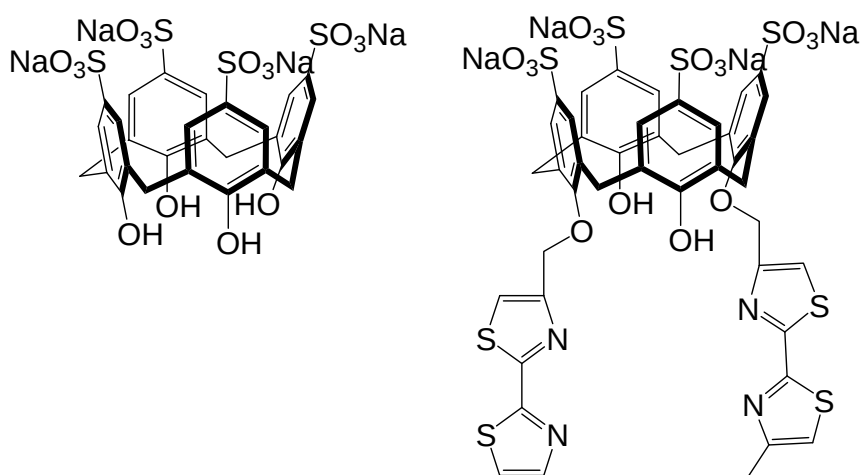


Fig. 57 : Calixarènes sulfoné et bithiazolé sulfoné.

I.4.3. Calixarènes Organisateur de principes actifs

Ben Salem (thèse 2004) et Regnouf de Vains développent un projet visant à utiliser la plate-forme calixarénique (rigide et aisément fonctionnalisable) pour la préparation de nouveaux types de podants incorporant des principes actifs sur la couronne basse du calixarène. L'objectif était de créer une nouvelle famille de composés présentant un caractère prodrogue, qui, une fois biodisponibilisés, seraient susceptibles de libérer par hydrolyse enzymatique (estérases) les principes

actifs portés par le calixarène. Le macrocycle est donc utilisé ici en tant que vecteur de principe actif, choisis dans l'étude préliminaire parmi les antibactériens de type pénicillines et quinolones.

En 2001, ils publient la synthèse d'un calixarène porteur de deux groupements pénicilliniques en couronne basse et liés par une fonction amide (POMAPA, Fig. 58) [138].

Deux ans plus tard, les mêmes auteurs décrivent la synthèse et la caractérisation d'un analogue porteur de bras type quinolone, ici l'acide nalidixique, liés au calixarène par l'intermédiaire de jonctions labiles de type ester (Fig. 58) [139].

Un nombre important de structures ont été préparées, intégrant des assemblages symétriques pénicilline **a**-pénicilline **a**, ou quinolone **a**-quinolone **a**, mais aussi mixtes pénicilline **a**-pénicilline **b** quinolone **a**-quinolone **b** enfin pénicilline-quinolone, qui préfigurent de nouvelles prodrogues à cible multiples. [140]

Toutefois, l'évaluation des propriétés microbiologiques de ces composés n'a pas pu se faire dans les conditions standards d'évaluation, à cause de leur caractère insoluble en milieu aqueux. Cependant, pour appréhender le comportement de ces composés amphiphile face aux membranes cellulaires, une série d'études de certains de ces dérivés a été menée à l'interface air-eau et en présence de phospholipides membranaires [141].

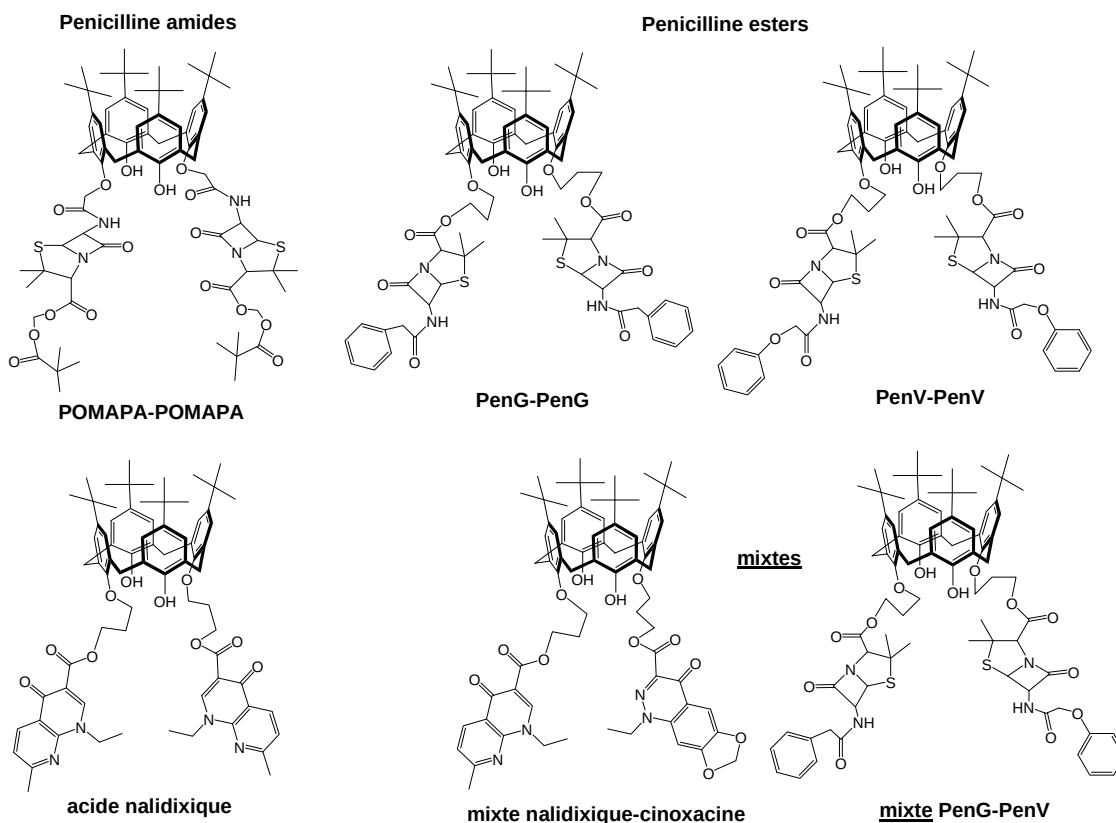


Fig. 58 : Podants calixaréniques poly- β -lactames, poly-quinolones, et mixtes.[138-140]

I.4.4. Activité de transporteurs membranaire

L'une des fonctions cruciales du système biologique est le transport sélectif des ions à travers les phospholipides membranaires. Des études ont été menées sur certains calixarènes pour leurs capacités à favoriser le passage d'ions au travers des membranes. Il a été démontré qu'une série de calix[n]arènes esters avait la capacité de s'insérer dans des membranes phospholipidiques et d'y discriminer le passage d'ions alcalins en fonction de leur taille. (Fig. 59) [142]

Pour le tétramère ($n = 4$), $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$; pour le pentamère ($n = 5$), $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ \sim \text{Na}^+ > \text{Li}^+$; pour le l'hexamère ($n = 6$), $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$; pour l'heptamère ($n = 7$), $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ \sim \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$. La sélection semble donc être liée au rapport de taille existant entre l'ion et le passage créé dans la membrane lipidique.

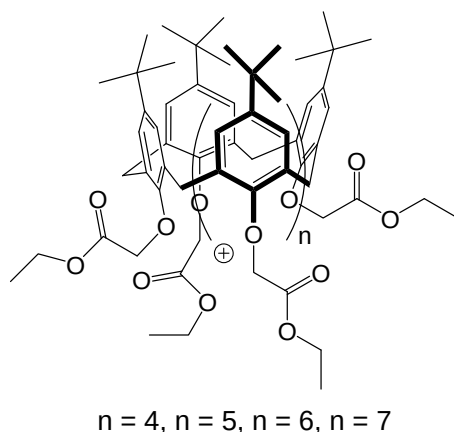


Fig. 59: Calix[n]arènes transporteurs de cations au travers de membranes phospholipidiques [142].

Une autre étude, effectuée *in vitro* sur culture de cellules endothéliales avec le calix[4]arène-tétra-*p*-sulfonate et son homologue tétra-O-méthylé Fig. 60) [143], présente d'intéressants résultats d'inhibition des canaux à chlorures membranaires.

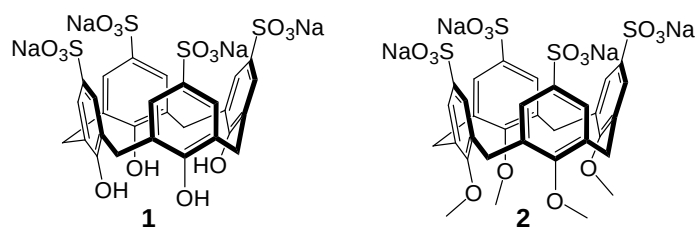


Fig. 60 : Deux calixarènes inhibiteurs des canaux VRAC, responsables du passage voltage-dépendant des ions chlorures au travers de la membrane cellulaire [143].

Le mécanisme d'action de ces molécules anioniques, passe par leur insertion au niveau du canal transmembranaire VRAC (Volume-Regulated Anion Channel), qui est responsable de la sortie des ions chlorures sous la dépendance du potentiel électrique membranaire. Cette propriété pourrait donner lieu à une isolation biochimique de ce type de canaux en vue de les étudier plus précisément.

I.4.5. Inhibiteurs d'enzymes

Grâce à leurs propriétés originales (conformation, rigidité, réactivité sur la partie basse et haute), les calixarènes ont depuis quelques années trouvés un intérêt dans l'étude de reconnaissance de protéines de surface [144]. Plusieurs études, démontrent une inhibition enzymatique par reconnaissance de la surface de protéines : l'inhibition de la L-lysyl oxidase [135], celle de l' α -chymotrypsine [144, 145], la trypase [146], la transglutaminase [147].

Références bibliographiques

- 1) B. Dietrich, P. Viout, J. –M. Lehn; "Aspect de la Chimie des Composés Macrocycliques". *Ed. du CNRS/Inter édition, Paris, 1991*.
- 2) a) A. Baeyer; "Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den phenolen", *Ber. 1872*, 5, 25-26. b) A. Baeyer; "Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den phenolen", *Ber. 1872*, 5, 280-282. c) A. Baeyer; "Ueber die Verbindungen der Aldehyde mit den phenolen und aromatischen Kohlenwasserstoffen", *Ber. 1872*, 5, 1094-1100.
- 3) B. Niederl, H.J. Vogel; "Aldehyde-resorcinol condensations"; *J. Am. Chem. Soc. 1940*, 62, 2512-2514.
- 4) A. Zinke, E. Ziegler; "Zur kenntnis des Härtungsprozesses von Phenol-Formaldehyd. V. Mitteilung"; *Ber. 1941*, 74B, 541-545.
- 5) a) C.D. Gutsche; "Calixarenes", *Monographs in Supramolecular Chemistry, Ed. Royal Society of chemistry, 1989*, , ISBN 0-85186-916-5; b) C.D. Gutsche; "Calixarenes revisited"; *Monographs in Supramolecular Chemistry, Ed. Royal Society of chemistry, 1998*, ISBN 0-85404-502-3.
- 6) C.D. Gutsche, R. Muthukrishnan; "Calixarenes. 1. Analysis of the Product Mixtures Produced by the bases- Catalysed condensation of Formaldehyde with Para-substituted phenols"; *J. Org. Chem. 1978*, 43, 4905-4906.
- 7) C.D. Gutsche, M. Iqbal, D. Stewart; "Calixarenes. 18. Syntheses Procedures for *p*-*tert*-butylcalix[4]arenes"; *J. Org. Chem. 1986*, 51, 742-745.
- 8) C.D. Gutsche, M. Iqbal; "*p*-*tert*-butylcalix[4]arenes"; *Org. Synth. 1990*, 68, 234 (ou Coll. Voll. 8, 75).
- 9) C.D. Gutsche, B. Dhawan, M. Leonis, D. Stewart; "*p*-*tert*-butylcalix[6]arene"; *Org. Synth. 1990*, CV 8, 77.

- 10) J.H. Munch, C.D. Gutsche; "*p*-tert-butylcalix[8]arene"; *Org. Synth.* **1990**, CV 8, 88.
- 11) D.J. Cram, S. Karbach, H.E. Kim, C.B. Knobler, E.F. Maverick, J.L. Ericson, R.C. Helgeson; "Host-Guest complexation. 46. Cavitands as open molecular vessel from solvates"; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2229-2237.
- 12) D.W. Chasar; "A calix[4]arene type molecule and its hydrate"; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 50, 545-546.
- 13) A.C. Davis, B.T. Hayes, R.F. Hunter; "Phenol-formaldehyde and Allied Resins VI. Rational Synthesis of a cyclic Tetranuclear p-Cresol Novolak"; *J. Appl. Chem.* **1957**, 7, 521-528.
- 14) a) R.F. Hunter, C. Turner; *J. Appl. Chem.* 1957, 7, 528-532. "Phenol-Formaldehyde and allied resins. V. Synthesis of a bridged decanuclear novolak and case of hardening by way of metasubstitution". b) A.C. Davis, B.T. Hayes, R.F. Hunter; "Phenol-formaldehyde and Allied resins. II. Trinuclear and hexanuclear novolaks"; *J. Appl. Chem.* **1953**, 3, 321-317.
- 15) V. Böhmer, L. Merkel, U. Kunz; "Assymmetrically-substituted calyx[4]arenes"; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 12, 896-897.
- 16) H. Goldmann, W. Vogt, E. Paulus, V. Böhmer; "A series of calix[4]arenes, having two opposite *para* positions connected by an aliphatic chain"; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6811-6817.
- 17) V. Böhmer, F. Marschollek, L. Zetta; "calix[4]arenes with four differently substituted phenolic units"; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 52, 3200-3205.
- 18) F. Ullmann, K. Brittner; "Preparation of Hydroxyuvitic Aldehyde from p-cresol"; *Ber.* **1909**, 42, 2539-2548.
- 19) A. Zinke, R. Kretz, E. Leggewie, K. Hossinger, G. Hoffmann, P. Oswalden, V. Weber, E. Wiesenberg, M. Sobotka; "The phenol-formaldehyde resin hardening process. XXVI. Linear and cyclic polynuclear methylenephenols"; *Monatshefte fuer Chemie.* **1952**, 83, 1213-1227.
- 20) E. Paulus, V. Böhmer; "Cristal structure of (2-hydroxy-1,3-phenylene) methylene oligomers"; *Macromolekulare Chemie.* **1984**, 185, 1921-1935.
- 21) V. Böhmer, R. Funk, J. Kielkiewicz, W. Walter; "Synthesis and polymerization of diesters from 2,2'-methylenediphenols with acrylic, methacrylic and crotonic acide"; *Macromolekulare Chemie.* **1984**, 185, 1905-1913.
- 22) F. Vocanson, R. Perrin. *Supramol.* "Characterization of precursors of p-tert-butylcalix[6]arene"; *Chem.* **1994**, 18, 153-157.
- 23) B. Dhawan, C.D. Gutsche; "Calixarenes. 10. Oxacalixarenes"; *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1536-1539.

- 24) B. Dhawan, S.I. Chen, C. D. Gutsche; "Calixarenes. 19. Studies of the formation of calixarenes via condensation of p-alkylphenols and formaldehyde"; *Makromolekulare Chemie*. **1987**, 1885, 921-950.
- 25) C. D. Gutsche, J. Rogers, S. Janet, D. Stewart, S. Donald, A. Keat; "Calixarenes: paradoxes and paradigms in molecular baskets"; *Pure and Applied Chemistry*. **1990**, 62, 485-491.
- 26) G. D. Andreetti, R. Ungaro, A. Pochini; *J. Chem. Soc.; Chem. Commun.* **1979**, 22, 1005-1007.
- 27) C.D. Gutsche, B. Dhawan, K. Hyun, R. Muthukrishnan; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3782.
- 28) R. Ungaro, A. Pochini, G.D Andreetti, P. Domiano; *J. Chem. Soc, Perkin Trans. II* **1985**, 197.
- 29) W. Verboom, P.J. Bodewes, G. van Essen, P. Timmerman, G.J. van Hummel, S. Harkema, D.N. Reinhoudt; *Tetrahedron* **1995**, 51, 499-512.
- 30) C.D. Gutsche, J.A. Levine, P.K. Sujeeth; "Calixarenes. 17. Functionalized calixarenes: the Claisen rearrangement route"; *J. Org. Chem.* **1985**, 50 (26), 5802-5806.
- 31) A. Casnati, E. Comelli, M. Fabbi, V. Bocchi, G. Mori, F. Ugozzoli, A.M.M. Lanfredi, A. Pochini, R. Ungaro; *Recl. Trav. Chim. Pays-bas* **1993**, 112, 384-392.
- 32) A. Arduini, A. Pochini, A.R. Sicuri, A. Secchi, R. Ungaro, *Gazz. Chem. Ital.* **1994**, 124, 129-132.
- 33) R. Lamartine, J.-B. Regnouf-de-Vains, P. Choquard, A. Marcillac; "Procédé de désalkylation et de sulfonation des calixarènes p-alkyl"; WO 97/49677, **1997**.
- 34) S. ShinKaï, K. Araki, T. Matsuda, T. Tsubaki, T. Arimura, O. Manabe; "New Syntheses of Calixarene-p-sulphonates and p-Nitrocalixarenes"; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1987**, 1, 2297-2299.
- 35) W. Verboom, A. Durie, R.J.M. Egberink, Z. Asfari, D.N. Reinhoudt; "Ipso nitration of p-tert-butylcalix[4]arene"; *J. Org. Chem.* **1992**, 57 (4), 1313-1316.
- 36) K. Araki, K. Iwamoto, S. Shinkaï, T. Matsuda; "pK_a" of Calixarenes and Analogs in Nonaqueous Solvents"; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, 63, 3480-3487.
- 37) C.D. Gutsche, B. Dhawan, J.A. Levine, K. Hyun, L.J. Bauer; "Calixarenes 9 : Conformational isomers of the ethers and esters of calix[4]arenes"; *Tetrahedron* **1983**, 39, 409-426.
- 38) R. Ungaro, A. Pochini, G.D. Andretti; *J. Incl. Phenom.* **1984**, 2, 199.
- 39) P.J. Dijkstra, J.A.J. Buminsk, K.-E. Bugge, D.N. Reinhoudt, S. Harkema, R. Ungaro, F.V. Gozzoli, E. Ghedini; "Kinetically stable complexes of alkali cations

- with rigidified calix[4]arenes: synthesis, x-ray structures, and complexation of calixcrowns and calixspherands"; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (19), 7565-7575.
- 40) J.-D. Van Loon, A. Arduini, W. Verboom, R. Ungaro, G.J. Van Hummel, S. Harkema, D.N. Reinhoudt; "Selective functionalization of calix[4]arenes at the upper rim"; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2681-2684.
- 41) J.-D. Van Loon, A. Arduini, L. Coppi, W. Verboom, A. Pochini, R. Ungaro, S. Harkema, D.N. Reinhoudt; "Selective functionalization of calix[4]arenes at the upper rim"; *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (21), 5639-5646.
- 42) J.-D. Van Loon, D. Kraft, M.J.K. Ankorre, K. Vogt, V. Böhmer, D.N. Reinhoudt; "Calix[4]arenes bridged at the lower rim"; *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (17), 5176-5179.
- 43) A. Arduini, A. Castani, L. Dodi, A. Pochini, R. Ungaro; "Selective 1,2-functionalization of calix[4]arenes at the lower rim. Synthesis of a new type of bis-calixcrown ether"; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1597-1598.
- 44) L.C. Groenen, B.H.M. Ruël, A. Castani, P. Timmerman, W. Verboom, S. Harkema, A. Pochini, R. Ungaro, D.N. Reinhoudt; "Syn-1,2-dialkylated calix[4]arenes : general intermediates in the NaH/DMF tetraalkylation of calix[4]arenes"; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2675-2678.
- 45) S. Pappalardo, S. Caccamese, L. Giunta; "Stereoselective synthesis and optical resolution of chiral calix[4]arenes with mixed ligating functionalities"; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7747-7750.
- 46) K.A. See, F.R. Fronczek, C.D. Gutsche; "Calixarenes. 26. Selective esterification and selective ester cleavage of calix[4]arenes"; *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (26), 7256-7268.
- 47) K. Iwamoto, K. Araki, S. Shinkai; "Syntheses of all possible conformational isomers of O-alkyl-p-t-butylcalix[4]arenes" *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 4325-4342.
- 48) J.A.J. Bumink, W. Verboom, J.F.J. Engbersen, S. Harkema, D.N. Reinhoudt; "Synthesis and cation complexation selectivity of bis(syn-proximally functionalized calix[4]arenes"; *Recl. Trav. Chim. Pays Bas.* **1992**, *111*, 511-516.
- 49) M. Iqbal, T. Mangiafico, C.D. Gutsche; "Calixarenes 21 : The conformations and structures of the products of arylation of the, calix[4]arenes"; *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 4917-4930.
- 50) F. Bottino, L.G. Giunta, S. Pappalardo; "Calix[4]arenes with pyridine podant groups. Regioselective proximal alkylation at the "lower rim""; *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (23), 5407-5409.
- 51) S. Shinkai, T. Otsuda, K. Araki, T. Matsuda; "(2-Pyridylmethoxy)calixarenes: New Versatile Ionophores for Metal Extraction"; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 4055-4057.

- 52) K. Iwamoto, K. Fujimoto, T. Matsuda, S. Shinkai; "Remarkable metal template effects on selective syntheses of p-t-butylcalix[4]arene conformers"; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (49), 7169-7272.
- 53) C.D. Gutsche, P.A. Reddy; "Calixarenes. 25. Conformations and structures of the products of arylmethylation of calix[4]arenes"; *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (15), 4783-4791.
- 54) K. Iwamoto, K. Araki, S. Shinkai; "Conformations and structures of tetra-O-alkyl-p-tert-butylcalix[4]arenes. How is the conformation of calix[4]arenes immobilized?"; *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (16), 4955-4962.
- 55) K. Araki, K. Iwamoto, S. Shinkai, T. Matsuda; "On the Conformational Isomers in Tetra-O-alkylcalix[4]arenes"; *Chem. Lett.* **1989**, 18, 1747.
- 56) A. Casnati, A. Arduini, E. Ghidini, A. Pochini, R. Ungaro; "A general synthesis of calix[4]arene monoalkyl ethers"; *Tetrahedron*, **1991**, 47, 2221-2228.
- 57) S. Shang, D.V. Khasnis, J.M. Burton, C.J. Santini, M. Fan, A.C. Small, M. Lattman; "From a Novel Silyl p-tert-Butylcalix[4]arene Triether to Mono-O-alkyl Substitution: A Unique, Efficient, and Selective Route to Mono-O-substituted Calix[4]arenes"; *Organometallics*. **1994**, 13, 5157-5159.
- 58) L.C. Groenen, B.H.M. Ruël, A. Casnati, W. Verboom, A. Pochini, R. Ungaro, D.N. Reinhoudt; "Synthesis of monoalkylated calix[4]arenes via direct alkylation"; *Tetrahedron*. **1991**, 47 (39), 8379-8384.
- 59) J.-B. Regnouf-de-Vains, R. Lamartine; "Synthesis and complexation properties of a new class of receptors based on a cone-configured tetra-p-(tert-butyl)calix[4]arenes and bipyridyl subunits"; *Helv. Chim. Acta*. **1994**, 77, 1817-1825.
- 60) F. Bottino, S. Pappalardo; "Synthesis and properties of pyridinocalixarenes"; *J. Incl. Phenom. Mol. Rec.* **1994**, 19, 85-100.
- 61) K. Iwamoto, A. Yanagi, T. Arimura, T. Matsuda, S. Shinkai; "Synthesis and Optical Resolution of a Chiral Calix[4]arene Asymmetrically-Substituted on the Rim"; *Chem. Lett.* **1990**, 19, 1901.
- 62) R. Grigg, J.M. Holmes, S.K. Jones, W.D.J.A. Norbert; "Luminescent sensors based on p-tert-butylcalix[4]arene-linked Ruthenium (II) Trisbipyridyl complexes"; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 185-187.
- 63) S. Pappalardo, S. L. Giunta, M. Foti, G. Ferguson, J.F. Gallagher, B. Kaitner; "Functionalization of calix[4]arenes by alkylation with 2-(chloromethyl)pyridine hydrochloride"; *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2611-2624.
- 64) P.D. Beer, T.P. Martin, M.G.B. Drew; "Calixarene cryptand and new 1,3-bis-pyridyl, -bipyridyl and -alkylthioether calix[4]arenes designed to coordinate transition metal cations"; *Tetrahedron*. **1992**, 48, 9917-9928.

- 65) G. Ulrich, R. Ziessel; "calixarènes[4]-Podants and barrel-shaped calixarene[4]-Cryptands based on 5,5'-substituted-2,2'-bipyridine subunits"; *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35 (34), 6299-6302.
- 66) L.C. Groenen, J.-D. Van Loon, W. Verboom, S. Harkema, A. Casnati, R. Ungaro, A. Pochini, F. Ugozzili, D.N. Reinhoudt; "The 1,2-alternate conformation of calix[4]arenes: a rare conformation? Dynamic ¹H NMR studies of flexible tetraalkylated calix[4]arenes"; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113 (7), 2385-2392.
- 67) K. Araki, K. Iwamoto, S. Shigematsu, S. Shinkai; "On the Origin of the Distal vs. Proximal Regioselectivity in Di-*O*-alkylation of Calix[4]arenes"; *Chem. Lett.* **1992**, 21, 1095.
- 68) G. Fergusson, B. Kaitner, M.A. Mckervery, E.M. Seward; "Synthesis, X-ray crystal structure, and cation transfer properties of a calix[4]arene tetraketone, a new versatile molecular receptor"; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 584-585,
- 69) F. Arnaud-Neu, E.M. Collins, M. Deasy, G. Fergusson, S.J. Harris, B. Kaitner, A.J. Lough, M.A. Mckervery, E. Marques, B.L. Ruhl, M.-J. Schwing-Weill, E.M. Seward; "Synthesis, x-ray crystal structures, and cation-binding properties of alkyl calixaryl esters and ketones, a new family of macrocyclic molecular receptors"; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8681-8691.
- 70) C. Jaime, J. de Mendoza, P. Prados, P.M. Nieto, C. Sanchez; "Carbon-13 NMR chemical shifts. A single rule to determine the conformation of calix[4]arenes"; *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (10), 3372-3376.
- 71) F. Vocanson, R. Lamartine, C. Duchamp, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Reverse-phase liquid chromatography of p-tert-butylcalixarenes"; *Chromatographia.* **1995**, 41, 204-206.
- 72) B.F. Graham, J.M. Harrowfield, R.D. Trengove, I. Rodriguez, S.F.Y. Li; "Comparaison of Supercritical fluid chromatographic and high-performance liquid chromatographic separations of p-tert-butylcalix[n]arenes"; *J. Chromatog. Sci.* **1997**, 35, 232-236.
- 73) a) S. Shinkai, S. Mori, T. Tsubaki, T. Sone, O. Manabe; "New water-soluble host molecules derived from calix[6]arene"; *Tetrahedron. Lett.* **1984**, 25, 5315-5318. b) S. Shinkai, K. Araki, T. Tsubaki, T. Arimura, O. Manabe; "New syntheses of calixarene-*p*-sulphonates and *p*-nitrocalixarenes"; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*; **1987**, 2297-2299. c) S. Shinkai, S. Mori, H. Koreishi, T. Tsubaki, O. Manabe; "Hexasulfonated calix[6]arene derivatives: a new class of catalysts, surfactants, and host molecules"; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108 (9), 2409-2416.
- 74) Y. Morzherin, D.M. Rudkevich, W. Verboom, D.N. Reinhoudt; chlorosulfonylated calix[4]arenes: "precursors for neutral anion receptors with a selectivity for hydrogen sulfate"; *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7602-7605.

- 75) M. Makha, C.L. Raston, "Direct synthesis of calixarenes with extended arms: p-phenylcalix[4,5,6,8]arenes and their water-soluble sulfonated derivatives"; *Tetrahedron. Lett.* **2001**, 42, 6225-6217.
- 76) C.D. Gutsche, P.F. Pagoria; "Calixarenes. 16. Fonctionnalisés calixarènes: The direct substitution route"; *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5795-5802.
- 77) C.D. Gutsche, K.C. Nam; "Calixarenes. 22. Synthesis, properties, and metal complexation of aminocalixarenes"; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6153-6162.
- 78) a) S.K. Sharma, S. Kanamathareddy, C.D. Gutsche; "Upper Rim Substitution of calixarènes: Carboxylic acids"; *Synthesis*. **1997**, 11, 1268-1272. b) S.K. Sharma, C.D. Gutsche; "Synthesis and Reaction of Calix[4]arene Bisanhydrides"; *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 3507-3512.
- 79) a) A. Arduini, G. Manfredi, A. Pochini, A.R. Sicuri, R. Ungaro; "Selective formylation of calix[4]arene at upper rim and synthesis of new cavitands"; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 936-937. b) E. Kelderman, L. Derhaeg, W. Verboom, J.F.J. Engbersen, S. Harkema, A. Person, D.N. Renhoudt; "Calix[4]arenes as molecules for second order nonlinear optics"; *Supramol. Chem.* **1993**, 2 (2), 183-190.
- 80) J.-D. Nan Loon, A. Arduini, L. Coppi, W. Verboom, A. Pochini, R. Ungaro, S. Harkema, D.N. Renhoudt; "Selective fonctionnalization of calix[4]arenes at the upper rim"; *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5639-5646.
- 81) M. Yilmaz, U.S. Vural; "Synthesis of new substituted calix[4]arenes and their complexes with iron (III)"; *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* **1991**, 21, 1231-1241.
- 82) M. Almi, A. Arduini, A. Casnati, A. Pochini, R. Ungaro; "Chloromethylation of calixarenes and synthesis of new water soluble macrocyclic hosts"; *Tetrahedron* **1989**, 45, 2177-2182.
- 83) Z.-T. Huang, G.-Q. Wang, L.-M. Yuang, Y.-X. Lou; "The selective chloromethylation of 25,27-dihydroxy-26,28-dimethoxycalix[4]arene and nucleophilic substitution therefrom"; *Synth. Comm.* **1995**, 25, 1109-1118.
- 84) A. Arduini, A. Pochini, S. Reverberi, R. Ungaro, G.D. Andreetti, F. Ugozzoli; "The preparation and properties of a new lipophilic sodium selective ether ester ligand derived from p-t-butylcalix[4]arene"; *Tetrahedron* **1986**, 42, 2089-2100.
- 85) A. Casnati, Y. Ting, D. Berti, M. Fabbi, A. Pochini, R. Ungaro, D. Sciotto, G.G. Lombardo; "Synthesis of water soluble molecular receptors from calix[4]arenes fixed in the cone conformation"; *Tetrahedron* **1993**, 49, 9815-9822.
- 86) G. Arena, A. Casnati, L. Mirone, D. Sciotto, R. Ungaro; "A new water-soluble calix[4]arene ditopic receptor rigidified by microsolvation: Acide-Base and Inclusion Properties" *Tetrahedron* **1997**, 38, 1999-2002.
- 87) G. Arena, A. Casnati, A. Contino, G.G. Lombardo; D. Sciotto, R. Ungaro; "Water-soluble calixarenes hosts that specifically recognize the trimethyl-

- ammonium group or the benzene ring of aromatic ammonium cations: A combined ^1H NMR, calorimetric and molecular mechanics investigation"; *Chem. Euro. J.* **1999**, 5, 738-744.
- 88) I. Alam, S. K. Sharma, C. D. Gutsche; "The Quinone Methide Route to Mono- and Tetrasubstituted Calix[4]arenes"; *J. Org. Chem.* **1994**, 59 (13), 3716–3720.
 - 89) T. Arimura, T. Nagasaki, S. Shinkai, T. Matsuda; "Host-guest properties of new water-soluble calixarenes derived from p-(chloromethyl) calixarenes"; *J. Org. Chem.*, **1989**, 54 (16), 3766–3768.
 - 90) N. Psychogios, J.-B. Regnouf-de-Vains; "A new water-soluble calix[4]arene podand incorporating p-phosphonate groups and 2,2'-bipyridine units"; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7691-7693.
 - 91) V.I. Kalchenko, L.I. Atamas, V.V. Pirozhenko, L.N. Markovsky; "Phosphorylation of the tetramethyl ether of 5,11,17,23-tetrabromocalix[4]arene"; *Zhurnal. Obshchei. Khimii.* **1992**, 62, 2623-2625.
 - 92) A. Solovyov, S. Cherenok, I. Tsymbal, S. Failla, G. A. Consiglio, P. Finocchiaro, V. Kalchenko; "Calix[4]arenes bearing α -amino- or α -hydroxyphosphonic acid fragments at the upper rim" *Heteroatom Chemistry*. **2001**, 12 (2), 58–67.
 - 93) P. Shahgaldian, A. W. Coleman, V. Kalchenko; "Synthesis and properties of novel amphiphilic calix-[4]-arene derivatives" *Tetrahedron Letters*. **2001**, 42 (4), 577-579.
 - 94) I. Matulkova, J. Rohovec; "Synthesis, characterization and extraction behaviour of calix[4]arene with four propylene phosphonic acid groups on the lower rim"; *Polyhedron A*. **2005**, 24, 311-317.
 - 95) C.D. Gutsche, M. Iqbal, K.C. Nam, K. See, I. Alam; "Conformation and complexational characteristics of calixarenes"; *Pure Appl. Chem.* **1988**, 4, 483-488.
 - 96) F. Otseto, H. Murakami, K. Araki, S. Shinkaï; "Substitution of OH with NH_2 calix[4]arenes: An approach to the synthesis of aminocalixarenes"; *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1217-1220.
 - 97) a) O. Aleksiuk, F. Grynzpan, S. E. Biali; "Spirodienone route for aminodehydroxylation : monoaminotrihydroxy-p-tert-butylcalix[4]arene"; *J. Org. Chem.* **1993**, 58 (8), 1994-1996. b) S. E. Biali; "The Spirodienone route for the functionalisation of calixarenes"; *Synlett*. **2003**, 1, 1-11.
 - 98) V. Verboom, A. Durie, R.J.M. Egberink, Z. Asfari, D. Reinhoudt; "Ipso nitration of p-tert-butylcalix[4]arenes"; *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6169-6173.
 - 99) S. K. Sharma, C. D. Gutsche; "Upper Rim Substitution of Calix[4]arenes via Their Upper Rim A,C Dinitro Compounds"; *J. Org. Chem.* **1999**, 64 (3), 998–1003.

- 100)** a) P. Tongraung, N. Chantarasiri, T. Tuntulani; "Calix[4]arenes containing urea and crown/urea moieties: effet of the crown ether unit and Na⁺ towards anion binding ability"; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 29-32. b) L. Wang, X. Shi, P. Jia, Y. Yang; "Preparation of calixarene-containing polymer with proton transport ability"; *J. Polym. Sci. Part A.* **2004**, *42*, 6259-6266.
- 101)** Y. Morita, T. Agawa, E. Nomura, H. Taniguchi; "Synthesis and NMR behaviour of calix[4]quinone and calix[4]hydroquinone"; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3658-3662.
- 102)** P. D. Beer, T. P. Martin, M. G. B. Drew; "Calixarene cryptand and new 1,3-bis-pyridyl, -bipyridyl and -alkylthioether calix[4]arenes designed to coordinate transition metal cations"; *Tetrahedron.* **1992**, *48*, 9917-9928.
- 103)** J.-B. Regnouf-de-Vains, R. Lamartine, B. Fenet, C. Bavoux A. Thozet, M. Perrin; "Synthesis and Reductive Complexation Properties of a Cone-configured Tetra[*p*-(*tert*-butyl)calix[4]arene incorporating Bipyridine Subunits. NMR Characterization and Crystal Structure of its Chiral copper (I) complex"; *Helv. Chim. Acta.* **1995**, *78*, 1607-1619.
- 104)** R. Grigg, J. M. Holmes, S. K. Jones, W. D. J. A. Norbert; "Luminescent pH sensors based on *p*-*tert*-butylcalix[4]arene-linked Ruthenium(II) Trisbipyridyl complexes". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 185-187.
- 105)** N. Sabbatini, M. Guardigli, I. Manet, R. Ungaro, A. Casnati, C. Fischer, R. Ziessel, G. Ulrich; "Synthesis and luminescence of Eu³⁺ and Tb³⁺ complexes with novel calix[4]arene ligands carrying 2,2'-bipyridine subunits"; *New. J. Chem.* **1995**, *19*, 137-140.
- 106)** N. Psychogios, J.-B. Regnouf-de-Vains; "A new water-soluble calix[4]arene podand incorporating *p*-sulfonate groups and 2,2'-bipyridine chelating units"; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 77-80.
- 107)** N. Psychogios, J.-B. Regnouf-de-Vains; "A new water-soluble ligand based on a calix[4]arene substituted by 2,2'-bipyridine chelating units"; *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2799-2800.
- 108)** N. Psychogios, J.-B. Regnouf-de-Vains, H. M. Stoeckli-Evans; "A water-soluble calix[4]arene-Based Podand incorporating 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridine Chelating Units - Synthesis and Complexation Properties toward Copper ions"; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 2514-2523.
- 109)** P. Engrand, J.-B. Regnouf-de-Vains; "A bifunctional calixarène designed for immobilisation on a natural polymer and for metal complexation"; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8863-8866.

- 110)** M. Mourer, J-B Regnouf-de-Vains; "New water-soluble calix[4]arene-based bipyridyl podands incorporating carboxylate groups"; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (12), 1895-1899.
- 111)** M. Mourer, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R.E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation". *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5496-5509.
- 112)** A. De Fátima, S.A. Fernandes, A.A. Sabino; "Calixarenes as New Platforms for Drug Design"; *Curr. Drug. Discov. Technol.* **2009**, 6 (2), 151-70.
- 113)** R.B. Kalchenko; "Calixarenes in Bio-Medical Researches"; *Curr. Med. Chem.* **2009**, 13(16), 1630-1655.
- 114)** a) J.W. Conforth, P. D'Arcy Hart, G.A. Nichols, R.J.W. Rees, J.A. Stock; "Antituberculous effects of certain surface-active polyethylene ethers"; *Br. J. Pharmacol.* **1955**, 10, 73-86. b) J.W. Conforth, E.D. Morgan, K.T. Potts, R.J.W. Rees; *Tetrahedron* **1973**, 29, 1659-1667.
- 115)** M.K. Jain, D.V. Jahagirdar; "Effect of antituberculous calixarènes on phospholipase A₂, susceptible and fusion of phospholipids bilayers"; *Biochem. J.* **1985**, 227 (3), 789-794.
- 116)** P.D. Hart, J.A. Armstrong, "Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action"; *Infect. Immun.* **1996**, 64, 1491-1493.
- 117)** M.J. Colston, H.C. Hailes, E. Stavropoulos, A.C. Hervé, G. Hervé, K.J. Goodworth, A.M. Hill, P. Jenner, P.D'Arcy Hart, R.E. Tascon; "Antimycobacterial Calixarenes Enhance Innate Defense Mechanisms in Murine Macrophages and Induce Control of Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice". *Infect. Immun.* **2004**, 72, 6318-6323.
- 118)** A. Casnati, M. Fabbi, N. Pelizzi, A. Pochini, F. Sansone, G. Tarzia, R. Ungaro E. Di Modugno, G. Tarzia; "Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arene based vancomycin mimics"; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 2699-2704.
- 119)** D.H. Williams, B. Bardley; "The Vancomycin and Group of Antibiotics and the Fight against Resistant Bacteria"; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 1172-1193.
- 120)** M. Mourer, R.E Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Fonctional Organisation and Gain of Activity: The case of the Antibacterial tetra-*para*-guanidinoethyl-calix[4]arene". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 296-63.

- 121)** M. Grare, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Towards new antibacterial drugs. Interest of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene". *Pathol. Biol.* **2006**, *54*, 470-476.
- 122)** M. Grare, M. Mourer, S. Fontanay, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "*In vitro* activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria"; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2007**, *60*, 575-581.
- 123)** M. Grare, E. Dague, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, J.-F.L. Duval, R.E. Duval; "Microelectrophoresis and atomic force microscopy: new tools to explore mechanism of action of antibacterial compounds". *Pathol. Biol.* **2007**, *55*, 465-471.
- 124)** M. Grare, S. Fontanay, H. Massimba Dibama, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Time-kill curves and evolution of membrane permeability after *para*-guanidinoethylcalix[4]arene exposure". *Pathol. Biol.* **2010**, *46*, 46-51.
- 125)** M. Grare, H. Massimba Dibama, S. Lafosse, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R. E. Duval; "Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics hexamidine and chlorhexidine". *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16* (5), 432-8.
- 126)** Clinical infectious diseases: *a practical approach* par Richard K. Root, 1999.
- 127)** R. Lamartine, M. Tsukada, D. Wilson, A. Shirata; "Antimicrobial activity of calixarenes". *C. R. Chimie.* **2002**, *5*, 163-169.
- 128)** S.J. Harris; "Calixarenes-based compounds having antibacterial, antifungal, anti-HIV activity"; *Patent*. WO 95/19975. **1995**.
- 129)** S.J. Harris; "Anti-viral compounds"; WO 02/44121. **2002**.
- 130)** D. Coveney, B. Castello; EP1367044. **2003**.
- 131)** V. Kral, P. Cigler, J. Konvalinka, M. Kozisek, J. Prejdova, B. Gruner, J. Plesek, M. Lepsik; *Patent*. WO 05/073240. **2005**.
- 132)** D. Coveney, B. Castello; US 05/113454. **2005**.
- 133)** K.M. Hwang, Y.M. Qi, S.-Y. Liu, W. Choy, J. Chen; "Inhibition and treatment of infection by enveloped virus with calix(n)arenes compounds"; WO 94/03164. **1994**.

- 134)** K.M. Hwang, Y.M. Qi, S.-Y. Liu, W. Choy, J. Chen; "Antithrombotic treatment with calix[n]arene compounds"; WO 94/03165. **1994**.
- 135)** D. Hulmes, A. Coleman, E. Aubert-Foucher; "Use of calix(n)arenes for treating fibrotic diseases" WO 00/07585. **2000**.
- 136)** A.E. Montornaya, L.M. Alimbarova, V.V. Kovalev; "Synthesis and antiherpetic activity of N-(3-amino-1-adamantyl)calix[4]arenes"; *Pharm. Chem. J.* **2006**, *40* (2), 68-72.
- 137)** M. Mourer, N. Psychogios, G. Laumond, A.M. Aubertin, J.-B. Regnoui-de-Vains; "Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands"; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 36-45.
- 138)** a) A. Ben Salem, J.-B. Regnoui-de-Vains; "Synthesis and characterisation of a new podand based on a calixarene and a β -lactam". *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7033-7036.
- 139)** A. Ben Salem, J.-B. Regnoui-de-Vains; "Towards a new family of calixarene-based podands incorporating quinolone arms. Example of nalidixic acid". *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6769-6771.
- 140)** A. Ben Salem, J.-B. Regnoui-de-Vains, résultats en cours de publication
- 141)** B. Korchowiec, A. Ben Salem, Y. Corvis, J-B Regnoui de Vains, J. Korchowiec, E. Rogalska; "Calixarenes in a Membrane Environment: A Monolayer Study on the Miscibility of Three *p*-tert-Butylcalix[4]arene β -Lactam Derivatives with 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine"; *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111* (46), 13231-13242.
- 142)** T. Jin, M. Kinjo, Y. Koyama, Y. Kobayashi, H. Hirata; "Selective Na⁺ transport through phospholipid bilayer membrane by a synthetic calix[4]arene carrier"; *Langmuir* **1996**, *12*, 2684-2689.
- 143)** G. Drogmans, J. Prenen, J. Eggermont, T. Voets, B. Nilius; "Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes"; *AJP-Cell Physiology*. **1998**, *275*, 646-652.
- 144)** H. S. Park, Q. Lin, A. D. Hamilton; "Protein surface recognition by synthetic receptors: A route to novel submicromolar inhibitors for α -chymotrypsin". *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (1), 8-13.
- 145)** H.S. Park, Q. Lin, A.D. Hamilton; "Modulation of protein-protein recognition interactions by synthetic receptors: design of molecules that disrupt serine protease-proteaceous inhibitors interaction"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, *99* (8), 5105-5109.

- 146)** T. Mecca, G.M.L. Consoli, C. Geraci, F. Consolo; "Designed calix[8]arene-based ligands for selective tryptase surface recognition"; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (19), 5057-5062.
- 147)** S. Francese, A. Cozzolino, I. Caputo, C. Esposito, M. Martino, C. Gaeta, F. Troisi, P. Neri; "Transglutaminase surface recognition by peptidocalix[4]arene diversomers"; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (10), 1611-1615.

Chapitre II :

CALIXARENES GUANIDINIUMS

- 1) Rappel sur la stratégie de synthèse du para-guanidinoéthyl-calix[4]arène (CX1).**
- 2) Dérivés de CX1 avec n groupes *tert*-butyles en *para*.**
- 3) Dérivés de CX1 sans *tert*-butyles**
- 4) Nouveaux calix[4]arènes hydrosolubles bis-substitués sur la partie basse et leurs analogues monomériques.**

II.1. Introduction

Comme nous l'avons présenté en introduction générale, les recherches impliquant les calixarènes en thérapeutique sont rares, mais constituent pour notre équipe un axe de recherche important, dédié à la recherche de nouveaux composés anti-infectieux. Dans le cadre de l'élaboration de nouveaux agents anti-bactériens, M. Mourer (thèse 2006) [1-7] a développé un certain nombre de structures innovantes de type guanidinoéthyl calixarènes. Parmi ces composés, un s'est particulièrement singularisé par son pouvoir antibactérien élevé associé à une faible toxicité cellulaire, lui conférant un bon indice de sélectivité. Ce composé leader est le *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène **CX1 / 13**.

Toutes les études faites à ce jour autour du **CX1 / 13**, notamment au travers du travail de thèse de M. Grare (thèse 2009) [2-6], et ceux en cours tendent à confirmer l'importance de l'organisation du *para*-guanidinoéthylphénol en son tétramère cyclique pour la genèse d'une activité antibactérienne, comparable, voire supérieure, à celle des antiseptiques connus.

L'ensemble des travaux que nous présentons dans ce chapitre et les résultats qui en découlent, s'inscrivent dans le prolongement du travail réalisé par M. Mourer durant sa thèse.

Créer la famille des guanidinoéthylcalix[4]arènes parents du **CX1 / 13** a été une des priorités dans ce projet de thèse. Nous avons pour cela défini un programme de modulation de structure du **CX1 / 13**. Nous nous sommes attachés à diminuer le nombre de groupements guanidinoéthyle, en gardant libres les positions *para* libérées, ou en y introduisant (ou plutôt y laissant) un groupe tert-butyle. En parallèle, en vue d'enrichir la famille des calixarènes bi-hétérocycliques, nous avons également, fonctionnalisé deux groupements hydroxyles en position alternée, par un bi-hétérocycle la 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine, et par une entité isostère non hétérocyclique, le 4-méthyl-1,1'-biphényle.

L'objet de toutes ces transformations est l'étude des variations des propriétés antibactériennes de ces composés par rapport au **CX1 / 13**.

II.2. Rappel sur la stratégie de synthèse du *para*-guanidinoéthyl-Calix[4]arène (CX1).

La stratégie de synthèse développée par M. Mourer pour obtenir le *para*-guanidinoéthyl-calix[4]arène comprend deux étapes :

II.2.1. Synthèse du *tétra-para*-(*boc*-aminoéthyl)calix[4]arène **8**.

La première étape vise l'obtention d'un composé intermédiaire "clé", *tétra-para*-(*boc*-aminoéthyl)calix[4]arène **8**. En effet, c'est sure cette entité calixarénique que nous apportons des groupements fonctionnels en partie basse.

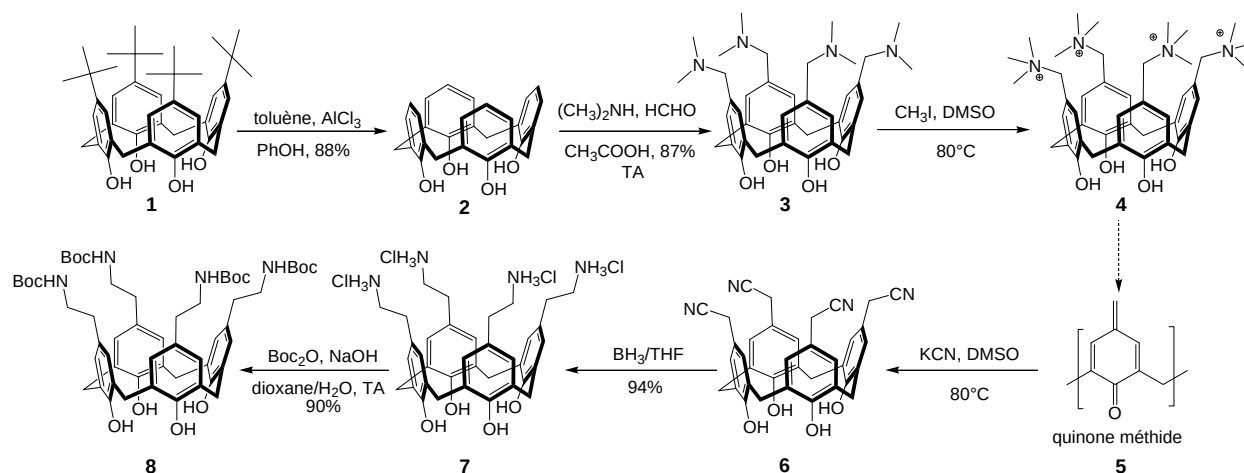


Fig. 1 : Synthèse du *tétra-para*-(*boc*-aminoéthyl)calix[4]arène **8**.

Cette synthèse (**8** Fig. 1) se déroule en 5 étapes selon différents modes opératoires décrits dans la littérature (Fig. 1)

- La première étape est une dé-tertiobutylation de type rétro-Friedel et Craft du calixarène tert-butylé **1**, pour donner le calixarène « nu » **2**.

➤ La seconde étape est une réaction de Mannich développée par Gutsche et coll notamment, pour le développement des composés hydrosolubles [8-12]. Le calixarène “nu” **2**, réagit en présence du formaldéhyde (HCHO, solution à 37 % dans l’eau) et d’une dialkylamine (ici la diméthylamine, solution à 40 % dans l’eau) durant 24 heures à température ambiante dans un mélange THF/acide acétique pour former la *tétra*-base de Mannich **3**, avec de très bon rendement (95 %) (Fig. 2).

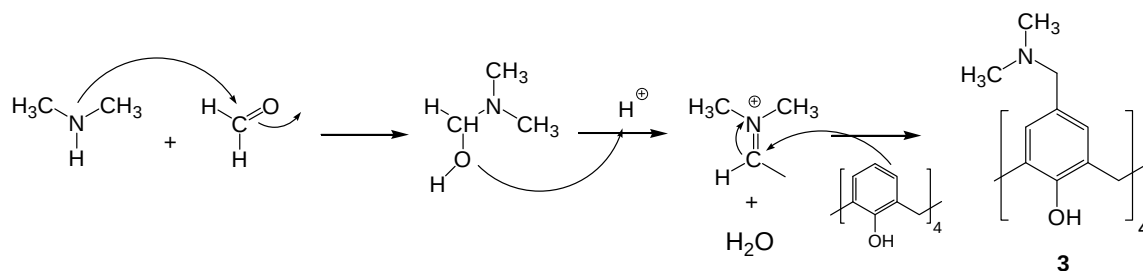


Fig. 2 : Proposition de mécanisme pour la réaction de Mannich.

➤ Dans la troisième étape, l’amine **3**, subit une méthylation par traitement à l’iodure de méthyle dans le DMSO, pour donner le sel d’ammonium quaternaire **4**.

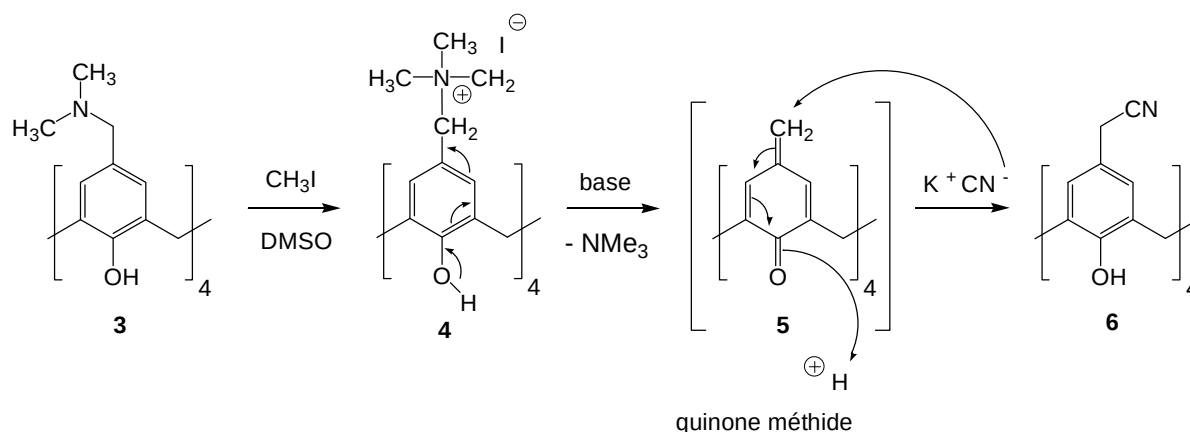


Fig. 3 : Réaction de nitrilation via la voie dite des “quinones méthide”.

L’attaque nucléophile sur l’ammonium quaternaire **4** peut être effectuée en mode « one pot », par addition directe, ici du cyanure en excès, au milieu d’alkylation, soit après isolement de **4**. Cependant, ce dernier mode n’est pas satisfaisant.

Le *tétra*-para-(cyanométhyl)calix[4]arène **6** est isolé par précipitation à l’acide chlorhydrique. Cette méthode de synthèse présente une contrainte importante qui est la

formation de HCN. Heureusement, ce dernier est infiniment soluble dans l'eau, ce qui limite les risques de dégazage incontrôlé lors de la filtration sous vide du tétra-nitrile **6**. Le traitement nécessite une étape supplémentaire de destruction des eaux de lavages contenant HCN par basification à pH 12 à l'aide d'une solution de soude, suivie d'une oxydation des cyanures à l'eau de javel.

L'ajout de javel additionnée d'hydroxyde de sodium dans une solution de cyanure conduit au cyanate correspondant.

- Formation de chlorure de cyanogène selon :



- Destruction du chlorure de cyanogène en milieu fortement alcalin :



Cette destruction doit s'effectuer en milieu très fortement basique (pH = 12) pour que le chlorure de cyanogène soit immédiatement détruit.

➤ L'avant dernière étape est la réduction du calix[4]arène cyano-méthylé **6**. Cette méthode a été décrite par Gutsche [10], utilisant comme agent réducteur le borane dans le THF. L'obtention de l'amine se fait par attaque à HCl, mais les difficultés rencontrées pour purifier le chlorhydrate **7** par précipitation nous ont amenés, au laboratoire, à procéder à une dérivation des fonctions amines, suivie d'une purification par chromatographie et déprotection consécutive. A ce stade, le choix du groupe dériveur a été fait avec deux objectifs : a) obtenir le sel d'ammonium **7** pur après déprotection, b) protéger l'amine pour proposer diverses réactions de fonctionnalisation sur les groupes hydroxyles de la couronne basse. Le groupe Boc (tert-butyloxycarbonyle), lipophile, stable en milieu basique, éliminé en milieu acide, a été ainsi choisi. Le composé *tétra-para*-(Bocaminoéthyl)calix[4]arène **8** est ainsi obtenu avec un excellent rendement par réaction du sel d'ammonium **7** avec le (Boc)₂O, puis purifié par chromatographie et cristallisation.

II.2.2. Synthèse du *para*-guanidinoéthyl-Calix[4]arène (CX1)

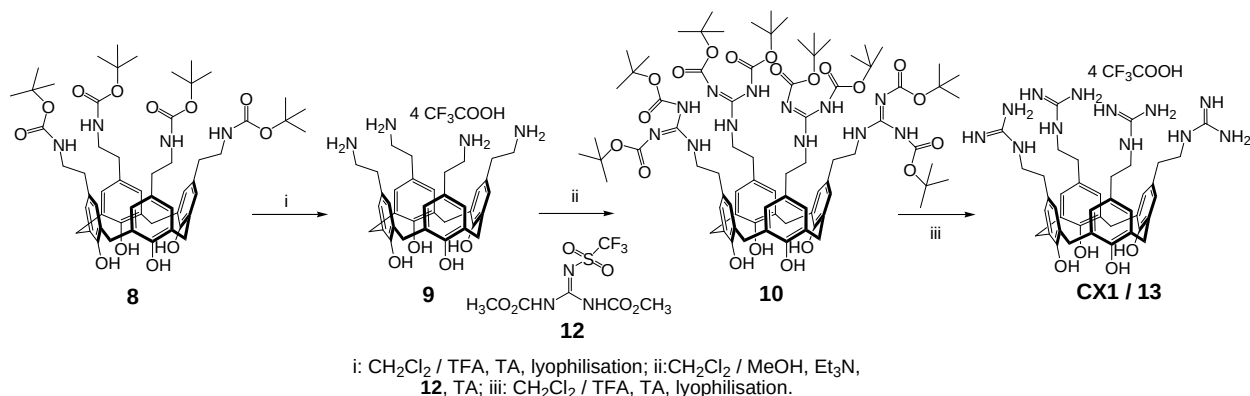


Fig. 4 : Synthèse de la *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène [1].

La synthèse du tétra-*para*-guanidinoéthyl-calix[4]arène **CX1 / 13** consiste à « créer » une fonction guanidine par attaque nucléophile du calixarène aminoéthyle sur le réactif guanidylant, avec formation du composé **10**, le tétra-*para*-[(N,N'-di-Boc-guanidinoéthyl)]calix[4]arène, qui est ensuite hydrolysé en milieu acide (TFA).

Afin de s'assurer du maximum de pureté au cours de ce protocole, le composé **8** est purifié puis déprotégé en milieu acide (TFA) pour donner le tétra trifluoroacétate d'ammonium **9** pur. Ce dernier est alors transformé en composé **10**, lui-même purifié avant d'être hydrolysé en tétra trifluoroacétate **CX1 / 13**.

Pour réaliser cette guanidylation, deux méthodes ont été utilisées au laboratoire [7] :

❖ La méthode N°1 (Fig. 5) est une attaque nucléophile par une fonction amine primaire du synthon 1,3-bis-(tert-butoxycarbonyl)-2-méthyl-2-thiopseudourée **11**, catalysée par HgCl_2 . Elle ne nous a donné que partiellement satisfaction. Ces résultats ont été confirmés dans nos travaux.

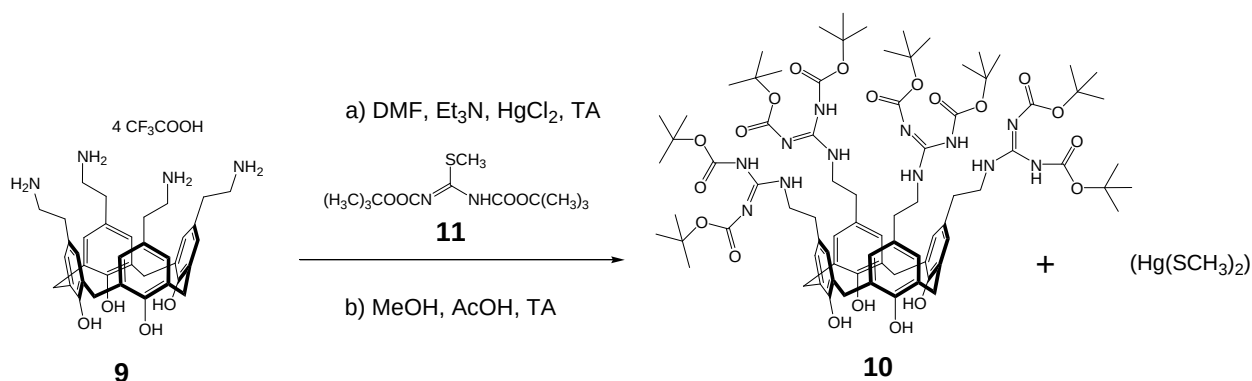


Fig. 5 : Création de la fonction guanidine sur le calix[4]arène selon la méthode N°1.

Cette méthode est également utilisée par Ungaro [13-15], mais uniquement sur des composés calixaréniques ne possédant pas de fonctions phénoliques libres et ce avec des rendements moyens de 40 %.

En revanche, cette méthode s'avère être excellente sur des composés moins encombrés que la tétra-amine **7**.

❖ La méthode N°2 utilise le trifluoroacétate du *tétra-para*-(aminoéthyl)calix[4]arène **9** purifié comme nucléophile pour l'attaque du synthon N,N' -bis(*tert*-butoxycarbonyl)- N'' -triflylguanidine **12**, selon le schéma réactionnel suivant (Fig. 6):

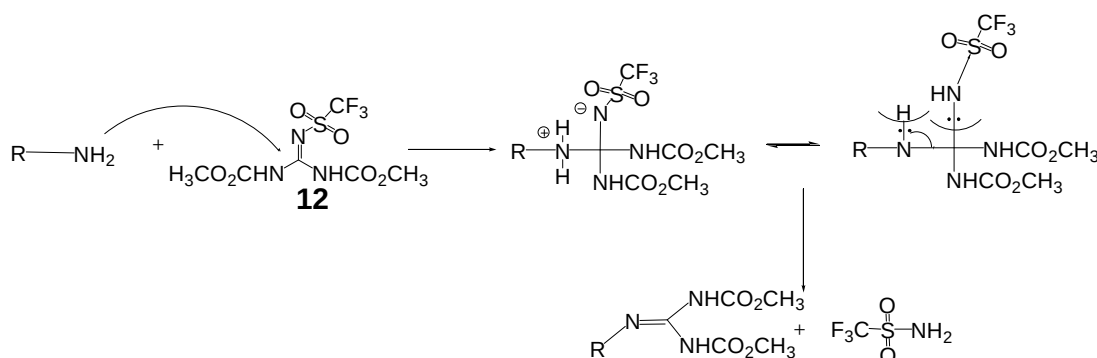


Fig. 6 : Greffage de la fonction guanidines sur le calix[4]arène selon la méthode N°2.

Par cette méthode, la création des fonctions guanidiniums sur le calix[4]arène est effectuée de manière très satisfaisante et reproductible. Dans le cadre de ce travail, nous avons apporté quelques modifications au niveau du traitement du brut réactionnel. Compte tenu de la fragilité des fonctions Boc en milieux acide, le lavage préconisé du brut par une solution acide (NaHSO_4 2M) et une solution basique saturée (NaHCO_3) [1] est remplacé par deux simples lavages à l'eau.

L'analyse RMN ^1H des composés obtenus, montre un profil identique à celui des composés n'ayant pas subi de modifications de traitement.

Toutefois, l'entité di-boc-triflyl-guanidine **12** est un composé commercial mais d'un coût très élevé en vue de synthèses engageant des quantités importantes, et ayant rencontré des difficultés à le préparer de façon convenable au début de ce travail (problème résolu), nous avons donc d'autres voies pouvant conduire à la création de fonctions guanidiniums.

❖ La méthode N°3 [16,17,18], consiste en l'attaque nucléophile d'une amine primaire (R-NH_2) sur le N, N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamidine **15** (Fig. 7).

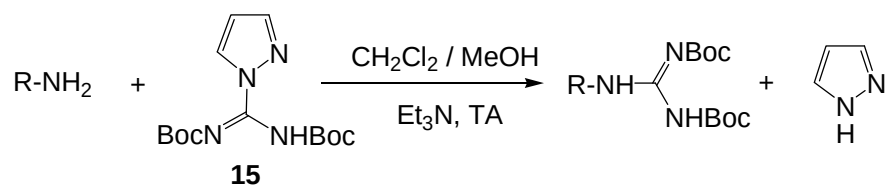


Fig. 7 : Création de fonctions guanidines selon la méthode N°3.

Nous avons jugé utile de synthétiser nous-même le N, N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamidine **15**, [16,17,18] à partir du 1H-pyrazole carboxamidine chlorhydrate (fig.9). La protection de la fonction amidine est effectuée en deux étapes.

La première protection se fait par réaction du di-tert-butyl-dicarbonate (Boc_2O) sur le chlorhydrate de 1H-pyrazole carboxamidine dans un mélange de dioxane / H_2O , en présence de NaOH.

Les analyses RMN ^1H réalisées ont montré l'introduction d'un seul groupement Boc, donnant le dérivé **14**. L'usage de la soude étant jugé insuffisant pour déprotoner l'imine, la protection de cette dernière s'est faite en faisant réagir **14** en présence de NaH sur du Boc_2O dans du THF fraîchement distillé (Fig. 8). Le produit doublement protégé **15** a été obtenu comme décrit dans la littérature [16], avec un rendement de 60 % et sous forme d'une huile incolore.

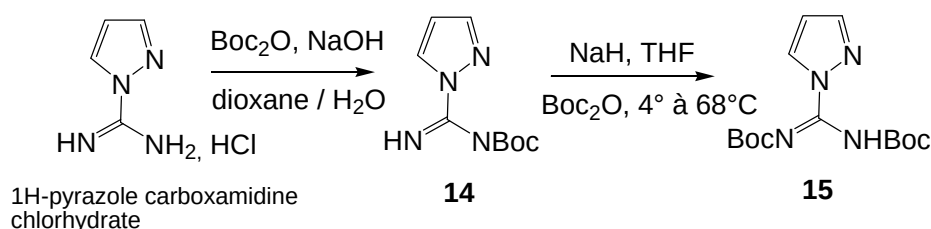


Fig. 8 : Synthèse du N, N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamidine **15**.

La réaction du calixarène tétra amine **9** sur **15** dans les conditions décrites en figure 9 a abouti à la synthèse du dérivé **10**, mais avec des rendements moyens **58%**. Cette alternative n'a pas été retenue pour la synthèse du calixarène **CX1**, mais, comme la méthode N°1, a été appliquée avec succès sur d'autres composés moins encombrés. Des trois méthodes, celle que nous avons sélectionné pour la création des fonctions guanidiniums sur un calixarène est la méthode N°2. Le synthon triflylguanidine **12** est certes très onéreux mais la méthode assure la fonctionnalisation des calix[4]arènes avec reproductibilité et un excellent rendement. **12** est à l'heure actuelle synthétisé avec succès au laboratoire.

II.3. Dérivés de CX1 avec n groupes *tert*-butyles en *para*

Dans le but d'évaluer le rôle joué par le nombre et le positionnement des groupes guanidinoéthyles sur la partie haute du calixarène, avec présence concomitante de groupes *tert*-butyles résiduels hydrophobisants, nous avons développé une stratégie de synthèse similaire à celle du **CX1**, sur divers calixarène partiellement détertibutylés.

II.3.1. Synthèse des dérivés (tert-butyl)_n (diméthylaminométhyl)_{4-n} – n = 2,3.

Notre travail a porté sur ces deux dérivés, aisément accessibles; le mono-para-tert-butyl et le 5,11-di-tert-butyl (adjacents) calix[4]arène n'ont pas pu être préparés durant cette étude.

Les travaux de Gutsche et coll [10,19,20] présentent l'introduction sur la partie haute du calix[4]arène de un à quatre groupements (diméthylamino)méthyles en utilisant la réaction de Mannich, ouvrant ainsi la voie à diverses fonctionnalisations ultérieures.

Regnouf-de-Vains et coll [21] ont procédé à l'introduction de diverse types de groupements méthyléniques activés (Cl, N₃, ...) sur la couronne haute du tris-para-(tertbutyl)calix[4]arène et démontrent, par des études de spectrométrie de masse en mode électrospray [22], que tous ces composés se décomposent en un même intermédiaire, l'analogue mono-quinoneméthide, confirmant ainsi l'existence de cette entité prévue par Gutsche.

II.3.2. Synthèse du composé 5,11,17-tris-para-(tert-butyl)-23-mono-(diméthylaminométhyl)-calix-[4]arène (17) et du 5,17-bis-para-(tert-butyl)-11,23-bis-(diméthylaminométhyl)-calix[4]arène 19

Dans cette première étape, nous avons conformément à la littérature [10,20,21], introduit un groupement diméthylaminométhyle sur la couronne haute du tris (p-tert-butyl)calix[4]arène **16**. [23] La mono-aminométhylation de **16** se fait dans les conditions de Mannich (formaldéhyde et diméthylamine) [21] (Fig. 9) pour donner **17**.

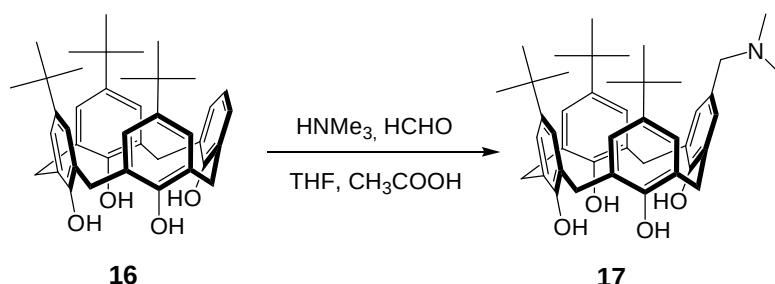


Fig. 9 : Incorporation d'une fonction diméthylaminométhyle sur le tris (p-tert-butyl)calix[4]arène **16** [22].

Gutsche et coll. [20], décrivent également l'introduction de deux groupements "diméthylaminométhyl" en positions distales sur le 5,17-bis-(*p*-*tert*-butyl)calix[4]arène **18**, donnant le composé **19**.

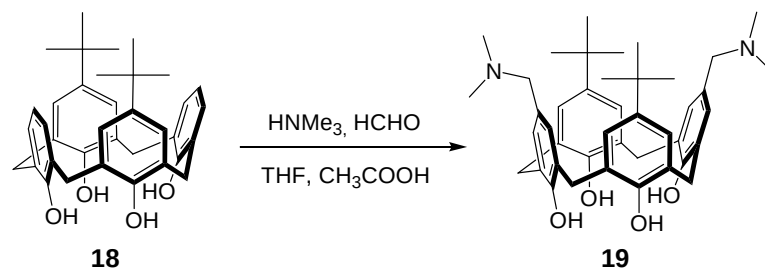


Fig. 10 : Incorporation de deux fonctions diméthylaminométhyle sur le bis-(*p*-*tert*-butyl)calix[4]arène **18** [20].

Les produits **17** et **19** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 92 % et 93 % conformément à la littérature [20,21]. Les analyses RMN ^1H ont confirmé les structures des produits attendus.

II.3.3. Synthèse des composés 5,11,17-tris-*para*-(*tert*-butyl)-23-mono-(cyanométhyl)-calix-[4]arène **20** et du 5,17-bis-*para*-(*tert*-butyl)-11,23-bis-(cyanométhyl)-calix-[4]arène **21**

Dans cette étape, les groupements diméthylamino des dérivés **17** et **19** sont transformés en groupement nitrile, dans les conditions quasi identiques à celles décrites par la littérature [20,21]. Les composés **17** et **19** réagissent chacun en présence d'un excès d'iodure de méthyle (CH_3I) et de cyanure de potassium (KCN) dans le DMSO. Nous avons ainsi obtenu respectivement les composés **20** et **21** (Fig. 11), avec des rendements de 62 % et 85 % ; les analyses (RMN ^1H , ^{13}C , AE... etc.) ont confirmé les structures attendues, ainsi que leur conformation conique.

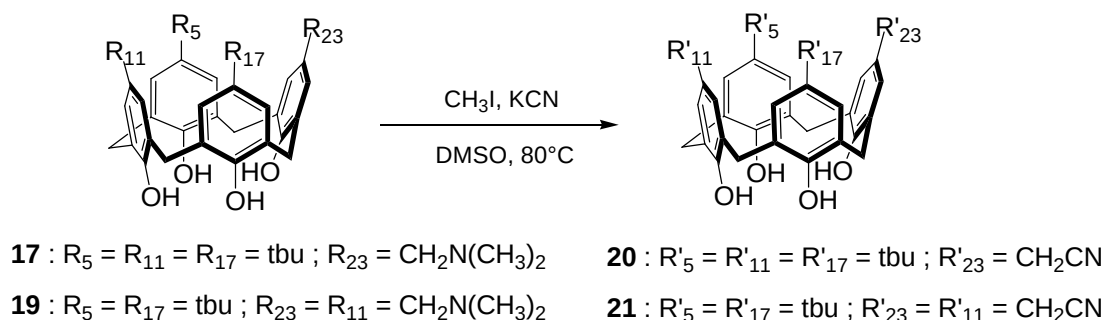


Fig. 11 : Synthèse des dérivés mono- et bis-nitriles **20** et **21**.

II.3.4. Synthèse des chlorhydrates du 5,11,17-tris-*para*-(tert-butyl)-23-mono-(aminoéthyl)-calix-[4]arène **22** et du 5,17-bis-*para*-(tert-butyl)-11,23-bis-(aminoéthyl)-calix-[4]arène **23**

L'étape suivante consiste à réduire les groupements nitriles des composés **20** et **21** (Fig. 12). Les conditions de réduction que nous avons utilisées s'inspirent de la littérature [1,10] et le traitement est identique à celui utilisé pour réduction du *tétra-para*-(cyanométhyl)calix[4]arène **6** (Cf chap II.2.1.).

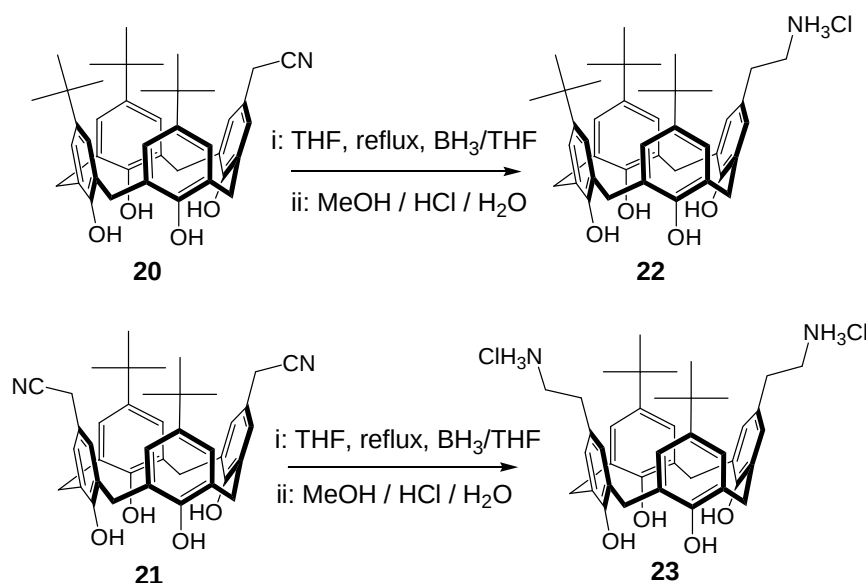


Fig.12 : Réduction des dérivés mono- et bis-(cyanométhyl)-calix[4]arènes **20** et **21**.

Chaque dérivé cyanométhylé est mis en solution dans du THF anhydre et 5 (**20**) ou 10 (**21**) équivalents d'une solution molaire de BH_3 (complexe THF-BH_3) dans le THF

sont additionnés. Le mélange réactionnel est porté à reflux sous argon puis, après destruction de l'excès de borane au méthanol, et évaporation de $B(OMe)_3$ et des solvants, le résidu est hydrolysé en milieu hydro-alcoolique acide pour donner les chlorhydrates **22** et **23** avec 85 et 91% de rendement, respectivement.

Les dérivés aminoéthylés **22** et **23** ont été engagés ensuite dans la réaction de guanidylation.

II.3.5. Synthèse des dérivés Boc du 5,11,17-tris-*para*-(*tert*-butyl)-23-mono-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène **24** et du 5,17-bis-*para*-(*tert*-butyl)-11,23-bis-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène **25**

Pour préparer ces deux composés, nous avons choisi la méthode n°2 impliquant le N,N'-di-Boc-N'' triflylguanidine **12**. Comme nous l'avons montré précédemment, cette méthode d'introduction de groupements guanidiniums, donne des résultats tout à fait satisfaisants et reproductibles. Les dérivés *para*-(aminoéthyl)calix[4]arène issus des chlorhydrate **22** et **23** réagissent comme nucléophile pour attaquer le synthon **12** suivant le schéma réactionnel suivant (Fig. 13).

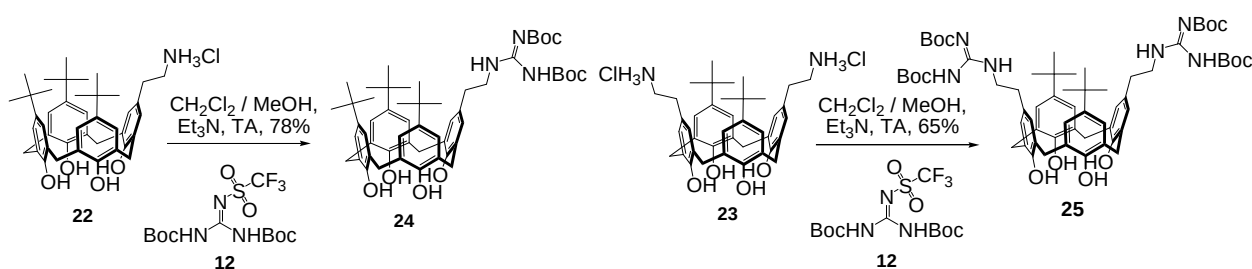


Fig. 13 : Première étape de la synthèse des calix[4]arènes « mixte *para*-*tert*-butyl / *para*-guanidinoéthyl ».

Nous avons obtenu les deux dérivés protégés **24** et **25** de manière très propre et avec des rendements de 78 % et 65% respectivement. Les produits ont été purifiés sur colonne de silice et l'ensemble des analyses effectuées est tout à fait conforme à nos attentes. Ces composés conservent la conformation conique.

II.3.6. Synthèse des sels du 5,11,17-tris-para-(tert-butyl)-23-mono-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène **26** et du 5,17-bis-para-(tert-butyl)-11,23-bis-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène **27**

La dernière étape est une déprotection des fonctions (di-Boc-guanidinoéthyle) des composés **24** et **25**. Elle s'effectue par hydrolyse acide ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ 85 :15) à température ambiante pendant 24 heures, sous argon.

Nous obtenons ainsi, les dérivés guanidinoéthyl **26** et **27** sous forme de trifluoroacétates avec des rendements de 93 % et 91 % respectivement (Fig.14). Le traitement final fait intervenir une suite d'évaporations de CH_2Cl_2 afin d'entraîner le maximum de TFA résiduel, puis une trituration dans Et_2O jusqu'à l'obtention d'un pH neutre de ce dernier. Le résidu solide final est repris dans l'eau et lyophilisé pour donner les sels **26** et **27** sous forme de poudre cotoneuse.

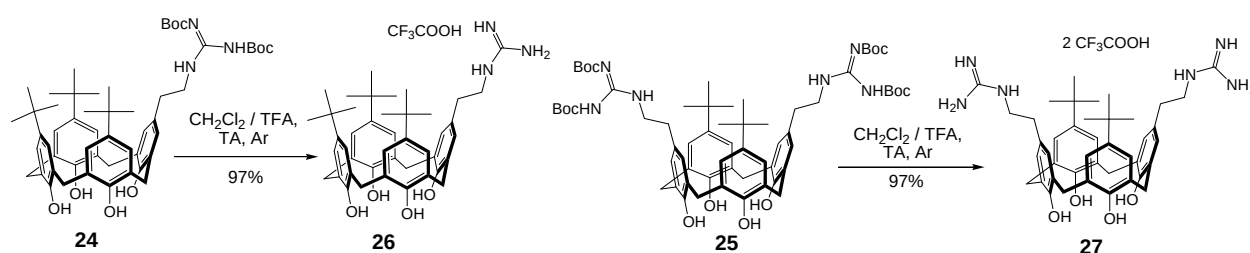


Fig. 14 : Déprotection en milieu acide des composés **24** et **25**.

II.3.6.1. Analyses des composés **26** et **27**.

L'examen des spectres RMN ^1H des composés **26** et **27** (à température ambiante, dans $\text{DMSO}-d_6$), montre des signaux de la plateforme calixarénique bien résolus et présentant des profils différents, ainsi qu'attendu.

• Le composé **26**, par la présence attendue d'un bras guanidinoéthyle sur la partie haute du calixarène, doit présenter une diminution de symétrie de l'anneau macrocyclique, créant ainsi trois groupes de noyaux phénoliques (Fig. 15).

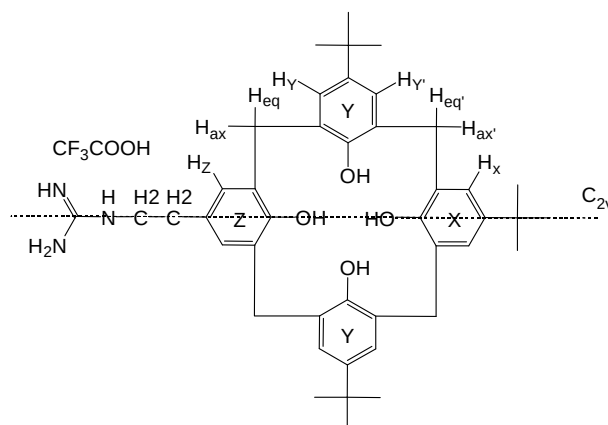


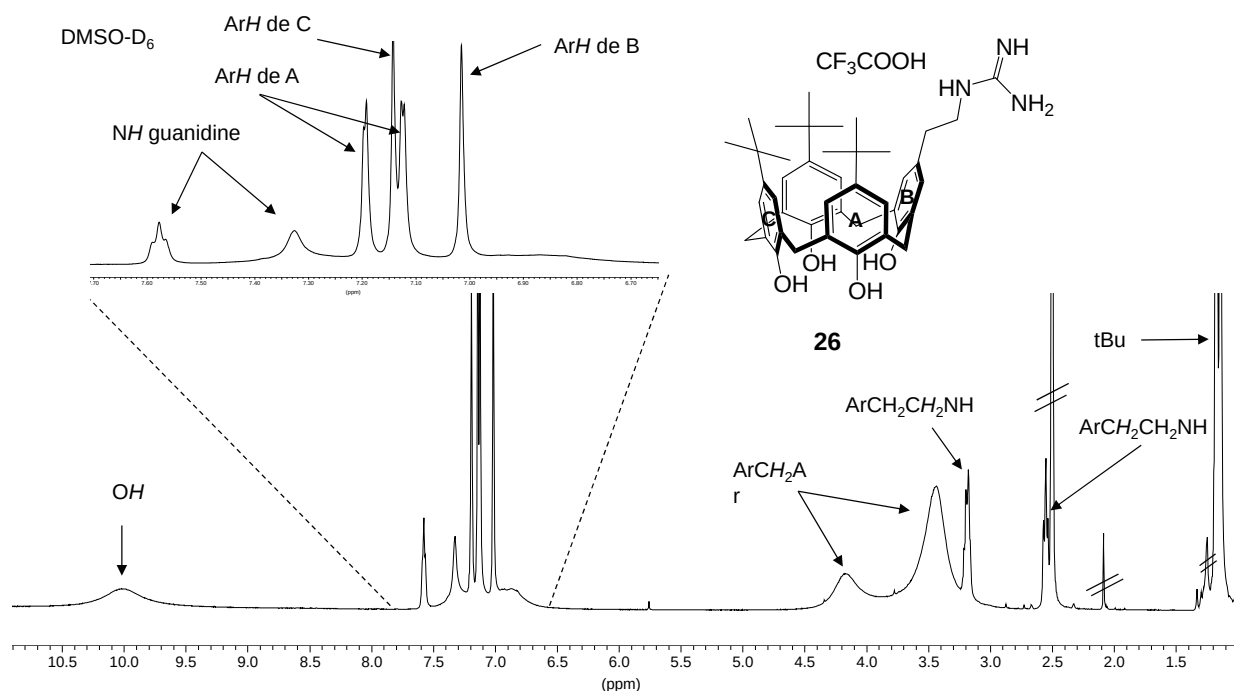
Fig. 15 : Représentation schématique du tris-para-(tert-butyl)-mono-guanidinoéthyl-calix[4]arène **26**.

Ainsi le spectre RMN ^1H (Fig. 16) fait apparaître dans la partie aromatique (6,5 – 7,5 ppm) deux singulets à 7,01 et 7,14 ppm correspondant aux protons aromatiques H_x et H_z (équivalent deux à deux) des noyaux phénoliques X et Z, et deux signaux à 7,12 et 7,19 ppm correspondant aux protons aromatiques H_y et $\text{H}_{y'}$. L'éclatement de cette partie du spectre montre que ces deux types de protons sont couplés l'un à l'autre et forment un système AB « fort » (constante J_{AB} non mesurable).

Les signaux des protons méthyléniques $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ sont observés dans la zone des champs moyens et sont représentés par un système AB large à 3.51 ppm et 4.25 ppm intégrant 4 H chacun. La présence du groupe guanidinoéthyle ne provoque pas de discrimination visible des protons $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ et $\text{Ar-CH}'_2\text{-Ar}$.

Les quatre protons hydroxyles des noyaux phénoliques apparaissent à 10.12 ppm sous la forme d'un signal large.

On observe enfin deux singulets à 1.18 ppm (9H) et 1.22 ppm (18 H) correspondant au groupement tert-butyle des noyaux phénolique X et Y et un ensemble de deux singulets larges à 2.66 et 3.17 ppm, attribués au bras éthylénique reliant le calixarène à la fonction guanidine. Les protons (H guanidine) sont représentés par un ensemble de



signaux (6,5-7,8 ppm).

Fig.16 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6 , TA) du composé **26**.

Nous avons réalisé le spectre RMN ^{13}C du composé **26** qui confirme la conformation cône de la structure calixarénique par la présence du signal des carbones ArCH_2Ar à 31.5 ppm. Nous présentons ci-dessous (Fig 17) le spectre effectué dans le DMSO- D_6 . On y note particulièrement la présence du signal correspondant au carbone de la fonction guanidinium à 157.04 ppm.

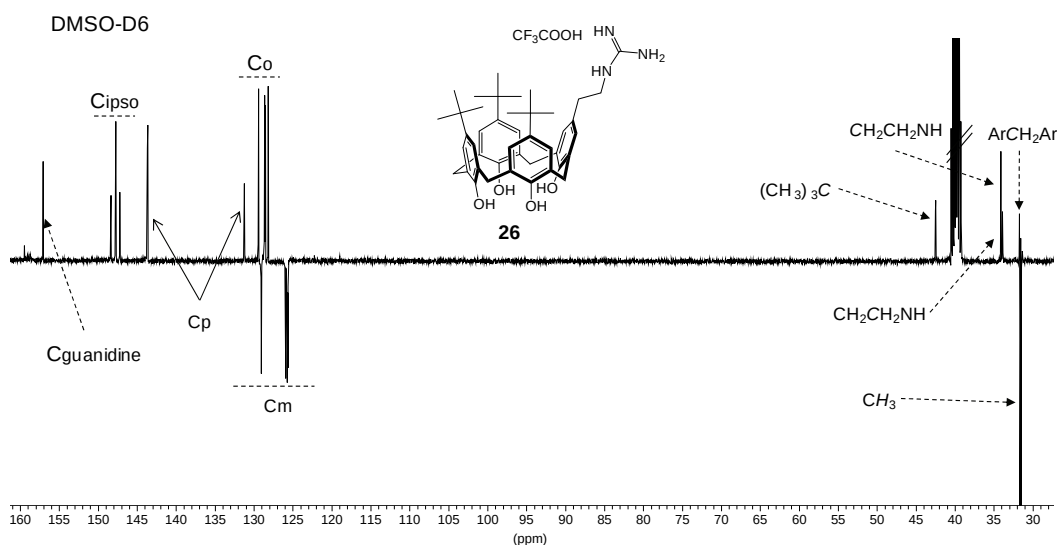


Fig.17 : Spectre ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6) du composé **26**.

Le signal trouvé à 157 ppm confirme la création de la fonction guanidine. Le groupe trifluoroacétate, difficile à observer du fait de sa multiplicité et de ses grandes constantes de couplage $J_{\text{C-F}}$, et qui apparaît de façon aléatoire dans cette famille de composés, n'est ici pas visible.

- Pour le composé **27**, la disposition des deux bras transforme la symétrie C_{4v} du calixarène non substitué en une symétrie C_{2v} (Fig. 18), caractérisée par un spectre d'une grande simplicité.

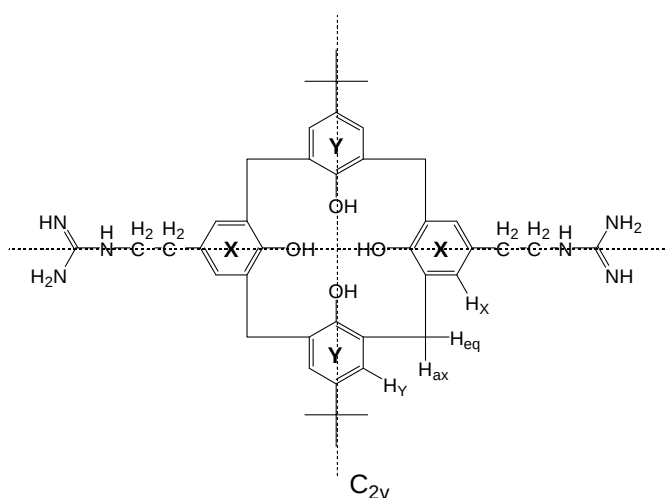


Fig.18 : Représentation schématique du composé **27**.

Le spectre RMN ^1H du composé **27**, mesuré dans DMSO-D_6 , comporte quatre parties bien définies, alkyl (tBu), guanidinoéthyle, méthylénique et aromatique.

- Les 18 protons des groupements tert-butyles apparaissent sous la forme d'un singulet à 1.19 ppm (18 H).

- Deux signaux larges à 2.64 (4H) et 2.87 ppm (4H) sont attribués aux bras éthyléniques reliant le calixarène aux fonctions guanidines. Le signal des protons guanidines est à 8,20 ppm.

Deux signaux larges à 3.38 et 4.16 ppm intégrant 8 H, et constituant un système AB, sont attribués aux ponts méthyléniques (ArCH_2Ar).

- Deux singulets à 7.00 et 7.16 ppm qui intègrent chacun 8 H sont attribués aux protons des cycles aromatiques.

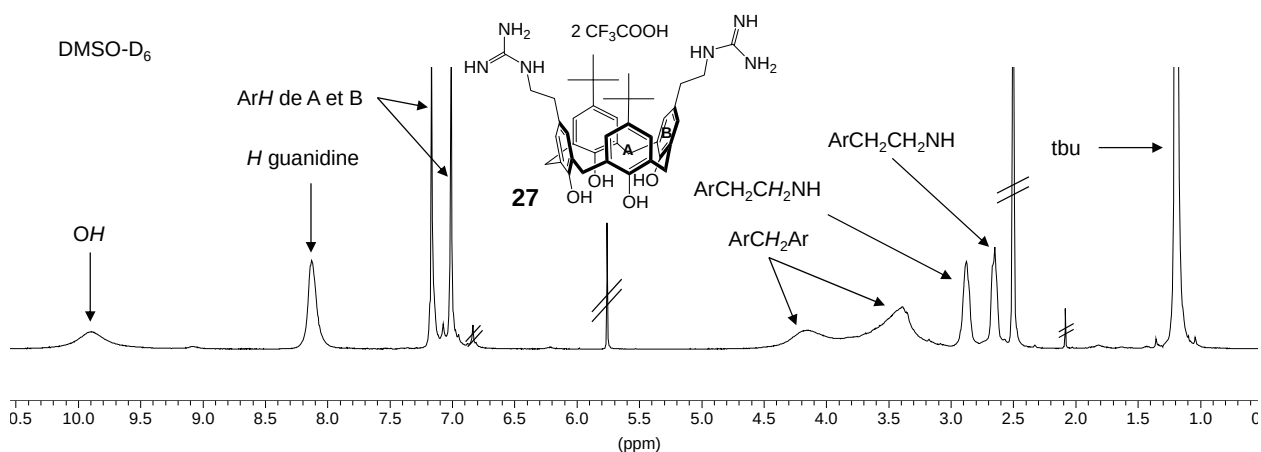


Fig. 19: Spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) du composé **27**.

L'analyse RMN ^{13}C du composé **27** (Fig. 20), réalisée dans DMSO-D_6 révèle aussi, par la présence du signal de résonance des groupes $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ à 31.57 ppm, que la molécule **27** est de conformation conique, le signal à 157.09 ppm correspond au carbone de la fonction guanidine.

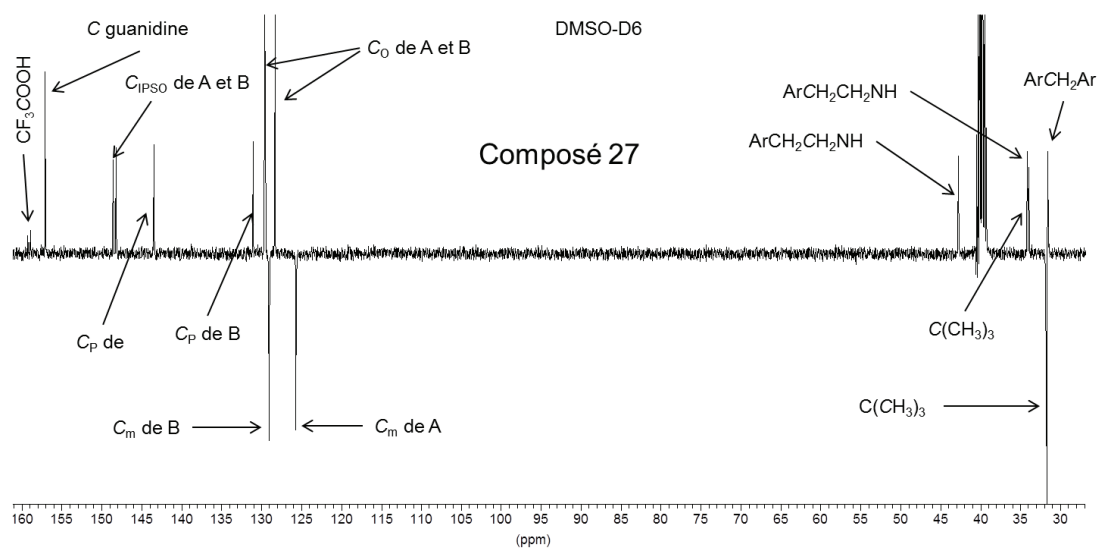


Fig. 20: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, TA) du composé **27**.

Les analyses élémentaires des composés **26** et **27** correspondent aux structures attendues (Tableau 1).

	Calculé (%)	Trouvé (%)
26	$\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_4$, CF_3COOH , 1.6 H_2O (935.49) $\text{C}(65.85\%); \text{H}(7.27\%); \text{N}(5.12\%)$	$\text{C}(65.50\%); \text{H}(7.15\%); \text{N}(5.84\%)$
27	$\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_4$, 2 CF_3COOH , H_2O (952.98) $\text{C}(57.98\%); \text{H}(6.13\%); \text{N}(8.82\%)$	$\text{C}(58.07\%); \text{H}(5.71\%); \text{N}(8.87\%)$

Tableau 1 : Valeurs des analyses élémentaires des composés **26**, **27**.

II.4. Dérivés de CX1 sans groupes *para*-tert-butyles

En parallèle à l'étude précédente portant sur la modulation du nombre de groupes guanidinoéthyles et de groupes lipophiles tert-butyles, nous avons développé les dérivés n'intégrant aucun groupe tert-butyles.

Nous avons dans ce cas préparé trois nouveaux composés, les mono-, di- et tris-guanidinoéthylcalix[4]arènes **32**, **38** et **42**, dont les synthèses sont décrites ci-après.

II.4.1. Stratégie de synthèse

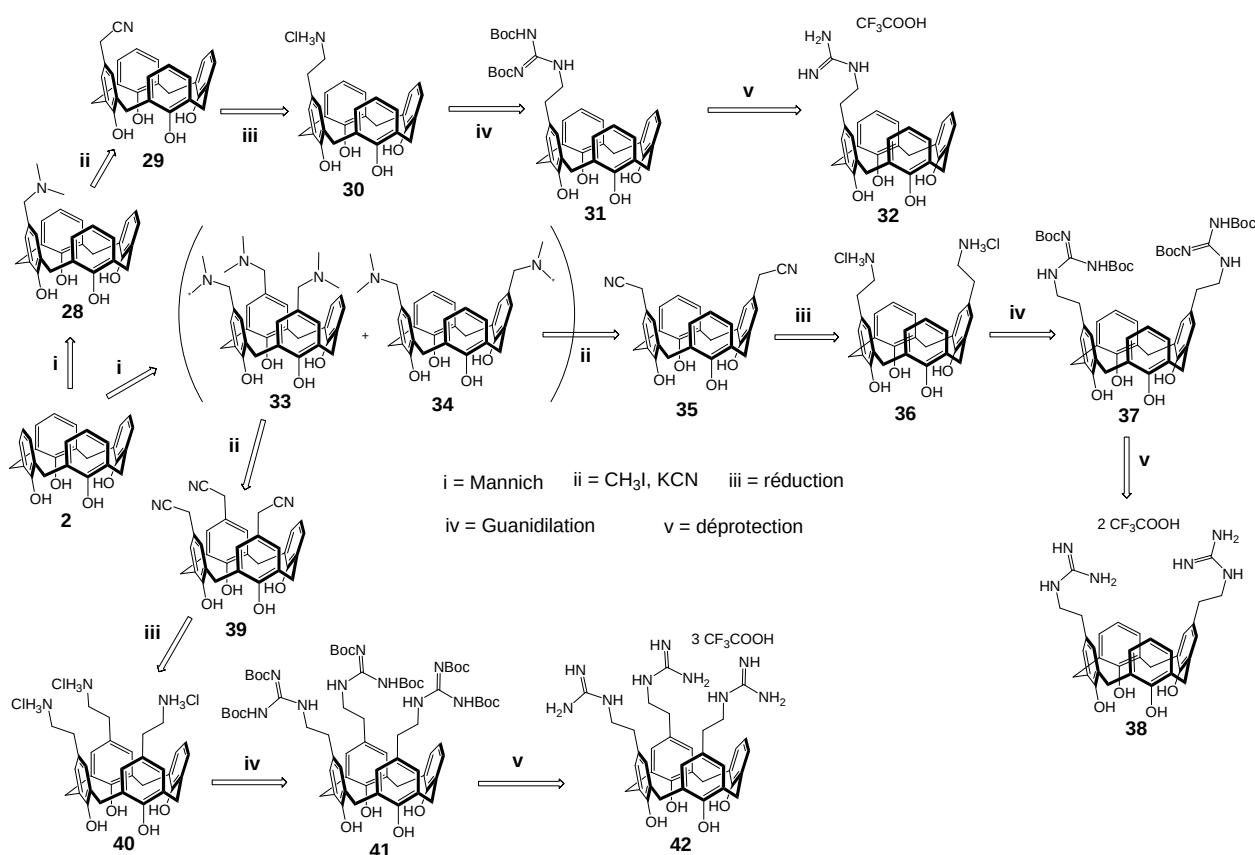


Fig. 21 : Stratégie de synthèse des composés **32, **38** et **42**.**

Les trois voies de synthèse partent du calixarène « nu » **2**, à partir duquel une réaction de Mannich, contrôlée ou non, permet de préparer les dérivés mono-, di- et tris-(diméthylaminométhyl) **28**, **33** et **34**. La réaction de (méthylation + nitrilation) donne alors les dérivés mono-, di- et tris-(cyanométhyl) **29**, **35** et **39** qui sont ensuite réduits en dérivés mono-, di- et tris-(aminoéthyl) **30**, **36** et **40**. La création des fonctions guanidines *via* les analogues Boc-protégés **31**, **37** et **41** permet d'obtenir enfin les dérivés hydrosolubles mono-, di- et tris-(guanidinoéthyl) **32**, **38** et **42**, sous forme de trifluoroacétates.

II.4.2. Synthèse des dérivés *para*-(diméthylaminométhyl)calix[4]-arène **28**, **33** et **34**

La synthèse de l'analogue mono-(diméthylaminométhyl) **28** a été décrite par Gutsche [24]. Elle est effectuée par réaction du calixarène **2** avec HCHO et NMe₂ et donne le composé **28** avec un rendement de 95 %. Par contre, nous n'avons pas trouvé dans la littérature de protocoles nous permettant d'obtenir les analogues **33** et **34**. Nous avons donc développé une méthode de synthèse de ces derniers.

Lors d'une synthèse du composé **CX1**, un formaldéhyde de mauvaise qualité avait été utilisé pour l'étape d'aminométhylation. Nous avons isolé du mélange brut un ensemble de produits parmi lesquels le tétra-, le tris- et le 5,17-bis-substitués, ce dernier en faible proportion. La réaction de Mannich dépendant de la stœchiométrie en formaldéhyde, nous avons exploité cette observation en limitant volontairement la quantité de ce dernier pour former préférentiellement les dérivés 5,11,17-tris- et 5,17-bis- (diméthylaminométhyl) **33** et **34**.

Ainsi, le calix[4]arène **2** est mis en réaction dans le THF en présence de CH₃COOH. 2.5 équivalents de HCHO et 2.5 équivalents de Me₂NH en solution aqueuse sont alors ajoutés au mélange qui est laissé sous agitation, sous atmosphère d'argon durant environ 5 heures. La phase aqueuse est ensuite extraite et lavée à l'éther, puis basifiée au carbonate de potassium pour donner un précipité blanc qui est filtré et séché.

Bien que cette synthèse ait présenté un bon résultat en chromatographie couche mince, elle reste toutefois une méthode aléatoire et qui ne permet pas de savoir à l'avance quel produit sera majoritaire. Il est bien sur possible d'influer sur le résultat final en modifiant les équivalences de formaldéhyde et de diméthylamine utilisés. Ainsi nous avons obtenu le mélange de deux produits majoritaires : les composés **33** et **34** (Fig. 22).



II.4.3. Synthèse des dérivés *para*-(cyanométhyl)calix[4]arènes 29, 35 et 39

106

Pour les analogues **35** et **39**, nous sommes partis du mélange constitué majoritairement des amines **33** et **34** sur lequel on a fait réagir en excès CH_3I et KCN . Après environ 24 heures de réaction sous atmosphère d'argon et à température ambiante, il se forme deux produits majoritaires que l'on sépare sur colonne chromatographique (SiO_2 , CH_2Cl_2). Nous présentons sur la figure 23 les spectres a, b et c des composés **29**, **35** et **39** issus des analyses RMN ^1H (400 MHz, TA) dans CDCl_3

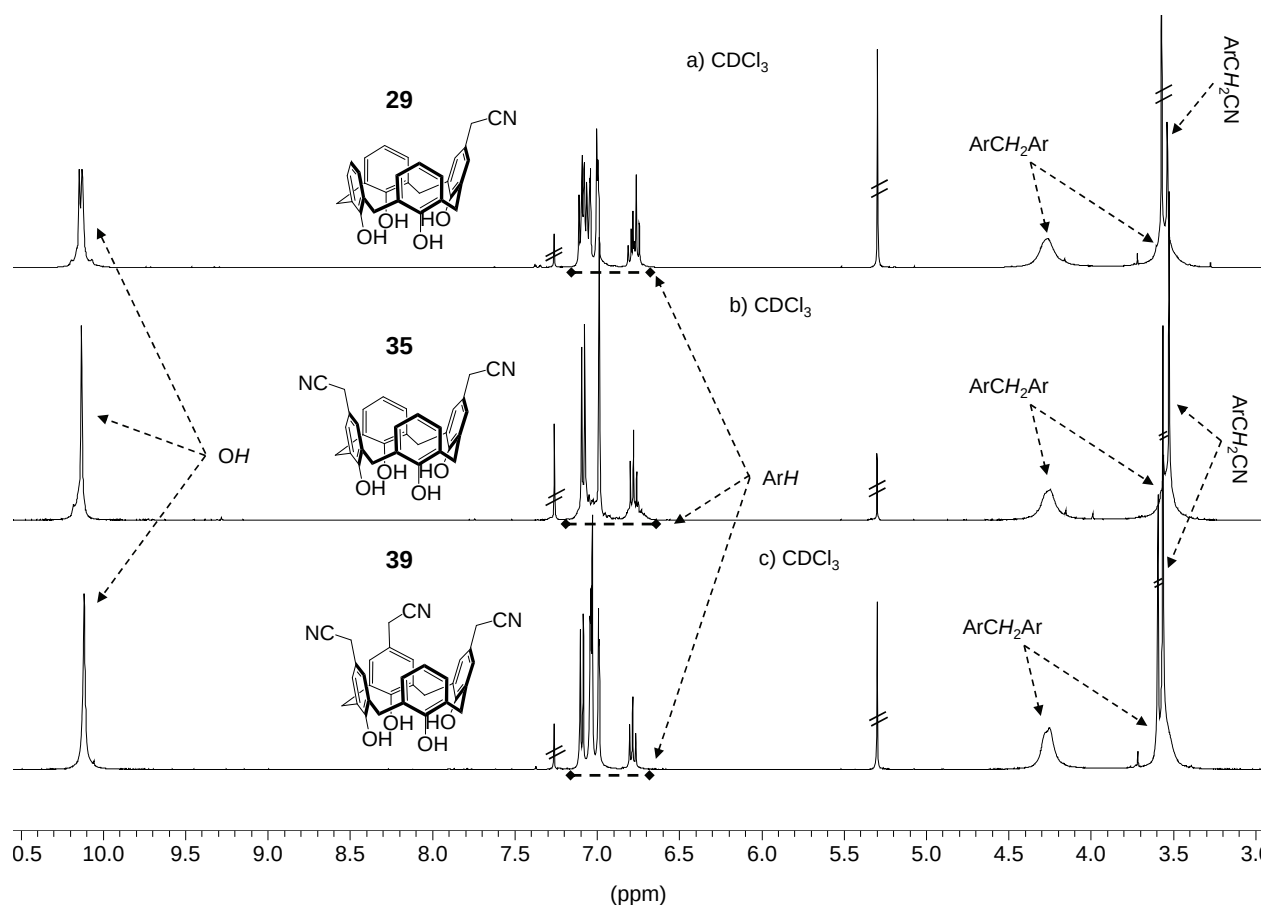


Fig. 23 : Spectres RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) des composés **29**, **35** et **39**.

II.4.4. Réduction des fonctions nitriles des mono-, bis-, et tétra-(cyanométhyl)calix[4]arènes **29**, **35** et **39**

La réduction est effectuée avec le borane, ainsi que décrit précédemment; les calixarènes **29**, **35** et **39** sont mis en suspension dans le THF anhydre puis on ajoute

une solution molaire de BH_3 (complexe THF-BH_3) à hauteur de 4, 5 et 13 mL respectivement. Le mélange est ainsi chauffé à reflux durant 8 h avant d'ajouter de nouveau 3, 5 et 8 équivalents durant la nuit. L'étape d'hydrolyse des fonctions boramines résultantes est effectuée dans un mélange (H_2O 70%/ MeOH 15%/ HCl 15%) pour donner les amines brutes sous forme de chlorures.

Ces dernières sont ensuite purifiées par précipitation dans un mélange $\text{MeOH-Et}_2\text{O}$, pour donner enfin les sels mono- **30**, bis- **36** et tris- **40** attendus.

Nous avons choisis de présenter sur la figure le spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) du composé **30** dans le DMSO-D_6 .

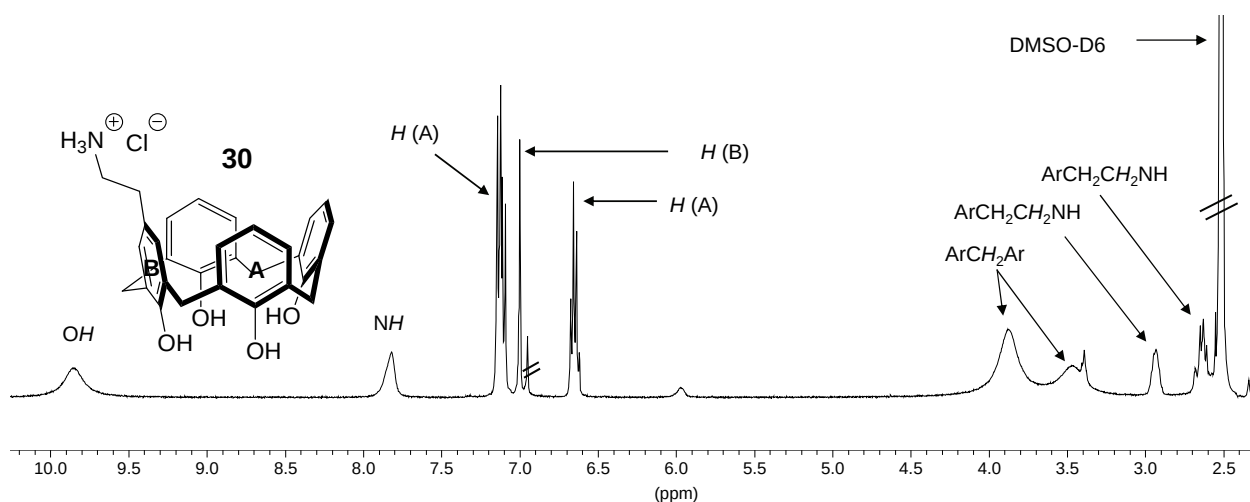


Fig. 24 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6 , TA) de **30**.

II.4.5. Synthèse des dérivés Boc du mono-*para*-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène, du 5,17-bis-*para*-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène et du 5,11,17-tris-*para*-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène

La création des groupements guanidines sur les calixarènes **30**, **36** et **40** (chlorures d'ammoniums) s'est faite par la méthode N°2 suivant le schéma réactionnel de la figure **23**, à partir du synthon di-boc-triflylguanidine **12** [1] en respectant les stoechiométries requises.

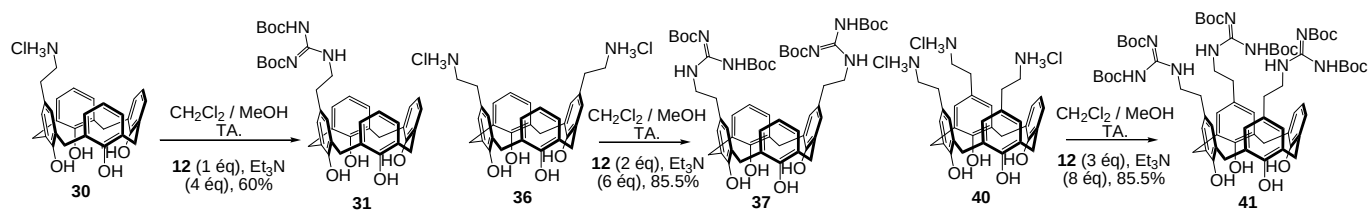


Fig. 25 : Synthèse des [di(Boc)-guanidinoéthyl]calixarènes **31**, **37** et **41**.

La comparaison des spectres RMN ^1H du composé mono- **31** avec le bis- **37** et le tris-(di(Boc)-guanidylé **41** (Fig. 26) montre une identité de structure attendue, ne présentant de différence notable qu'au niveau des signaux aromatiques.

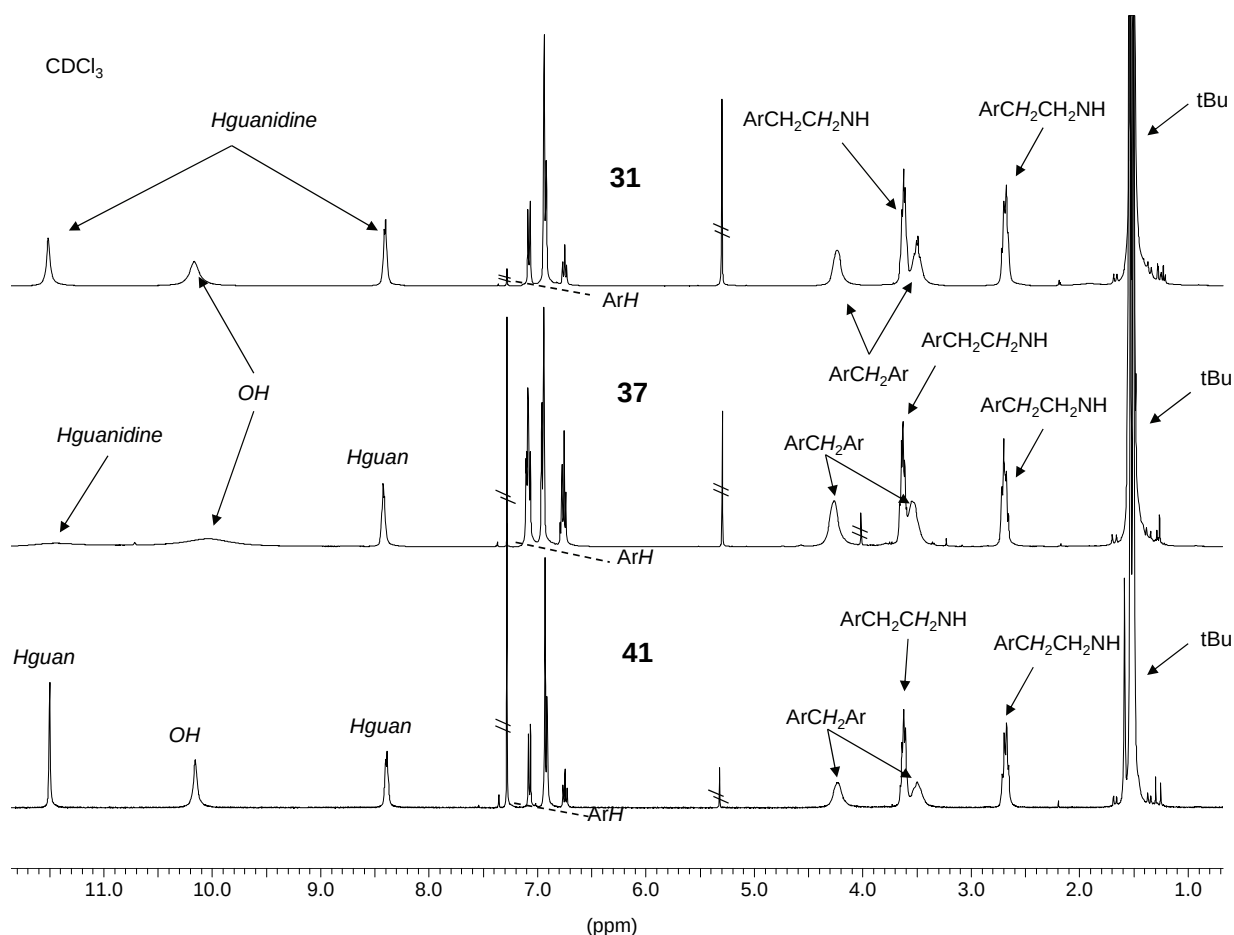


Fig. 26 : RMN ^1H comparative des calixarènes mono-di(Boc)-guanidinoéthylé **31**, bis-(di(Boc)-guanidinoéthylé **37** et tris-di(Boc)-guanidinoéthylé, **41**.

La figure 27 est un agrandissement de la partie aromatique des composés **31**, **37** et **41**

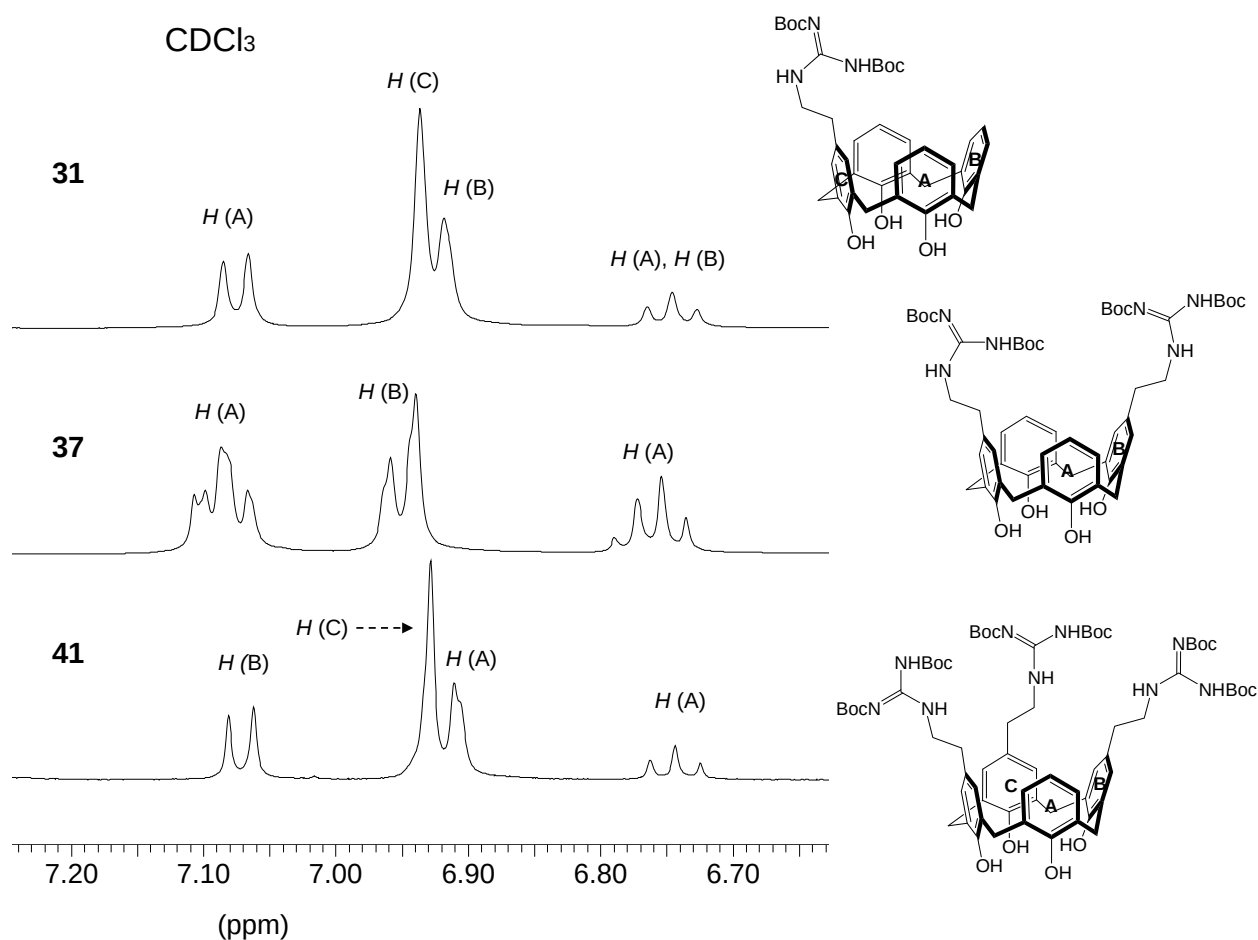


Fig. 27 : RMN ^1H comparative de la partie aromatique des composés **31**, **37** et **41**.

Nous avons réalisé les spectres RMN ^{13}C de tous nos composés, qui confirment la nature conique de ces entités calixaréniques par la présence systématique du signal des carbones des ArCH_2Ar autour de 31 ppm.

Nous présentons ci-dessous (Fig. 28) le spectre du composé **37** effectué dans le CDCl_3 .

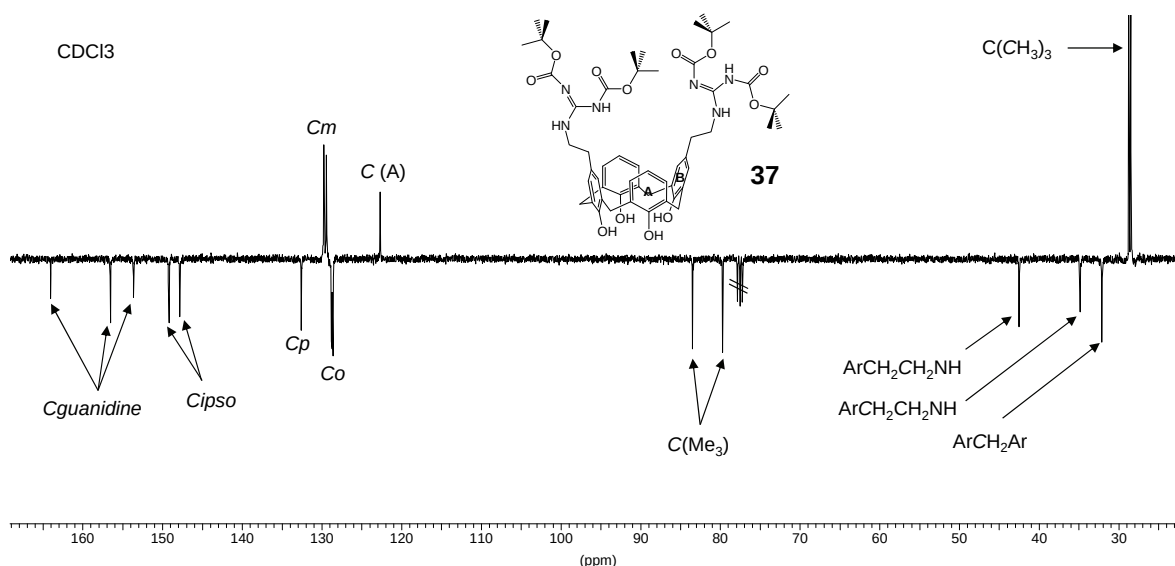


Fig. 28 : RMN ^{13}C du dérivé bis-(di(Boc)-guanidinoéthyl)calix[4]arène **37**.

❖ Remarque :

La synthèse du tris-(di(Boc)-guanidinoéthyl)calix[4]arène **41** a aussi été effectuée à partir du sel trifluoroacétate correspondant. En effet, le chlorhydrate **40** posant quelques problèmes de purification, nous avons adapté la stratégie développée avec le composé **13** (**CX1** / **13**), en passant par l'amine protégée tris-(Bocaminoéthyl) **A**, chromatographiable, qui est ensuite déprotégée par le TFA pour donner le sel **B** pur qui est enfin engagé dans la préparation de **41**

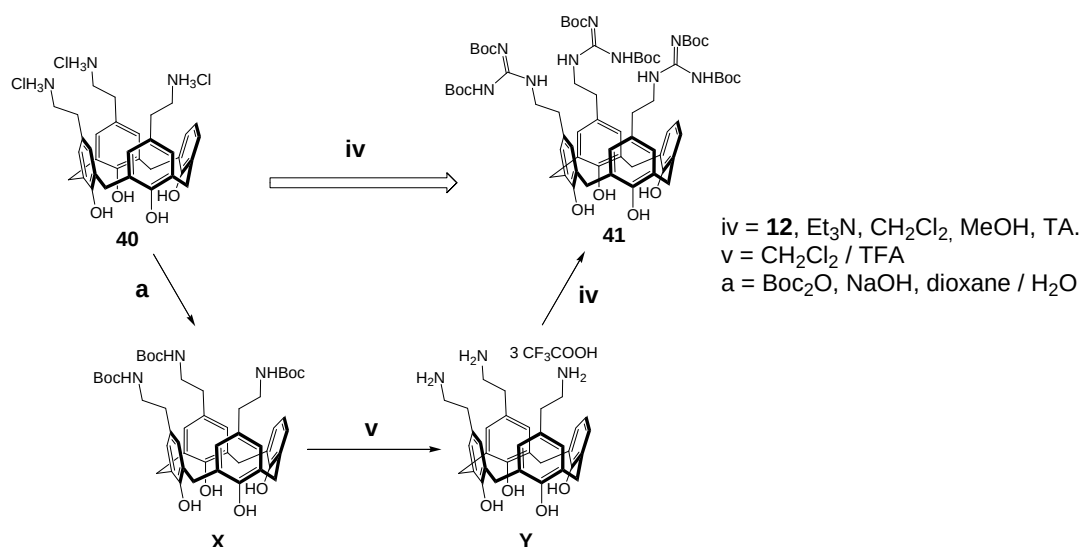


Fig. 29 : Seconde voie d'obtention du composé **41**.

II.4.6. Synthèse des trifluoroacétates du mono-*para*-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène, du 5,17-bis-*para*-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène et du 5,11,17-tris-*para*-(guanidinoéthyl)-calix-[4]arène

L'étape de déprotection s'est faite dans des conditions acide standard : CH_2Cl_2 / TFA 75 : 15, sous atmosphère d'argon et à température ambiante. Comme précédemment décrit, les bruts réactionnels subissent un traitement poussé dans le but d'éliminer le maximum de TFA résiduel, par évaporations successives, trituration dans Et_2O et lyophilisation. Les dérivés (guanidinoéthyl) **32**, **38** et **42** sont obtenus avec un rendement moyen de 93 %.

❖ Remarque :

Nous avons observé une parfaite hydrosolubilité des composés **38** et **42** en phase aqueuse, tandis que leur analogue **32** l'est beaucoup moins. Cela est certainement dû à la présence d'une seule fonction hydrosolubilisante sur **32**, contre deux et trois sur **38** et **42**.

L'acquisition d'une parfaite solubilité dans l'eau de nos composés finaux est primordiale, car l'étape qui suit cette synthèse est l'évaluation de leur potentiel antibactérien en milieu aqueux. Une solubilité de 1024 microgrammes par mL est en effet nécessaire pour préparer la gamme de dilution des tests bactériologiques et de toxicité cellulaire.

II.4.6.1. Analyses des (guanidinoéthyl)calixarènes **32**, **38**, et **42**.

Les spectres RMN ^1H des composés (guanidinoéthyle) **32** et **38** ont été mesurés dans le DMSO-D_6 , celui du dérivé trisubstitué **42** dans D_2O (Fig. 30).

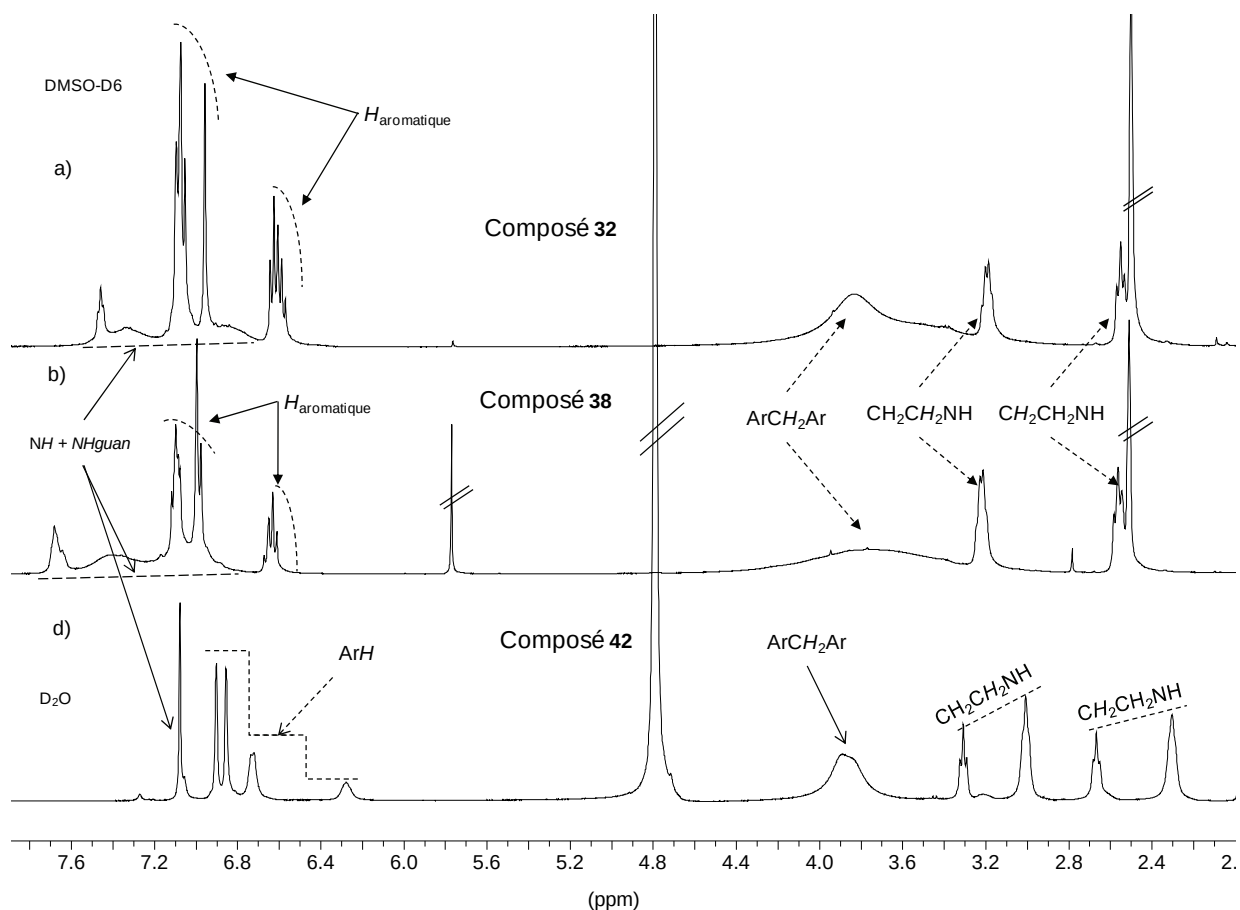


Fig. 30 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) des composés **32** (a), **38** (b) et **42** (c).

Nous observons que malgré une certaine flexibilité de structure qui se traduit par certains signaux larges (Ar-CH₂-Ar surtout), nous trouvons dans les trois cas l'ensemble des informations structurales attendues.

Plus particulièrement, les groupes Ar-CH₂CH₂N qui apparaissent, pour **32** et **38**, sous la forme de deux massifs à 2,55 et 3,20 ppm, dans un rapport d'intégration correct, avec une multiplicité apparente mais difficile à quantifier (J non mesurable). Pour **42**, sous la forme de deux groupes de deux massifs à 2,30 et 3,00 ppm (Ar-CH₂CH₂N central), et à 2,66 et 3,30 ppm (Ar-CH₂CH₂N latéraux), dans un rapport d'intégration 1 : 2 ; la multiplicité est clairement apparente pour le motif central (J = 6,02.Hz).

Pour **32** et **38**, la partie aromatique montre clairement la présence des triplets (J = 8,48 Hz) attribués aux H *para* résiduels, mais les H guanidinium présents dans cette

zone masquent les doublets des H *mé*ta correspondants. La partie aromatique du spectre de **42** est plus explicite du fait de l'échange H-D opéré sur les guanidiniums avec D₂O.

Nous avons réalisé les spectres RMN¹³C des composés **32**, **38** et **42**, qui confirment la nature conique de ces entités calixaréniques par la présence de systématique du signal des carbones des ArCH₂Ar autour de 31 ppm (Fig. 31). Et confirme la présence des guanidines par les signaux correspondant au C guanidinium observés autour de 157,00 ppm.

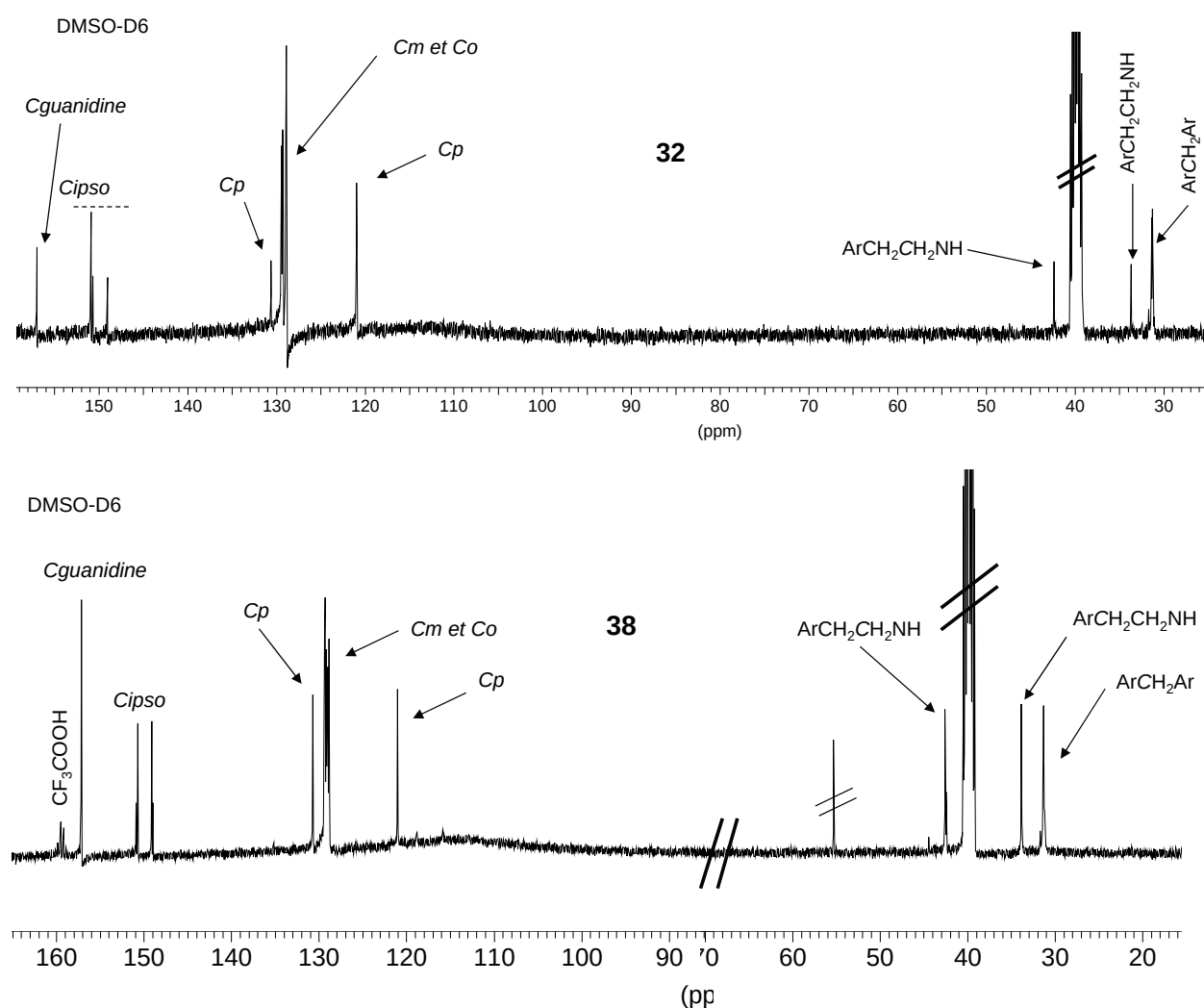


Fig. 31 : RMN ¹³C des dérivés calixaréniques **32** et **38**.

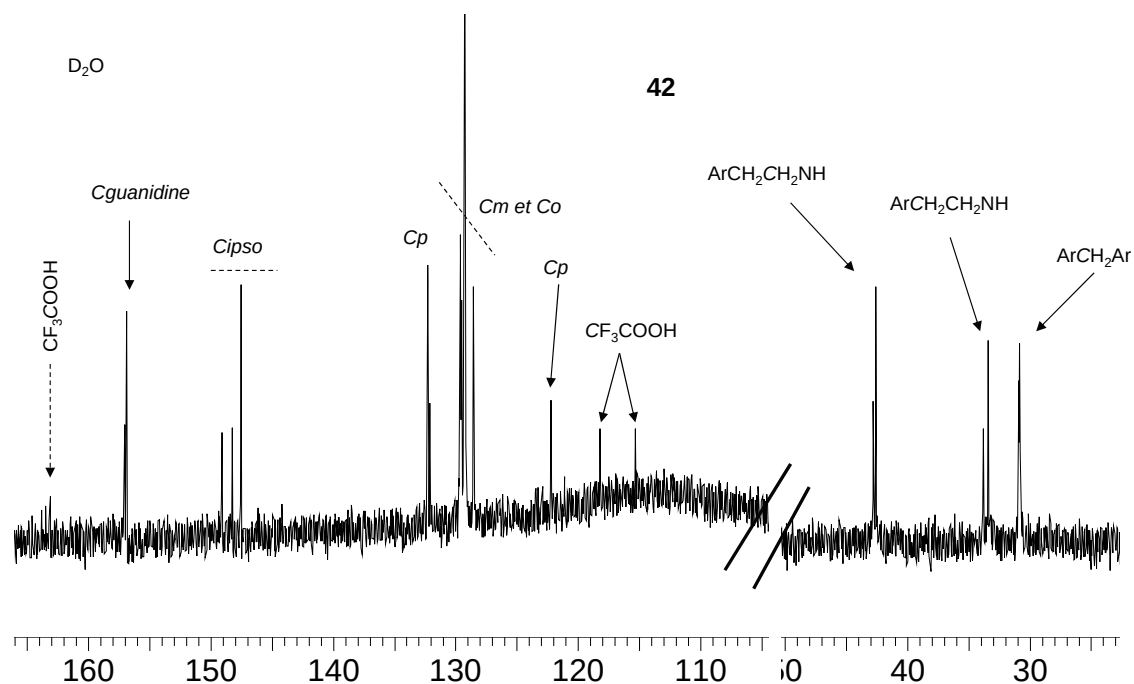


Fig. 32 : RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TA) du dérivé tris-(di(Boc)-guanidinoéthyl)calix[4]arène **42**.

L'analyse élémentaire des composés **32**, **38**, et **42** répond à nos attentes et les résultats sont présentés au tableau 2

	Calculé (%)	Trouvé (%)
32	$\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$, CF_3COOH , H_2O (641.23) C(61.77%); H(5.33%); N(6.55%)	C(62.04%); H(5.13%); N(6.72%)
38	$\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_4$, 2 CF_3COOH , 2 H_2O (858.30) C(53.15%); H(5.16%); N(9.79%)	C(53.23%); H(5.00%); N(9.73%)
42	$\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_4$, 3 CF_3COOH , 3 H_2O (1075.93) C(48.00%); H(5.06%); N(11.72%)	C(47.82%); H(4.82%); N(12.15%)

Tableau 2 : Analyses élémentaires de **32**, **38** et **42**.

La spectrométrie de masse en électrospray mode positif des composés finaux correspond parfaitement aux profils attendus; en particulier celle du composé **42** représentée ci-dessous (Fig. 33) montre l'existence des ions moléculaires ayant perdu un, deux et trois trifluoroacétates sous la forme de massifs mono-chargés et compensés par protonation.

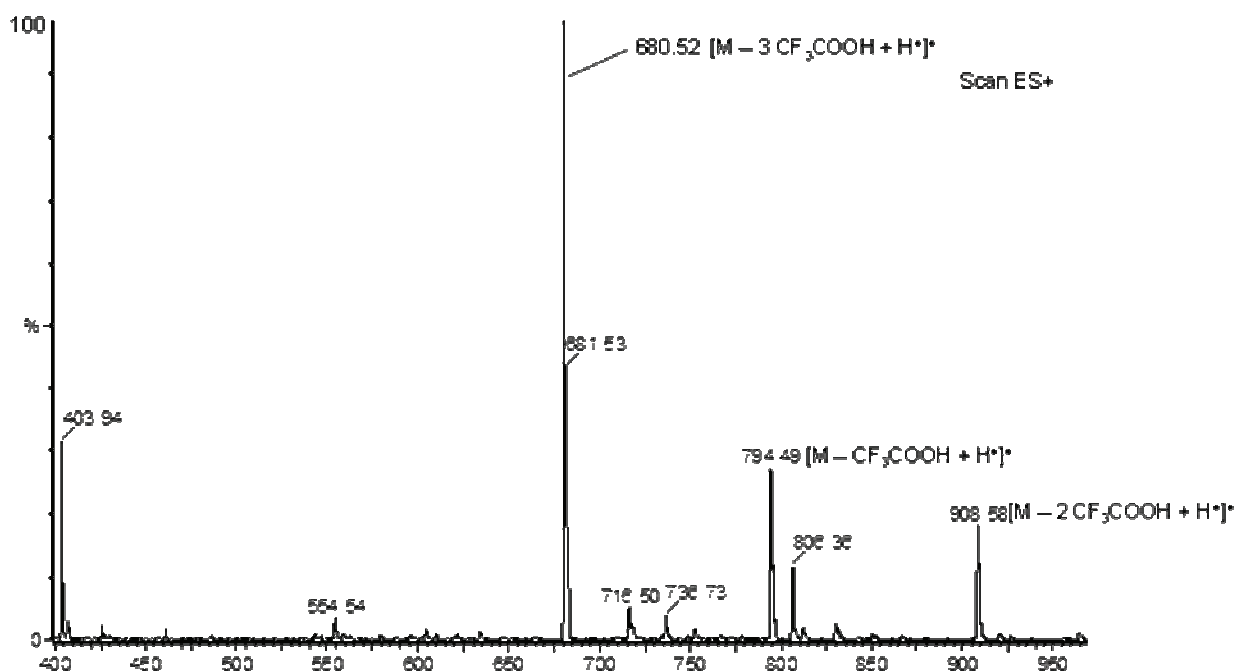


Fig. 33 : Spectre de masse du composé **42** en électrospray mode positif.

II.4.7. Conclusion :

Le développement de ces deux familles de composés a fait appel à l'utilisation de méthodes chimiques qui ont permis l'obtention du *tétra-para*-guanidinoéthyl-calix[4]arène (**CX1**) avec néanmoins, l'abandon de l'étape de protection/déprotection *via* l'incorporation du groupement boc. Le développement de ces composés constituent un élargissement intéressant dans la famille des guanidinoéthyl-calix[4]arènes dont le **CX1 / 13** est le modèle. L'ensemble de ces structures calixarénique, à l'exception des dérivés mono-guanidylés présente une parfaite solubilité dans l'eau ce qui va permettre leurs évaluation antibactérienne en microbiologie.

II.5. Nouveaux calix[4]arènes hydrosolubles bis-substitués sur la partie basse et leurs analogues monomériques.

Dans ce sous-chapitre, nous avons développé une famille de calix[4]arènes hydrosolubles bis-substitués en position distale sur la partie basse ainsi que leurs analogues monomériques. Les travaux précédents menés au laboratoire ont démontré que la présence de groupements (guanidinoéthyl) sur la partie haute du calix[4]arène lui confère un pouvoir antibactérien considérable [1-7], là où le monomère libre est inactif.

Un certain nombre de dérivés de **CX1 / 13** intégrant des fonctionnalités bi-hétérocycliques (6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine et 4,4'-diméthyl-2,2'-bithiazole) ont montré une activité antibactérienne élevée associée, contrairement à **13**, à une toxicité cellulaire non négligeable. Les entités monomériques correspondantes ont aussi montré des activités similaires (antibactérienne et toxique), contrairement au monomère de **13** [7].

Afin d'enrichir cette famille, nous avons choisi d'introduire d'autres substituants sur la partie basse de **13** : a) le motif 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine afin d'évaluer l'effet du positionnement des groupes $-CH_2$ d'ancrage, b) le motif 4-méthyl-1,1'-biphényle afin d'évaluer l'impact des atomes d'azote bipyridiniques sur l'activité biologique.

II.5.1. Nouveaux calix[4]arènes hydrosolubles bis-substitués sur la partie basse

La voie de synthèse choisie a été explorée précédemment au laboratoire et validée dans la référence [7] qui intègre cette partie du travail de recherche. Cette voie a le mérite de minimiser les coûts, permet le passage par des intermédiaires hydro- et organosolubles qui peuvent être nécessaires, indépendamment de l'objectif final, pour des études de relations structure-activité. Cette stratégie est présentée en figure 34.

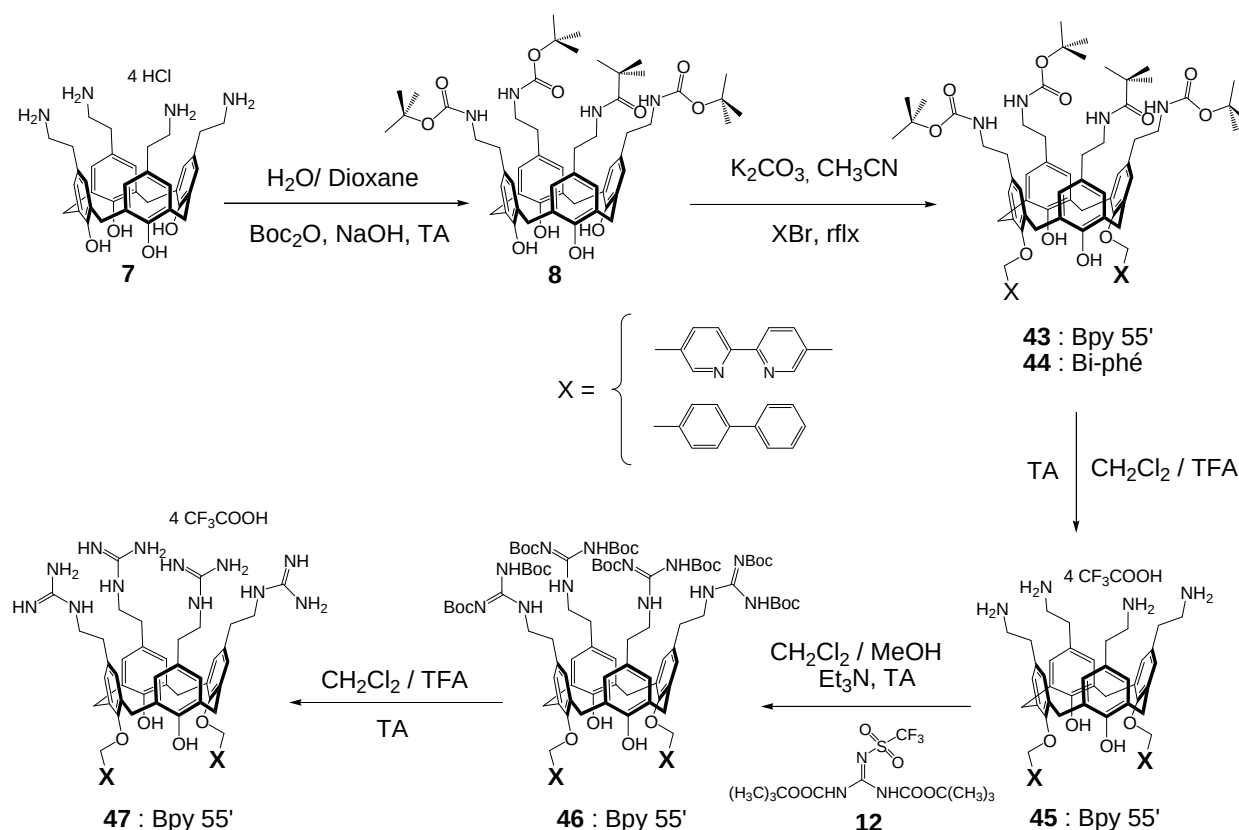


Fig. 34: Stratégie de synthèse des composés bipyridyle **47** et biphényle **44**.

Le tétra chlorhydrate du *tétra-para*-(aminométhyl)calix[4]arène **7** est transformé en son analogue protégé **8**. Notre objectif dans cette étape est double : a) perdre le caractère nucléophile de la fonction amine pour autoriser les attaques nucléophiles des phénols; b) bénéficier de l'apport de la lipophilie pour travailler en solvant organique et procéder à des purifications par chromatographie.

Le risque majeur étant dans l'étape suivante que les fonctions NHBOc restent malgré tout réactives dans notre schéma synthétique.

Le dérivé protégé **8** est ensuite traité dans l'acétonitrile par une base minérale, K_2CO_3 , avec l'objectif de générer deux anions phénates en position distale, ainsi que bien documenté dans la littérature sur d'autres dérivés calix[4]aréniques, et de procéder à l'attaque nucléophile de ces phénates sur les dérivés halogénométhylés de notre étude, le 5-bromométhyl-5'-méthyl-2,2'-bipyridine et le 4-bromométhyl-1,1'-biphényle.

Les composés résultants **43** et **44**, purifiables par chromatographie doivent être ensuite déprotégés pour donner les trifluoroacétates correspondants. Ces derniers,

après basification, doivent subir l'attaque d'un des agents de guanidylation vus précédemment, pour donner les dérivés « octaboc » purifiables par chromatographie. Ces derniers, par traitement acide, doivent donner les analogues *tétra-para*-guanidinoéthyle correspondants. La figure 34 présente cet enchainement complet pour les dérivés bipyridinés; la série concernant le biphényle s'est arrêtée dès la première étape de déprotection en milieu acide. En effet, les analyses RMN révèlent la disparition des groupes biphényles dans le produit après traitement et lyophilisation du produit final. Les autres essais réalisés par la suite, en remplaçant par exemple, le TFA par HCl se sont soldés par le même constat d'échec : la dégradation du calix[4]arène **44** en milieu acide.

II.5.2. Protection des fonctions amines du calix[4]arène **7**

Afin de fonctionnaliser la partie basse du calix[4]arène **7**, nous devons rendre les fonctions amines inertes dans les conditions de couplage. Nous avons fait le choix d'une méthode de protection classique et simple.

Les groupements protecteurs *tert*-butoxycarbonyle (Boc) ont la capacité de résister aux milieux alcalins ainsi qu'à l'hydrogénation. Toutefois, leur hydrolyse se fait très simplement en milieu acide (exemple TFA ou HCl).

Le *tétra* chlorure d'ammonium **7** et le di-*tert*-butyl-dicarbonate (Boc)₂O sont solubilisés dans un mélange eau / dioxane, en présence de NaOH. Après 24 heures de réaction, et un traitement intégrant une purification sur colonne, nous obtenons le composé **8** avec un rendement de 83% (Fig. 34).

II.5.3. Fonctionnalisation sur la partie basse du composé **8**.

Les conditions de couplage utilisées (CH₃CN, K₂CO₃, 2 équivalents de dérivé bromé) sont propices à l'incorporation des substituants en position distale sur la partie basse du calix[4]arène, d'une manière générale. C'est aussi le cas dans cette série de dérivés.

Nous avons obtenu dans ces conditions les composés **43** et **44**, avec 61 % et 77 % de rendement après purification, respectivement. (Fig. 34)

Les analyses RMN ^1H des composés **43** et **44** répondent aux profils attendus, notamment par la présence de singulets à 5.30 ppm (**43**) et 5.12 ppm (**44**) qui intègrent chacun quatre protons et attribués aux protons oxyméthyléniques reliant la bipyridine ou le biphenyle à la plate-forme calixarénique; la valeur d'intégration et la forme singulet de ces signaux confirment donc le greffage des deux entités en position distale sur le calix[4]arène.

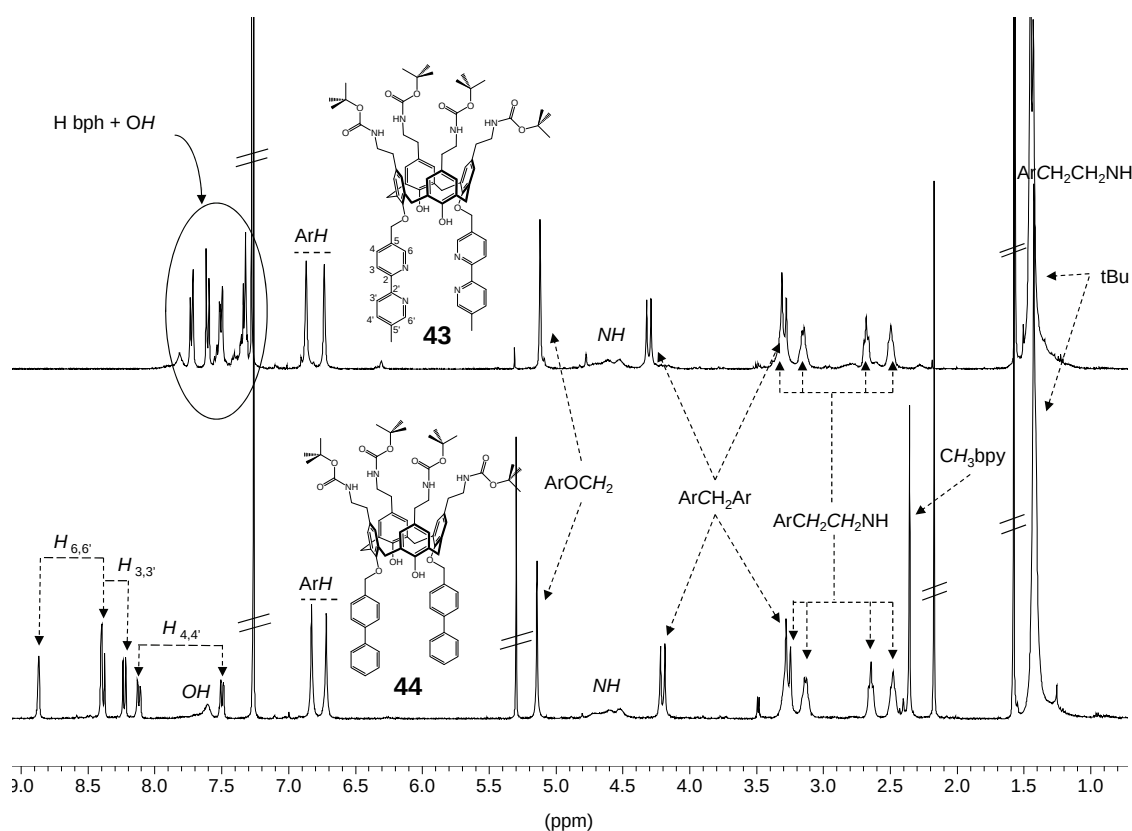


Fig. 35 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) des composés **43** et **42**.

Les protons des ponts méthyléniques $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ apparaissent sous la forme de systèmes AB entre 3.20–4.00 ppm ($J_{\text{AB}} = 13.06$ Hz) pour **43** et entre 3.26–4.20 ppm ($J_{\text{AB}} = 13.08$ Hz) pour **44**, ce qui confirme que les composés **43** et **44** sont de conformation conique. Les autres analyses sont en accord avec les structures proposées.

II.5.4. Déprotection des fonctions amines des composés **43** et **44**

Le retour aux formes (aminométhyl) est indispensable pour accéder aux dérivés (guanidinoéthyl), mais aussi, du fait de leur hydrosolubilité, être évaluées en tant que tels comme agents antibactériens.

Au cours de cette étape, les fonctions amines, précédemment protégées, doivent retrouver leur nucléophilie, indispensable pour l'étape de guanidilation, mais également pour l'évaluation de ces produits sous forme de sel, dans des conditions standards de microbiologie.

La déprotection est effectuée dans les conditions précédemment décrites (CH_2Cl_2 / TFA 75 : 25 ; TA). Toutefois, bien que cela n'ait pas été observé pour les produits initialement préparés [7], nous avons une crainte à propos de la stabilité des ponts éther reliant les bipyridines ou les biphényles au calixarène (Fig. 34)

Les composés **43** et **44**, sont solubilisés dans le mélange acide, sous atmosphère d'argon, à température ambiante pendant quelques heures (contrôle CCM). Après évaporation des solvants, le résidu est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Après précipitation dans Et_2O du résidu final solubilisé dans le méthanol, et répétition de ce traitement jusqu'à disparition de toute acidité (papier pH) du filtrat, le produit est finalement lyophilisé.

Nous avons ainsi obtenu le calix[4]arène bis-bipyridine **45**, sous forme de trifluoroacétate parfaitement hydrosoluble. Les analyses nous ont confirmé la structure du produit recherché, avec la jonction éther toujours présente.

La figure 36 est une hypothèse de dégradation, dans laquelle de cation benzylique 4-phénylbenzyl serait stabilisé par effet mésomérique.

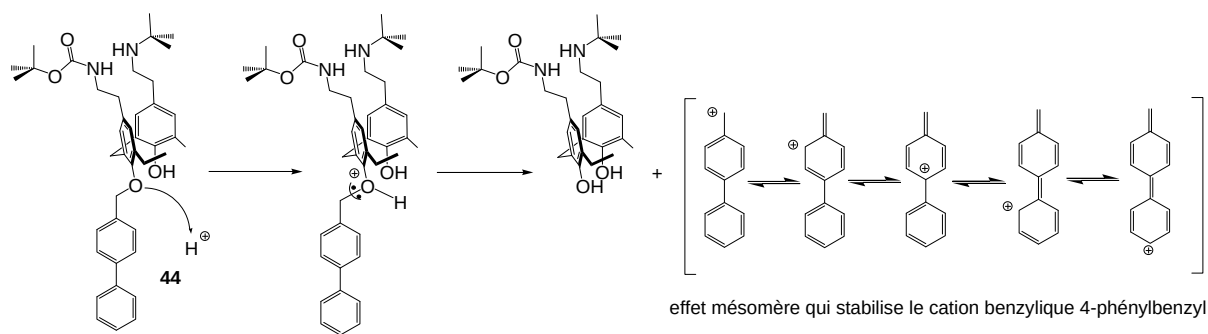


Fig. 36 : Hypothèse de dégradation de dérivés 4-phényl-benzylether aromatiques en milieu acide.

Nous pouvons supposer ici que le groupement 4-phényl-benzyl est un groupement protecteur des fonctions phénol, libérable en milieu acide. Quelques essais complémentaires mais non approfondis semblent confirmer cette observation, comme nous le verrons après.

II.5.4.1. Analyse du composé 45

La figure 37 représente le spectre RMN de proton du composé **45** dans D₂O, à température ambiante. On observe un ensemble de deux jeux de deux triplets à 2.65, 3.04 ppm et 2.87, 3.22 ppm correspondant aux protons des bras amino-éthyléniques.

On observe également la présence d'un système AB à 3.55 - 4.21 ppm ($J_{AB} = 13.6$ Hz) attribués aux groupements Ar-CH₂-Ar, confirmant que la conformation cône a été conservée. L'incorporation des deux motifs bipyridine en position distale est confirmée par la présence d'un signal singulet intégrant 4 H à 5,23 ppm (OCH₂).

Deux singulets intégrant 4 H chacun, à 6.97 et 7.16 ppm, correspondant aux protons aromatiques phénoliques. Un ensemble de signaux de résonance fortement déblindés entre 7,8 et 9,0 ppm correspondent aux protons des bipyridines.

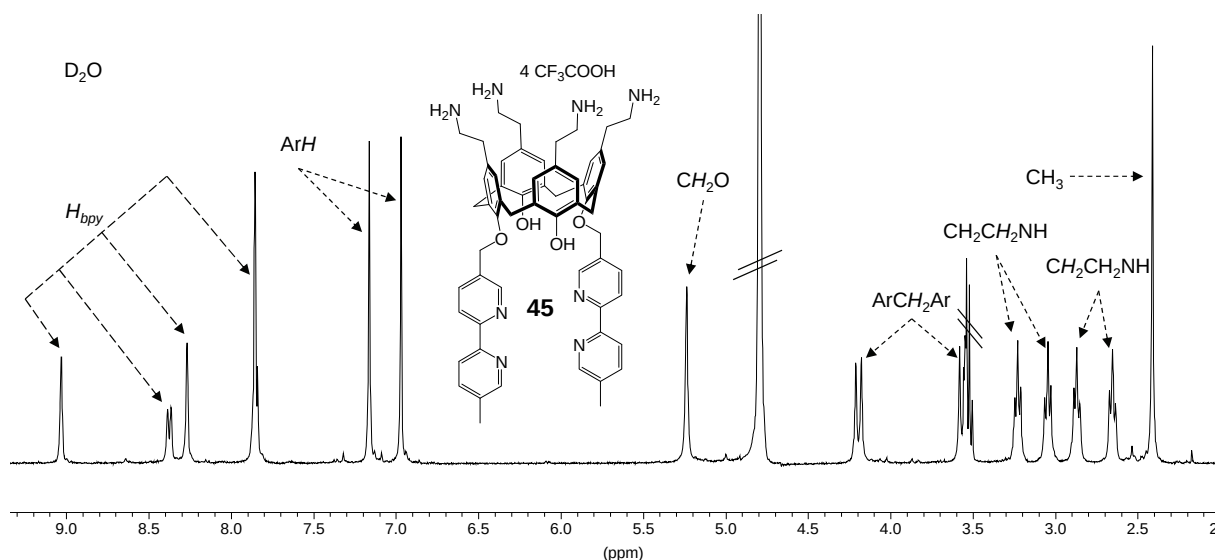


Fig. 37: Spectre RMN^1H (400 MHz, D_2O , TA) du composé **45**.

Au-delà de la caractérisation de l'ensemble du squelette carboné, la présence du signal à 30,93 ppm attribué aux groupements $Ar-CH_2-Ar$ confirme le maintien de la conformation conique. Il est à noter que les anions CF_3COO^- ne sont pas visibles.

L'analyse par spectrométrie de masse en électrospray mode positif (Fig. 38) nous a donné le profil attendu : -présence d'un « massif » à 961,3, 962,3 et 963,3 uma attribué à l'ion moléculaire mono-chargé, ayant perdu quatre unités CF_3COOH [$M - 4 CF_3COOH + H^+$] $^+$; -présence d'un pic à 481.29 uma correspondant à l'ion moléculaire di-chargé et di-protoné avec perte de 4 CF_3COOH [$M - 4 CF_3COOH + 2 H^+$] $^{2+/2}$.

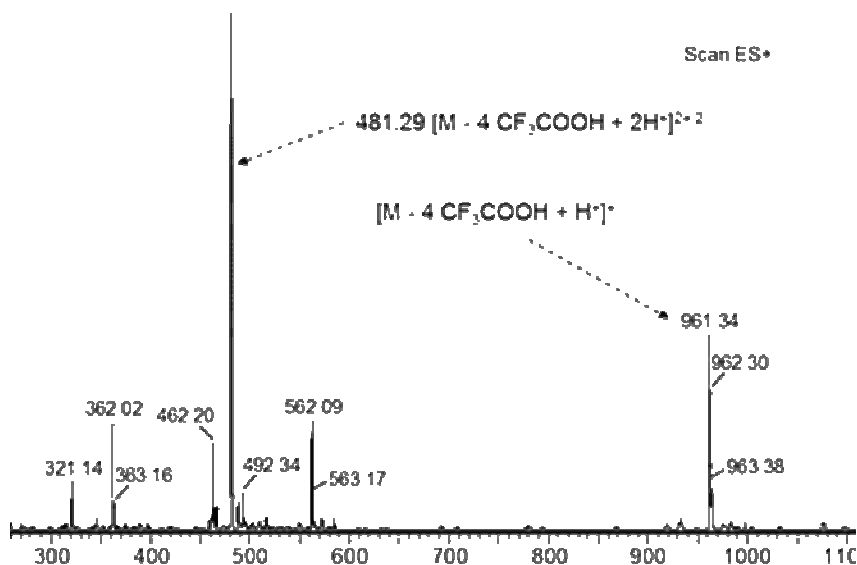


Fig. 38 : Spectre électrospray mode positif du composé **45**.

L'analyse élémentaire correspond au composé bipyridylé **45** accompagné de deux molécules d'acide trifluoroacétique supplémentaires, justifiables par la salification des bipyridines, et de 3/2 molécules d'eau donnant la formule brute : $C_{60}H_{64}O_4N_8$, 6 CF_3COOH , 1.5 H_2O (1671.48).

II.5.5. Création des fonctions guanidines

Cette étape consiste à construire les quatre fonctions guanidines sur la partie supérieure du calix[4]arène tétra-aminoéthyle **45**. Le protocole de guanidylation utilisé est celui développé par Mourer et al [1,7], pour la synthèse du *tétra-para*-[di(Boc)guanidinoéthyl]-calix[4]arène **10** (appelé aussi « octa-Boc »). (chap.II.2.2.)

La réaction de **45** avec la di-(boc)triflylguanidine **12** dans les conditions de la méthode n°2 (Fig. 34) donne le composé « octa-Boc » **46** avec un très bon rendement de 84% après purification par chromatographie.

La totalité des analyses effectuées sur le composé **46** est conforme à nos attentes. La conformation cône est conservée, ainsi qu'en attestent les signaux de résonance des groupes Ar-CH₂-Ar en RMN ¹H (3.27 et 4.22 ppm, AB, J_{AB} = 13.1 Hz) et RMN ¹³C (32.06 ppm).

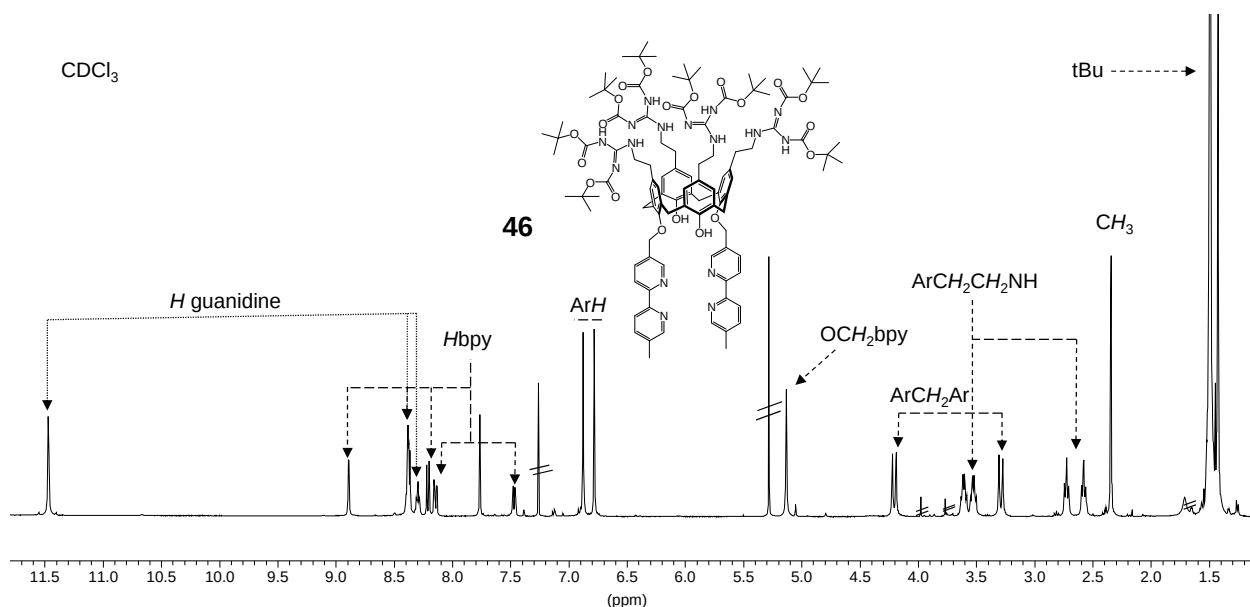


Fig. 39 : Spectre RMN¹H (400 MHz, CDCl₃, TA) du composé **46**.

II.5.6. Déprotection des fonctions guanidines du composé **46**

Une fois assurés de la pureté de l'intermédiaire **46**, essentielle à ce stade car dernier composé à pouvoir être chromatographié, ce dernier est traité par le mélange CH₂Cl₂ / TFA 85 : 15, à température ambiante (Fig. 34), pour donner le dérivé *tétra-para*-(guanidinoéthyl)-calix[4]arène bis-bipyridine **47**, sous forme de trifluoroacétate.

Après un précautionneux traitement du sel brut solide par Et₂O pour éliminer les traces de TFA résiduelles (contrôle du pH de Et₂O), le composé **47** est repris dans l'eau puis est lyophilisé pour donner un coton blanc avec 83 % de rendement.

II.5.6.1. Analyse du composé 47

Le spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) (Fig. 40) est conforme à nos attentes, et présente un degré de pureté très satisfaisant. Nous notons particulièrement :

- Un système AB unique à 3.56-4.25 ppm ($J_{AB} = 13.34$ Hz Hz), intégrant 8 H (Ar- CH_2 -Ar), prouvant la conformation cône du composé **47**
- Un singlet à 5.24 ppm intégrant 4 H, correspondant aux bras oxyméthyléniques reliant les sous-unités bipyridines à la plate-forme calixarénique.
- Deux singlets à 6.96 et 7.13 ppm correspondant aux protons aromatiques du calixarène (8 H), Un ensemble de signaux fortement déblindés à singulet à 7.80, 8.24 et 8.99 ppm chaque signal integre pour 2 H), doublets à 7.84 ppm ($J = 8.31$ Hz, intégrant pour 2 H), 8.35 ppm ($J = 9.32$ Hz, intégrant pour 2 H). tous ces signaux correspondant aux protons aromatiques des bipyridines.

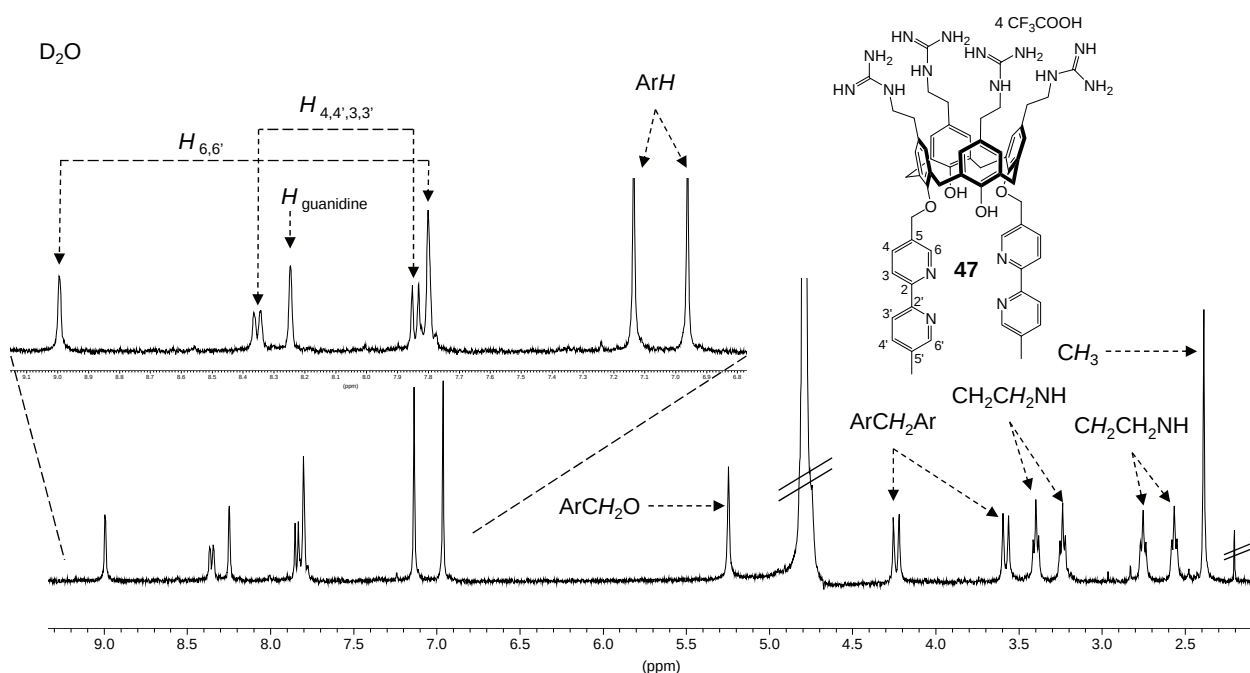


Fig. 40 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) du composé **47**.

L'étude par RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6) confirme la conformation cône de **47**, avec un signal de résonance des $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ à 31,20 ppm [25,26]; le signal des carbones des guanidines est trouvé à 157 ppm. Il est intéressant de trouver les signaux de résonance des trifluoroacétates, plus particulièrement le carbonyle à 163.17 ppm (quadruplet, $J_{\text{CF}} = 35.5 \text{ Hz}$).

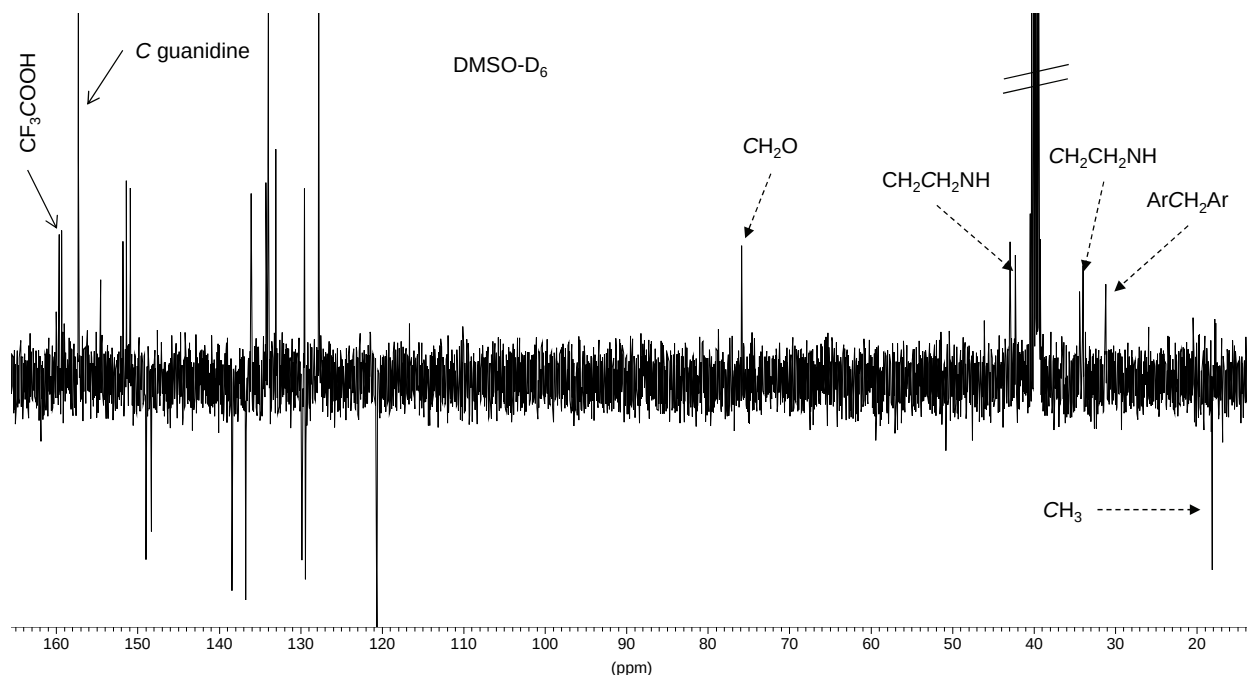


Fig. 41 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, APT, DMSO-D_6 , TA) du composé **47**.

L'analyse élémentaire correspond au produit recherché accompagné de 2 molécules d'acide trifluoroacétique supplémentaires, salifiant les deux bipyridines, et de 4 molécules d'eau. La formule brute du composé **47** est donc : $\text{C}_{64}\text{H}_{72}\text{O}_4\text{N}_{16}$, 6 CF_3COOH , 4 H_2O (1885.56).

L'analyse par spectrométrie de masse en électrospray mode positif montre que **47** existe sous la forme hexa-trifluoroacétate, ainsi que nous l'avons évalué en analyse élémentaire : nous trouvons en effet un pic de base mono-chargé à 1471,4 uma, correspondant à la perte de 2 CF_3COOH et un CF_3COO^- ; nous observons ensuite une

série de pics mono-chargés correspondants à la perte successive d'un, deux et trois CF_3COOH supplémentaire, pour donner la tétraamine mono-protonée à 1129,32 u.m.a. Cette dernière apparaît aussi sous forme di- et tri-chargée à 563,3 et 377,29 u.m.a.

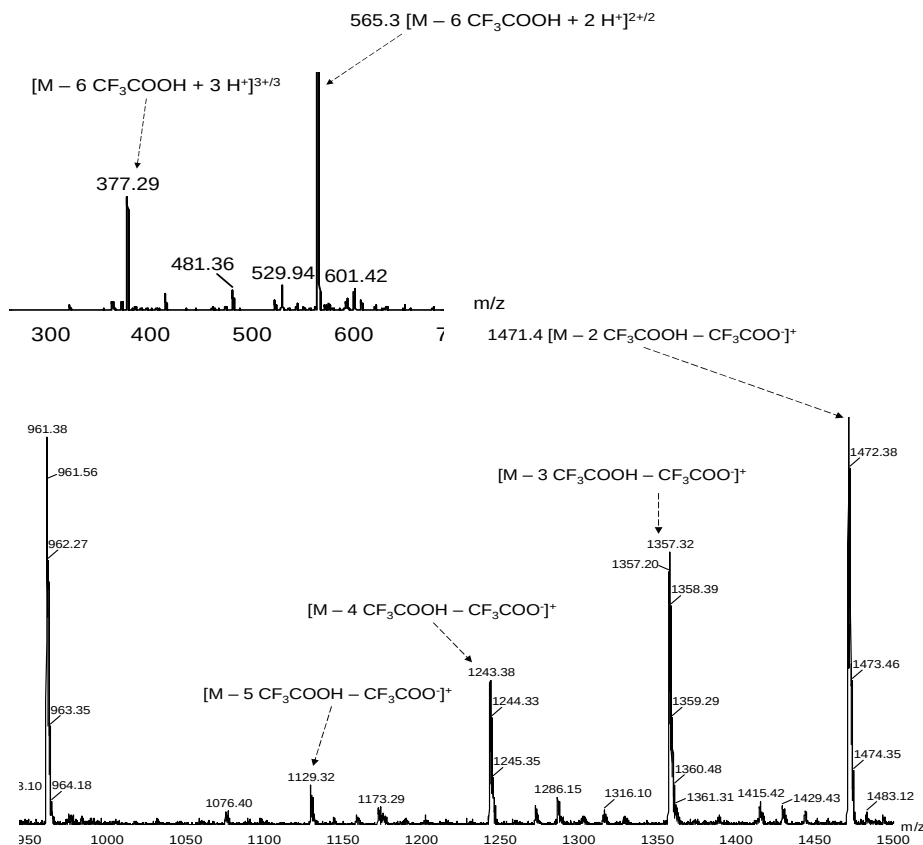


Fig. 42 : Spectre de masse électrospray mode positif du composé **47**.

II.6. Synthèse des analogues monomériques

Dans le but de compléter l'étude sur le rôle de la cyclisation d'entités phénoliques sur la genèse d'une activité antibactérienne [1-7], nous avons procédé à la synthèse des entités monomériques correspondant aux calix[4]arènes bipyridine **47** et biphényle **44** décrits ci-avant, en espérant pour ce dernier pouvoir développer la stratégie synthétique jusqu'au dérivé guanidylé.

II.6.1. Voie d'accès aux dérivés monomères

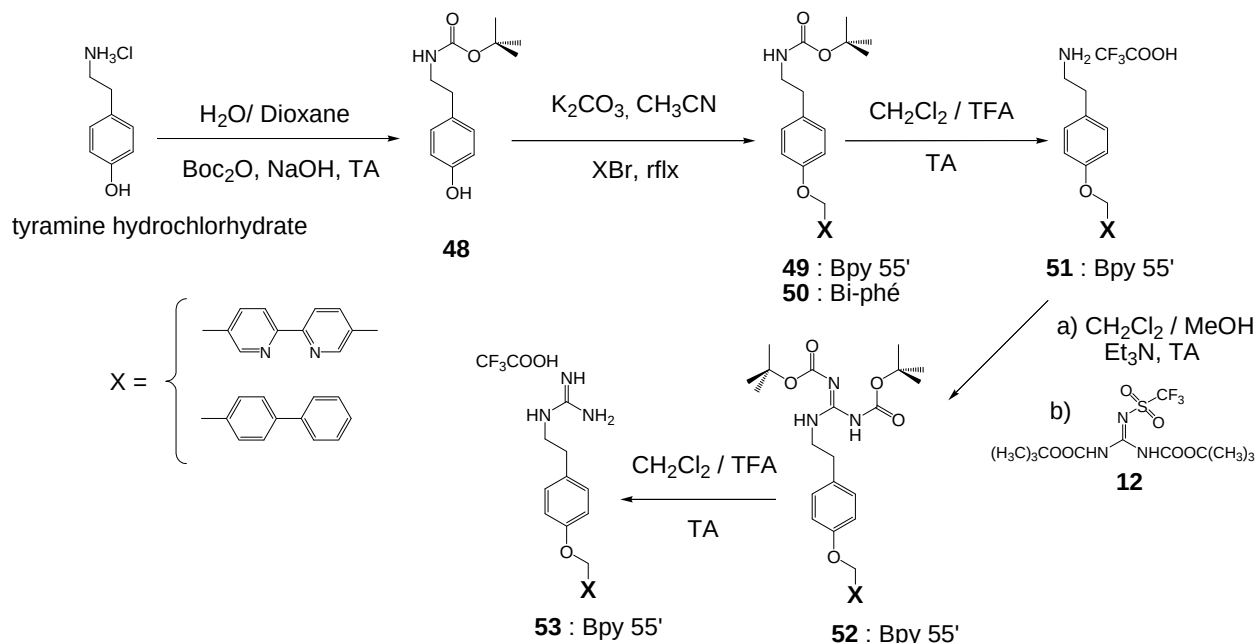


Fig. 43 : Stratégie de synthèse des monomères bipyridiné et biphényle.

La stratégie de synthèse (Fig. 43) proposée est très proche de celle employée pour les calixarènes ; la tyramine, ou *para*-aminoéthylphénol, est protégée sur la fonction amine par un groupe Boc ; le phénol est ensuite alkylé par le réactif bromé, puis l'amine est déprotégée ; elle est alors transformée en dérivé di(boc)guanidinoéthyl-, qui est enfin hydrolysé en milieu acide pour donner le dérivé final guanidinoéthyl-.

II.6.2. Protection de la tyramine

Afin de cibler la fonctionnalisation du groupe hydroxyle, nous devons procéder à la protection de l'amine de la tyramine. Le choix étant porté sur une protection « Boc », la tyramine, HCl commerciale est solubilisée dans un mélange dioxane / eau, puis sont ajoutés l'hydroxyde de sodium et le Boc_2O . Le mélange réactionnel est laissé durant une nuit à température ambiante puis purifié pour donner le *para*-(Bocaminoéthyl)phénol **48** avec 70 % de rendement (Fig. 43).

II.6.3. Greffage des entités bi-pyridine **49** et bi-phényle **50**

Le greffage de la 5-bromométhyl-5-méthyl-2,2'-bipyridine ou du 4-bromométhyl-1,1'-biphényle sur le composé **48**, s'est fait conformément au mode opératoire standard avec 1 équivalent de K_2CO_3 et 1 équivalent de dérivé bromé, le tout à reflux dans CH_3CN , sous argon. Après les traitements de purification, nous avons isolé les monomères **49** et **50**, avec 80 et 84 % de rendement, respectivement.

L'analyse RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, TA) des deux composés confirme les profils attendus, et montre une analogie des spectres aux substituants greffé près. (Fig. 44).

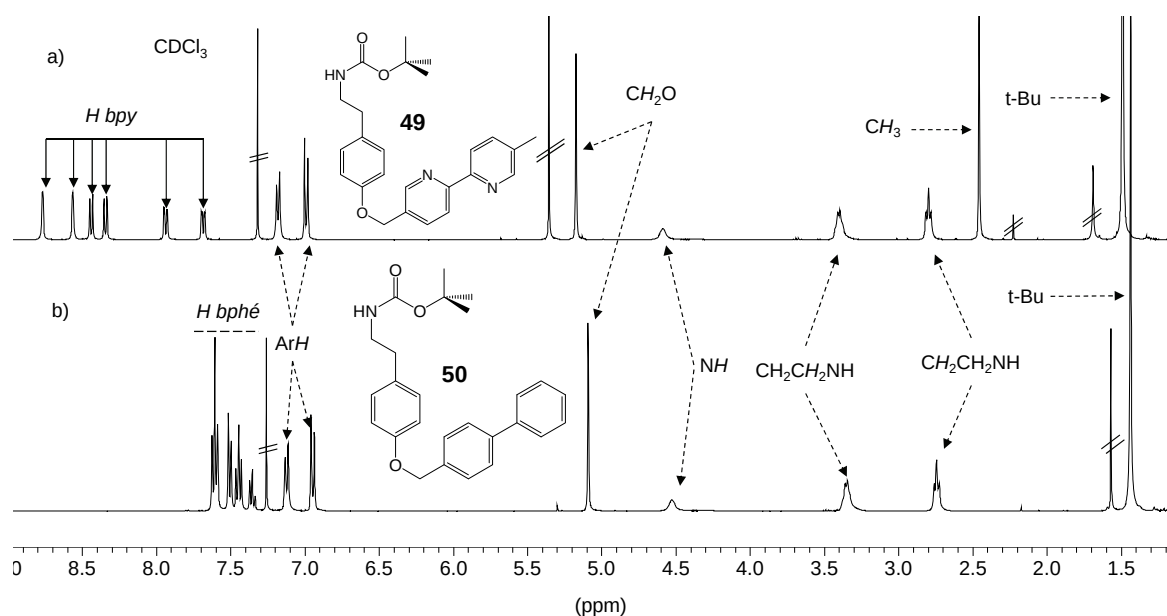


Fig. 44 : Spectre RMN 1H (400 MHz, D_2O , TA), de **49** et **50**.

II.6.4. Déprotection des fonctions amines de **49** et **50**.

La libération des fonctions amines de **49** et **50** pour un engagement ultérieur dans la « création » des fonctions guanidines est effectuée dans les conditions classiques acides (CH_2Cl_2 / TFA 85 : 15).

Dans le cas du dérivé bipyridine **49**, nous avons obtenu l'ammonium **51** (Fig. 43), avec 96 % de rendement.

Par contre, comme pour son analogue calixarénique **44**, le dérivé biphenylé **50** ne supporte pas ces conditions acides, que ce soit avec TFA ou en milieu HCl-dioxane ; nous récupérons séparément la tyramine et un dérivé biphenylé.

II.6.4.1. Analyse de l'ammonium **51**.

La figure suivante (Fig. 45) présente l'analyse RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) de l'ammonium **51**. Le spectre est simple et répond au profil du composé attendu :

- Un singulet à 2.34 ppm, correspondant au groupe méthyl de la bipyridine.
- Deux triplets à 2.92 et 3.22 ppm ($J = 7.17$ Hz) qui correspondent au bras éthylnique ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$)

Un singulet à 5.14 ppm, correspondant au pont oxyméthylénique

- Un ensemble de signaux dans les champs faibles, où se distinguent très clairement les protons aromatiques de la tyramine à 7.04 et 7.25 ppm intégrant chacun pour 4 H ($J = 8.6$ et 8.31 Hz respectivement) et ceux qui correspondent à la partie bipyridine. Un doublet à 7.78 et 7.89 ppm qui intègrent chacun pour 1 H (avec $J = 8.56$ et 7.81 Hz respectivement). Trois singulets à 7.98, 8.41 et 8.61 qui intègrent respectivement pour 2 H, 1 H et 1 H.

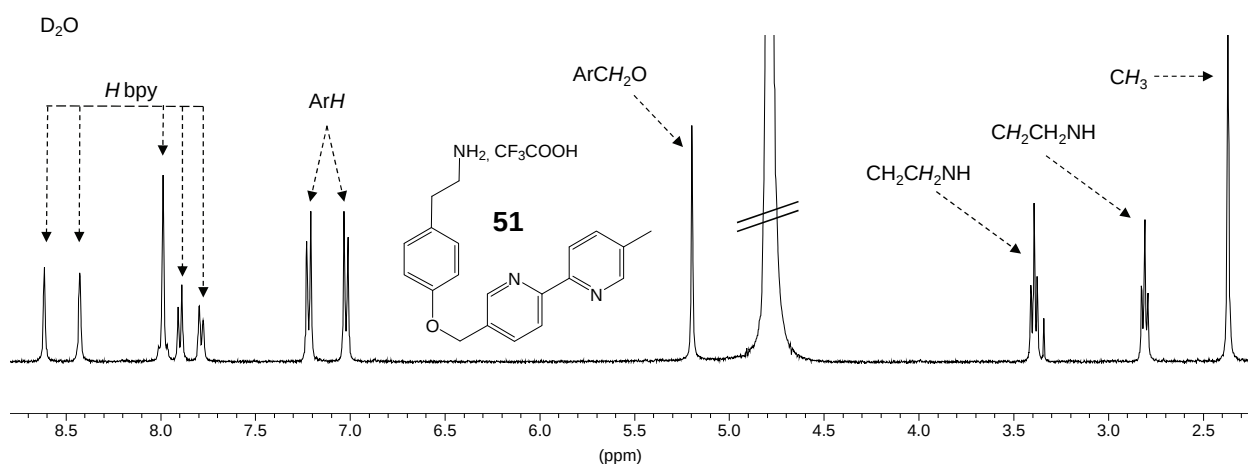


Fig. 45 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA), de **49** et **50**.

➤ **Analyse élémentaire :**

Elle répond à la formule brute $C_{20}H_{21}ON_3$, CF_3COOH , 0.5 H_2O , pour une masse de 442.17 g / mol. Notons ici que la bipyridine n'est pas salifiée.

➤ **Spectrométrie de masse :**

L'analyse par spectrométrie de masse en électrospray mode positif montre un pic correspondant à l'ion moléculaire $[M - CF_3COOH + H^+]^+$ à 320.0 u.m.a.

II.6.5. Création de la fonction guanidine

Elle est réalisée *via* la méthode n°2, en faisant réagir l'ammonium **51** dans un mélange (CH_2Cl_2 / MeOH), avec la triméthylamine (Et_3N) et la di-boc-triflylguanidine **12**. Nous avons obtenu après purification le composé **52** avec un rendement de 84 %.

II.6.6. Déprotection du composé 52

Le produit bipyridiné final **53** a été obtenu par déprotection de la fonction guanidine de **52**, à l'aide du mélange CH_2Cl_2 / TFA à température ambiante (Fig. 43). Après un traitement précautionneux identique aux précédentes réactions de déprotection, et visant à éliminer toute trace de TFA résiduel, **53** est récupéré sous forme de lyophilisat cotonneux avec un rendement de 95% et le produit est parfaitement hydrosoluble.

II.6.6.1. Analyse du trifluoroacétate de guanidinium 53

➤ **RMN 1H et ^{13}C :** Le spectre RMN 1H (Fig. 46) réalisé dans D_2O montre le degré de pureté élevé du composé **53**. L'ensemble des signaux de résonance des protons non échangeables est parfaitement attribué ; l'incorporation de la guanidine ne peut cependant être démontrée ici.

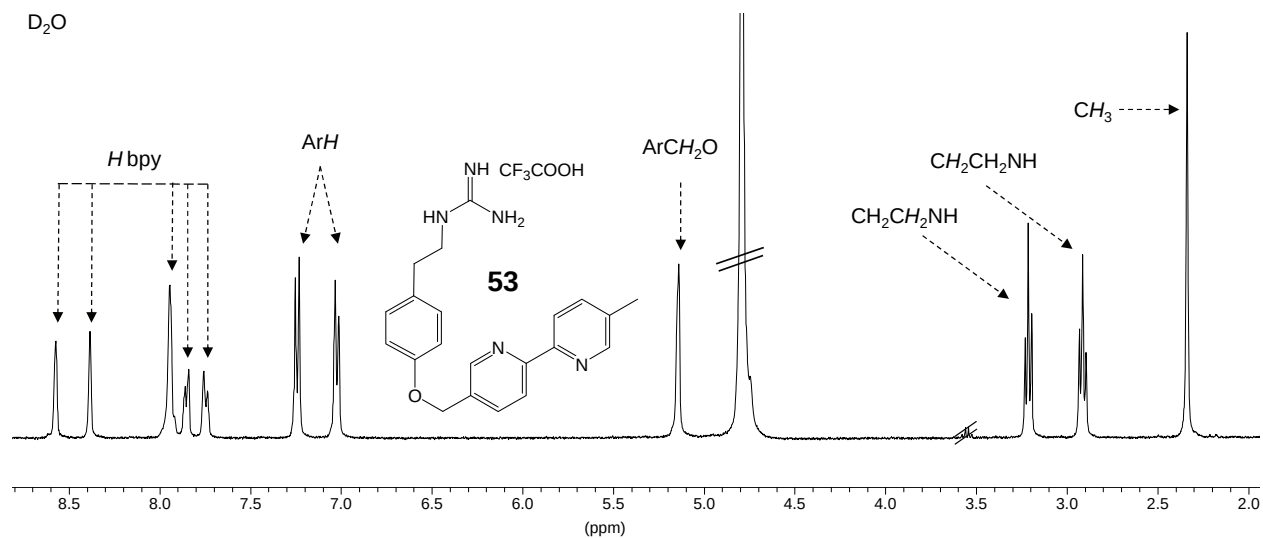


Fig. 46 : Spectre RMN 1H (400 MHz, D_2O , TA) de **53**.

L'analyse par RMN ^{13}C effectuée dans le DMSO- D_6 (Fig. 47) nous permet de vérifier la présence de la fonction guanidine, avec un signal de résonance autour de 158.85 ppm cumulé avec le signal du carbone *ipso* phénolique.

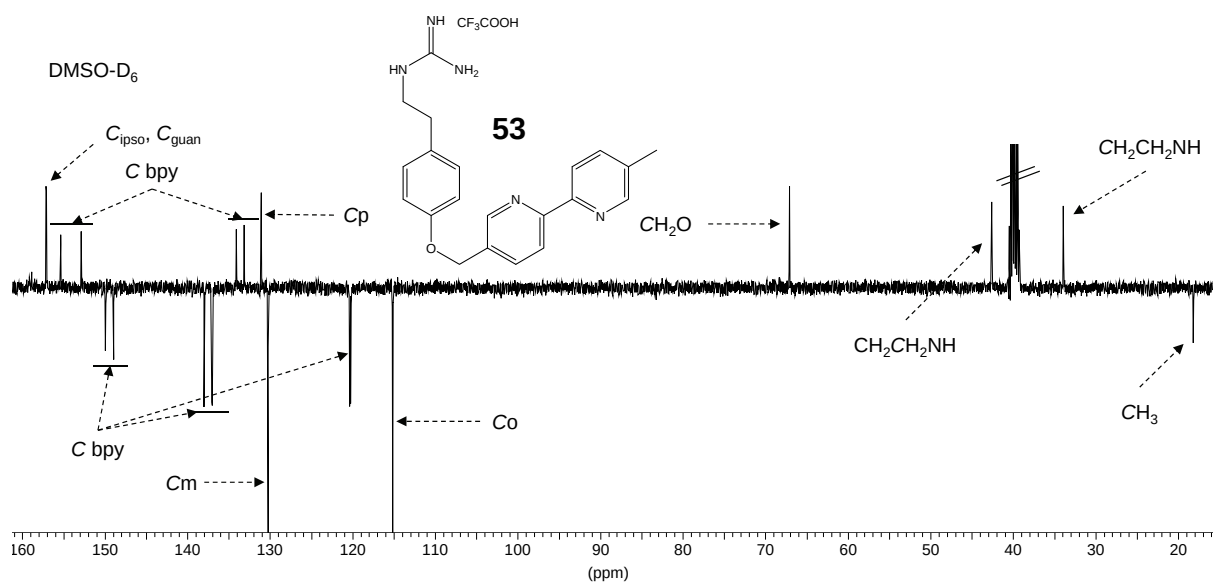


Fig. 47 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) de **53**.

➤ **Analyse élémentaire :**

L'analyse élémentaire est en accord avec la formule brute $C_{21}H_{23}ON_5$, CF_3COOH (475.46 g/mol), sans présence d'eau d'hydratation.

➤ **Spectrométrie de masse :**

L'analyse par spectrométrie de masse en électrospray mode positif révèle un pic de base à 362 uma, correspondant à l'ion moléculaire $[M - CF_3COO]^{+}$.

II.7. Conclusion

Nous avons contribué au développement de la famille du composé antibactérien leader **13** (CX1), découvert précédemment [1-7].

La chimie que nous avons utilisée pour la synthèse de ces nouveaux dérivés est bien maîtrisée au sein du laboratoire, et, au cours de nos avancées, nous avons pu constater sa reproductibilité et sa souplesse, tout en y apportant un certain nombre de petites améliorations ; cependant, elle n'est pas extrapolable à tout type de fonctionnalité, ainsi que nous l'avons observé avec le groupement biphényle.

L'échec rencontré dans la série biphényle ne nous permet pas d'évaluer, à ce jour, l'impact de ce groupement en biologie. Nous espérons cependant développer dans le futur une stratégie spécifique à ce groupement. L'ensemble de composés finaux décrits dans ce chapitre sera évalué en tant qu'agents antibactérien, au chapitre V.

Références bibliographiques

- 1) a) M. Mourer, R.E Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Fonctional Organisation and Gain of Activity: The case of the Antibacterial tetra-*para*-guanidinoethyl-calix[4]arene". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 296-63.
- 2) M. Grare, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Towards news antibacterial drugs. Interest of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene". *Pathol. Biol.* **2006**, 54, 470-476.
- 3) M. Grare, M. Mourer, S. Fontanay, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "*In vitro* activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria"; *J.Antimicrob. Chemother.* **2007**, 60, 575-581.
- 4) M. Grare, E. Dague, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, J.-F.L. Duval, R.E. Duval; "Microelectrophoresis and atomic force microscopy: new tools to explore mechanism of action of antibacterial compounds". *Pathol. Biol.* **2007**, 55, 465-471.
- 5) M. Grare, S. Fontanay, H. Massimba Dibama, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Time-kill curves and evolution of membrane permeability after *para*-guanidinoethylcalix[4]arene exposure". *Pathol. Biol.* **2010**, 46, 46-51.
- 6) M. Grare, H. Massimba Dibama, S. Lafosse, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics hexamidine and chlorhexidine". *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, 16, 432-438.
- 7) M. Mourer, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R.E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "p-Guanidinoethyl calixarenes and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation". *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5496-5509.
- 8) C.D. Gutsche; "Calixarenes"; *Monographs in Supramolecular Chemistry*, Ed. Royal Society of chemistry, **1989**, ISBNB 0-85186-916-5.

- 9)** C.D. Gutsche; "Calixarenes revisited"; *Monographs in Supramolecular Chemistry, Ed. Royal Society of chemistry*, **1998**, ISBN 0-85404-502-3.
- 10)** C.D. Gutsche, K.C. Nam; "Calixarenes. 22. Synthesis, properties, and metal complexation of aminocalixarenes"; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6153-6162.
- 11)** C.D. Gutsche, I. Alam; "Calixarenes 23: The complexation and catalytic properties of water soluble calixarenes"; *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4689-4694.
- 12)** S.K. Sharma, S. Kanamathareddy, C.D. Gutsche; "Upper Rim Substitution of calixarenes: Carboxylic acids"; *Synthesis* **1997**, *11*, 1268-1272.
- 13)** a) M. Dudic, A. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, G. Donofrio, R. Ungaro; "A general synthesis of water soluble upper rim calix[4]arene guanidinium derivatives which bind to plasmid DNA"; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11613-11618.
- 14)** A. Mulder, T. Auletta, A. Sartori, S. Del Ciotto, A. Casnati, R. Ungaro, J. Huskens, D.N. Reinhoudt; "Divalent Binding of a Bis(adamantyl)-Functionalized Calix[4]arene to β -cyclodextrin-based Host: An Experimental and Theoretical Study on Multivalent Binding in solution and at Self-Assembled Monolayers"; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6627-6636.
- 15)** T. Auletta, B. Dorti, A. Mulder, A. Sartori, S. Oncli, C.M. Bruinink, M. Peter, C.A. Nijhuis, H. Beijleveld, H. Shönherr, G.J. Vancso, A. Casnati, R. Ungaro, B.J. Ravoo, J. Huskens, D.N. Reinhoudt; "Writing Patterns of Molecular Printboards"; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 369-373.
- 16)** M.S. Bernatowicz, Y. Wu, G.R. Matsueda; "Urethane protected derivatives of 1-guanylpzazole for the mild and efficient preparation of guanidines"; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3389-3060.
- 17)** S. Robinson, E.J. Roskamp; "Solid Phase Synthesis of Guanidines"; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6697-6705.
- 18)** C. Schroif-Grégoire, K. Barale, A. Zapparucha, A. Al-Mourabit; "Preparation of N-alkyl-N'-carboalkoxy guanidines: unexpected effective trans-alkoxylation transforming

the 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl onto various carbamates”; *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2357-2359.

19) a) C.D. Gutsche, M. Iqbal, K.C. Nam, K. See, I. Alam; “Conformation and complexational characteristics of calixarenes”; *Pure Appl. Chem.* **1988**, *4*, 483-488. b) I. Alam, S.K. Sharma, C.D. Gutsche; “The Quinone Methide Route to Mono- and Tetrasubstituted Calix[4]arenes”; *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3716-3720.

20) S. Kanamathareddy, D.C. Gutsche; Calixarene: “Selective Functionalization and bridge Building”; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6070-6075.

21) S. Berthelon, J.-B. Regnouf-de-Vains, R. Lamartine; “Mono-Functionalization of the tris-(p-tert-Butyl)Calix[4]arene”; *Tetrahedron Lett.* **1997**, *49*(38), 8527-8528.

22) J.-B. Regnouf-de-Vains, S. Berthelon, R. Lamartine; “Electrospray Mass Spectrometric Evidence of Calixarene p-Quinone Methide Formation”; *J. Mass. Spectrom.* **1998**, *33*, 968-970.

23) S. Berthelon, J.-B. Regnouf-de-Vains, R. Lamartine “Selective Mono-dealkylation of Tetra-*p*-tert-Butyl-Calix[4]arene at the Upper Rim”, *Synthetic Commun.*, **1996**, *26*, 3103-3108.

24) I. Alam, S.K. Sharma, C.D. Gutsche; “The quinonemethide Route to Mono- and Tetrasubstituted Calix[4]arenes”; *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3716-3720.

25) J. Jaime; J. de Mendoza; P. Prado, P.M. Nieto; C. Sanchez; “¹³C NMR Chemical Shifts. A Single Rule Determine the Conformation of Calix[4]arene”; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3372-3376.

26) J.O. Magrans, J. de Mendoza, M. Pons, P. Prado; “Are 1,3-Di-O-benzylcalix[4]arenes an Exception to the ¹³C-NMR Rule for Conformational Determination”; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4518-4520.

Chapitre III :

**NOUVEAUX PRODRUGUES
HYDROSOLUBLES A BASE
CALIXARENIQUES ET PORTEUR DE
QUINOLONE**

III.1. Introduction

Le mot prodrogue désigne tout composé destiné à l'usage thérapeutique qui doit subir une bio-transformation, après son administration à un organisme, pour que s'exerce une activité pharmacologique. On modifie ainsi, non pas les propriétés pharmacodynamiques intrinsèques d'une molécule, mais ses propriétés pharmacocinétiques (ou même galéniques).

De nombreuses situations nécessitent le recours aux prodrogues : passer de la formule liquide à la forme comprimé ou inversement, masquer une odeur ou une saveur, résister au milieu stomacal, aux enzymes hépatiques, passer la barrière intestinale, cutanée ou hématoencéphalique, obtenir un effet retard. Il faut parfois aussi modifier le métabolisme et la répartition tissulaire pour diminuer la toxicité. Indépendamment de ce type de démarche, qui débouche sur des analogues simples d'une molécule connue dès le départ, la recherche peut conduire à des structures nouvelles très différentes, ayant simplement une probabilité d'activité thérapeutique voisine. La plupart des prodrogues rencontrées, sont de type ester ou amide, ces fonctions étant aisément hydrolysables *in vivo* par voie enzymatiques.

Notre projet repose sur l'utilisation des propriétés de la plate-forme calixarénique (rigidité, organisateur spatial, facilité à fonctionnaliser ...etc.) pour développer une nouvelle famille de composés potentiellement actif (Fig. 1).

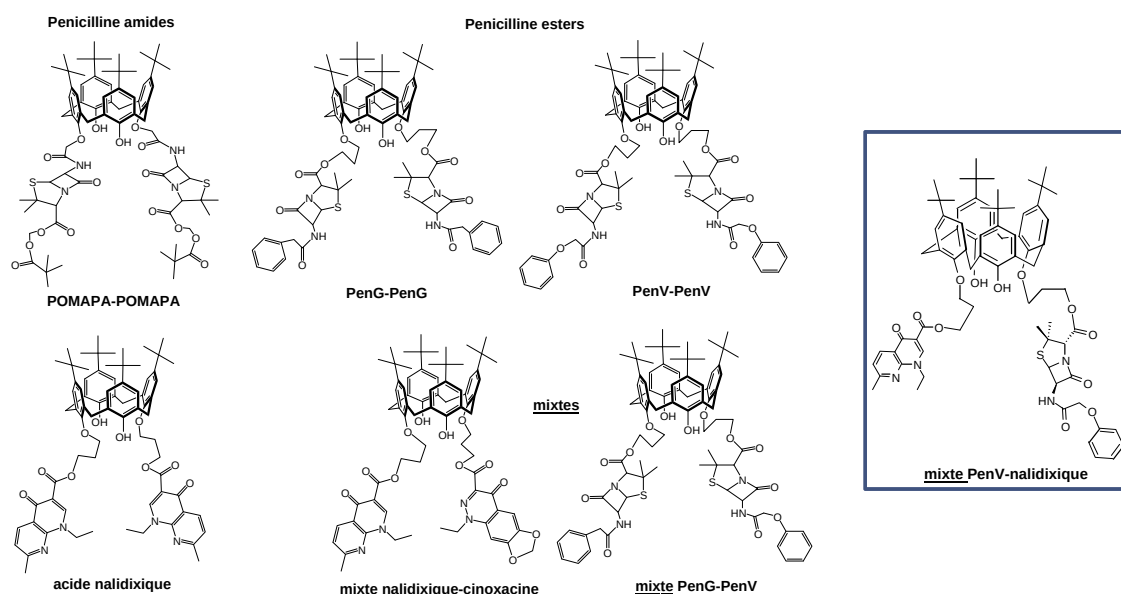


Fig. 1 : Podants calixaréniques poly- β -lactames, poly-quinolones, et mixtes [1,2].

Le premier domaine thérapeutique que nous avons choisi est celui des anti-infectieux, par la création de nouveaux composés présentant un caractère de prodrogue, c'est-à-dire susceptible de libérer après biodisponibilisation le ou les principes actifs choisis. Ces derniers peuvent être identiques ou différents (Fig. 1).

C'est suivant le schéma très simple illustré par la figure 2, qu'a été initié ce projet au sein du laboratoire par Adel Ben Salem (thèse 2004). Ses travaux initiaux [1,2], ont porté sur la mise en place d'une stratégie visant à construire de nouveaux édifices moléculaires constitués d'un support calixarénique de type *p*-tert-butylcalix[4]arène, lipophile porteur *via* des fonctions amides ou esters de plusieurs anti-infectieux, tels que les antibiotiques pénicillines et quinolones, ou antifongique amphotéricine B.

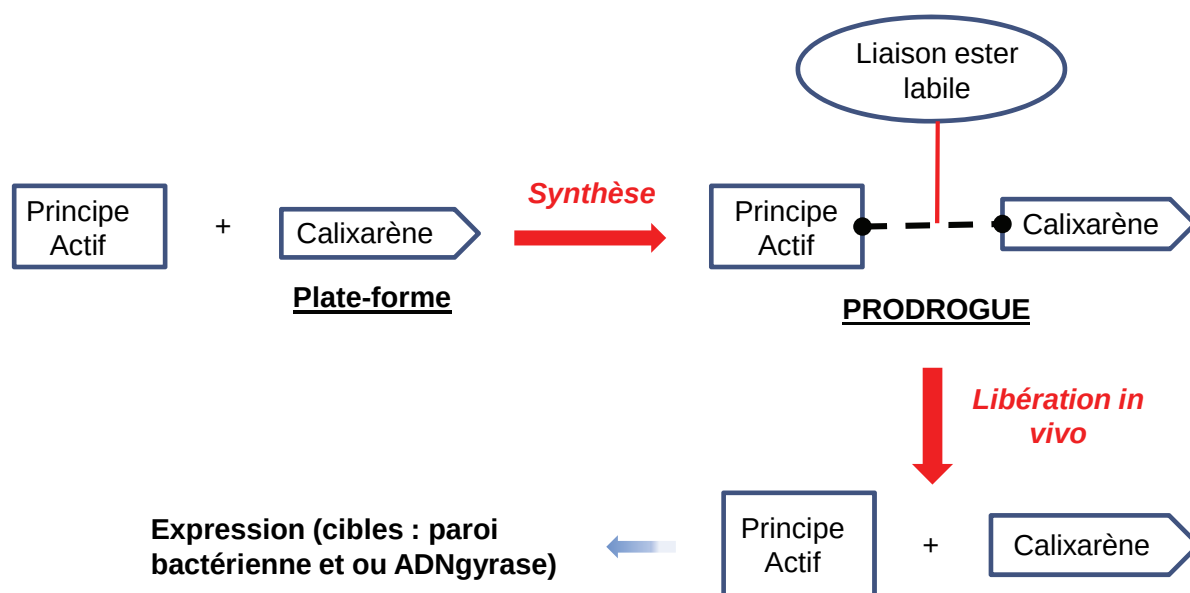


Fig. 2 : Synthèse et hydrolyse in vivo d'une prodrogue.

Un nombre important de dérivés intégrant soit deux principes actifs différents, pénicilline G + pénicillineV, quinolone A + quinolone B, mais aussi pénicilline e+quinolone (Fig. 1) ont été préparés.

Le travail de thèse d'Adel Ben Salem [1,2] a été plus centré sur l'approche de synthèse et d'analyse structurale. Les méthodologies de synthèse mises au point ont constitué la base du développement de composés analogues mais hydrosolubles que nous présentons dans ce manuscrit.

En effet, les molécules synthétisées au laboratoire et présentées en figure 2 sont très peu hydrosolubles, de ce fait leurs pouvoirs antibactérien n'ont pas pu être évalués dans des conditions standards *in vitro* de microbiologie.

En reprenant ce projet, nous sommes fixés comme premier objectif d'apporter un caractère hydrosoluble aux modèles de base développés précédemment, la figure ci-dessous (Fig. 3) résume le modèle prodrogue que nous avons construite.

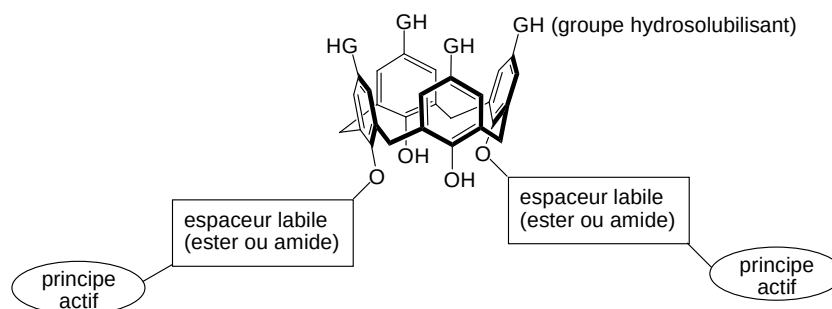


Fig.3 : Représentation schématique de prodrogue hydrosoluble à base calixarénique (exemple pour deux principes actifs incorporés).

Après avoir obtenu, par des voies chimiques appropriées les calixarènes hydrosolubles potentiellement prodrogues incorporant un ou plusieurs motifs acide nalidixique, nous avons évalué et caractérisé l'hydrolyse du principe actif dans différents milieux en utilisant la chromatographie liquide haute performance (CLHP) à polarité de phase inversée.

Ce travail a nécessité la mise au point et la validation d'une méthode qui nous a permis d'identifier et de quantifier l'acide nalidixique libérée par l'hydrolyse des prodrogues, dans les milieux d'études choisis (tampon à pH variables, milieux biologiques variés).

Le dernier objectif de ce projet a consisté, à déterminer par des méthodes de microbiologies standards, le pouvoir antibactérien de nos composés. Les résultats microbiologiques sont présentés au Chapitre V.

III.2. Synthèse et caractérisation de calix[4]arènes hydrosolubles porteurs de quinolones *via* une liaison ester hydrolysable.

III.2.1. Stratégie de synthèse (Schéma)

L'approche synthétique que nous avons choisie est la suivante : il s'agit d'un schéma général, chaque étape sera détaillée par la suite.

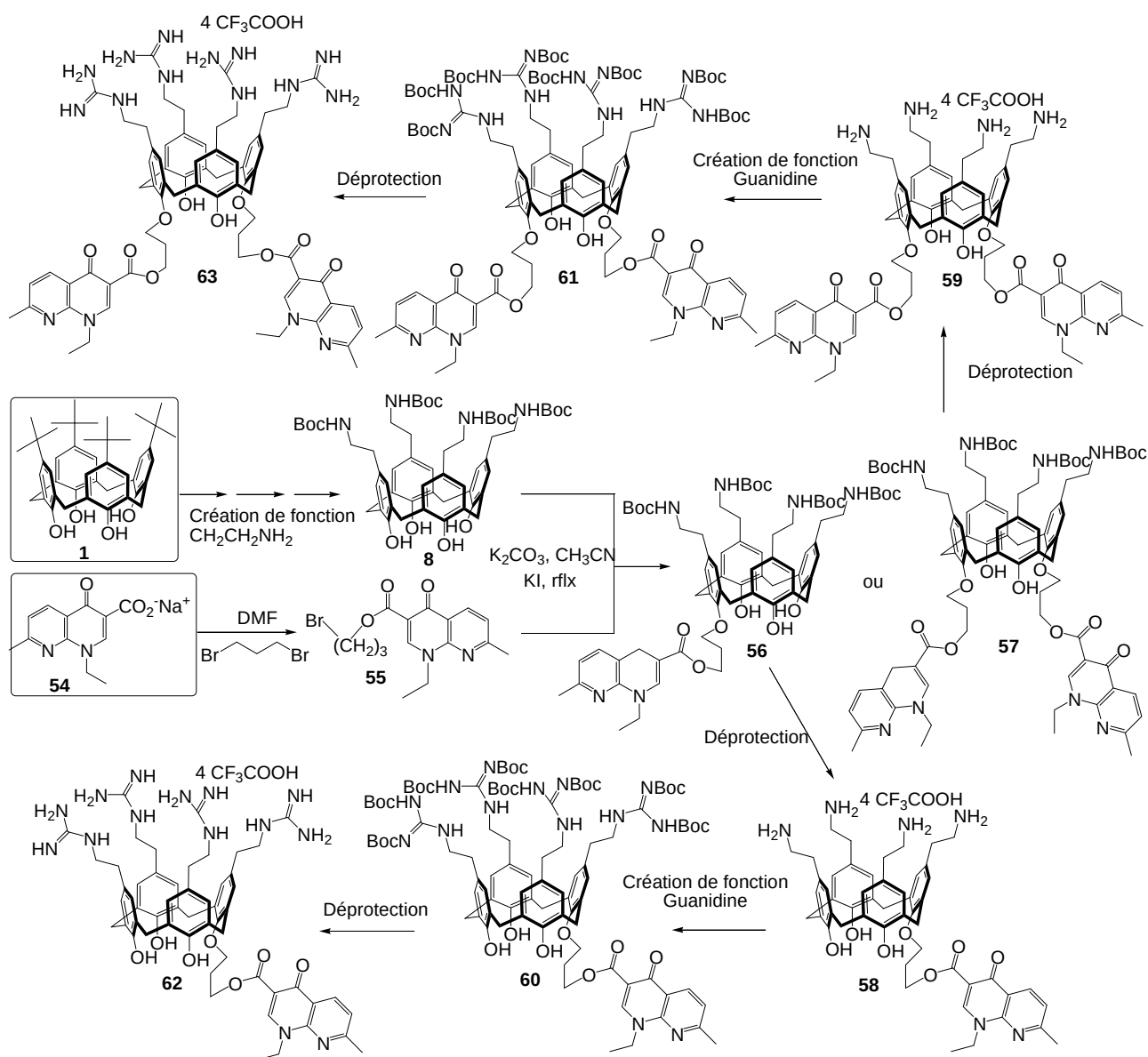


Fig. 4 : Stratégie de synthèse des prodrogues hydrosolubles.

III.3. Création de fonctions hydrosolubilisantes sur la partie haute du calix[4]arène

La première étape du schéma synthétique, consiste à modifier la couronne supérieure du calix[4]arène, en y incorporant des fonctions hydrosolubilisantes de types aminoéthyle ou guanidinoéthyle. Nous avons présenté au chapitre II, les procédés chimiques conduisant à ces transformations.

III.4. Incorporation du nalidixate sur la partie basse

La préparation des sels de sodium de l'acide nalidixique a été précédemment décrite [2,3]. Cette méthode consiste à ajouter un équivalent d'une solution d'hydroxyde de sodium à une suspension de quinolone dans l'eau, à température ambiante (Fig. 5). Après la solubilisation totale, le solvant est évaporé et le solide rouge est mis dans un dessiccateur sur P_2O_5 pendant une semaine.

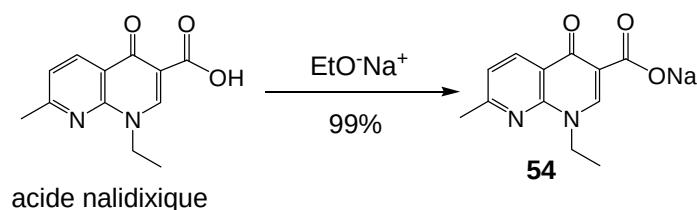


Fig.5 : Synthèse du sel de sodium de l'acide nalidixique 54.

Des améliorations à la dernière étape ont été apportées. En effet, une lyophilisation de la solution saline permet en une nuit d'obtenir le sel sous forme de solide de coloration jaune clair avec un rendement quantitatif.

III.4.1. Synthèse du bromo-propyl nalidixate 55

La synthèse du dérivé bromé **55** fait intervenir un excès de 1,3-dibromopropane dans le but de défavoriser la dimérisation dans un solvant anhydre (DMF fraîchement distillé sur CaH_2 sous vide poussé et à basse température). La température de réaction est maintenue à 35°C.

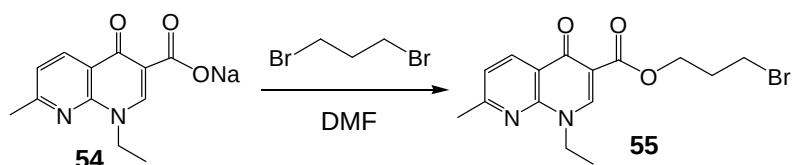


Fig.6 : Synthèse du bromo-propyl ester de quinolones

La purification du bromo-propyl nalidixate **55** est obtenue par pré-purification rapide sur colonne chromatographique de silice, élué par 100% de CH_2Cl_2 . Puis, deux à trois précipitations à froid, dans un mélange CH_2Cl_2 / heptane 60 : 40 (v : v) permettent d'obtenir le bromo-propyle nalidixate pur, sous une forme solide jaunâtre. L'analyse RMN du proton réalisée sur le composé **55** est conforme à la littérature.

III.4.2. Greffage du bromopropyl-nalidixate sur le *tétra*-(*boc*-aminoéthyle)calix[4]arène **8**.

Dans la deuxième étape, nous avons ciblé le greffage sur la partie basse du *tétra*-(*boc*-aminoéthyle)calix[4]arène **8** (synthèse présentée au chapitre II), de un puis deux acides nalidixiques (en position distale), sous la forme de bromopropyl nalidixate (Fig. 7).

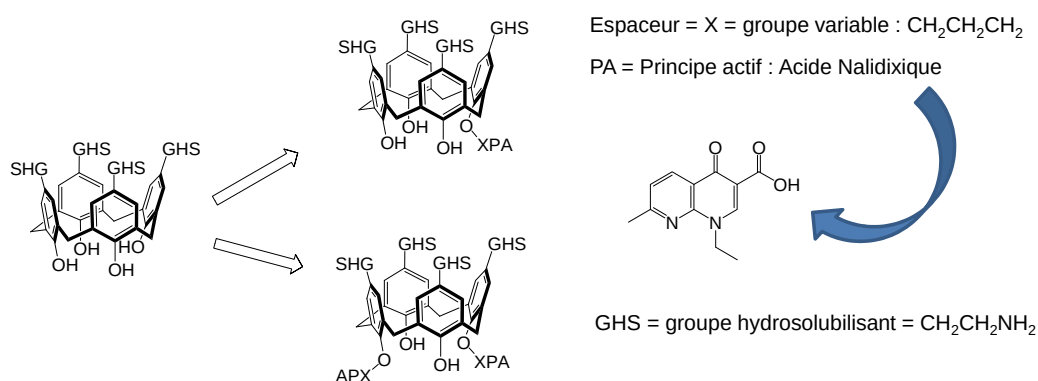


Fig.7 : Modèle de calixarène-prodrogues hydrosolubles.

Nous avons ciblé les synthèses de deux dérivés nalidixiques mono-substitué **56** et di-substitué **57**. (Fig. 8)

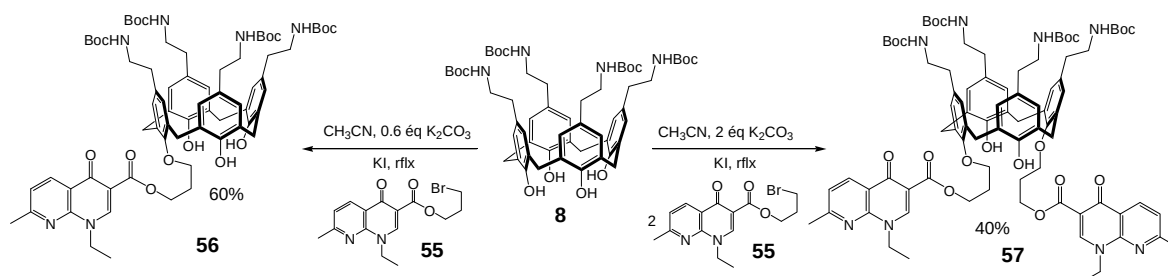


Fig.8 : Synthèse des composés **56 et **57**.**

Les conditions opératoires du greffage validées depuis longtemps au laboratoire [1,2] font état de la solubilisation du composé **8** dans l'acétonitrile (fraîchement distillé sur CaH_2) à reflux, sous atmosphère d'argon pendant 24 heures en présence d'une base minérale, le carbonate de potassium. L'anion phénate (nucléophile) qui est généré va se substituer au brome du bromo-propylnalidixate **55**.

Du fait que nous avons un bromure d'alkyl primaire, nous nous attendions à une faible réactivité. C'est pourquoi nous avons envisagé l'ajout de KI pour aider la réaction de substitution.

Le tableau 1 indique les proportions de K_2CO_3 , de bromopropylnalidixate utilisé pour la synthèse des composés **56** et **57**, ainsi que les rendements de ces podants isolés et purifiés.

Produits	K_2CO_3	Bromopropylnalidixate	Rendements
56	0,6 éq.	1 éq.	60%
57	2 éq.	2 éq.	40%

Tableau 1 : Stœchiométries employées et rendements obtenus pour 1 équivalent de calixarène pour les podants **56 et **57**.**

III.4.2.1. Problèmes rencontrés lors du greffage.

La fonctionnalisation sélective des groupes hydroxyles (mono- ou difonctionnalisation 1,3) est délicate à réaliser, la déprotonation de une à quatre fonctions hydroxyles étant liée à la force de la base utilisée, mais aussi à la température, au temps de réaction, à la nature du solvant, ainsi qu'à la réactivité de l'électrophile.

La synthèse des podants **56** et **57** ne s'est pas faite sans difficultés. Nous avons constaté que, même lorsque nous utilisons un excès de base, le brut réactionnel contient toujours les réactifs de départ; la conversion n'est donc pas totale dans les conditions de réaction. En même temps, il se forme en faibles proportions des sous-produits de réaction. La chromatographie couche mince (SiO_2 , CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2 (v : v).) réalisée sur les bruts de synthèse nous montrent, des R_f très proches induisant des problèmes de séparation.

Nous avons également été confrontés aux problèmes de dégradation de nos produits pendant leur purification par chromatographie sur colonne de silice, avec l'éluant CH_2Cl_2 / MeOH, notamment pour le mono-substitué **56** (Fig. 8).

L'analyse RMN ^1H réalisée sur les produits de dégradation montre qu'il s'agit de l'ester méthylique de l'acide nalidixique, qui serait issu d'une réaction de transestérification, probablement catalysée par la silice en présence du méthanol.

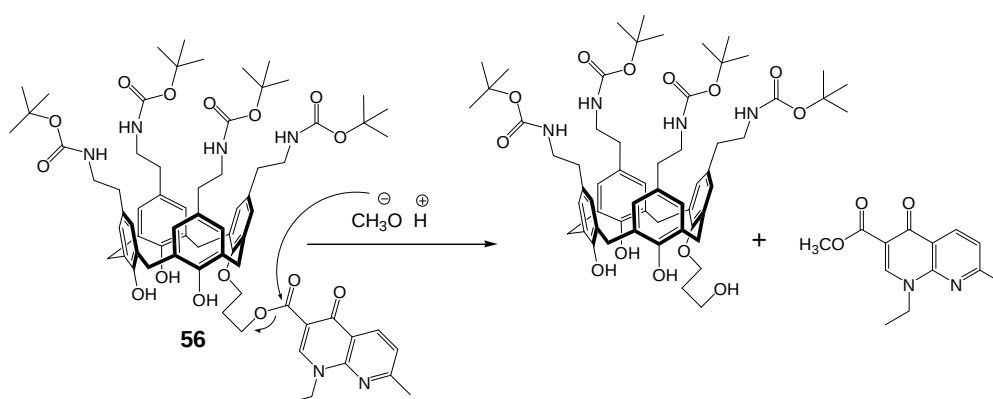


Fig. 9 : Réaction de trans-estérification sur **56**.

Face aux problèmes rencontrés (réaction incomplète, fonctionnalisation complexe des groupes hydroxyles et dégradations du produit durant la purification) nous avons apporté certaines modifications :

- Evolution des conditions stœchiométriques vers la mise en contact de 0.6 équivalent (au lieu de 1 équivalent) de l'agent alkylant pour un équivalent calixarénique. Des lors, nous avons observé en CCM (SiO_2 , CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2 (v : v)), une consommation considérable des réactifs avec formation de très peu de produits secondaires.

- la purification sur colonne est réalisée avec un petit volume de silice, le mélange d'élution CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2 (v : v), à lieu après plusieurs éluions au CH_2Cl_2 . Cette procédure vise à réduire le temps de contact entre le produit, la silice et le méthanol.

Nous avons pu, par ces changements de protocole, isoler après plusieurs purifications le produit **56** propre, avec un rendement de 60%

III.4.2.2. Evaluation des structures - Analyses de **56** et **57**.

- RMN ^1H

L'étude des spectres RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC et HMBC a été faite conformément à la littérature [2,4] et nous a permis de confirmer la formation des composés **56** et **57**.

Nous présentons ci-dessous (Fig.10 et Fig. 11) les spectres (RMN ^1H , 400 MHz, CDCl_3) caractéristiques des calix[4]arènes mono- **56** et bis-substitué **57**. Notre démarche dans cette étude consiste à montrer l'existence d'une partie quinolone (1 à deux groupes nalidixate) qui soit lié à un calix[4]arène *via* un groupement propyle.

- **Nalidixate** :

Le proton vinylique H(2) apparait dans tous les cas sous forme de singulet, à 8,68 ppm (1 H) et 8,63 ppm (2 H) pour **56** et **57** respectivement. Les protons H(5) et H(6) sortent sous la forme de doublet à 7,23 et 8,64 ppm ($J = 7,91$ Hz) pour **56**, et à 7,18 et 8,54 ppm ($J = 8,04$ Hz) pour **58**. Un massif est observé à environ 4,40-4,60

ppm (**56**) et à 4,34 ppm (**57**) qui correspond aux protons $-\text{CH}_2-$ du groupe éthyle (la constante J n'est pas mesurable). Le singulet à 2,67 et 2,63 ppm est attribué au méthyle, avec respectivement 3 H pour **56** et 6 H pour **57**.

- **Calix[4]arène :**

Il se justifie par la présence d'un massif à 1,38 ppm attribué aux protons des groupes Boc. On observe également un ensemble de signaux dont deux massifs à 2,58 et 3,27 ppm pour **56** et un ensemble de quatre massifs à environ 2,46; 2,53-2,66; 3,16-3,20; et 3,30 ppm pour **57**, attribué aux bras éthyléniques reliant calixarène et fonctions guanidiniums. La conformation cône est déduite de la présence d'un système AB entre 3.35 – 4.48 ppm ($J_{AB} = 13$ Hz) pour **56** et 3.26 – 4.27 ppm ($J_{AB} = 13.04$ Hz) pour **57**; ces signaux correspondent aux protons des ponts méthylénique ArCH_2Ar . Les protons aromatiques sont représentés pour **56** par un ensemble de deux massifs à 6.86 et 6.89 ppm qui intègre pour 8 H, et, pour **57**, deux singulets bien distincts à 6.71 et 6.76 ppm intégrant chacun pour 4 H.

- La mono- ou la di-O-alkylation des macrocycles est déduite par la présence de l'ensemble (triplet-« quintuplet »-triplet) à 2.58, 4.47, 4.82 ppm et 2.53-2.68, 4.20, 4.86 ppm du groupe propyl respectivement pour **56** dans un rapport 1 : 2 avec un jeu de protons de référence du calixarène (doublet ArCH_2Ar à 4.48 ppm), et pour **57** dans un rapport 1 : 1 (doublet de référence ArCH_2Ar à 4.27 ppm).

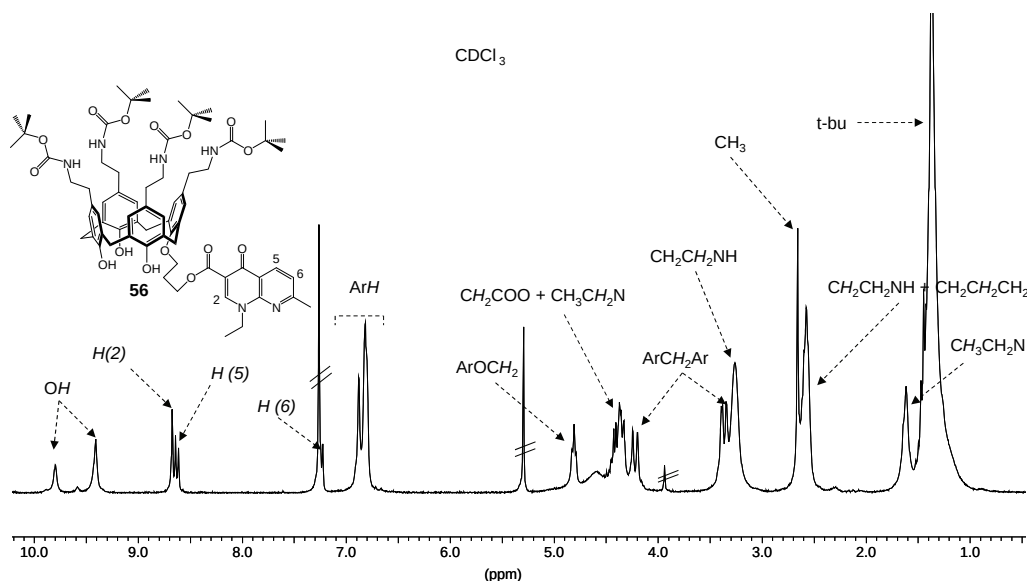


Fig.10 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) du composé **56**.

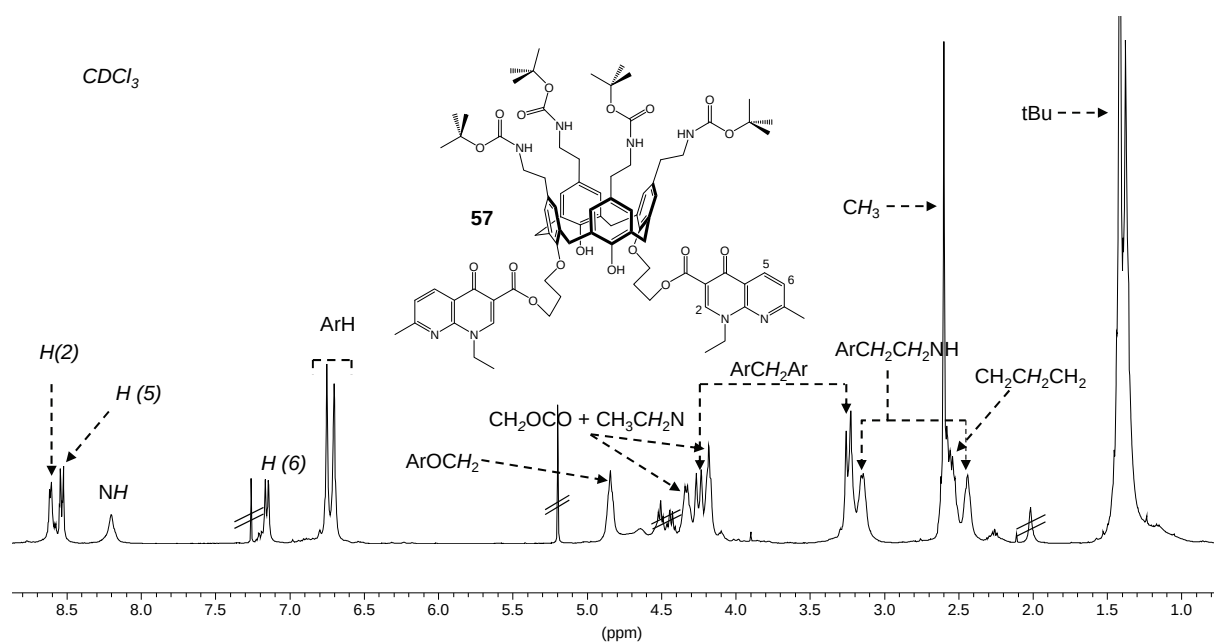


Fig.11 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) du composé **57**.

Les déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des groupes ArCH_2Ar sont reportés dans le tableau 2.

Produits	Composé 56	Composé 57
RMN ^1H (ppm)	3.35 – 4.48 (13 Hz)	3.26 – 4.27 (13.04 Hz)
RMN ^{13}C (ppm)	31.98, 32.52	31.97

Tableau 2 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C des ArCH_2Ar des podants **56** et **57**.

Nous présentons sur la figure 12, les spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TA) des composés **56** et **57**. Le déplacement chimique des ArCH_2Ar à 31.97 ppm confirme leur conicité.

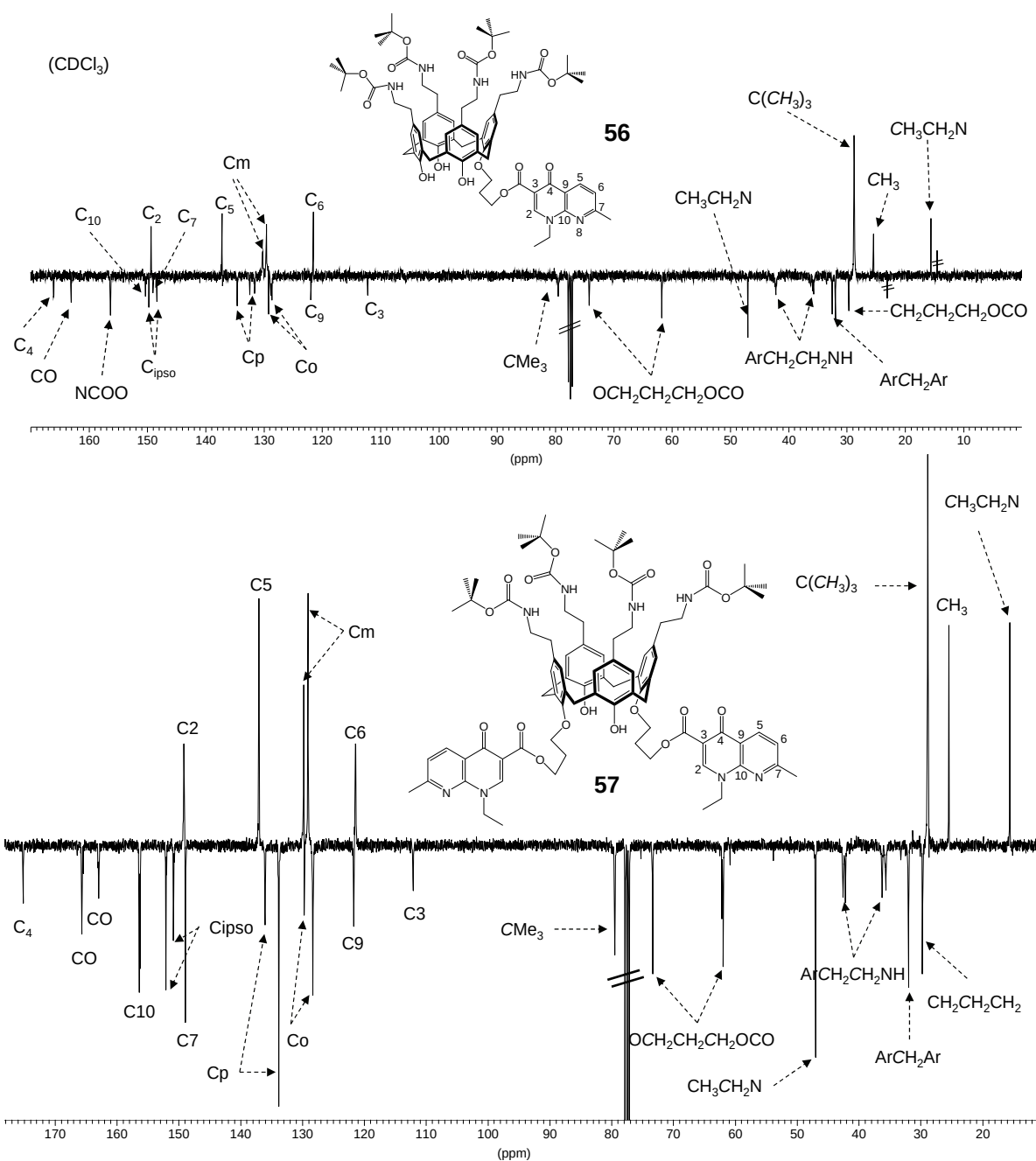


Fig.12 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TA) des composé **56** et **57**.

III.4.3. Déprotection des composés **56** et **57**

La déprotection des composés **56** et **57** s'est faite suivant un protocole usuel, dans le mélange CH_2Cl_2 / TFA 85 : 15 (V : V), à température ambiante sous atmosphère d'argon pour donner, après traitement, les trifluoroacétates

d'ammoniums **58** et **59** avec un rendement quasi quantitatif 95% et 96% respectivement.

Comme pour les produits initialement préparés [7], nous avons une crainte à propos de la stabilité des ponts éther reliant la quinolone au calixarène. Les analyses effectuées sur ces produits ont montré que la stabilité des liaisons éther et ester était effective.

III.4.3.1. Analyses des composés **58** et **59**

L'analyse élémentaire des prodrogues mono- et bis-nalidixate (**58** et **59**) après lyophilisation correspond pour le dérivé **58**, à la formule $C_{51}H_{60}N_6O_7$, 4 CF_3COOH , 4 H_2O (masse 1396,47 g/mol). Le dérivé bis-substitué **59** répond à la formule $C_{65}H_{80}N_8O_{10}$, 5 CF_3COOH , H_2O (masse 1721,5 g/mol).

Ces produits ont été totalement caractérisés; outre l'analyse élémentaire, l'étude par RMN 1H de ces deux ammoniums est conforme à nos attentes, à quelques impuretés près. On note la présence de traces de diéthyléther, dont l'élimination est parfois très difficile avec ce type de sels (lyophilisation nécessaire).

Les spectres RMN 1H de ces deux composés sont présentés en Figure 13. Nous en donnons ci-après quelques éléments d'interprétation.

- L'absence sur les deux spectres (a/**58**) et (b/**59**) d'un signal large à 1.38 ppm correspondant aux protons des groupes protecteur (Boc) prouve que la déprotection a été complète.
- Sur le spectre (a / **58**), un ensemble de quatre massifs à 2.54, 2.66, 2.95 et 3.09 ppm est attribué aux bras éthyléniques reliant le calixarène aux fonctions ammoniums ($ArCH_2CH_2NH_2$). Une RMN 1H dans le DMSO- D_6 permettrait de distinguer ces deux signaux *via* un couplage avec le NH (pas d'échange H / D)
- Sur le spectre (b / **59**), ces groupements éthylammoniums sont représentés par un ensemble de quatre massifs à 2.40–2.69, 2.88, et 3.03 ppm.
- Le composé mono-nalidixate **58** présente dans les champs moyens, et dus à sa dissymétrie, deux systèmes AB entre 3,30–3,95 ppm et 3,41–4,13 ppm (J_{AB}

= 13,6 Hz) attribués aux groupements ArCH_2Ar . Le bis-nalidixate **59** quant à lui exhibe un seul système AB entre 3,28–4,14 ppm ($J_{\text{AB}} = 13,36 \text{ Hz}$, 8 H)

- L'introduction d'un groupe nalidixate sur la partie basse du calix[4]arène entraîne la diminution de la symétrie de l'anneau macrocyclique (C_{4v} en D_{2h}) créant trois groupes de noyaux phénoliques (Fig. 14). Ainsi le spectre de **58** fait apparaître dans sa partie aromatique, deux singulets intégrant chacun pour 2 H, à 6.72 et 6.84 ppm correspondant aux deux protons du noyau phénolique substitué et à ceux de son voisin d'en face, puis deux doublets à environ 6.88 ppm (J = très fins) attribué aux protons des groupes phénoliques non substitués.

- La présence de deux nalidixates en position distale sur la plate-forme calixarénique transforme la symétrie C_{4v} du calixarène non substitué en une symétrie C_{2v} , de ce fait le spectre du bis-nalidixate **59** est plus simple que celui du mono-nalidixate **58**. Ainsi les protons aromatiques des noyaux phénoliques sont identifiés sous forme de deux singulets à 6.71 et 6.73 ppm intégrant chacun pour 4 H.

- Une ensemble de signaux (triplet-«quintuplet»-triplet) du bras espaceur propyl reliant la partie calixarénique à l'acide nalidixique. Les déplacements chimiques sont les suivants : 2.54, 4.31, 4.73 ppm pour le mono-nalidixate **58** et 2.40–2.69, 4.20–4.30, 4.83 ppm pour **59**.

- Les signaux qui justifient la présence du groupe nalidixate : un triplet à 1.39 ppm ($J = 6.5 \text{ Hz}$) intégrant pour 3 H (**58**) et à 1.35 ppm ($J = 7.18 \text{ Hz}$) intégrant pour 6 H (**59**). Un ensemble de signaux (triplet-quadruplet) du groupe éthyl sur le nalidixate à 1.36, 4.31 ppm pour **58** et à 1.35, 4.20–4.30 ppm pour **59**. Dans les deux cas, les spectres présentent dans les champs faibles un singulet attribué au proton vinylique H(2) à 8.83 ppm (**58**) et 8.73 ppm (**59**), et deux doublets attribués aux protons H(6) et H(5) à 7.39 et 8.33 ppm pour **58**, et à 7.39 et 8.34 ppm pour **59**.

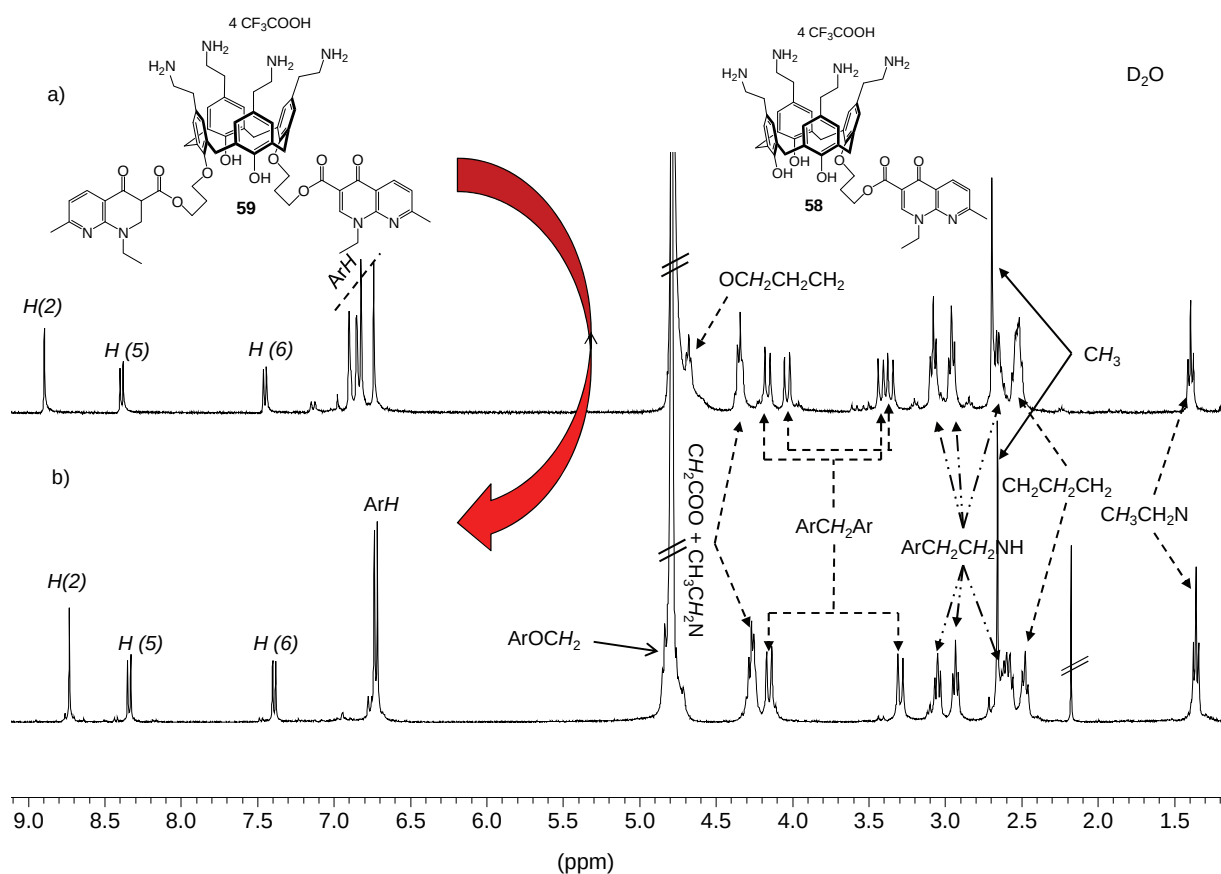


Fig. 13 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) des composés a) **58** et b) **59**.

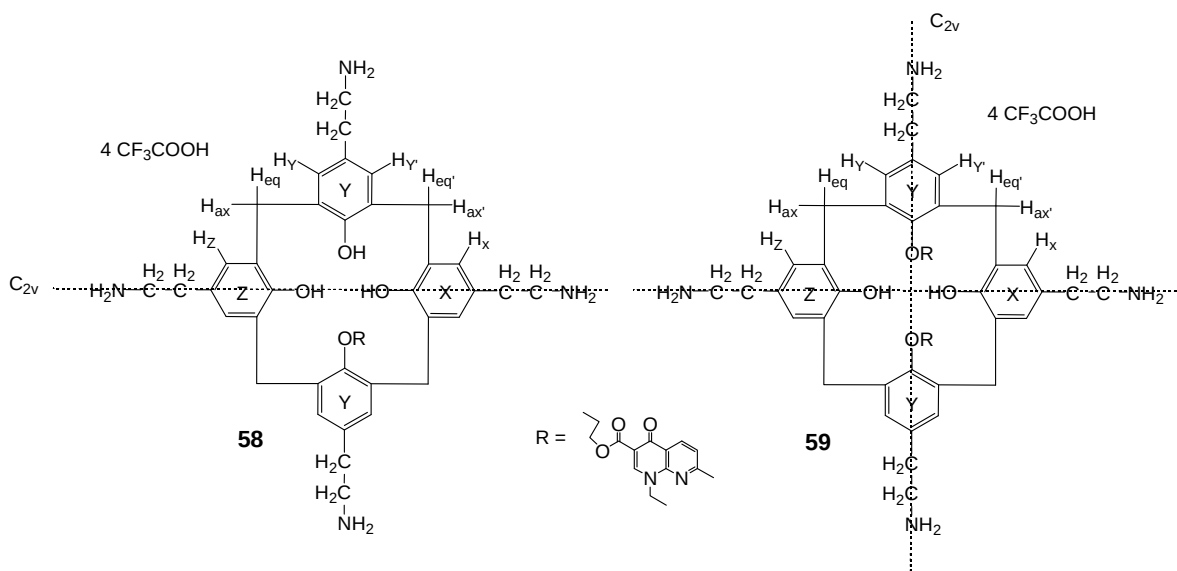


Fig. 14 : Représentation schématique des mono- et bis-nalidixate **58** et **59**.

Nous avons également réalisé les spectres RMN ^{13}C des composés **58** et **59**, qui présentent des profils identiques et confirment la nature conique des entités calixaréniques, les carbones correspondants aux ponts méthyléniques (ArCH_2Ar) apparaissant à 30.90 ppm pour **58** et à 30.77 ppm pour **59**. Nous avons choisi de présenter ici le spectre RMN ^{13}C du prodrogue hydrosoluble **59** (Fig.15).

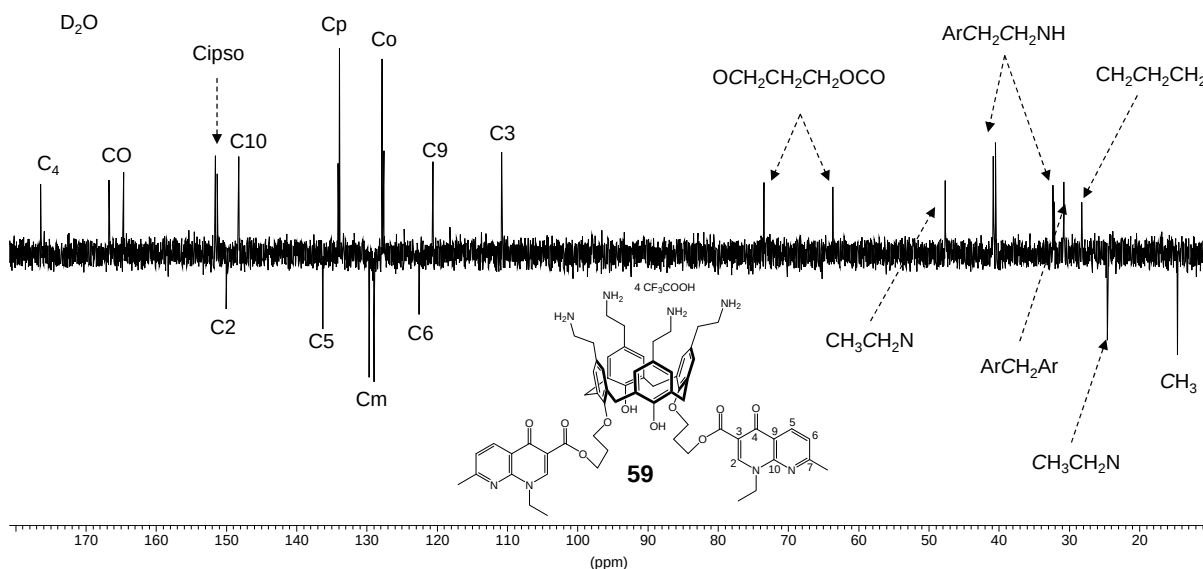


Fig. 15 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) du composé **59**.

L'analyse par spectrométrie de masse en électrospray mode positif nous apporte des profils conformes à nos attentes. Les spectres sont représentés en figure 16.

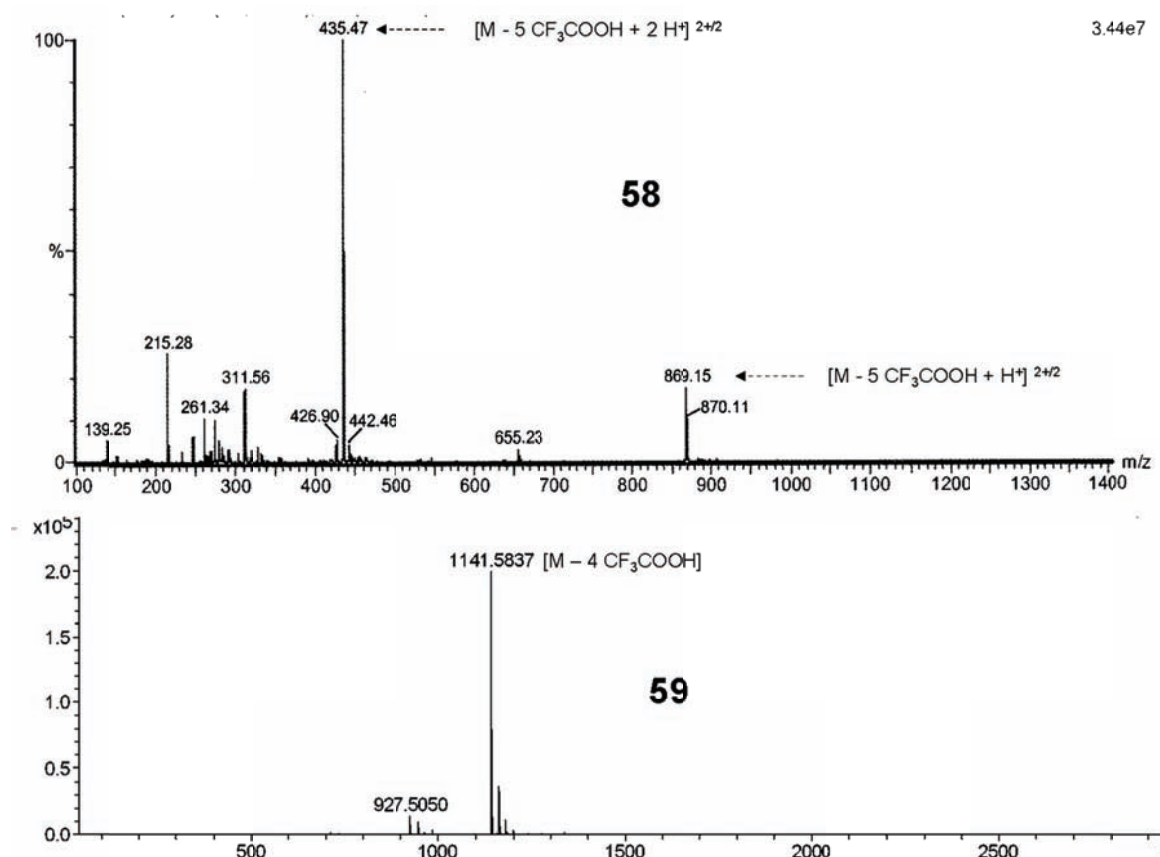


Fig. 16 : Spectres de masse en électrospray mode positif de **58** et **59**.

III.4.4. Synthèse des analogues alcools

La figure 17 représente la réaction hypothétique d'hydrolyse des prodrogues, tels que nous l'envisageons (exemple du prodrogue **58**). Selon cette hypothèse, le prodrogue mono-nalidixate **58** est hydrolysé pour donner deux produits : l'alcool **65** et l'acide nalidixique **NAL**.

Afin de pouvoir les identifier durant les analyses chromatographiques prévues dans les études d'hydrolyse, et d'évaluer leurs éventuelles activités antibactériennes propres dont il faudra tenir compte dans l'étude des propriétés biologiques des deux prodrogues **58** et **59** correspondants, il s'est avéré indispensable de faire la synthèse de **65** et de son homologue di-alcool **67**.

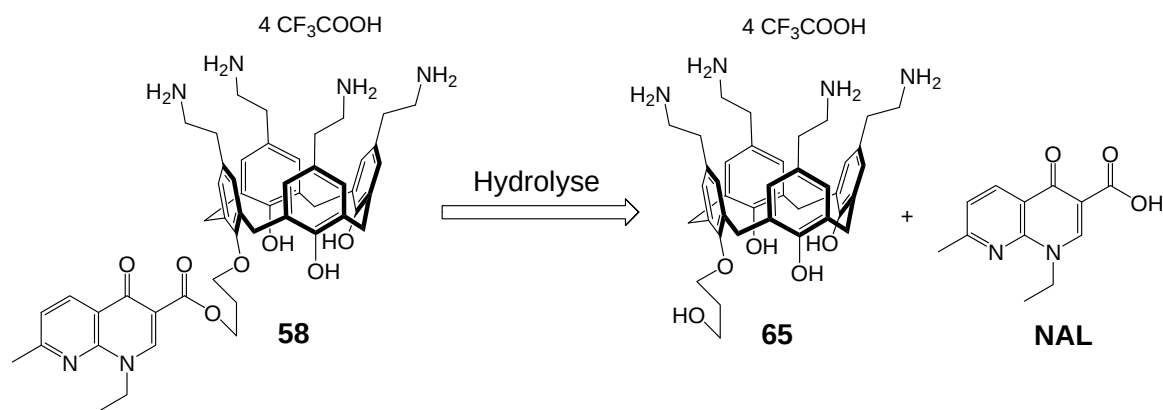


Fig. 17 : Hypothèse d'hydrolyse du prodrogue **58**.

III.4.4.1. Synthèse du podant calixarénique hydrosoluble mono-propyl alcool **65**

Le composé **65** a été obtenu en deux étapes. La première est une réaction de trans-estérification volontaire du prodrogue mono-nalidixate protégé **56** qui, sous la forme organosoluble subit une hydrolyse de la liaison ester suivant la réaction présentée sur la figure 18.

Le calixarène mono-nalidixate **56** a été mis en solution dans l'éthanol en présence de 7 équivalents de K₂CO₃; après une nuit de réaction à température ambiante et sous argon, le mélange réactionnel devient jaune trouble. Les chromatogrammes (SiO₂, iode + sable) du brut réactionnel nous ont montré la présence d'un produit majoritaire qui est par la suite purifié sur colonne chromatographique (SiO₂, CH₂Cl₂ : MeOH 99 : 1 (V : V)). Après un traitement de purification, nous avons obtenu l'intermédiaire alcool **64**, avec 61% de rendement.

La seconde étape a consisté à faire une déprotection classique des fonctions amines en milieu acide (CH₂Cl₂ / TFA 75 : 25 (v : v)) (Fig.18). Après avoir subi un traitement de purification identique aux déprotections précédemment décrites, le brut est lyophilisé pour donner le composé **65** attendu, parfaitement hydrosoluble, avec un rendement de 95%.

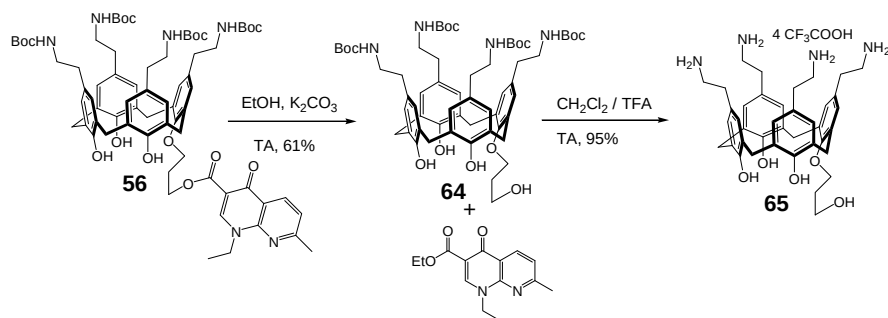


Fig.18 : Synthèse du composé 65.

III.4.4.1.2. Analyse des composés 64 et 65

Nous avons effectué toutes les analyses courantes (analyses élémentaires, Tableau 2), RMN ^1H (Fig. 19) et ^{13}C (Fig. 20), Masse (Fig. 21), IR et UV sur les composés **64** et **65**. Celles-ci nous révèlent des structures tout à fait conforme à nos attentes.

- L'analyse élémentaire des composés **64** et **65** est présentée dans le tableau 2; nous notons que **64** est probablement accompagné d'un résidu CH_2Cl_2 .

	Calculé (%)	Trouvé (%)
64	$\text{C}_{59}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_{13}$, $\frac{1}{2} \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1096.60) C(65.10%); H(7.62%); N(5.10%)	C(65.43%); H(7.64%); N(5.18%)
65	$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_5$, 4 CF_3COOH , 3 H_2O (116.98) C(48.46%); H(5.19%); N(4.81%)	C(48.36%); H(4.84%); N(4.76%)

Tableau 3 : Analyses élémentaires des composés 64 et 65.

- RMN ^1H

On constate en Figure 19, la disparition des signaux correspondants à l'acide nalidixique à 4.47, 7.23, 8.64 et 8.68 ppm (NCH_2CH_3 , H(6), H(5) et H(2)). La présence du bras propyl alcool est confirmée par les signaux à 4.24; 3.97 et 2.26 ppm ($\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$). Chaque signal intègre pour deux protons. Les protons aromatiques sont représentés par un ensemble de signaux bien définis sous forme de deux singulets à 6.91 et 7.00 ppm, et d'un doublet à 7.15 ppm.

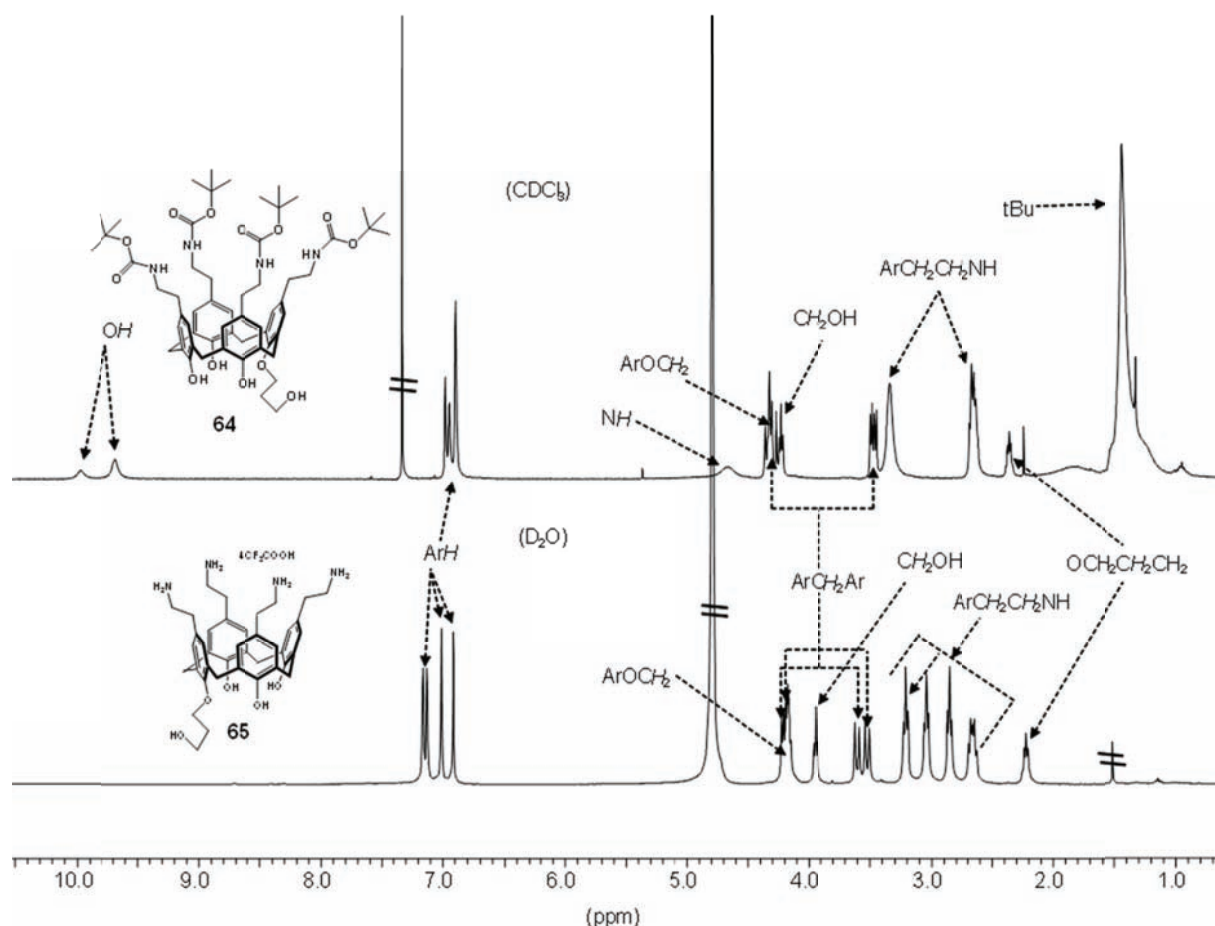


Fig. 19 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) de **64** et **65** dans respectivement CDCl_3 et D_2O .

Les analyses RMN ^{13}C (100 MHz, TA) réalisée sur des composés **64** et **65** (Fig. 20) nous informent que les structures calixaréniques ont conservé leur

conformation cône, justifié par la présence du signal des carbones des ArCH_2Ar à 31.98 et 32.52 ppm (**64**) et à 31.12 ppm (**65**).

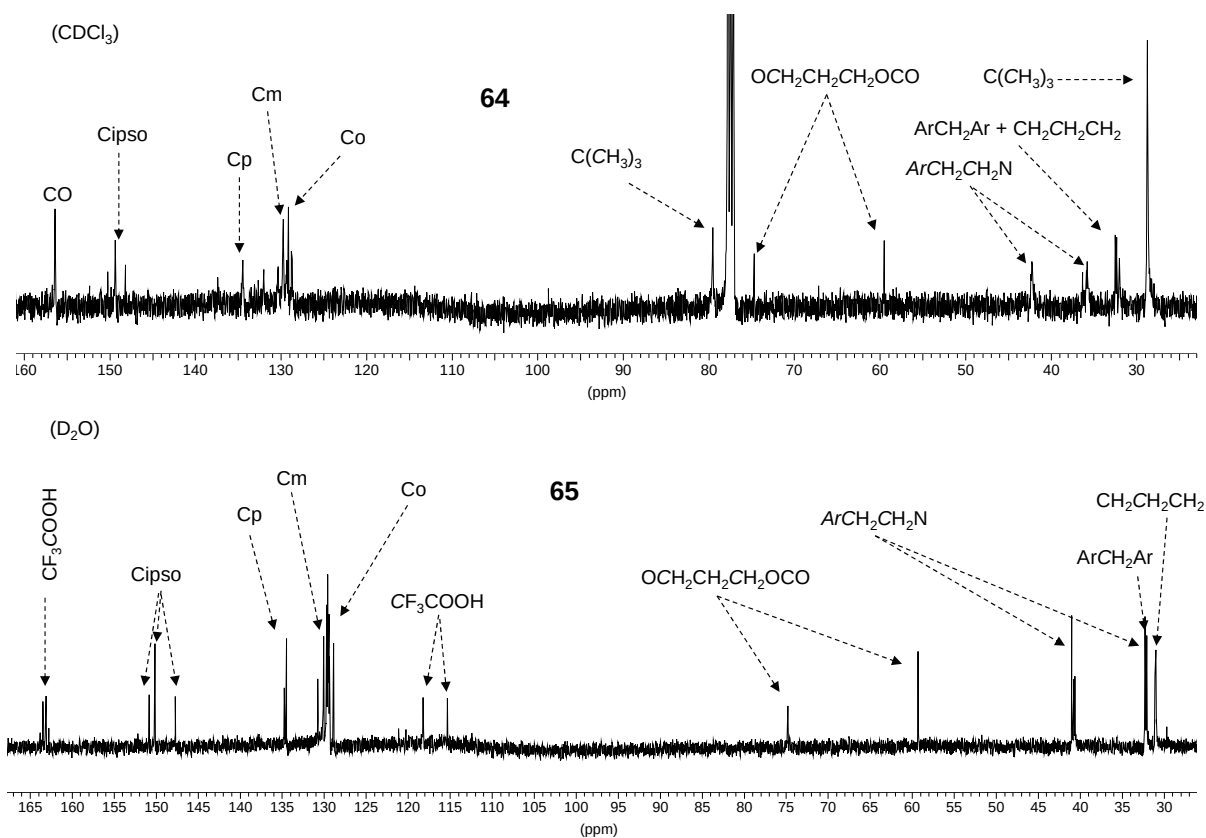


Fig. 20 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, TA) de **64** et **65** dans respectivement CDCl_3 et D_2O .

D'autre part, des études de spectrométrie de masse en électrospray mode positif (Fig. 21) ont été faites sur ces deux composés, elles confirment les structures des produits attendus.

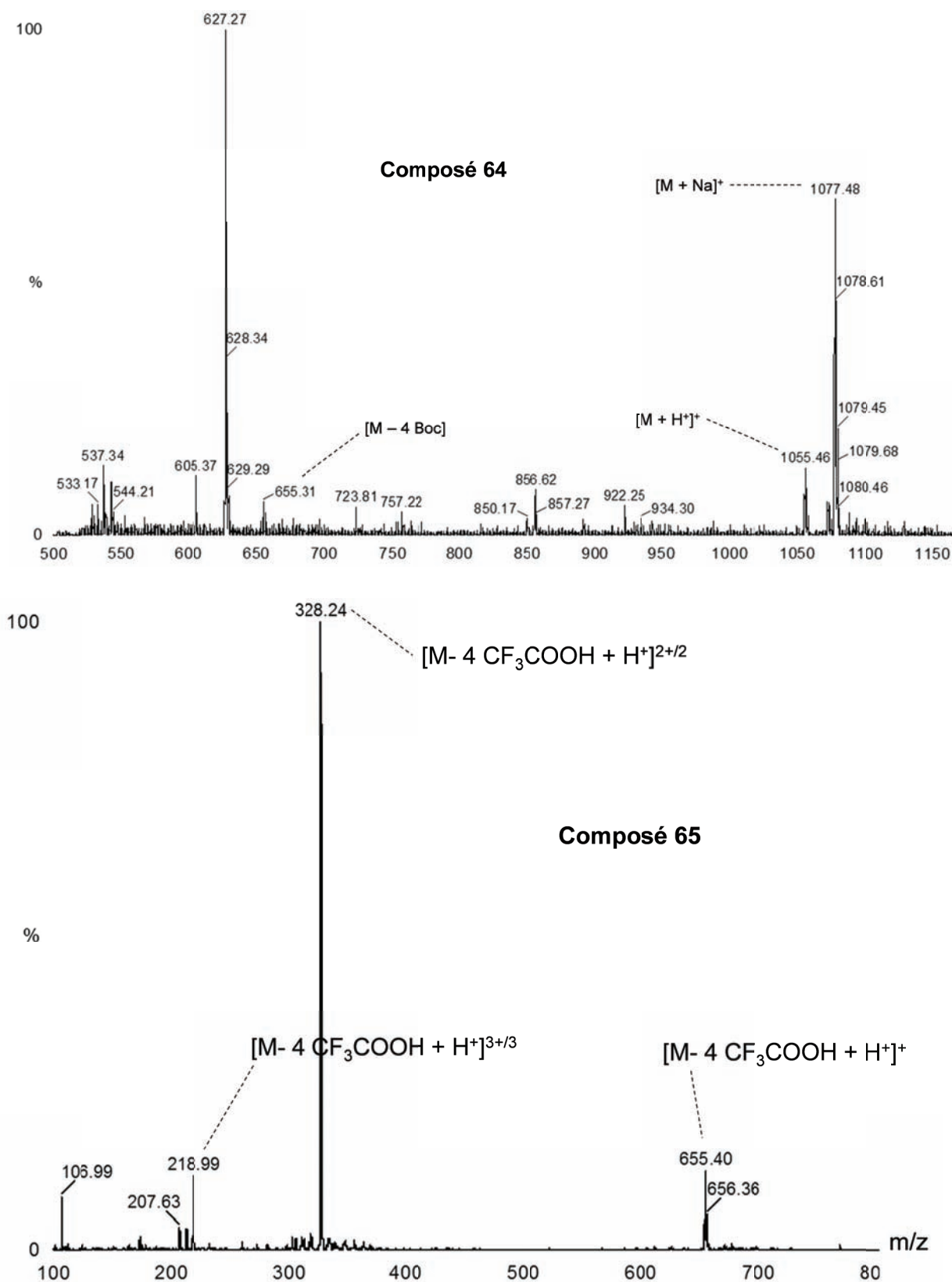


Fig. 21 : Spectre de masse en électrospray mode positif de **64** et **65**.

III.4.4.2. Tentative de synthèse de l'analogue bis-alcool 67.

Nous avons également envisagé la synthèse de l'analogue bis-nalidixate **67**. En première intention, nous avons décidé de suivre le procédé de trans-estérification ayant permis d'obtenir l'analogue mono-alcool **65**, en l'adaptant à l'intermédiaire **57** (Fig. 22).

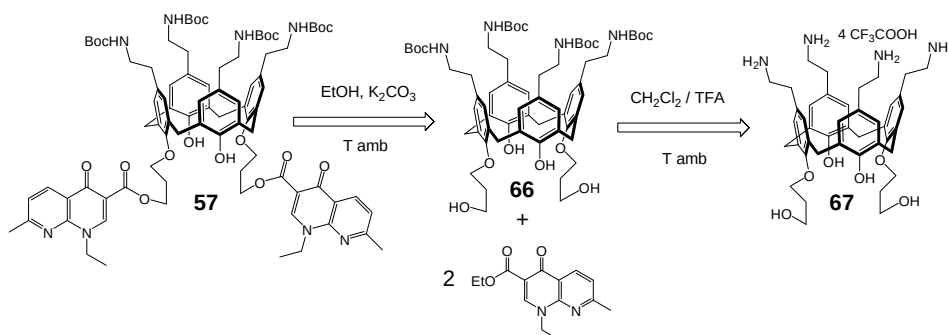


Fig. 22 : Hypothèse de synthèse de l'analogue bis-alcool **67**.

Malheureusement cette voie n'a pas permis l'obtention du bis-alcool **67** dans des conditions efficaces. Actuellement, d'autres voies de synthèse « douces » visant à son obtention sont en cours d'étude, par exemple celle consistant à greffer deux groupements -propyl-benzoate par réaction du dérivé bromé **i**) sur la couronne basse du calix[4]arène **8**, greffage suivi de la saponification des esters, puis de l'hydrolyse des groupes protecteurs Boc. (Fig. 23).

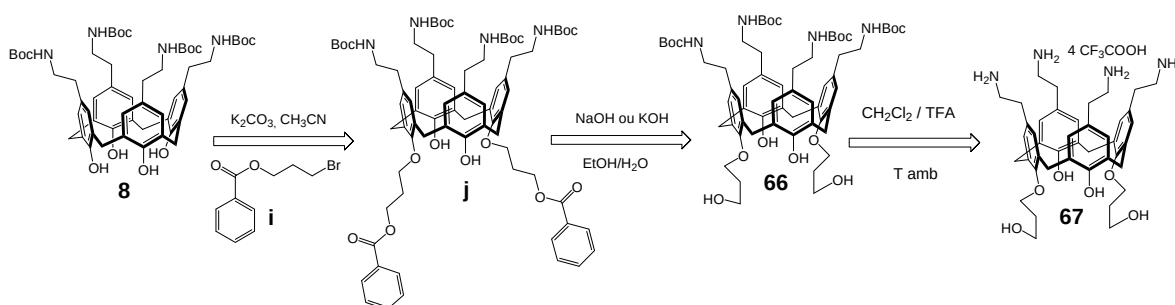


Fig. 23 : Hypothèse de synthèse de l'analogue bis-alcool **67**.

III.5. Vers une autre voie d'hydrosolubilisation des prodrogues calixaréniques mono- et bis-nalidixate.

Dans le but d'agrandir la famille des prodrogues hydrosolubles à base calixarénique, nous avons remplacé la fonction ammonium par un autre groupement hydrosolubilisant : le guanidinium. Dans ce cadre, notre démarche cumule à la recherche d'hydrosolubilité, l'apport de l'activité antibactérienne reconnue pour les dérivés du composé leader tétra-(guanidinoéthyl) **CX1** / **13**. Nous présentons ici les premiers résultats concernant ce projet.

La création de la fonction guanidine a mis en jeu la méthode N°2 (mode opératoire décrit précédemment), impliquant le synthon di-boc-triflylguanidine **12** et le dérivé prodrogue aminé **58**. Nous avons obtenu le produit *tétra*(di-(Boc)guanidinoéthyl)calix[4]arène mono-nalidixate **60** recherché (représenté en figure 24) avec un rendement de 65%. Le produit final, le tétra-trifluoroacétate du tétra-(guanidinoéthyl)calix[4]arène mono-nalidixate **62** (voir figure 24) est obtenu par déprotection de **60** dans le mélange CH_2Cl_2 / TFA 85 : 15, avec un rendement élevé (91%).

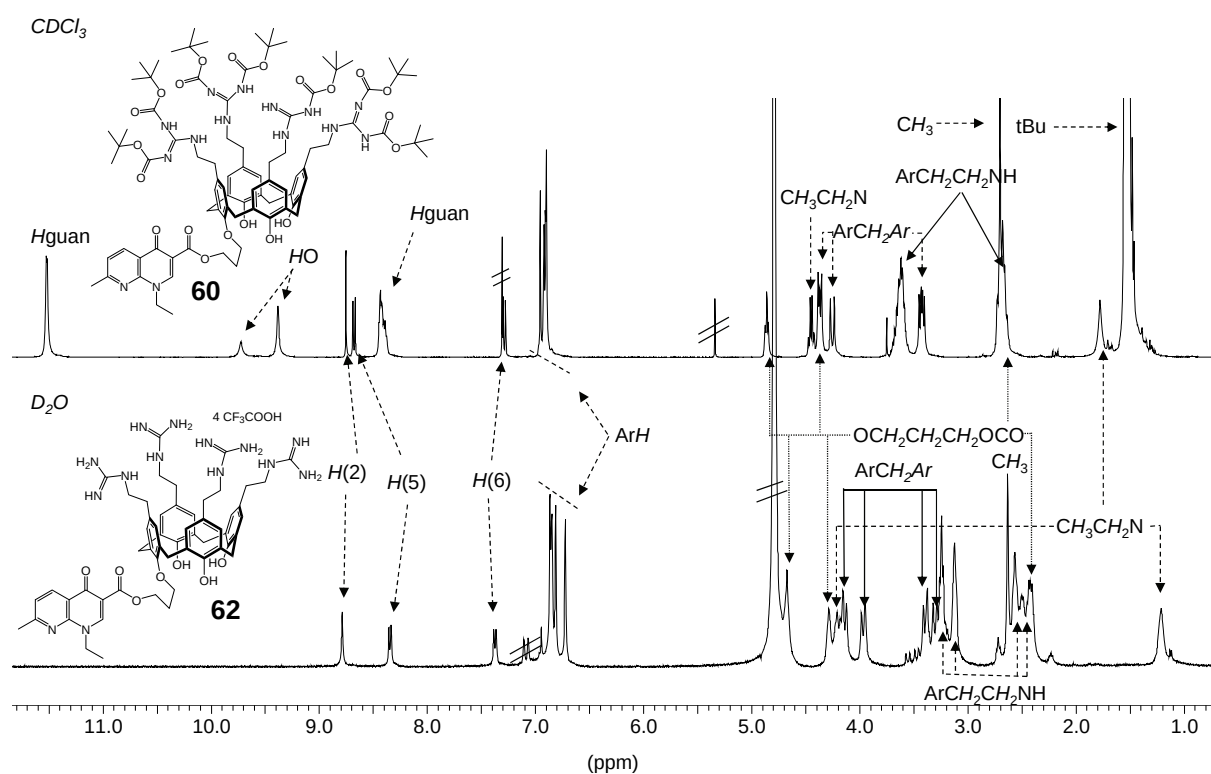


Fig. 24 : Spectres RMN ^1H des dérivés guanidino- **60** et **62** (400 MHz, TA).

Les spectres RMN ^1H superposés des composés **60** (CDCl_3) et **62** (D_2O) sont donnés en figure 24. Ces spectres présentent des profils analogues à ceux des prodrogues ammoniums et qui correspondent à nos attentes. Le spectre du composé **62** montre la présence de quelques impuretés.

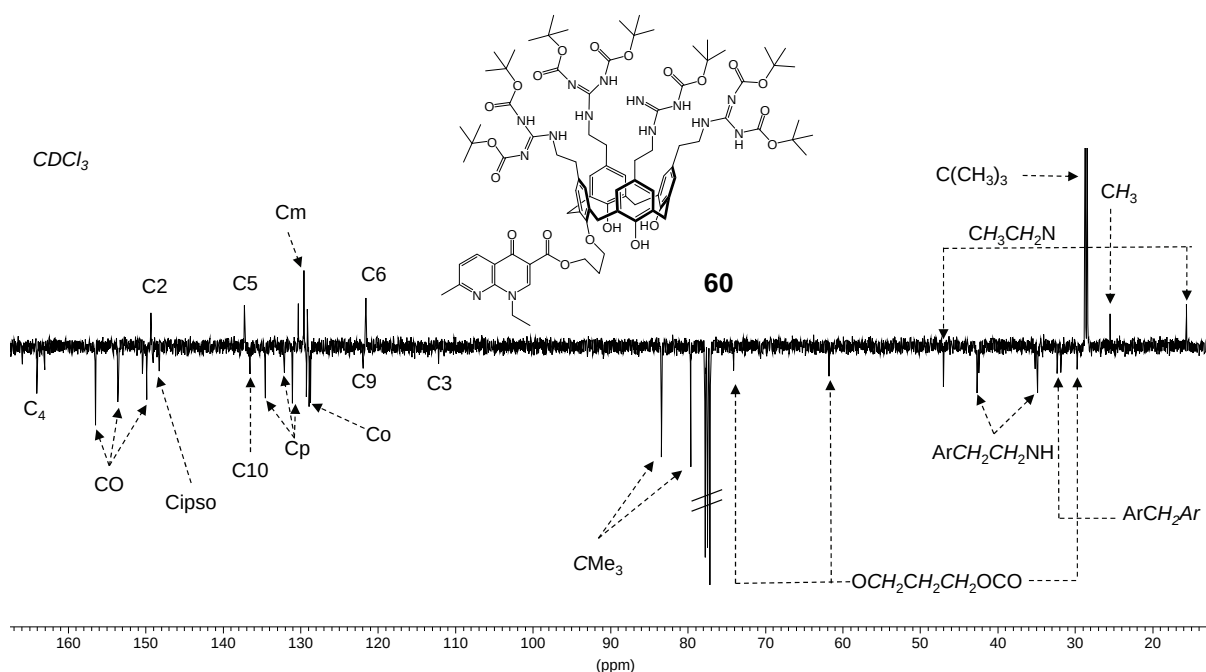


Fig. 25 : Spectre RMN ^{13}C du composé **60**.

Les analyses RMN ^{13}C (100 MHz, TA) des composés **60** et **62** dans respectivement CDCl_3 et D_2O , confirment la conicité des deux structures calixaréniques, par la présence systématique du signal des ArCH_2Ar autour de 31 ppm (Fig. 25).

L'analyse élémentaire du sel **62** correspond à la structure recherchée, accompagnée d'une molécule d'acide trifluoroacétique et d'une molécule d'eau. Sa composition chimique donne $\text{C}_{55}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_7$, 5 CF_3COOH , H_2O pour une masse molaire de 1625,35 g/mol.

Le spectre de masse de **62** en électrospray mode positif montre bien la présence de l'entité calixarène recherchée avec le pic moléculaire désalifié monochargé à 1037.82 u.m.a. $[\text{M}-4 \text{ CF}_3\text{COOH} + \text{H}]^+$, dichargé à 519.60 u.m.a. $[\text{M}-4 \text{ CF}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}]^{2+/2}$, ainsi que le produit d'hydrolyse $[\text{M}-\text{NAL}-4 \text{ CF}_3\text{COOH} + \text{H} + \text{H}]^+$ à 823.83 u.m.a.

Un problème technique ne nous a pas permis d'insérer le spectre en figure.

En conclusion, nous avons dans ce projet développé une série de nouveaux podants basés sur l'association, par le biais d'une fonction présentant un certain caractère de labilité, d'une plate-forme calix[4]arénique hydrosoluble et d'un principe actif anti-infectieux (l'acide nalidixique).

La relative complexité de cette stratégie à ce jour imposée par le choix des groupes protecteurs, ainsi que les difficultés rencontrés pendant les étapes de purification nous ont contraint à limiter notre approche à la synthèse des prodrugs ammoniums mono- et bis-nalidixate (**58**, **59**) et initier la synthèse des dérivés guanidinium avec le mono-nalidixate **62**. D'autres dérivés guanidino- ont été préparés, non décrits ici.

III.6. Evaluation du caractère prodrug des composés 58 et 59 par CLHP phase inverse

III.6.1. Objectif de l'évaluation

L'objectif de cette étude est la validation du concept «prodrug» des podants **58** et **59**. C'est-à-dire, montrer grâce à un système CLHP à polarité de phase inversée que l'hydrolyse des composés **58** et **59** se fait selon la figure 17. Ce qui entraîne respectivement la libération des analogues alcools **65**, **67** et l'acide nalidixique. Pour cela, Nous avons donc développé et validé une méthode CLHP de dosage de l'acide nalidixique notamment en milieu biologique (plasma de rat).

III.6.2. Matériels et méthode.

Toutes les manipulations et expériences décrites dans ce chapitre sont réalisées avec les matériels et procédures qui suivent.

III.6.2.1. Matériels

L'acide nalidixique utilisé comme référence provient des laboratoires WINTHROP (Longvic, côte d'or). L'acétate d'ammonium provient de UCB (*Union chimique belge*; Euronext : UCB). L'acide orthophosphorique est issu de la société Riedel-de Haën. Les tampons pH 7,0 et 10,0 proviennent de Prolabo (Prolabo, Vitry, France). L'hydroxyde de sodium (NaOH 1,0 M) est commercialisé par la société Riedel-de Haën. L'acétonitrile (HPLC grade) et le méthanol (HPLC grade) proviennent de CARLO ERBA REACTIS-SDS, (Rueil Malmaison, France). L'eau ultra pure est obtenue par le système d'appareil Milli-Q Bedford, MA, USA).

Les plasmas de rat (héparinés) nous été fournis par le Pr Isabelle Lartaud (Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire Faculté de Pharmacie de Nancy).

Les analyses sont effectuées à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance (HPLC) constituée d'une pompe de type Merck HITACHI, équipée d'une boucle d'injection de 20 μ L, d'une colonne chromatographique de type RP₁₈ (125 x 4 mm, 100 Å, 3 μ m) maintenue à 25°C par un four (T-6300 column thermostat, Merck).

La méthode utilisée est basée sur celle décrite par Hua et coll. [7], La phase mobile est un mélange ternaire constitué de tampon acétate (pH 2,0 ; 50 mM), d'acétonitrile (30%) et de méthanol (65 : 30 : 5; v : v : v) à un débit de 1.0 mL/min. La détection est réalisée entre 200-350 nm, quantification à 256 nm avec un détecteur UV à barrette de diodes (DAD). L'acquisition des données est réalisée à l'aide d'un ordinateur muni d'un logiciel de traitement des données de type (D-700 Multi-HSM_Manager).

III.6.2.2. Développement de la Méthode

Plusieurs techniques ont été développées pour l'identification et la quantification de l'acide nalidixique **NAL** dans des fluides biologiques et dans des préparations pharmaceutiques. La majorité des méthodes analytiques publiées sont basées sur la (CLHP) [7-12] en détection UV ou couplée à la spectrométrie de masse [13,14,15].

Le premier objet de cette étude a été de trouver des conditions d'élution, nous permettant d'identifier et de quantifier l'acide nalidixique dans un système CLHP à polarité de phase inversée. La composition de la phase mobile la mieux adaptée, à la fois aux prodrogues ammoniums (pka proche de 10) et à l'acide nalidixique a été le mélange ternaire suivant : tampon acétate d'ammonium (50 mM) ajusté à pH 2.0 par l'acide orthophosphorique / CH₃CN / MeOH 65 / 30 / 5; V/V/V [13,14].

❖ Les premiers essais nous ont permis d'identifier l'acide nalidixique à partir de deux échantillons témoins dilués dans la phase mobile (C1 = 220 µg/mL et C2 = 11 µg/mL).

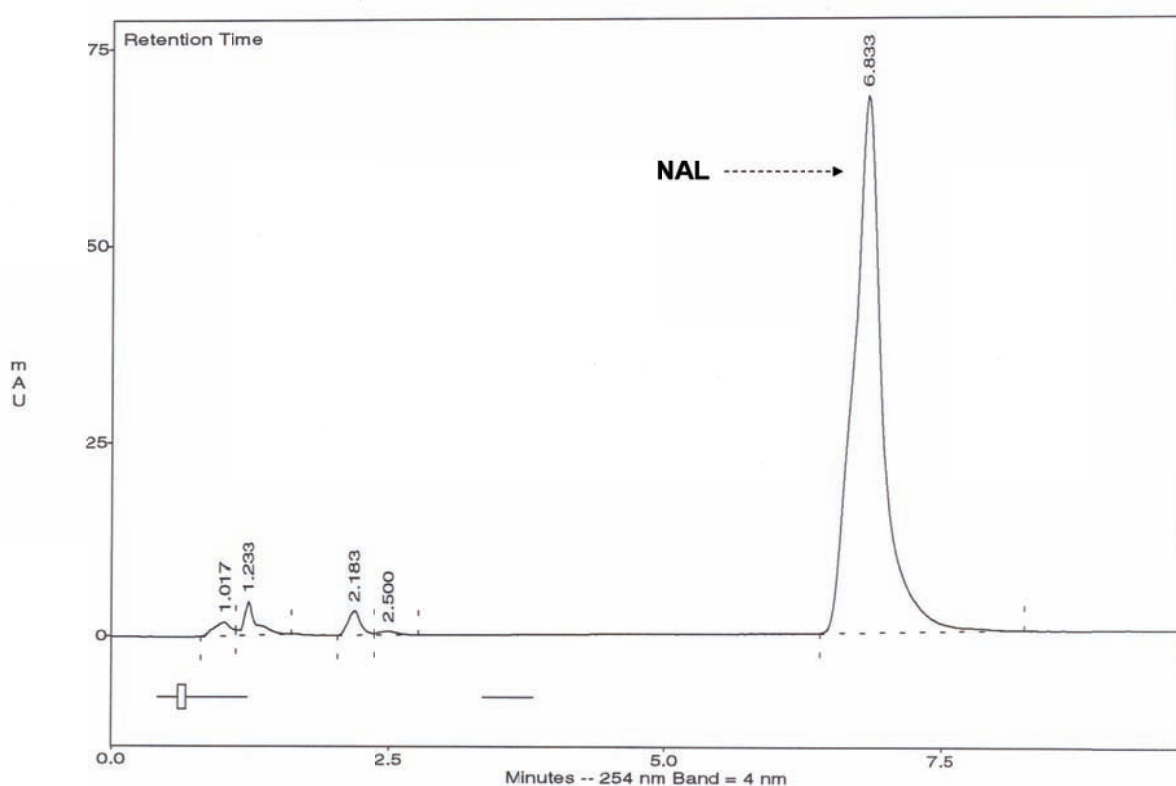


Fig. 26 : Chromatogramme ($\lambda = 254 \text{ nm}$) obtenu pour l'acide nalidixique (**NAL**) dans la phase mobile (11 µg/mL).

Après injection des échantillons dans le système d'analyse, nous avons obtenu des chromatogrammes identiques, dans lesquels nous observons la présence bien distincte d'un pic avec un temps de rétention à environ 6.83 minutes (Fig. 26). Mais l'identification certaine du pic comme étant celui de l'acide nalidixique n'a pu se faire que grâce à un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) entre 200 – 300 nm, couplé au système chromatographique.

Nous avons également préparé une solution 1 mg/mL de prodrogue mono-nalidixate **58** dans la phase mobile. L'injection est réalisée après dilution au 1/5 dans le même système que précédemment.

Le chromatogramme obtenu montre un profil *quasi* propre (peu de pics interférents) où se distingue très majoritairement un pic à 1.16 mn. Le DAD a permis de l'identifier comme étant le pic du prodrogue mono-nalidixate **58**. Le pic de l'analogue mono-alcool **65** est lui aussi identifié grâce à son spectre UV à Tr = 0.98 mn dans le chromatogramme de la figure 28.

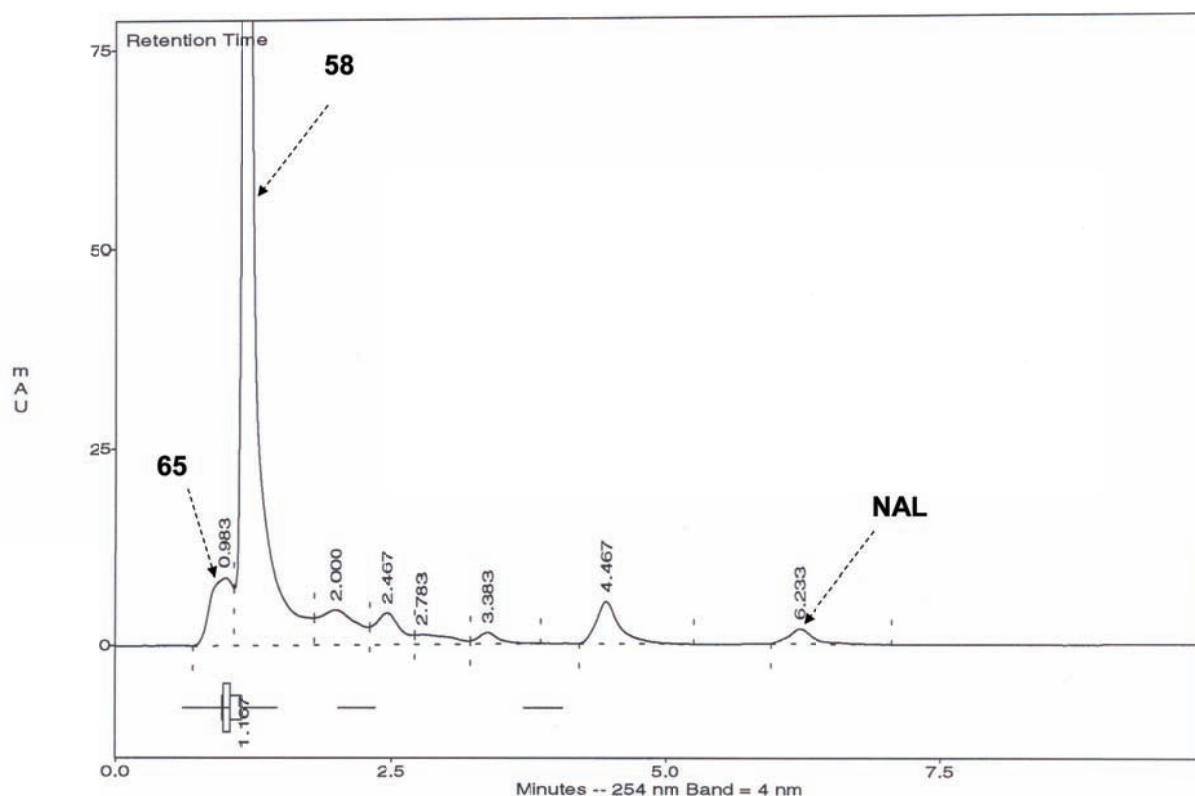


Fig. 27 : Chromatogramme ($\lambda = 254$ nm) du mono-nalidixate **58** avant hydrolyse.

NB : la qualité du profil chromatographique du prodrogue **58** nous apporte une information supplémentaire quant à la qualité de nos produits, on constate par exemple, dans le cas du composé **58** la présence en minima d'acide nalidixique résiduel. La qualité de ce spectre, donc du composé **58**, est primordiale pour les études microbiologiques ultérieures.

❖ Pour réaliser les premiers essais de récupération de l'acide nalidixique dans une matrice biologique, nous avons préparé et comparé les chromatogrammes de deux témoins (témoin acide nalidixique **A** et témoin plasma de rat **B**) (Fig. 28).

Cependant, la présence des protéines dans le plasma de rat a nécessité un traitement particulier de l'échantillon plasmatique. Il existe plusieurs possibilités pour le traitement préalable des échantillons biologiques. A l'extraction (liquide-liquide, liquide-solide ou SPE) nous avons préféré une méthode plus simple de précipitation via un agent déféquant (l'acétonitrile). Le procédé de défécation vise à précipiter les protéines avant injection de l'échantillon dans le système chromatographique. Il existe différents types d'agents précipitants, les principaux sont des acides tels que trichloroacétique par exemple, ou des solvants organiques, tel que l'acétonitrile qui a la particularité d'être compatible avec les systèmes CLHP. Voici le protocole de traitement utilisé pour la précipitation des protéines :

A 50 μ L de plasma, surchargé ou non, sont additionnés 50 μ L d'acétonitrile, l'ensemble est vortexé (30 s) puis centrifugé (14000 tr/min, 5 minutes à température ambiante). On récupère 50 μ L de surnageant qui sont ajoutés à 200 μ L de phase mobile puis injectés dans le système CLHP.

Nous avons obtenu les chromatogrammes **A** et **B**. On constate l'absence de perturbations entre le pic d'acide nalidixique et ceux des analytes interférents présents dans le plasma après traitement (entre 5 et 7 mn).

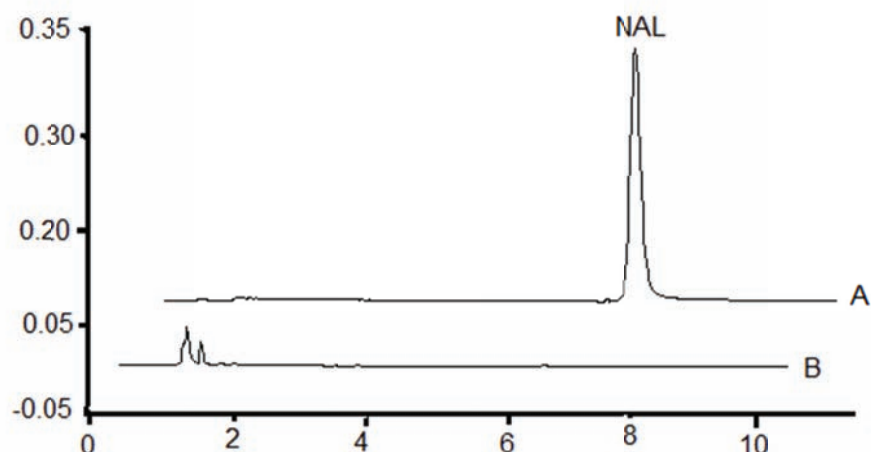


Fig. 28 : Chromatogrammes du témoin acide nalidixique (**A**) et du blanc plasmatique (**B**) dans la phase mobile.

III.6.3. Validation de la méthode

La validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. La validation a été faite suivant le respect des critères définis par l'ICH Guidelines [16] sur a) le témoin acide nalidixique; b) sur l'échantillon plasmatique.

Pour chaque critère, après une rapide définition et énoncé du protocole d'application, nous donnerons les résultats obtenus.

- **La spécificité** : Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de l'analyte même en présence d'autres composants

- ❖ **Application** : nous avons comparé les chromatogrammes du témoin acide nalidixique (**A**) et celui du témoin «blanc» plasmatique (**B**). (Fig. 28).

- ❖ **Résultats** : le résultat est positif car on n'observe pas d'interférence entre le pic de l'acide nalidixique (identifiable par le détecteur à barrette diodes à 6.16 mn) et les analytes potentiels présents dans le plasma (entre 1 et 2 mn). Donc la méthode est bien spécifique à l'identification et la quantification de l'acide nalidixique.

- **La linéarité** : la linéarité des gammes d'étalonnages est la vérification de la proportionnalité de la réponse en fonction de la concentration en analyte à doser.

❖ **Application** : nous avons d'abord défini le domaine d'étude où linéarité, exactitude et précision doivent être respectées. 5 points de gamme ont été ainsi définis :

- 2 points de faible concentration (1 et 5 µg/mL).
- 1 point central 10 µg/mL.
- 2 points de forte concentration (16 et 20 µg/mL)

20 µg/mL représentent la concentration d'acide nalidixique totale libérée pour 100% d'hydrolyse (calculée grâce à la concentration du prodrogue correspondant).

La linéarité a d'abord été réalisée pour le témoin acide nalidixique (T1) dans la phase mobile et pour la prodrogue **58** dans le plasma de rat (T2). Les deux droites sont par la suite comparées statistiquement. Nous observons deux droites similaires donc il n'y a pas d'effet de matrice.

❖ **Evaluation statistique de la linéarité** (tableau 3).

Pour chaque témoin (T1 et T2), il a été réalisé 5 concentrations injectées 3 fois ($n = 3$) soit 15 points.

- **Test de COCHRAN** : c'est la première étape, elle consiste à vérifier l'homogénéité des variances entre groupes.

La vérification de ce test se fait en 5 étapes :

- **Analyse de variances Anova** : c'est un test de linéarité qui permet de vérifier la bonne adaptation des mesures à un modèle (existence d'une pente et validité de la droite).

La procédure d'analyse est la suivante : La détermination de la pentes et l'ordonnées à l'origine s'est faite par le test de student avec $\alpha = 5\%$ $t = 2,16$.

En partant de l'équation $Y = ax + b$, le test de Student nous permet de déterminer des intervalles de confiances

Selon les résultats du test de Student, on constate que les pentes statistiques du témoin acide nalidixique (T1) et le témoin acide nalidixique sur plasma (T2) sont proches (61224 pour T1 et 57534 pour T2) (Tableau 3), donc on confirme l'absence d'un effet de matrice, ce qui justifie la possibilité de comparer quantitativement l'acide nalidixique dans T1 et T2.

			Modèle linéaire	
			T1	T2
		valeurs		
pende			61224	57534
Écart-type sur pente			594	693
Intercept			-9495	-10105
Écart-type sur intercept			7518	8775
Coefficient de Corrélation			0,999	0,999
Ordonnée à l'origine	t-value 0.05	2,16	1,26	1,15
F de linéarité (F _l)	F-value 0.01	4,67	10620,20	6884,89
F de non linéarité (F _{nl})	F-value 0.05	3,71	2,20	0,17

Tableau 3 : Evaluation statistiques de la linéarité des témoins T1 et T2 entre 1 - 20 $\mu\text{g/mL}$.

- **La précision** = répétabilité + précision intermédiaire

❖ **La répétabilité** exprime la capacité de la méthode à rendre un résultat unique lorsque des mesures répétées sont réalisées dans les mêmes conditions. Dans notre cas, la répétabilité a été établie pour chaque témoin (T1 et T2). Nous avons réalisé 18 déterminations pour 3 concentrations (1, 10 et 20 $\mu\text{g/mL}$) réalisées 6 fois ($n = 6$) chaque jour durant trois jours).

❖ **Résultats** : les résultats présentés dans le tableau 4 représentent les variabilités par jours de validation. Ils montrent une répétabilité acceptable pour la méthode avec le CV (le coefficient de variation) $< 8\%$. Ce qui permet d'envisager l'utilisation d'une telle méthode à des fins de dosage précis.

❖ **La précision intermédiaire** rend compte de la stabilité de la méthode analytique sur une période de temps plus longue, trois jours en général. Le tableau 6 rend également compte de l'étude de la précision intermédiaire qui s'est faite en 3 jours. Le résultat est satisfaisant car le coefficient de variation intra et inter-jour ne dépassent pas 8%, ce qui traduit la bonne reproductibilité de cette méthode.

- **L'exactitude** : elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme conventionnellement vraie et la valeur trouvée (= justesse). Elle doit être établie sur tout le domaine de linéarité.

❖ **Application** : L'exactitude de la méthode a été évaluée chaque jour (n = 3 jours), par l'injection de 5 concentrations d'échantillons pour chaque série. Les valeurs sont acceptées jusqu'à un coefficient de variation ≤ 15 %. Ce qui est au regard du tableau 4, largement le cas.

			SS	SP	
			Précision (RSD %)	Précision (RSD %)	Exactitude %
1^{er} jour		LoQC	3,12	7,37	100.28 $\pm$ 6.52
		MeQC	1,99	1,66	96.97 $\pm$ 1.59
		HiQC	2,94	3,04	93.72 $\pm$ 2.83
2^{ème} jour		LoQC	3,18	6,38	94.43 $\pm$ 5.27
		MeQC	2,01	3,61	86.52 $\pm$ 3.08
		HiQC	0,93	4,83	92.30 $\pm$ 4.43
3^{ème} jour		LoQC	3,63	7,50	101.11 $\pm$ 6.70
		MeQC	2,01	2,33	96.24 $\pm$ 2.21
		HiQC	1,81	5,22	97.91 $\pm$ 5.08
Précision intermédiaire (RSD %)					
		LoQC	4,04	7,57	
		MeQC	2,44	6,17	
		HiQC	3,42	4,76	

Tableau 4 : Précision obtenue pour la validation de la méthode à partir des témoins acide nalidixique et acide nalidixique sur plasma.

- **Limite de détection et de quantification** : elles se mesurent à partir du rapport signal sur bruit. La mesure se fait en tenant compte d'un blanc et d'un échantillon : LOD pour S/B = 3, LOQ pour S/B = 10.

❖ LOD : la limite de de détection est définie comme la plus petite quantité de substance présent dans l'échantillon et pouvant être détectée avec un niveau de confiance donné mais non quantifiée comme valeur exacte.

❖ LOQ : la limite de quantification est la plus petite concentration d'analyte pouvant être évaluée avec un coefficient de variation donné.

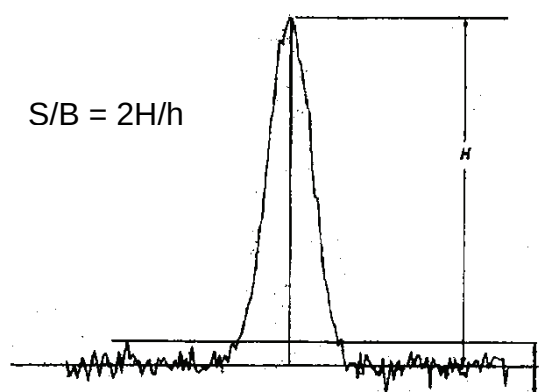


Fig. 29 : Chromatogramme représentant le rapport signal sur bruit.

- **Applicati on :** dans notre cas nous avons le blanc plasma et l'échantillon acide nalidixique sur plasma. Les valeurs de LOD et LOQ déterminé sont 0.15 et 0.42 µg/mL respectivement.

III.6.3.1. Conclusion sur la validation de la méthode

Cette méthode simple et rapide a permis de réaliser à la fois l'identification et la quantification de l'acide nalidixique dans divers matrices de liquides biologiques. La méthode a été validée selon les critères définis par l'ICH [16] pour sa spécificité, sa précision, son exactitude et sa linéarité.

Cette étude qui a été menée par CLHP mode phase inverse couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (DAD), montre que notre méthode est fiable et donne des résultats reproductibles. Ce qui nous a permis d'envisager la

détermination du pourcentage de libération de l'acide nalidixique à partir de l'hydrolyse des prodrogues mono- **58** et bis-nalidixate **59** dans le plasma de rat.

III.6.4. Evaluation de la qualité des prodrogues synthétisés par CLHP

Nous avons pu évaluer, par la méthode précédemment développée, la qualité de nos matières premières synthétisées (mono- et bis-nalidixate **58** et **59**). En effet, l'analyse de nos échantillons à T_0 montre la présence en très faible proportion (1 à 2 %) d'acide nalidixique qui ne serait pas lié chimiquement à la molécule prodrogue (résiduel). Ce qui démontre la bonne qualité de nos matières premières, résultat d'une purification efficace (Fig. 27).

De plus, les chromatogrammes des différents lots étant très similaires, nous avons la confirmation que les synthèses sont reproductibles (essai sur trois lots de synthèse différents), ce qui est un atout pour assurer la fourniture de la même qualité en matière première indispensable à nos études (chimie analytique et microbiologique par la suite).

III.6.5. Evaluation du concept prodrogue

L'évaluation du concept prodrogue a été réalisée sur les composés calixaréniques hydrosolubles porteurs *via* une liaison ester labile d'un à deux acides nalidixique (**58** et **59**). Il s'agit dans cette étude, de montrer que les prodrogues **58** et **59**, placées dans certaines conditions de pH ou en milieu biologique libèrent l'acide nalidixique.

III.6.5.1. Influence du pH

Il s'agit d'étudier l'influence du pH sur l'hydrolyse de nos prodrogues. Nous avons donc réalisé des études d'hydrolyses à pH acide, neutre (7), alcalin (10 & 13).

❖ Hydrolyse en condition de pH acide

Nous avons par deux études démontré la stabilité des prodrogues mono- et bis-nalidixate (**58** et **59**).

La première porte sur les conditions de réaction visant à l'obtention des prodrogues hydrosolubles (**58** et **59**).

En effet, la réaction se fait toujours en milieu acide (CH_2Cl_2 / TFA 70 : 30 (v : v), 24 heures) sans que nous ayons rencontré des problèmes d'hydrolyse de la liaison ester. Les analyses de RMN ^1H , ^{13}C , Analyse Élémentaire et Spectrométrie de Masse confirment l'absence d'hydrolyse et donc la stabilité des prodrogues **58** et **59**.

La deuxième étude concerne un des tous premiers essais faits sur la cinétique de dégradation du mono-nalidixate **58** en condition acide trifluoroacétique (1,0 M). L'étude CLHP démontre la stabilité du pic correspondant au composé **58** après environ 30 jours.

❖ Hydrolyse en condition de pH neutre

L'hydrolyse du prodrogue mono-nalidixate **58** a été réalisée dans un tampon pH neutre (7,0). La cinétique d'hydrolyse qui a été établie montre qu'après (48 heures) le taux de libération de l'acide nalidixique est < 10% (Fig. 30). Nous avons déduit que le pH 7.0 ne constitue pas un facteur favorable à l'hydrolyse du prodrogues **58**.

❖ Hydrolyse en conditions alcalines

Les études d'hydrolyse des prodrogues **58** et **59**, ont également été menées dans les conditions alcalines (pH = 10,0 et 13,0) (Fig. 30). Les échantillons de prodrogues **58** et **59** ont été préparés dans chacune ces conditions et injectés au système chromatographique après dilution.

Nous observons :

- Une libération de l'acide nalidixique à partir du prodrogue **58**, dans les conditions alcalines. La libération est plus rapide (le plateau de libération est atteint au bout de 24 heures) et totale (100% d'hydrolyse) pour les conditions alcalines extrêmes (pH 13). Alors qu'à pH = 10,0, la libération est moins rapide et le plateau

est atteint au bout de 150 heures. Le taux de libération de l'acide ne dépasse pas 60%.

- Une libération de l'acide nalidixique de façon modérée à partir du prodrogue **59**. A peine 40% (pH = 10) et 80% (pH = 13) d'acide nalidixique est libérée en 150 heures.

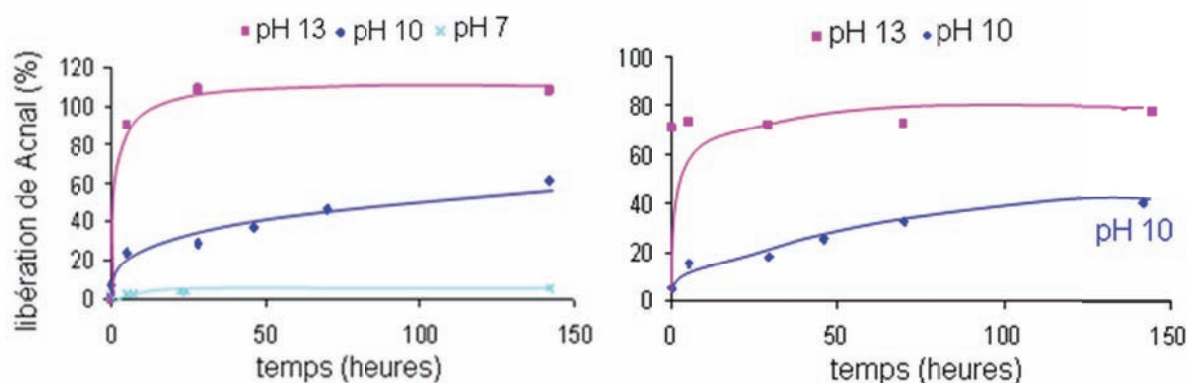


Fig. 30 : Influence du pH sur la cinétique du mono- **58** et bis-nalidixate **59**.

❖ En conclusion, nous montrons par ces différentes expériences que les composés mono-nalidixate **58** et bis-nalidixate **59** sont stables ou *quasi* stable dans des conditions de pH acide ou neutre. En revanche, pour des conditions de pH alcalines, les composés **58** et **59** s'hydrolysent en libérant l'acide nalidixique, validant ainsi le concept de prodrogue sur le plan chimique.

III.6.5.2. Evaluation du concept en matrices biologiques

Il s'agit maintenant d'évaluer l'hydrolyse et la libération d'acide nalidixique dans des milieux de composition plus complexe exemple des matrice biologiques : l'albumine de sérum bovin (ABS), Sérum de veau fœtal (SVF) et le plasma de rat. Les résultats ce sont avérés concluants, particulièrement dans le plasma de rat.

III.6.5.2.1. Hydrolyse du mono- et du bis-nalidixate (**58** et **59**) dans le plasma de rat

Nous avons évalué la cinétique d'hydrolyse des composés **58** et **59** dans le plasma de rat, avec l'espoir d'une libération effective de la quinolone (acide nalidixique), et que cette dernière soit d'abord identifiée puis quantifiée afin d'établir une cinétique de libération, et présumer d'une action antibactérienne *in vitro*.

Les conditions chromatographiques utilisées pour cette étude sont celles qui ont été optimisées pour l'identification et la quantification de l'acide nalidixique dans une matrice biologique.

Ainsi, pour chaque condition, une prise d'essai de 1,0 mg de prodrogue (**58** ou **59**) est introduite dans 500 µL de plasma (2,0 mg / mL) dans un tube Eppendorf. Après vortexation (30 s) et premier prélèvement (T0), les eppendorfs sont maintenus dans un bain à 37°C. Dans le même temps, chaque milieu est également évalué sans prodrogue (blanc). Tous les échantillons avant injection dans le système chromatographique subissent le traitement de défécation des protéines que nous avons présenté précédemment.

Pour chaque temps de la cinétique, chaque milieu est traité par la procédure suivante (le reste du milieu est remplacé à 37°C) :

- 50 µL de plasma + 50 µL d'acétonitrile
- Vortex 30 s
- Centrifugation 14000 tr/min, 5 minutes à température ambiante
- 50 µL de surnageant + 200 µL de phase mobile
- Vortex 30 s
- Injection

❖ Résultats :

La figure 34 montre simultanément La libération de l'acide nalidixique (**NAL**) et la disparition du composé **58** (chromatogramme **B** et **C**). Le composé **58** et ses deux

co-produits d'hydrolyse (**65** et **NAL**) ont tous été identifiés à l'aide du détecteur UV ($\lambda = 254$ nm) à barrette de diodes (DAD) sur la base de leurs spectres UV respectifs (Fig. 31).

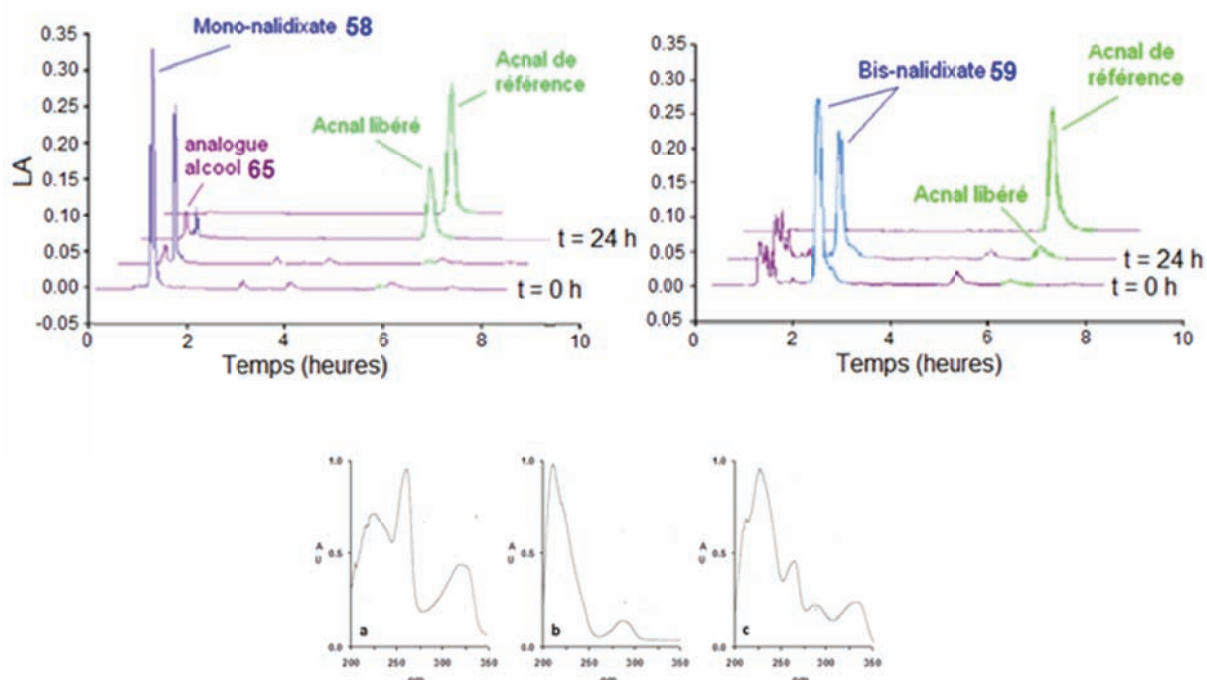


Fig. 31 : Chromatogrammes ($\lambda = 254$ nm) obtenus pour les prodrogues **58** **59** dans le plasma de rat (à $t = 0$ et $t = 24$ h) et les spectres UV de **NAL** (a), **65** (b) et le composé **58** (c).

Sur la même figure 32, nous présentons les chromatogrammes correspondant à la cinétique d'hydrolyse du bis-nalidixate **59**, toujours dans le plasma de rat. Cependant, contrairement aux observations faites sur l'hydrolyse du mono-nalidixate **58**, on observe particulièrement un faible pourcentage d'hydrolyse du prodrogue bis-nalidixate **59**, par conséquent une faible libération de l'acide nalidixique.

A partir de ces chromatogrammes (Fig. 31) nous avons établi les cinétiques de libération de l'acide nalidixique (Fig. 32) en fonction du temps (0 à 200 h) des prodrogues mono- et bis-nalidixate **58** et **59**.

Comme l'illustre la figure 33, on observe une libération de l'acide nalidixique de manière rapide et quantitative à partir du prodrogue **58**, avec un taux de libération proche de 90%.

Dans le cas du bis-nalidixate **59**, le maximum d'acide nalidixique libéré ne dépasse pas les 10%. Ce composé présente donc un problème d'hydrolyse. Nous avons envisagé plusieurs hypothèses, dont celle pour laquelle la présence d'un second groupement propyl nalidixate sur **59** créerait une gêne stérique qui pourrait empêcher l'accessibilité aux sites d'hydrolyse. Dans une autre approche, la présence du groupement hydroxyle en position alternée par rapport au groupe propyl nalidixate sur **58**, serait indispensable pour activer son hydrolyse.

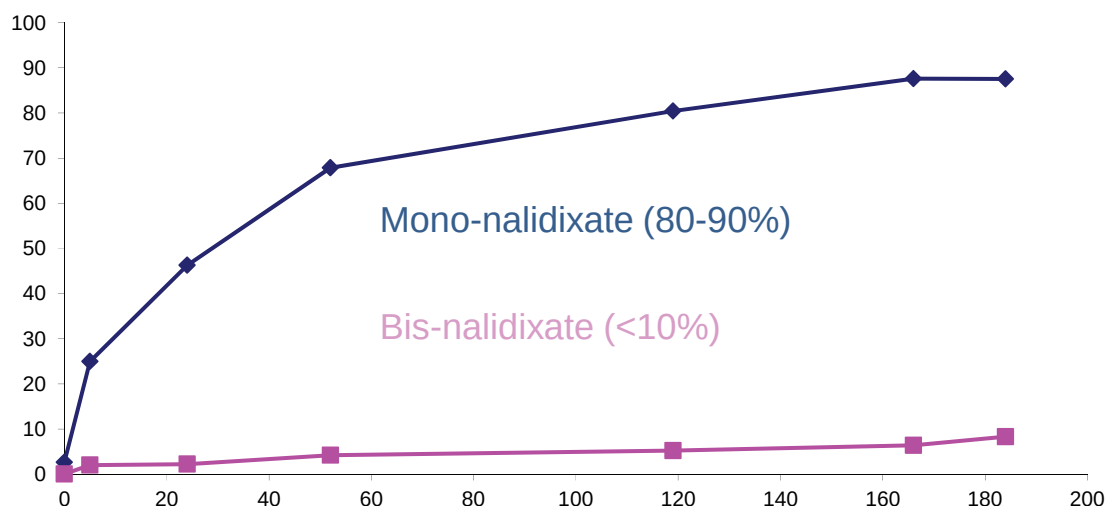


Fig.32 : Cinétique de libération de l'acide nalidixique à 37°C dans le plasma de rat pour **58** et **59**.

La dernière des études que nous avons réalisées en CLHP et dont les résultats sont directement liés aux tests microbiologiques a été d'évaluer l'hydrolyse des prodrogues **58** et **59** dans le milieu Mueller-Hinton.

Le bouillon de Mueller Hinton est utilisé comme milieu non sélectif pour la culture de très nombreux microorganismes de diverses origines, ainsi que pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices par la méthode en dilution.

Notre crainte était que le milieu Mueller-Hinton génère l'hydrolyse des prodrogues **58** et **59** lors des évaluations biologiques *in vitro*, ce qui contrarierait fortement les résultats de ces dernières. L'étude d'hydrolyse a été faite dans les mêmes conditions que les études précédentes.

❖ **Résultats** : nous n'avons pas observé de libération de l'acide nalidixique au bout de 24 heures (temps nécessaire pour l'évaluation des CMI), et 48 heures de contacts avec les prodrogues à 37°C. Nous avons donc confirmé par cette étude la neutralité du milieu Mueller-Hinton.

III.6.5.3. Conclusion générale.

Ce travail présente dans une première étape la mise au point d'une nouvelle série de prodrogues à base calixaréniques porteurs d'un ou deux principes actifs de la famille des quinolones (ici l'acide nalidixique) et solubles dans l'eau grâce à l'incorporation de fonctions ioniques de types ammoniums. Nous avons ensuite étudié les propriétés physicochimiques de ces prodrogues, notamment par RMN, spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse...etc.

Dans la seconde étape, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la qualité des prodrogues synthétisés par CLHP, dans divers milieux (tampons, ..) et dans le plasma de rat. Ceci a nécessité le développement et la validation d'une méthode permettant la détermination et la quantification de l'acide nalidixique libéré. L'évaluation des propriétés antibactériennes de nos prodrogues est décrite dans le chapitre V.

Nous avons en parallèle amorcé le développement d'une autre famille de prodrogues. Dans cette dernière le caractère hydrosoluble est apporté par des fonctions guanidiniums. Les premiers résultats (synthèse, validation du concept prodrogues et études microbiologiques) sont très intéressants mais ce travail se poursuit actuellement au sein du laboratoire.

Références bibliographiques

- 1) A. Ben Salem, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Synthesis and characterisation of a new podand based on a calixarene and a β -lactam". *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7033-36.
- 2) A. Ben Salem, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Towards a new family of calixarene-based podands incorporating quinolone arms. Example of nalidixic acid". *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6769-71.
- 3) E. Pawelczyk, R. Wachowiak, Z. Plotkowiak; "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**.
- 4) C.D Gutsche, K.C. Nam; "Calixarene 22. Synthesis, properties and metal complexation of amino calixarenes"; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6153.
- 5) M. Mourer, R.E Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Fonctionnalisation et Gain d'Activité: Le cas de l'Antibactérien tétra-*para*-guanidinoéthyl-calix[4]aréne". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 296-63.
- 6) E. Pawelczyk, R. Wachowiak, Z. Plotkowiak; "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**.
- 7) T. Perenyi ; "Human biotransformation of nalidixic acid. I. Chemical methods"; *Acta Pharma. Hung.* **1975**, 45, 196.
- 8) T. Perenyi ; "Human biotransformation of nalidixic acid. I. Chemical methods"; *Acta Pharma. Hung.* **1975**, 45, 196.
- 9) A.P. Argekar, S.J. Shah ; *Indian Drugs*. **1997**, 34, 520.
- 10) T.J. Wenzel, K. Zomlefer, S.B. Rapkin, R.H. Keith; *J. Liquid Chromatogr.* **1995** 18, 1473.
- 11) N. Ichikawa, K. Naora, M. Hayashibara, K. Iwamoto ; *J. Pharma. Biomed. Anal.* **1993**, 11, 993.
- 12) V.P. Halkar, S.H. Rane, N.P. Bhandari; *Indian Drugs* **1997**, 34, 302.

- 13)** D. Doerge, S. Bajic; "Multiresidue determination of quinolone antibiotics using liquid chromatography coupled to atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry"; *Mass Spectrom. Rapid Commun.* **1995**, 9, 1012-1016.
- 14)** F. Belal, A. Al-Majed, A. M. Al-Obaid; "Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials"; *Talanta*. **1999**, 50 (4), 765-786.
- 15)** G. V Vyncht, A. János, G. Bordin, B. Toussaint, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, A. R. Rodriguez; "Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry"; *Journal of Chromatography A*. **2002**, 952, (1-2), 121-129.
- 16)** ICH/CPMP **1996**. Guidelines Q2B, Validation of analytical procedures-Methodology.

Chapitre IV :

**EVOLUTION DU CONCEPT VERS DES
POLY-GUANIDINIUMS ETOILES**

IV.1. Introduction

Les résultats biologiques obtenus avec le composé **13** (**CX1**; tétra- *para*-(guanidinoéthyl)calix[4]arène) ont validé partiellement le concept ayant mené à sa synthèse, lié à l'importance d'une organisation spatiale de fonctionnalités cationiques, non actives prises indépendamment, dans la genèse d'une activité antibactérienne [1]. Dans les chapitres précédents, nous avons apporté un certain nombre de modifications structurales à ce composé, dans l'attente de mieux cerner les relations structure-activité.

Remplacer l'organisateur spatial calixarénique par un autre support de forme et rigidité variable constitue une démarche naturelle dans l'optique de valider ce concept. L'élargissement de ce concept à d'autres plate-formes organisatrices est bien entendu naturellement envisageable, pour autant que la chimie, comme nous l'avons vu multi-étapes, soit accessible, et que les édifices moléculaires finaux conservent une masse molaire « raisonnable » ainsi qu'une solubilité en milieu aqueux suffisante pour les évaluations biologiques.

Parmi les différents systèmes abordés au laboratoire, une approche concerne des dérivés « linéaires » bifonctionnels aux terminaisons de chaînes alkyles de longueur variable [2], et une autre, objet du présent travail, une série de composés oligofonctionnels utilisant un cœur organisateur aromatique de type benzène.

Nous avons attribué à cette nouvelle famille le nom de poly-guanidiniums étoilés.

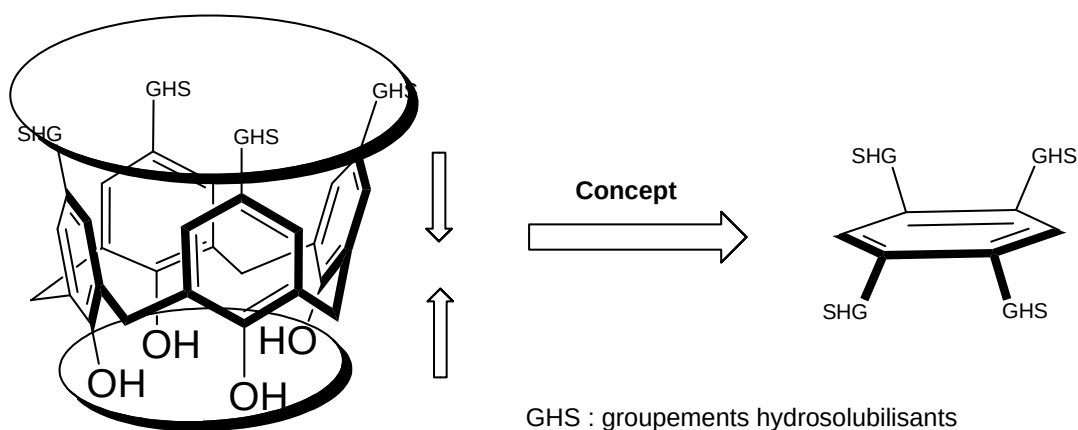


Fig. 1 : Evolution du concept du calix[4]arène vers un benzène.

Dans ce cadre, nous passons d'une organisation tridimensionnelle, contrôlée et contrainte, pilotée par la structure calix[4]arénique où toutes les fonctions greffées sont orientées dans une même direction, à une autre organisation, bidimensionnelle, contrôlée et contrainte par le cycle plan benzénique.

En 2005, C. Schmuck et M. Schwegmann [3] développent des structures tricationique guanidinocarbonyl pyrrol (Fig. 2) construit autour d'un organisateur de type benzenique. Ces nouveaux récepteurs cationiques forment des complexes très stables avec des substrats tricarboxylates avec des fortes constantes d'associations dans des solvants aqueux.

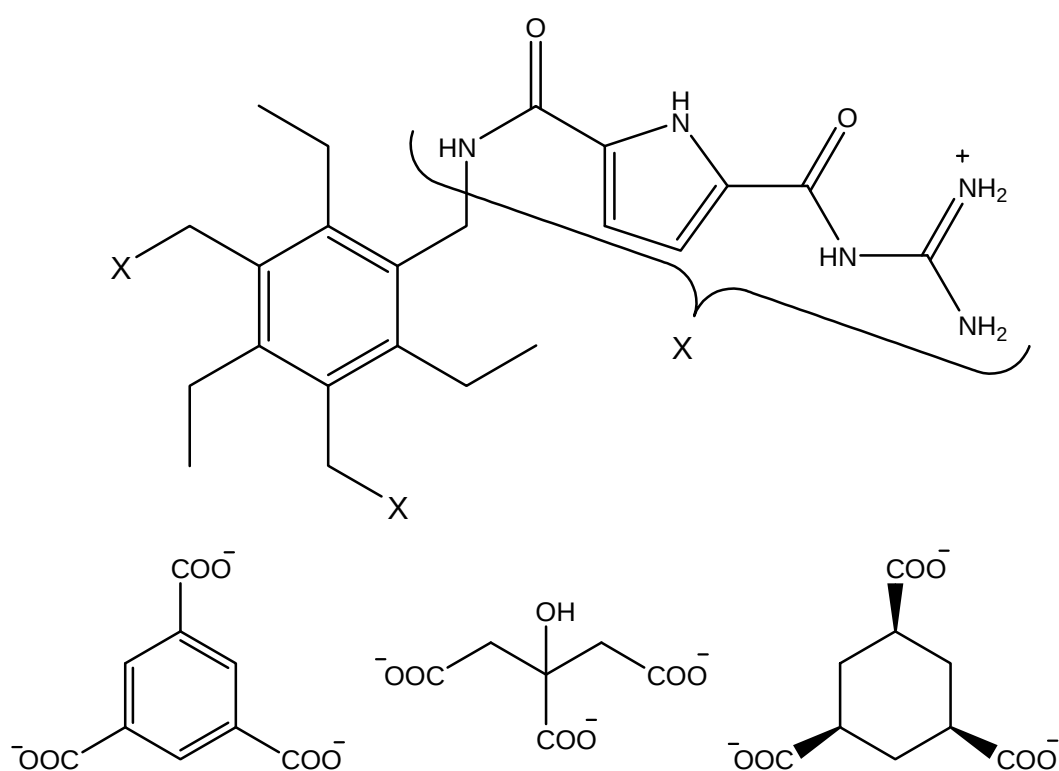
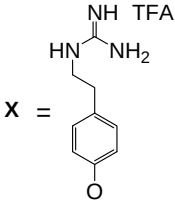


Fig. 2 : Exemple de récepteur pyrrole tricationique de guanidinocarbonyl et les trois substrats tricarboxylates [3].

Nous avons développé les synthèses de six nouveaux composés finaux (Fig. 3), sur les 12 autorisés (figure 3), intégrant un nombre variable de fonctionnalités terminales éthylguanidinium. Nous avons adapté les voies réactionnelles développées avec les composés calixaréniques précédemment décrits.



Pour rester le plus proche possible du modèle calixarène, nous avons choisi comme premier modèle de guanidinium le para-guanidinoéthylphénol **48** (Chap. II, 6) que nous avons cherché à organiser autour du benzène. Notre stratégie générale a consisté à greffer le motif (Boc)aminoéthylphénol sur les dérivés (bromométhyl)_n benzène, déprotéger les fonctions amines, puis construire les fonctions guanidines *via* la réaction avec la di(Boc)triflylguanidine (méthode n° 2) ou par une des deux autres méthodes précédemment décrites.

IV.2. Synthèse du trifluoroacétate d' α -[*para*-(guanidinoéthyl)-phénoxy] toluène 71

188

Le couplage de la boc-tyramine **48** avec le bromométhylbenzène **a** est effectué dans l'acétonitrile à reflux, sous argon, en présence d'un équivalent de K_2CO_3 , (Fig. 4). Après une nuit de réaction, l' α -[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy]toluène **68** est isolé du brut de synthèse par chromatographie, avec un rendement élevé de 90%.

Le composé **68** est déprotégé dans les conditions classiques, CH_2Cl_2 / TFA 85 : 15, intégrant un précautionneux travail d'élimination de l'excès de TFA. Le trifluoroacétate de l' α -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]toluène **69** est obtenu sous forme solide avec un rendement quasi quantitatif.

La création de la fonction guanidine a mis en jeu la méthode N°2 (mode opératoire a été décrit précédemment), impliquant le synthon di-boc-triflylguanidine **12**. Nous avons obtenu le produit α -[para-((di-Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]toluène **70** recherché (Fig. 4) avec un rendement de 85%.

Le produit final, le trifluoroacétate d' α -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]toluène **71** (Fig. 4) est obtenu par déprotection dans le mélange , CH_2Cl_2 / TFA 85 : 15, avec un rendement quantitatif (98%).

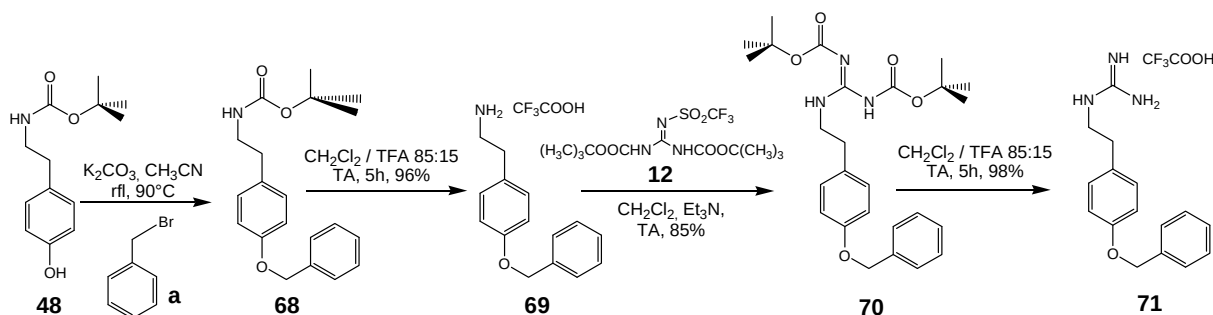


Fig. 4 : Stratégie d'obtention du trifluoroacétate d' α -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]toluène **71.**

IV.2.1. Analyse des composés **68**, **69**, **70** et **71**

Nous avons réalisé la totalité des analyses sur les 4 composés (voir partie expérimentale de ce manuscrit). La figure 5 représente une superposition interprétée des spectres RMN 1H des composés de cette première série .

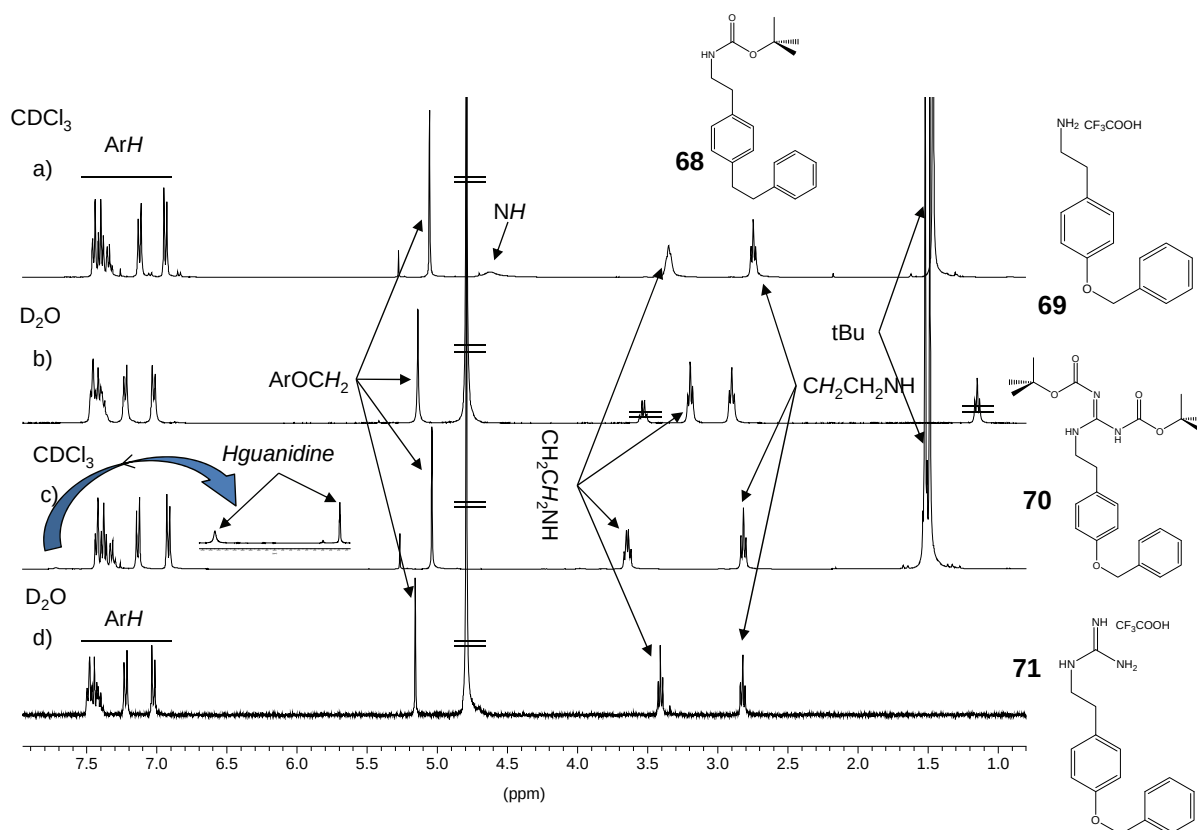


Fig. 5 : Spectre RMN¹H (400 MHz, TA) des composés a) **68** b) **69** c) **70** et d) **71**

L'analyse par RMN ¹³C confirme la structure attendue de ces dérivés ; plus particulièrement, pour le dérivé final **71**, nous vérifions la présence du signal de résonance du carbone du guanidinium à 157.34 ppm; le signal du trifluoroacétate n'est pas observable.

L'analyse élémentaire obtenue pour le composé **71** répond à la formule brute C₁₆H₁₉ON₃, CF₃COOH, 0.5 H₂O avec une masse molaire de 392,37 g.mol⁻¹.

L'analyse par spectrométrie de masse en électrospray mode positif du composé **71**, nous apporte un profil simple conforme à nos attentes. On observe la présence d'un massif attribué à l'ion moléculaire mono chargé avec perte de 1 CF₃COOH à 270.28 u.m.a.

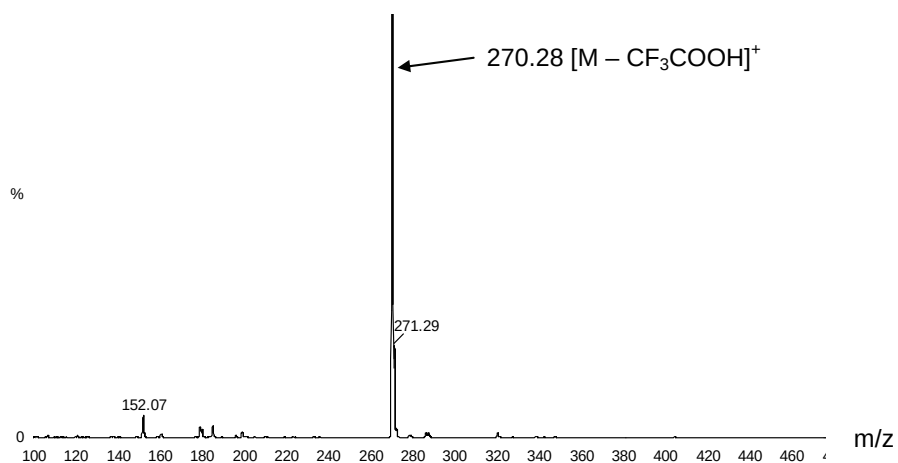


Fig. 6 : Spectre de masse en électrospray mode positif de 71.

IV.3. Synthèse des bis- $[\alpha,\alpha'$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes 75 et 79

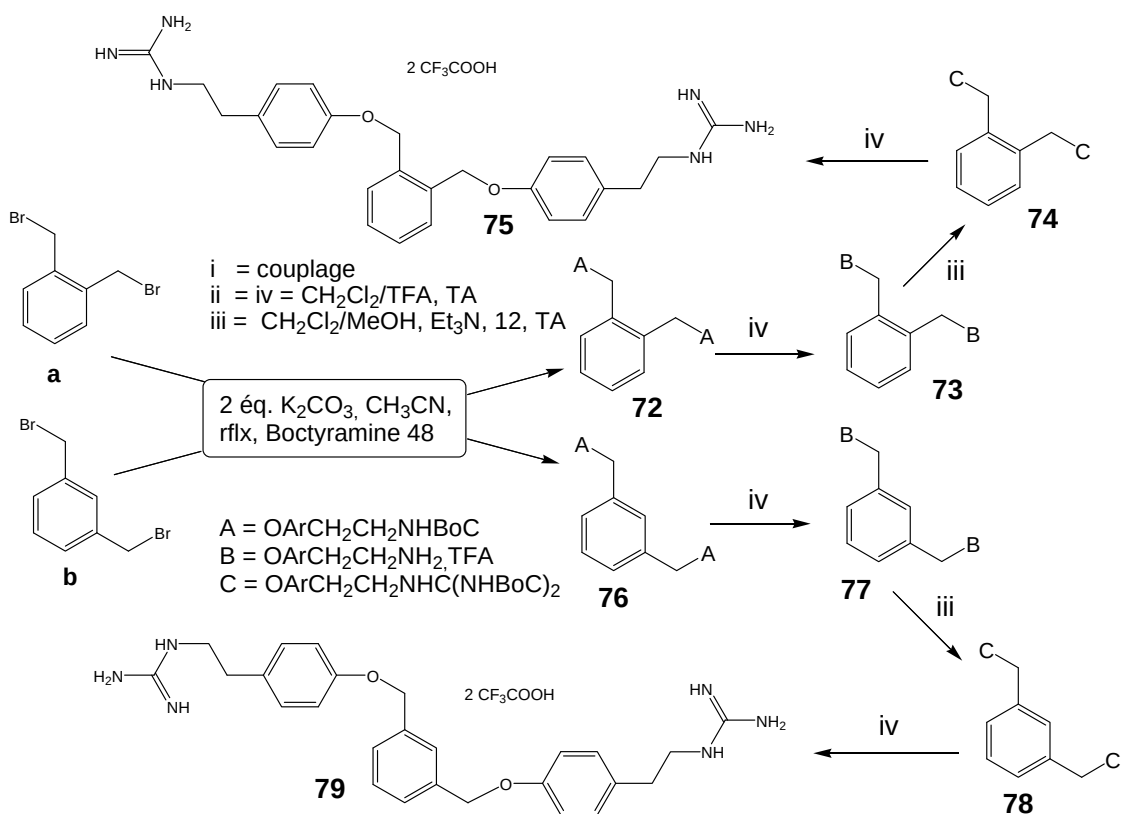


Fig. 7 : Stratégie de synthèse des bis- $[\alpha,\beta$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes 75 et 79.

IV.3.1. Synthèse des composés bis- $[\alpha,\alpha'$ -[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » **72** et « méta » **76**

Cette réaction de substitution nucléophile, réalisée dans les conditions classiques utilisées au laboratoire, a nécessité deux équivalents de K_2CO_3 , et deux équivalents de boc-tyramine **48** dans l'acétonitrile anhydre. Les dérivés bromés utilisés sont d'origine commerciale : l'ortho-[di-(bromométhyl)]-benzène (**b**) et le méta-[di-(bromométhyl)]-benzène (**c**). Après une nuit de réaction, les bruts réactionnels sont purifiés par chromatographie, avec des rendements de 60% pour le composé "ortho" (**72**) et 93% pour le "méta" (**76**).

Ces produits ont été totalement caractérisé (voir la partie expérimentale), nous présentons ci-dessous les analyses RMN 1H (400 MHz, TA) dans $CDCl_3$ des composés **72** et **76**.

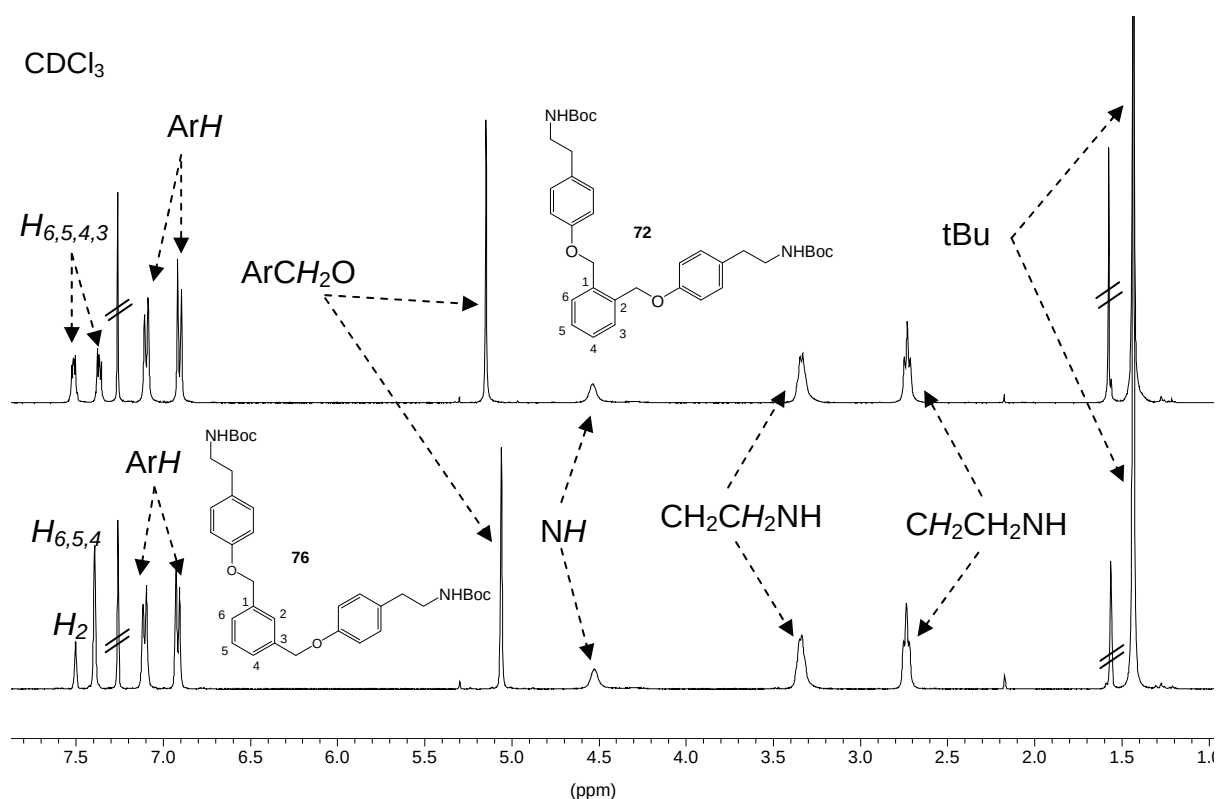


Fig. 8 : Spectre RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, TA) des composés ortho **72** et méta **76**.

IV.3.2. Synthèse des bis- $[\alpha,\alpha'$ -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » **74** et « méta » **75**

La déprotection des composés **72** et **76** s'est faite suivant le protocole usuel, dans le mélange CH_2Cl_2 / TFA 85 : 15, pour donner, après traitement, les trifluoroacétates d'ammoniums **73** et **77** avec un rendement quasi quantitatif.

L'analyse par RMN ^1H (Fig. 8) de ces deux ammoniums est conforme à nos attentes, à quelques impuretés près. On note la présence de traces de diéthyléther, dont l'élimination est parfois très difficile avec ce type de sels (lyophilisation nécessaire).

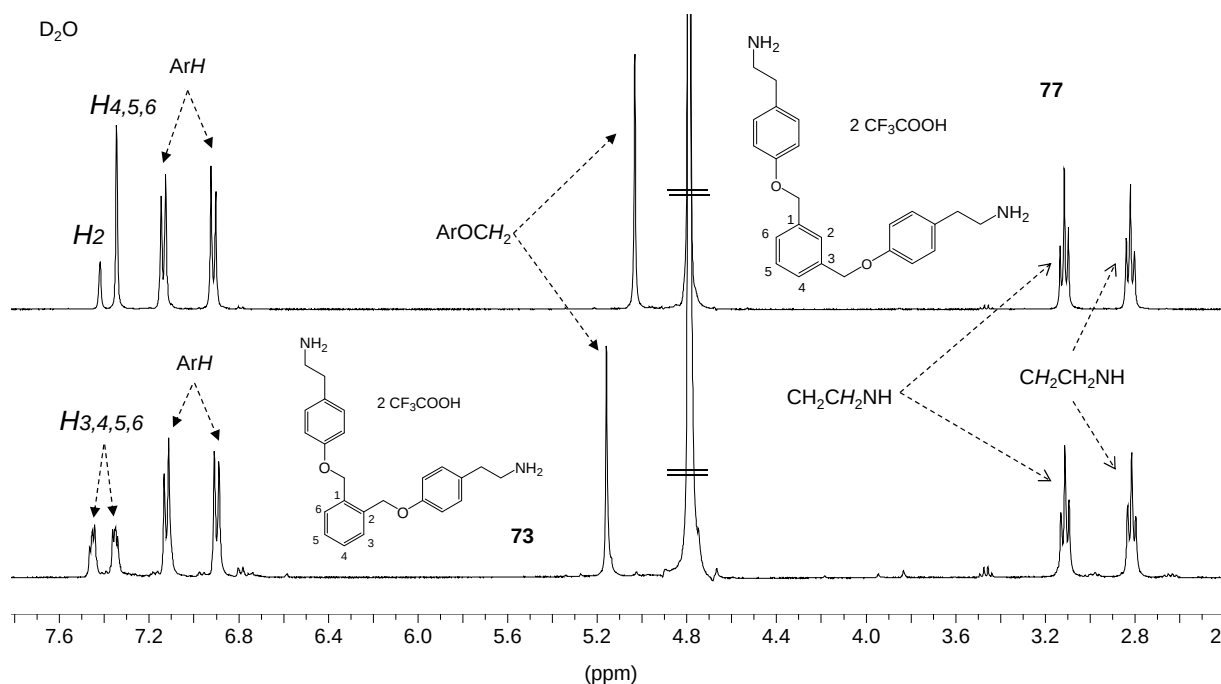


Fig. 9 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) des composés **73** et **77**.

L'analyse élémentaire de **73** et **77** purifiés donne les formules suivantes: $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_2$, 2 CF_3COOH , $\frac{1}{2}$ H_2O (613.21) pour **73** et $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_2$, 2 CF_3COOH , H_2O (622.21) pour **77**.

IV.3.3. Synthèse des bis-[α,α' -[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » **74** et « méta » **78**

Pour cette étape, nous avons tenté la formation des fonctions guanidines par deux méthodes différentes.

La méthode N° 1 (synthon "1,3-bis-(tert-butoxycarbonyl)-2-méthyl-2-thiopseudourée" **11**) a été utilisé avec le sel **73**, pour donner le composé « ortho » **76** avec un rendement de 40%.

En revanche, la méthode N° 2 (synthon "N,N'-Bis-(tert-butoxycarbonyl),N''triflylguanidine" **12**), a été utilisée pour créer les fonctions guanidines sur la diamine « méta » **77**. Nous avons obtenu le produit attendu **78**, avec un bien meilleur rendement que le précédent (98%).

Le choix entre ces deux méthodes a été particulièrement hésitante; la première méthode donne un faible rendement et nécessite un sel de mercure toxique, de plus la difficulté à éliminer la DMF (solvant) limite l'accès à des quantités importantes. Cependant, elle présentait au début du projet un avantage considérable qui était son coût moindre.

La seconde méthode utilisant le synthon di-boc-triflylguanidine **12**, est d'un coût beaucoup plus élevé, mais donne de meilleurs rendements. Ce problème a été résolu par la possibilité de préparer **12** au laboratoire en quantités confortable.

La figure présente le spectre RMN ^1H (400 MHz, TA) dans CDCl_3 des composés ortho **74** et méta **78**. Les spectres présentent des profils identiques vers les champs forts. Un ensemble de signaux, triplets à 2,80 ppm ($J = 7.30$ Hz) et quadruplets. Ces signaux correspondent aux protons des bras amino-éthyléniques. Le couplage du CH_2 directement lié à la guanidine avec NH visible dans CDCl_3 est sous la forme d'un quadruplet à 3,62 ppm ($J = 6.55$ Hz). On observe également pour chacun des composés (**74** et **78**), la présence du singulet des protons oxyméthyléniques à 5.14 ppm. De même, à 8,36 et 11,47 ppm se trouve un ensemble de signaux que l'on attribue aux protons des fonctions guanidines de **74** et **78**.

Seule la partie aromatique permet de différencier véritablement les deux composés.

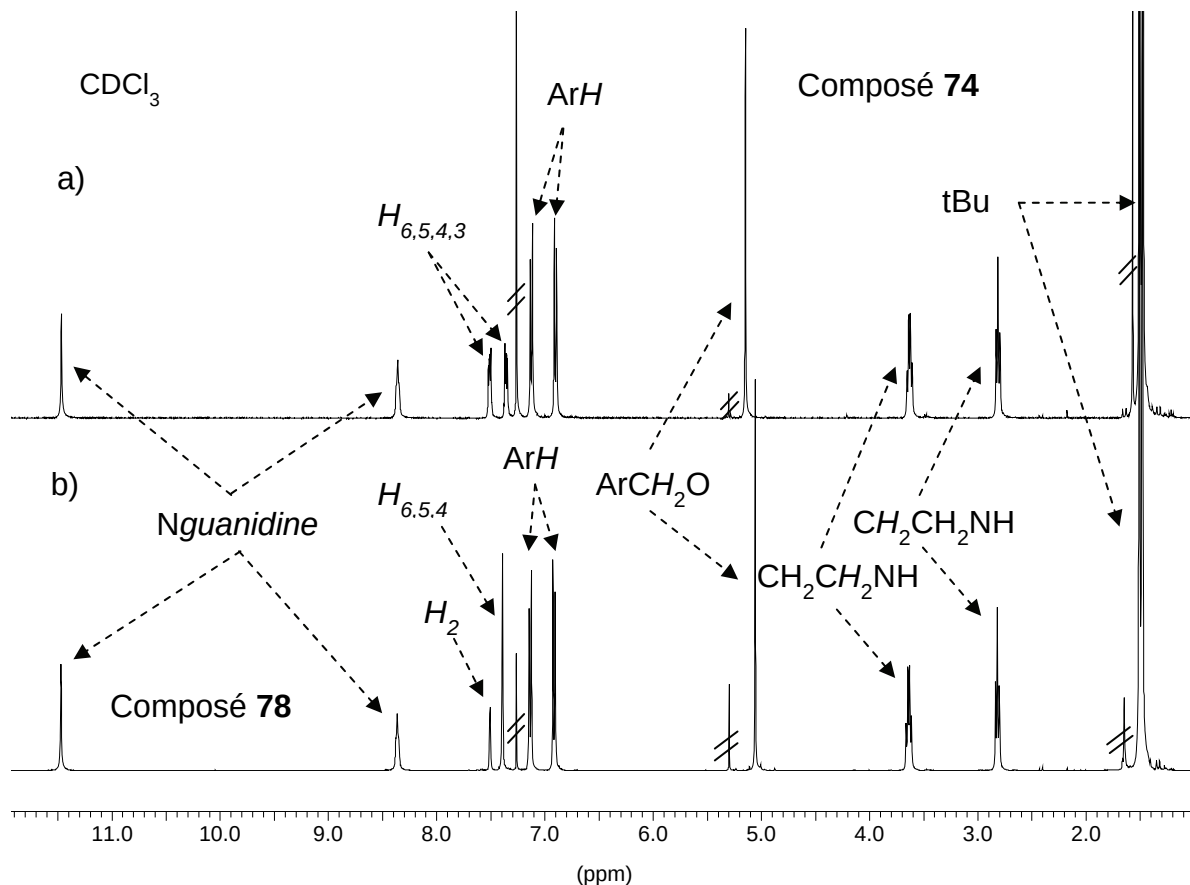


Fig. 10 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) des composés **74** et **78**.

IV.3.4. Déprotection des fonctions guanidines des composés **74** et **78**– Synthèse des bis-guanidiniums « ortho » **75** et « méta » **79**

La déprotection des composés **74** et **78** a été effectuée dans les conditions usuelles; le traitement des bruts de réaction, précautionneux comme nous l'avons déjà évoqué, a donné les trifluoroacétates **75** et **79** avec des rendements après lyophilisation de 75 et 97% respectivement.

Nous présentons ci-après les caractérisations de ces deux composés.

IV.3.4.1. Analyse des composés **75** et **79**

- RMN

Les spectres RMN ^1H des composés **75** et **79** ont été effectués dans D_2O ; ils ne diffèrent que par les signaux de résonance des noyaux xylènes : pour **75**, un système AX d'intégration 4 H, attribués aux protons en position 3, 4, 5 et 6 – plan de symétrie passant entre les positions 1 et 2, et 4 et 5 ; pour **79**, un système de deux « singulets », mal définis – plan de symétrie passant par les protons en positions 2 et 5.

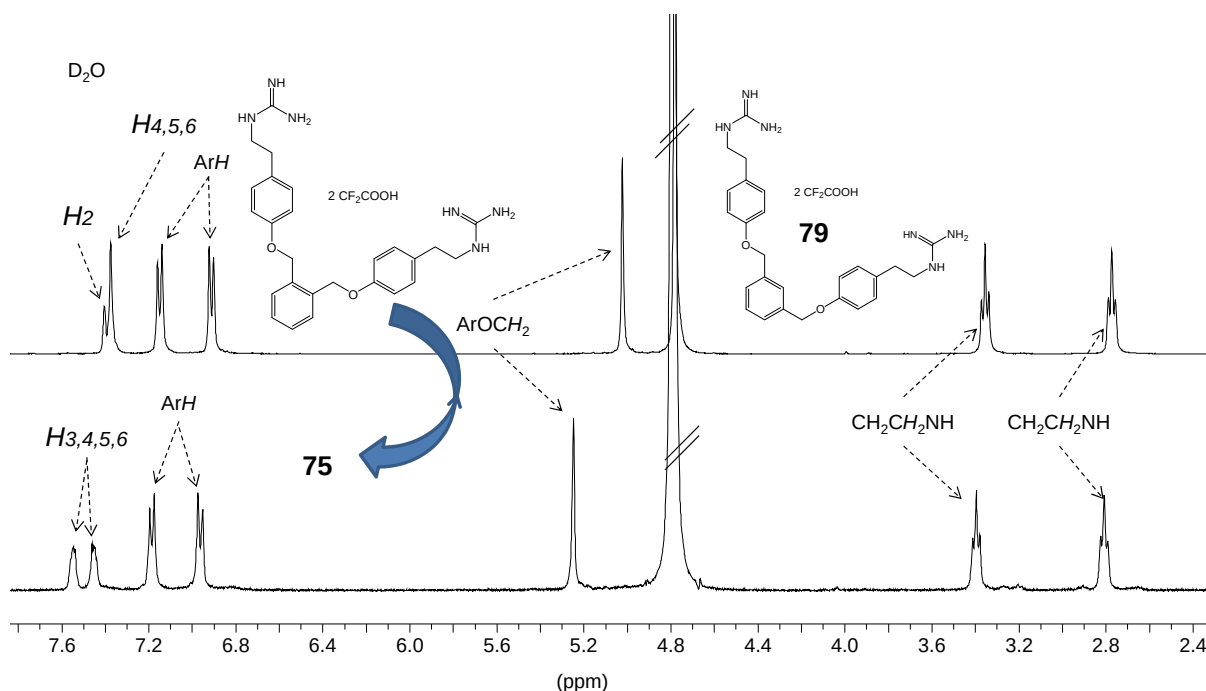


Fig. 11: Spectres RMN ^1H (400 MHz, D_2O) des bis- $[\alpha,\alpha'$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » **75** et « méta » **79**.

La figure 12 ci-dessous représente le spectre RMN ^{13}C du composé ortho **75**. Celui-ci est relativement simple et est proche du spectre du composé méta **79**.

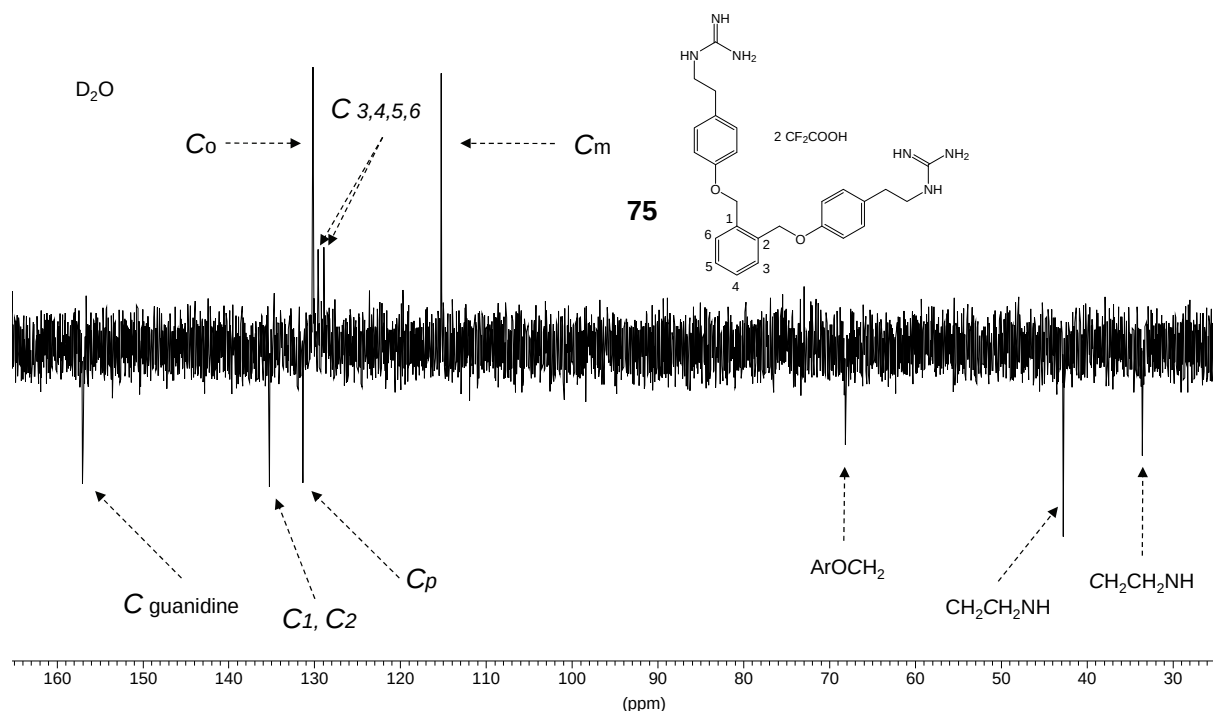


Fig.12 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) du composé ortho **75**.

• Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire du composé ortho **75** montre qu'il est accompagné d'une demi-molécule d'eau. Ce qui répond à la formule $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6$, 2 CF_3COOH , $\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (697.53g/mol).

Le composé meta **79** est accompagné d'une molécule d'eau, donnant la formule $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6$, 2 CF_3COOH , 0,5 H_2O , avec une masse de 706.63 g/mol.

• Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse réalisée en électrospray mode positif donne des résultats conformes à nos attentes (Fig. 13). On observe logiquement quelques similitudes correspondantes aux deux composés :

On retrouve pour chacun des composés :

- Les pics à 575,38 (**75**) et 575,43 (**79**) u.m.a attribués à l'ion moléculaire $[\text{M} - \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}]^+$.

- Les pics de base à 461.26 (**75**) et 461.25 (**79**) u.m.a attribués à l'ion moléculaire $[M - 2 \text{ CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+]^+$.

Les pics à 230,82 (**75**) et 231,05 (**79**) u.m.a attribués à l'ion moléculaire dichargé $[M - 2 \text{ CF}_3\text{COOH} + 2 \text{H}^+]^{2+/2}$.

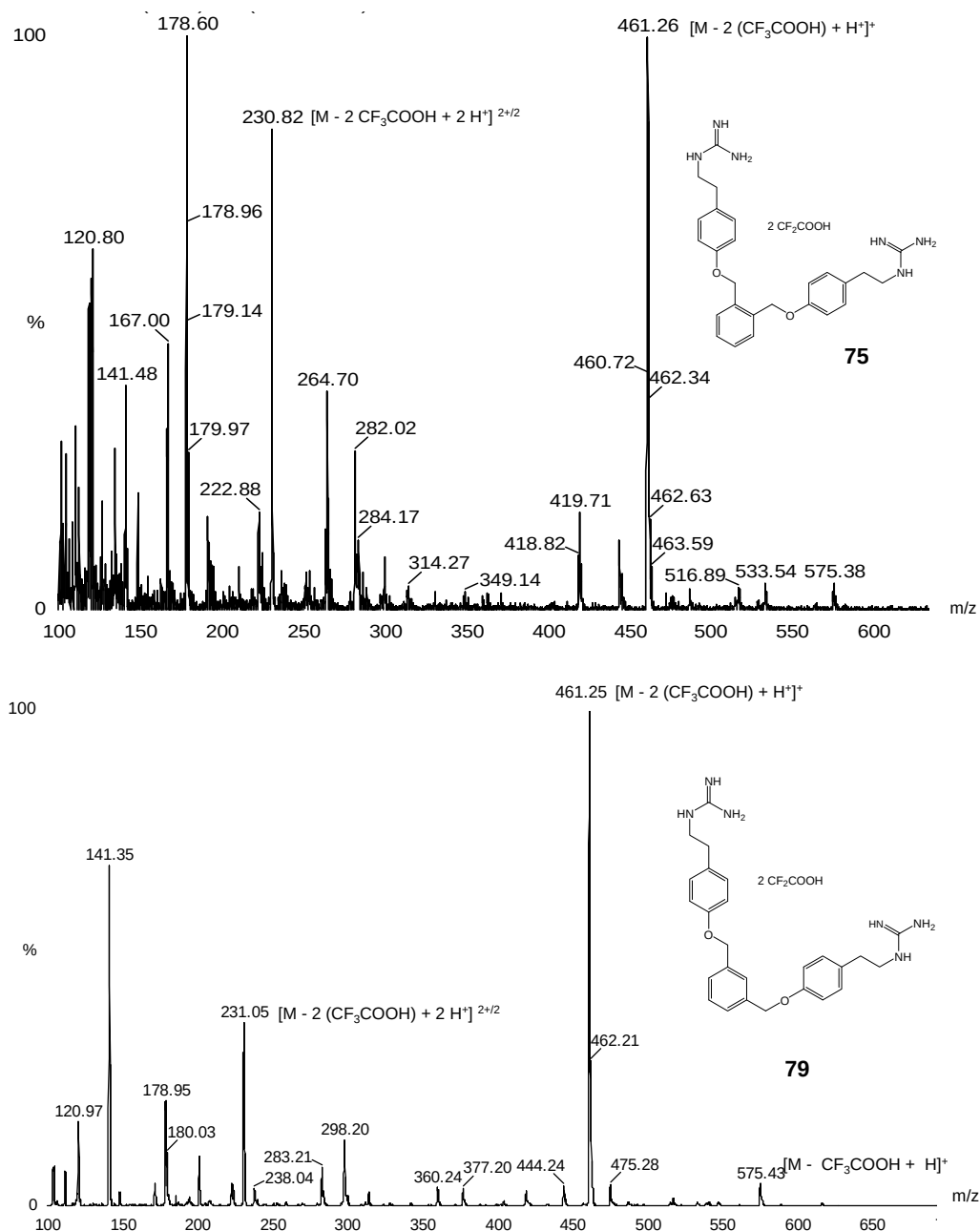


Fig. 13: Spectres de masse en électrospray mode positif des bis- $[\alpha, \alpha'$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]xylènes « ortho » **75** et « méta » **79**.

IV.4. Synthèse du composé tris- $[\alpha,\alpha',\alpha'']$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **83**

La stratégie de synthèse du composé **83** est présentée en figure 14; elle est identique à celle des composés précédents.

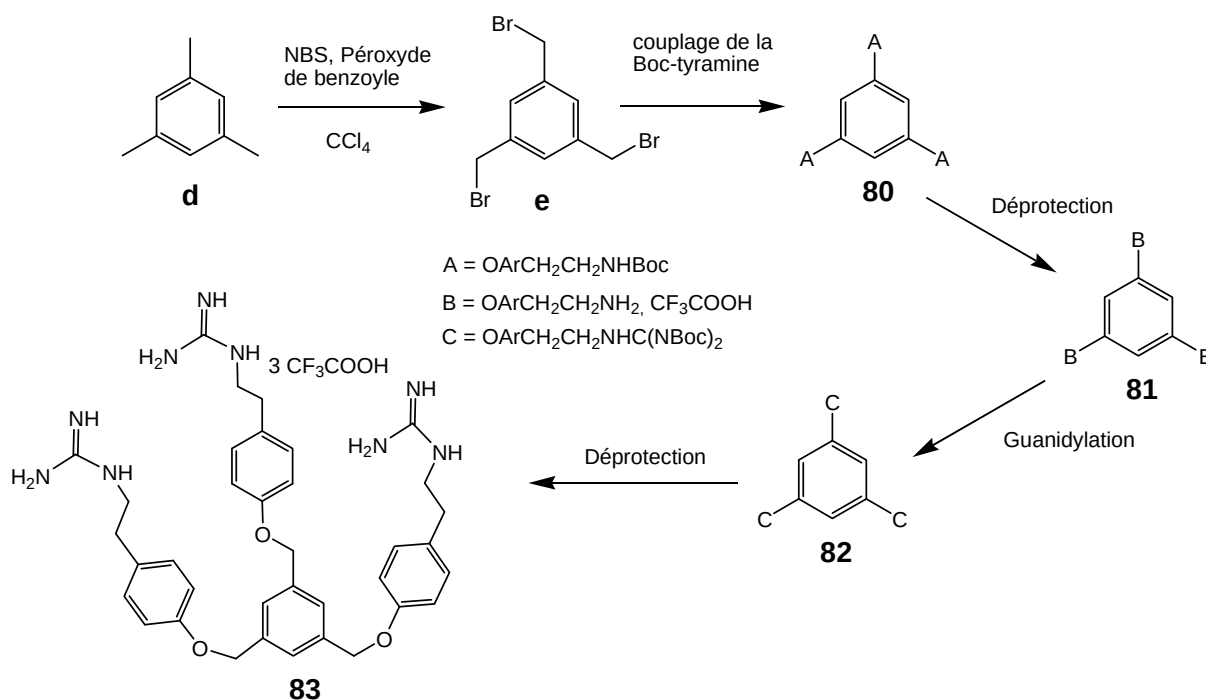


Fig. 14 : Stratégie de synthèse du tris- $[\alpha,\alpha',\alpha'']$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **83**.

IV.4.1. Synthèse du 1,3,5-tris(bromométhyl)benzène (e)

Dans un souci de maîtrise des coûts et dans l'hypothèse d'un besoin en grandes quantités, nous avons décidé de réaliser nous-même la synthèse du réactif de départ, le "1,3,5-tris(bromométhyl)benzène" (**e**).

Nous avons trouvé dans la littérature plusieurs modes opératoires décrivant, mais avec peu de détails quant aux purifications, la bromation du 1,3,5-tris(méthyl)benzène (ou mésitylène) **e**. Peu d'entre eux ont abouti à des résultats satisfaisants au laboratoire. Une seule référence [4] a permis l'obtention du produit final, mais avec un rendement décevant de 50% avant purification

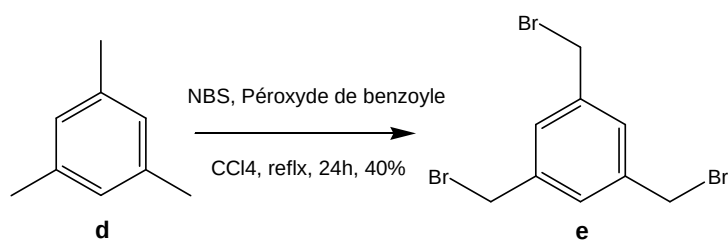


Fig.15 : Bromation radicalaire du mésitylène (d**).**

Nous avons fait réagir, le mésitylène (**d**) dans le CCl₄ (à la place du toluène comme décrit), en présence du N-bromosuccinimide et d'un initiateur radicalaire : le peroxyde de benzoyle. Le tout est porté à reflux pendant 24 heures. Nous observons par CCM (SiO₂, CH₂Cl₂ / Hexane 30 : 70), l'apparition de deux tâches majoritaires avec des R_f très proches.

Les conditions de traitement visant à purifier le brut, telles que décrites dans la littérature, ne nous ont pas satisfait en pratique. Aussi, nous avons décidé de faire une pré-purification sur colonne SiO₂, suivie d'une recristallisation à chaud dans l'hexane. Après une nuit au réfrigérateur, le solide blanc formé est de nouveau recristallisé dans l'hexane (3 fois). Le solide blanc final est ensuite repris dans l'hexane (à froid), trituré, soniqué, rincé plusieurs fois à l'hexane puis filtré pour donner **80** avec un rendement global de 40 %.

Malgré la faiblesse de ce dernier, nous avons pu obtenir une masse de produit suffisante nous permettant d'amorcer la synthèse du *tris-[α,α',α'']-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **83**.*

L'analyse RMN ¹H a permis de confirmer l'obtention du produit recherché.

IV.4.2. Synthèse du composé tris- $[\alpha,\alpha',\alpha'']$ -[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy]mésitylène **80**

Le couplage de la boc-tyramine **48** sur le composé **e** a été réalisé conformément aux précédents couplages. Après 24 heures de réaction, et purification du brut réactionnel par chromatographie, nous obtenons le composé **80** désiré avec 69% rendement (Fig 16).

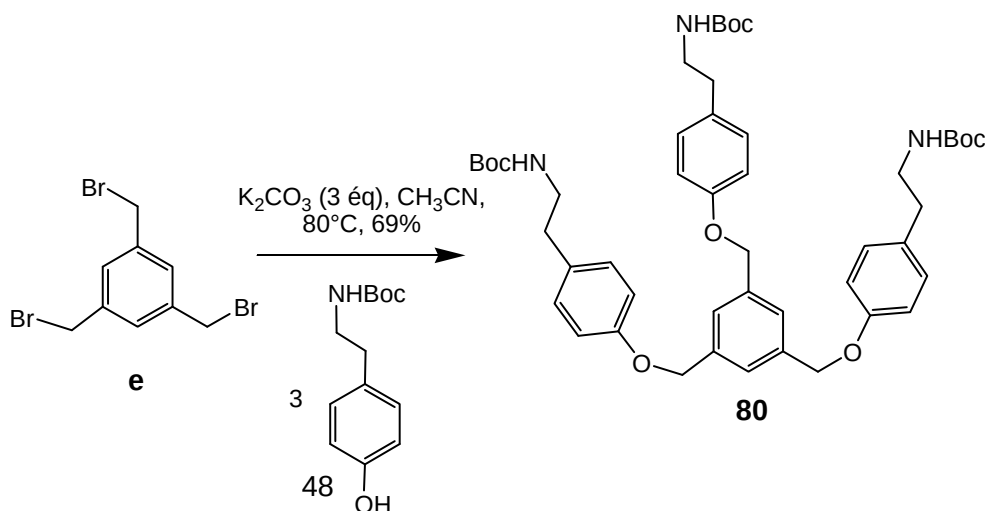


Fig. 16 : Couplage de la boc-tyramine **48** sur le 1,3,5-tris(bromométhyl)benzène **80**.

IV.4.2.1. Analyses du composé **80**

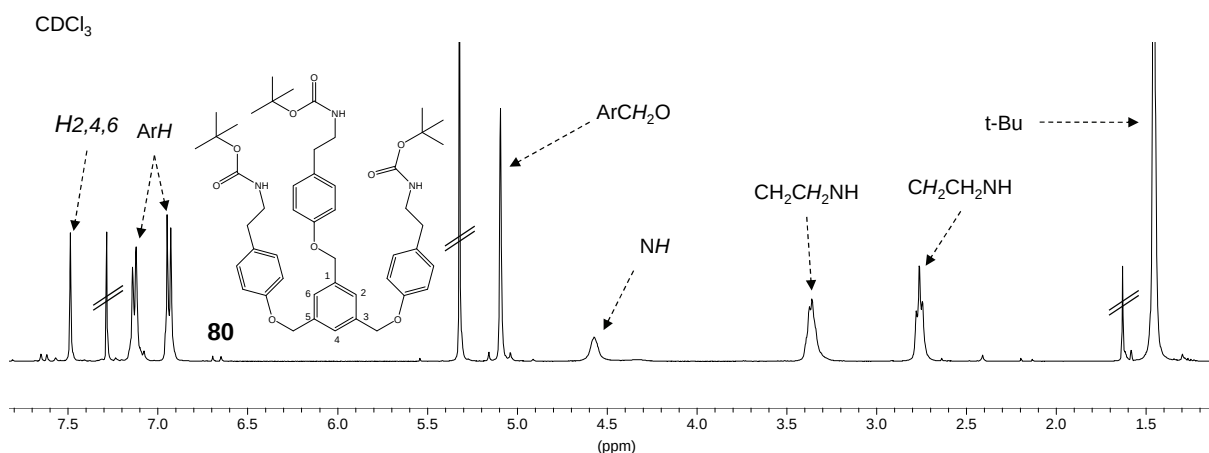


Fig. 17 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du tris- $[\alpha,\alpha',\alpha'']$ -[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy]mésitylène **80**.

L'analyse RMN ^1H du composé **80**, effectuée dans CDCl_3 , confirme la structure attendue, ainsi que détaillé en figure 17.

La figure suivante (Fig. 18) représente son spectre ^{13}C .

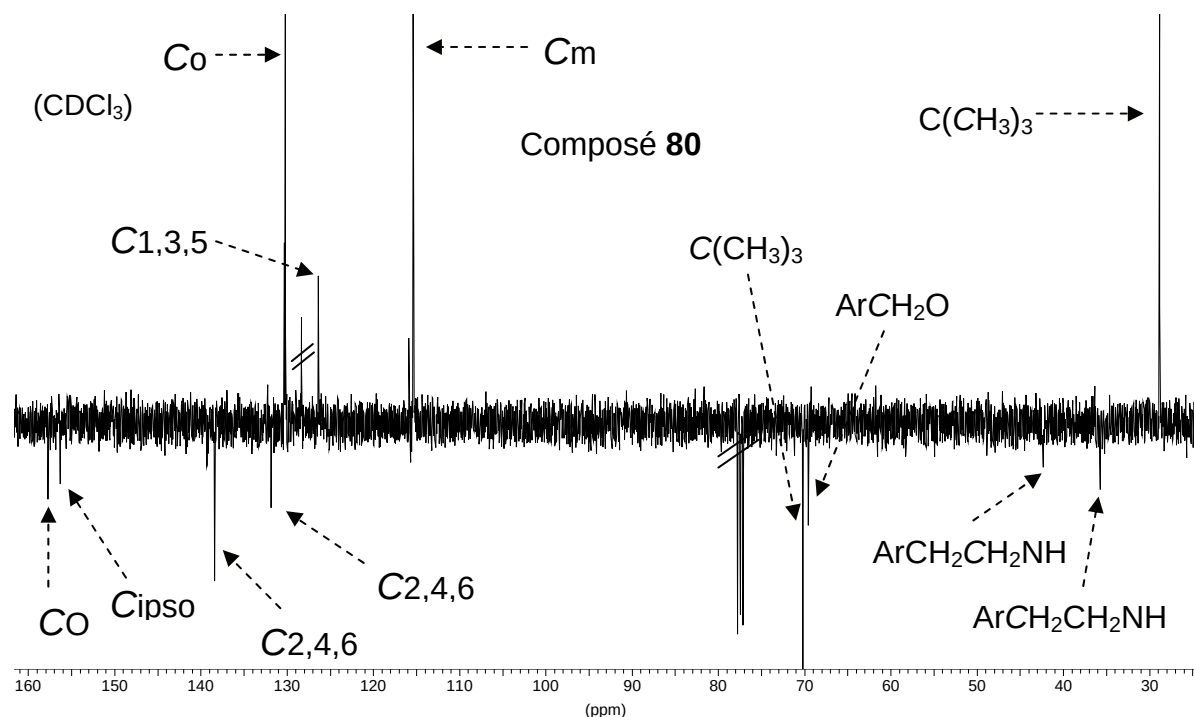


Fig. 18 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **80**.

L'analyse élémentaire du composé ortho **80** répond à la formule $\text{C}_{64}\text{H}_{63}\text{O}_9\text{N}_3$, avec une masse de 826.03 g/mol.

IV.4.3. Synthèse du trifluoroacétate de tris- $[\alpha,\alpha',\alpha'']$ -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]mésitylène **81**

Elle est réalisée dans les conditions précédemment décrites : CF_3COOH / CH_2Cl_2 25 : 75, à température ambiante. Le caractère salin prononcé de **81** nous a amenés à un traitement précautionneux à l'éther éthylique, avant reprise à l'eau pour une lyophilisation finale, avec un rendement quasi quantitatif.

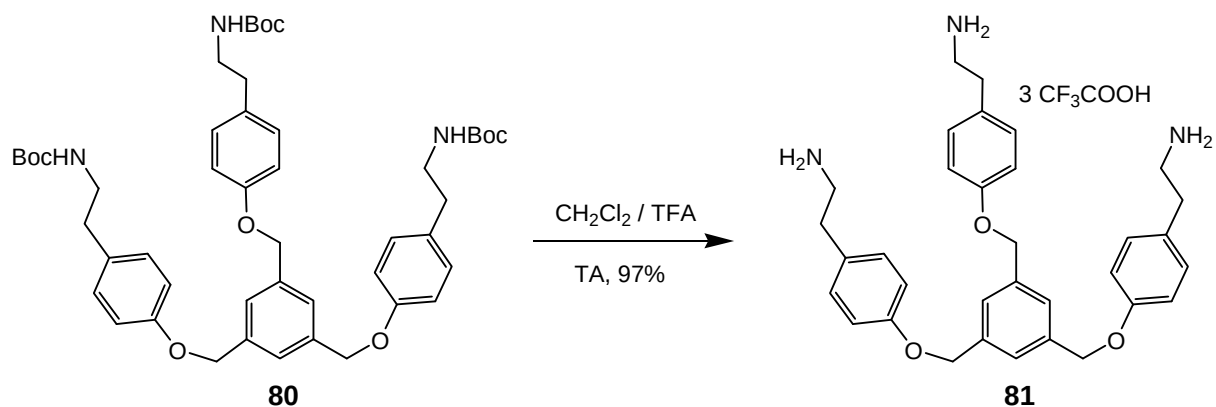


Fig.19 : Synthèse du trifluoroacétate de tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]mésitylène **81**.

Nous présentons ci-dessous l'analyse RMN ^1H du composé **81** dans D_2O (Fig. 20).

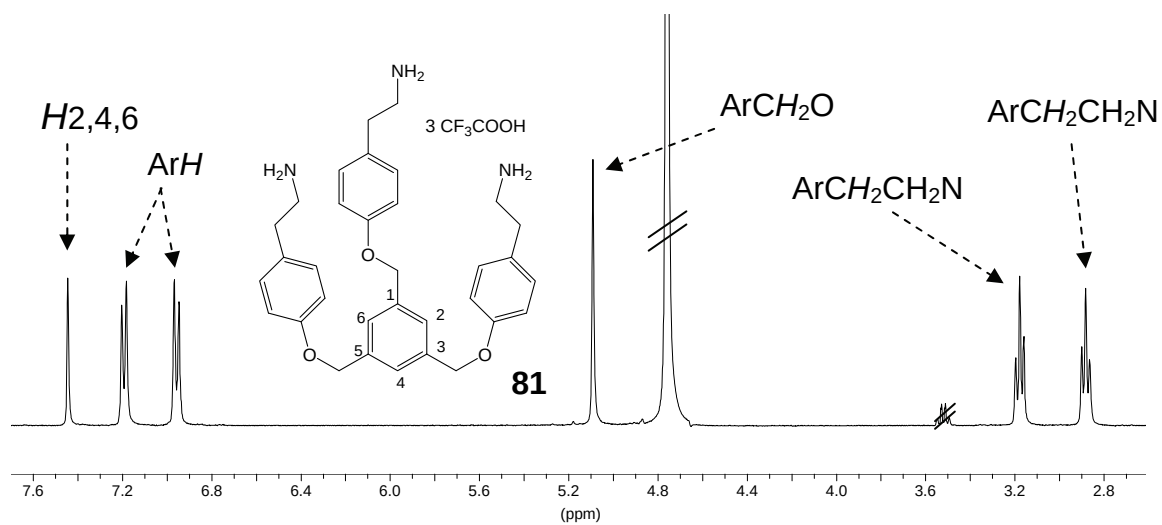


Fig. 20 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O) du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]mésitylène **81**.

Ce spectre présente :

- Un ensemble de deux signaux (triplet dans D₂O) à 2.84 ppm ($J = 7.44$ Hz) et 3.13 ($J = 7.42$ Hz) correspondant aux bras éthylénique reliant le benzène et la fonction guanidine.
- Un sigulet à 4,80 ppm prouvant que la liaison éther a résisté aux conditions acides de déprotection.

L'analyse par RMN ¹H (Fig. 20) de **81** est conforme à nos attentes, à quelques impuretés près. On note la présence de traces de diéthyléther, dont l'élimination est parfois très difficile avec ce type de sels (lyophilisation nécessaire).

IV.4.4. Synthèse du tris-[α,α',α'']-[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **82**

Cette réaction a été effectuée en suivant les conditions de la méthode N°2 (Fig. 21). Le composé **82** est obtenu après purification par chromatographie avec un bon rendement de 87%.

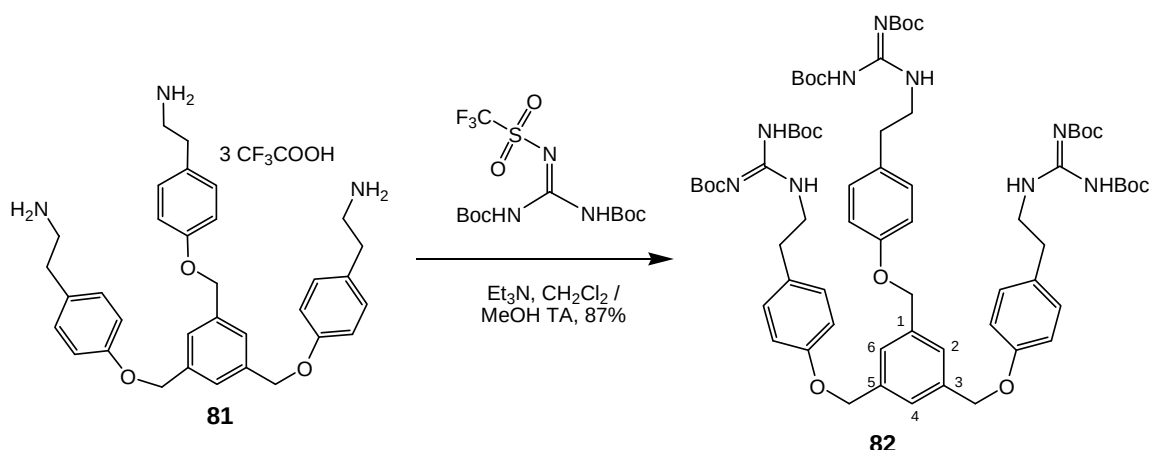


Fig. 21 : Synthèse du composé **82** selon la méthode N°2.

IV.4.4.1. Analyses

L'analyse par RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, TA) confirme la symétrie de greffage (Fig. 22), et la présence du signal de résonance à 156.52, 157.83 et 164.02 ppm en RMN ¹³C celle des carbones appartenant aux groupements guanidines (Fig. 23).

- RMN ^1H

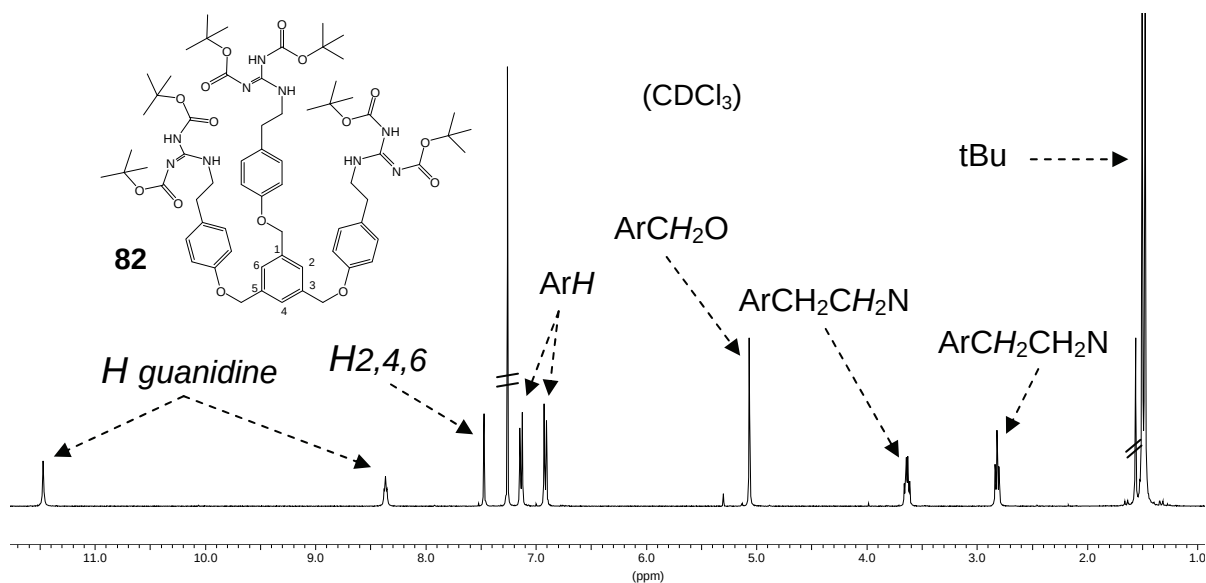


Fig. 22 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O) du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **82**.

- RMN ^{13}C

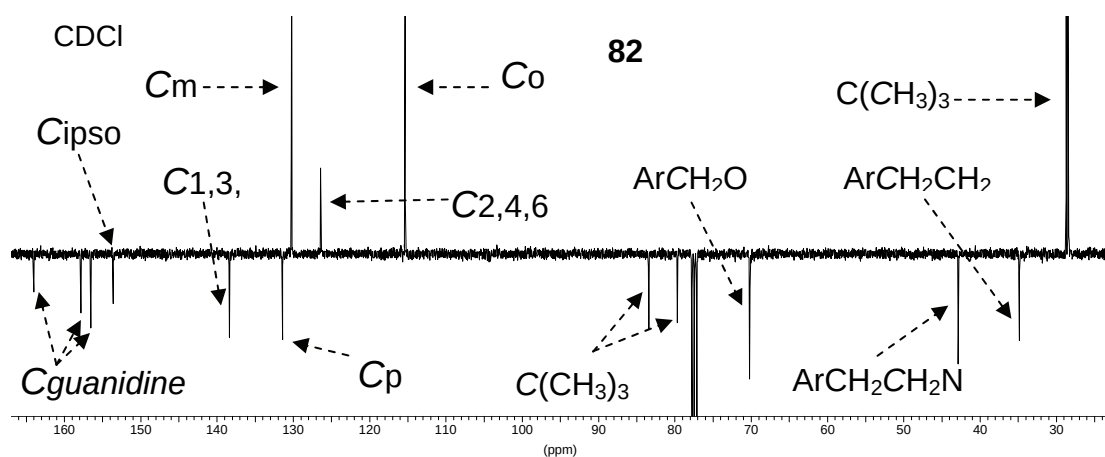


Fig. 23 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) du composé **82**.

L'analyse par spectrométrie de masse en électrospray mode positif nous apporte des profils conformes à nos attentes (Fig. 24).

Nous observons le pic moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à 1252.7 u.m.a., associé aux espèces mono-métallées $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}+\text{K}]^+$ à 1274.6 et 1290.6 u.m.a.,

respectivement. Un pic à 1052.6 u.m.a. est attribué à l'entité ayant perdu 2 groupements tert-butylcarbonate.

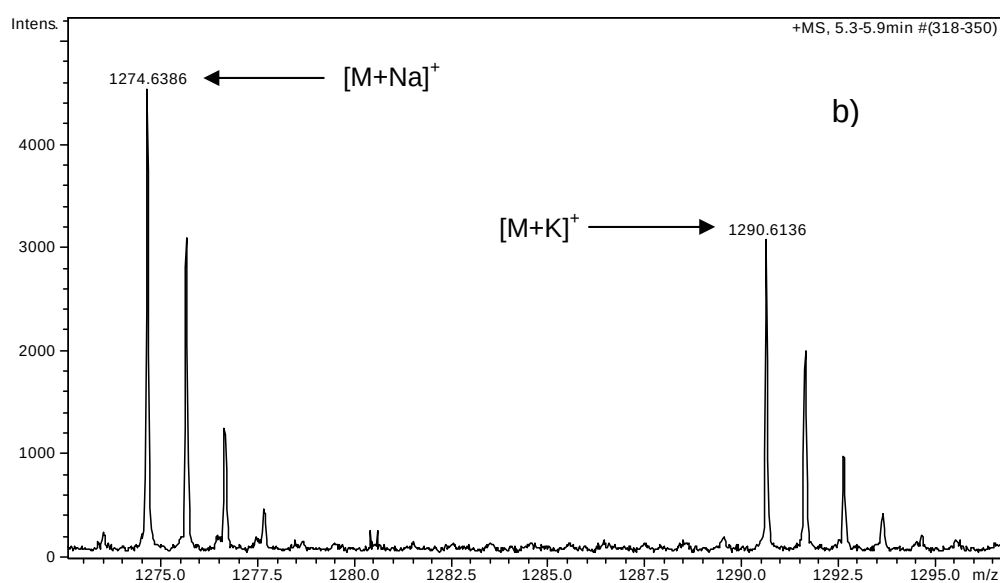
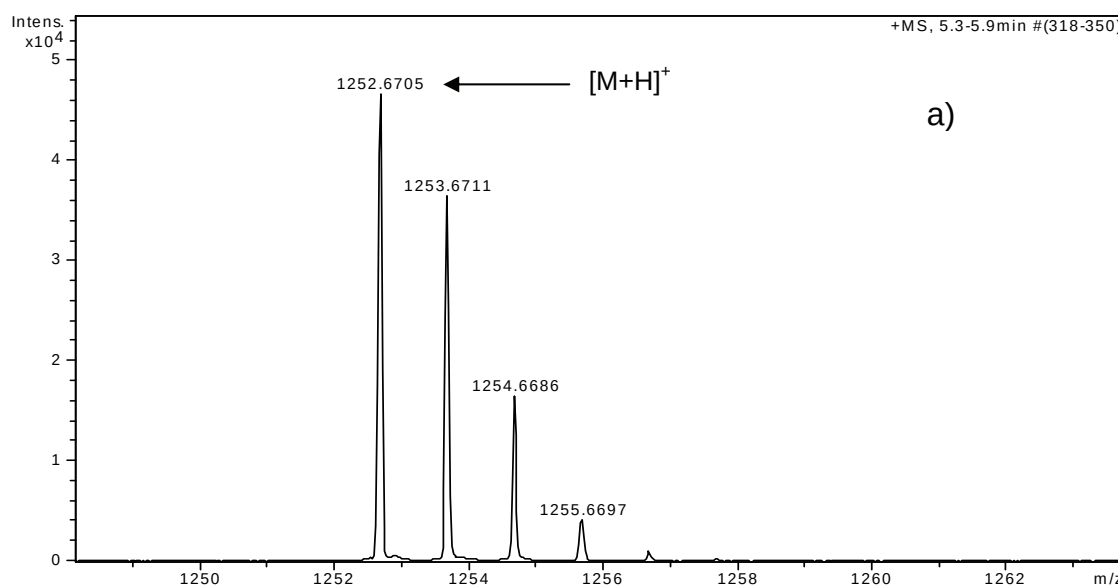


Fig. 24: Spectres de masse en électrospray mode positif du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **82**.

L'analyse élémentaire confirme l'obtention du composé **82**, avec pour formule brute $C_{66}H_{93}O_{15}N_9$ et une masse molaire de 1251,68 g/mol. L'analyse centésimale a

été calculée pour C: 63.29%; H: 7.48%; N: 10.06%; nous avons trouvé: C: 62.97%; H: 7.59%; N: 10.36%.

IV.4.5. Synthèse du tris-[α,α',α'']-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **83**

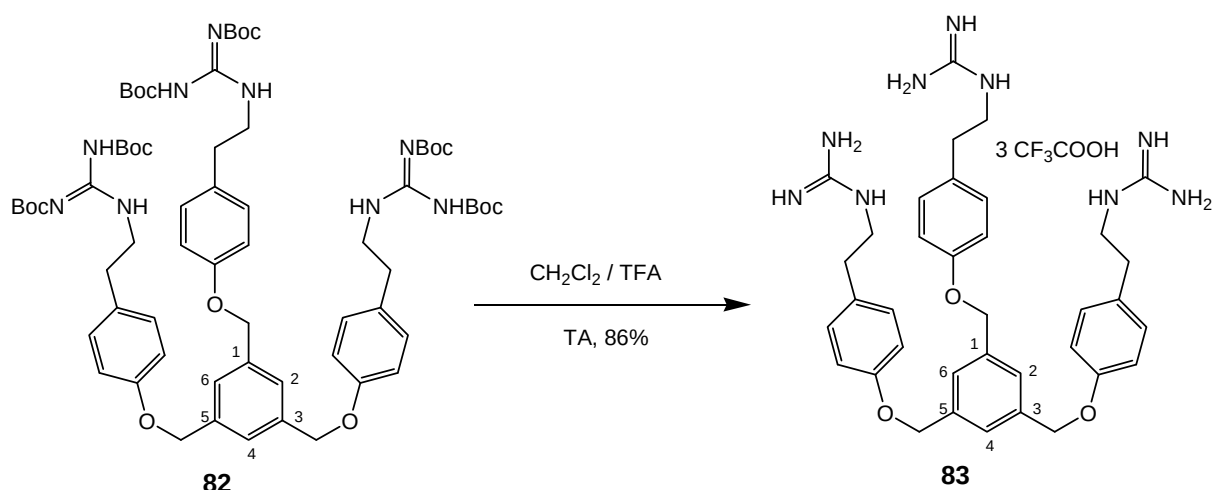


Fig. 25 : Synthèse du composé **83.**

Le composé **83** est obtenu avec un rendement de 86% par attaque acide du dérivé protégé **82**, dans les conditions standard déjà décrites. (Fig. 25) Dans ce cas particulier, comme pour la triamine **81**, le fort caractère salin de **83** a nécessité un traitement précautionneux intégrant plusieurs précipitations et lavage à l'éther éthylique, avant de procéder à la lyophilisation finale. Nous avons observé que **83** était très hydrosoluble, et hygroscopique à température ambiante, nécessitant de le conserver à basse température en flacon étanche.

IV.4.5.1. Analyses du composé **83**

Ce produit a été totalement caractérisé :

- RMN ^1H : De par sa symétrie C_{3v} , la RMN du proton, effectuée dans D_2O , s'avère relativement simple (Fig. 26). Ce spectre présente : deux triplets à 2,76 ($J = 6,04$ Hz) et 3,34 ($J = 6,04$ Hz) ppm correspondant aux bras éthyléniques reliant le noyau aromatique aux fonctions guanidines ; un singulet à 4.80 ppm correspondant aux bras oxyméthyléniques reliant les noyaux aromatiques entre eux ; enfin deux

doublets à 6.74 et 7.02 ppm formant un système AX ($J = 7.56$ Hz) attribués aux protons des aromatiques externes et un singulet à 7.22 ppm attribué aux protons du noyau benzénique central.

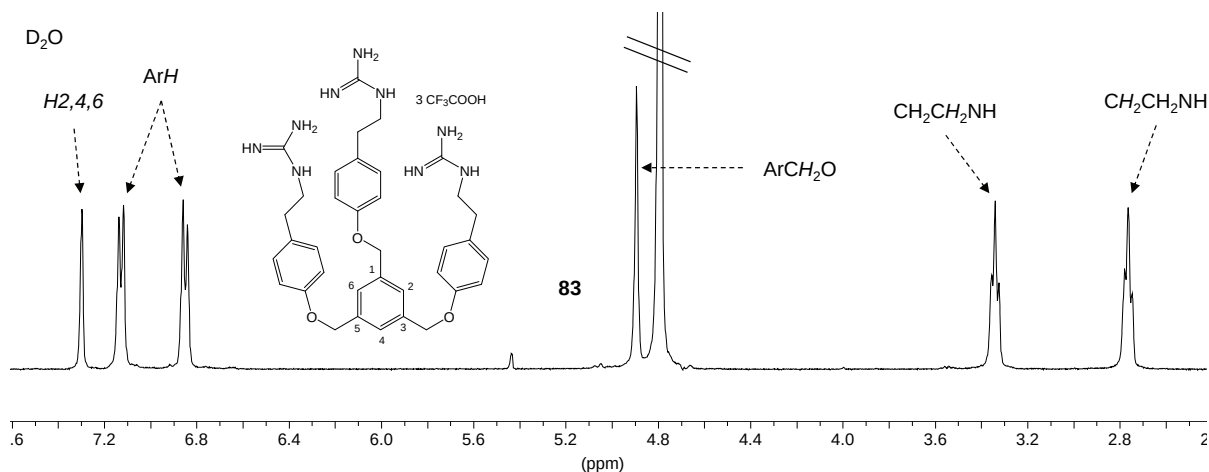


Fig. 26: Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) du tris- $[\alpha, \alpha', \alpha'']$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]mésitylène **83**.

■ RMN ^{13}C :

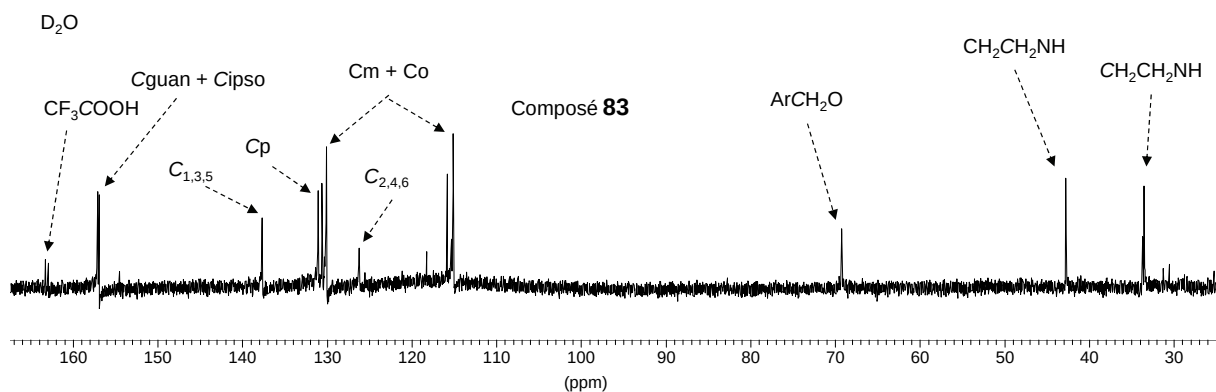


Fig. 27 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) du composé **83**.

La figure 28 représente le spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) du composé **83**. Nous notons ici l'apparition du signal du carbonyle du groupe trifluoroacétate vers 164 ppm, que nous mentionnons ici car rarement observable dans nos familles de composés.

▪ Spectrométrie de masse :

Elle a été réalisée en électrospray mode positif et donne des résultats conformes à nos attentes, malgré la présence de certains pics de faible intensité non attribués. Nous notons à 944,2 u.m.a. un pic que nous avons attribué au fragment $[M - (\text{CH}_2\text{-guanidine}) - \text{H}^+ + \text{Na}^+]^+$. Le pic moléculaire $[M - \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+]^+$ apparaît à 880,35 u.m.a., et le pic de base à 766,36 u.m.a. est attribué à l'espèce mono-chargée $[M - 2 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+]^+$.

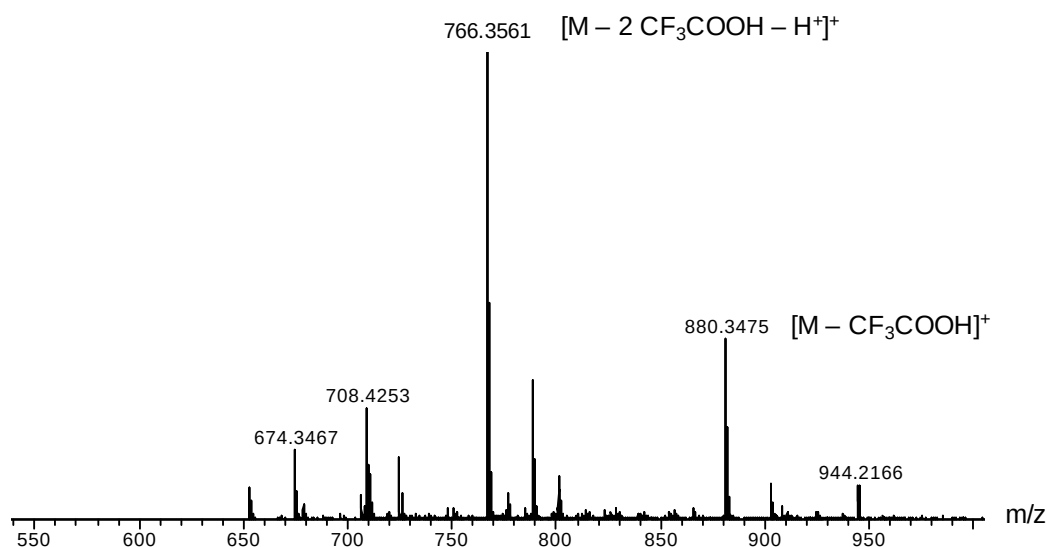


Fig. 28 : Spectre électrospray en mode positif du composé **83**.

▪ Analyse élémentaire :

	Calculé (%)	Trouvé (%)
Lot N° 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_3, 3 \text{CF}_3\text{COOH}, 3/2 \text{H}_2\text{O} (1020.87)$ C(49.15%); H(5.04%); N(12.35%)	C(49.15%); H(5.08%); N(12.94%).
Lot N° 2	$\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_3, 3 \text{CF}_3\text{COOH}, 1/2 \text{H}_2\text{O} (1002.34)$ C(50.30%); H(4.92%); N(12.57%)	C(50.27%); H(5.06%); N(12.41%)

Tableau 1 : Analyses élémentaires des lots de **83**.

IV.5. Synthèse du 1,2,4,5-tétrakis-[*para*-(guanidinoéthyl)-phénoxyéthyl]benzène **87** et de l'hexakis-[*para*-(guanidinoéthyl)-phénoxyéthyl]benzène **91**

IV.5.1. Stratégie de synthèse

Du point de vue théorique, la stratégie de synthèse de ces deux dérivés fortement chargés est identique à celle utilisée pour les précédentes molécules de cette famille. Nous avons obtenu les sels finaux **87** et **91** en quatre étapes (Fig. 29):

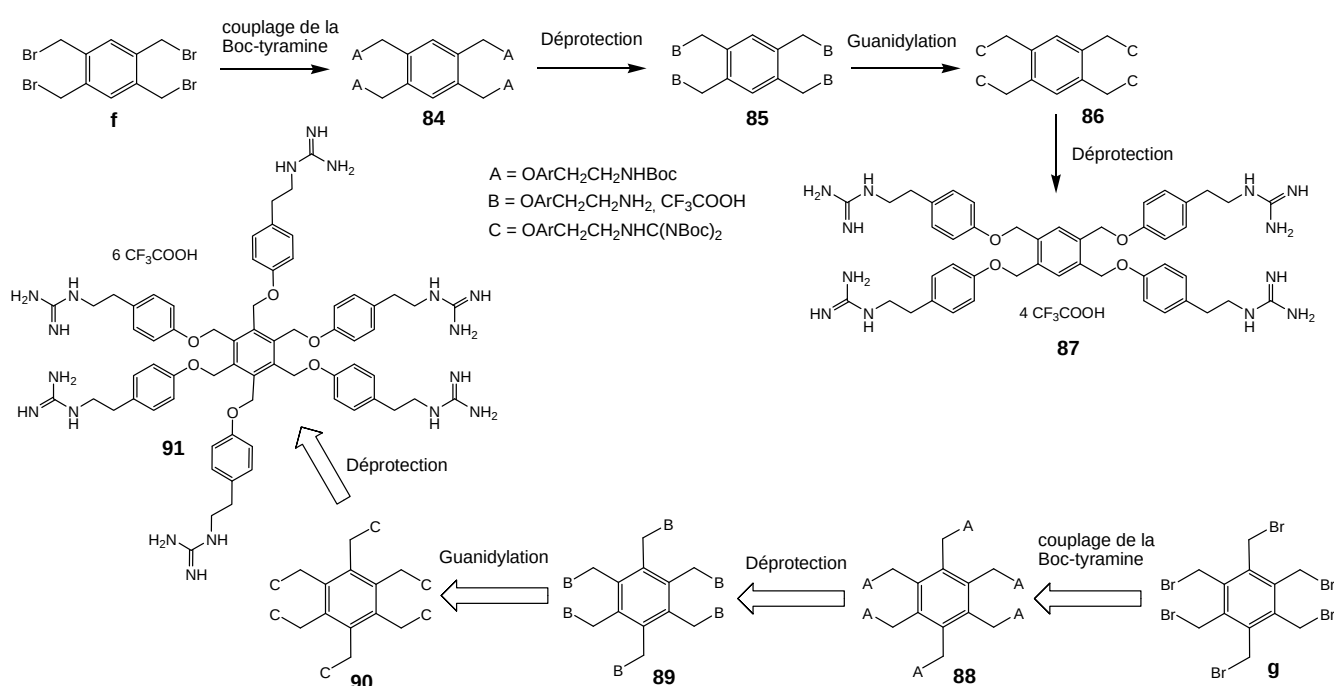


Fig. 29 : Poly-guanidiniums étoilés **87 et **91**.**

▪ **Etape 1 :** Le couplage de la boc-tyramine **48** sur les dérivés 1,2,4,5-tétra(bromométhyl)benzène **f** et hexa(bromométhyl)benzène **g** (d'origine commerciale) en présence de K_2CO_3 dans l'acétonitrile anhydre, donne les deux intermédiaires **84** et **88**, avec des rendements après chromatographie de 99% et 93%, respectivement.

Les analyses faites sur ces produits, notamment la RMN ^1H (400 MHz, dans CDCl_3 , TA) interprétée en figure 30, ont confirmé les structures des produits **84** et **88**.

On constate que les deux composés présentent un profil identique : dans les champs forts, hormis la présence de quelques impuretés sur le spectre du composé **88**, on retrouve un massif à 1.49 ppm attribué aux protons des groupes protecteurs Boc, un ensemble de deux signaux correspondant aux bras éthyléniques reliant les fonctions guanidines au reste de la structure à 2.73 et 3.33 ppm (8 H) pour **84** et à 2.69 et 3.29 ppm (12 H) pour **88** ainsi que qu'un singulet qui intègre pour 4 H, correspondant aux bras oxyméthyléniques reliant le benzène central aux benzènes périphériques à 5.14 ppm (8 H) pour **84** et à 5.15 ppm (12 H) pour **88**.

Dans les champs faibles, les profils diffèrent, pour **84**, par la présence d'un singulet à 7,66 ppm (2 H), correspondant aux protons -2 et -4 du benzène central.

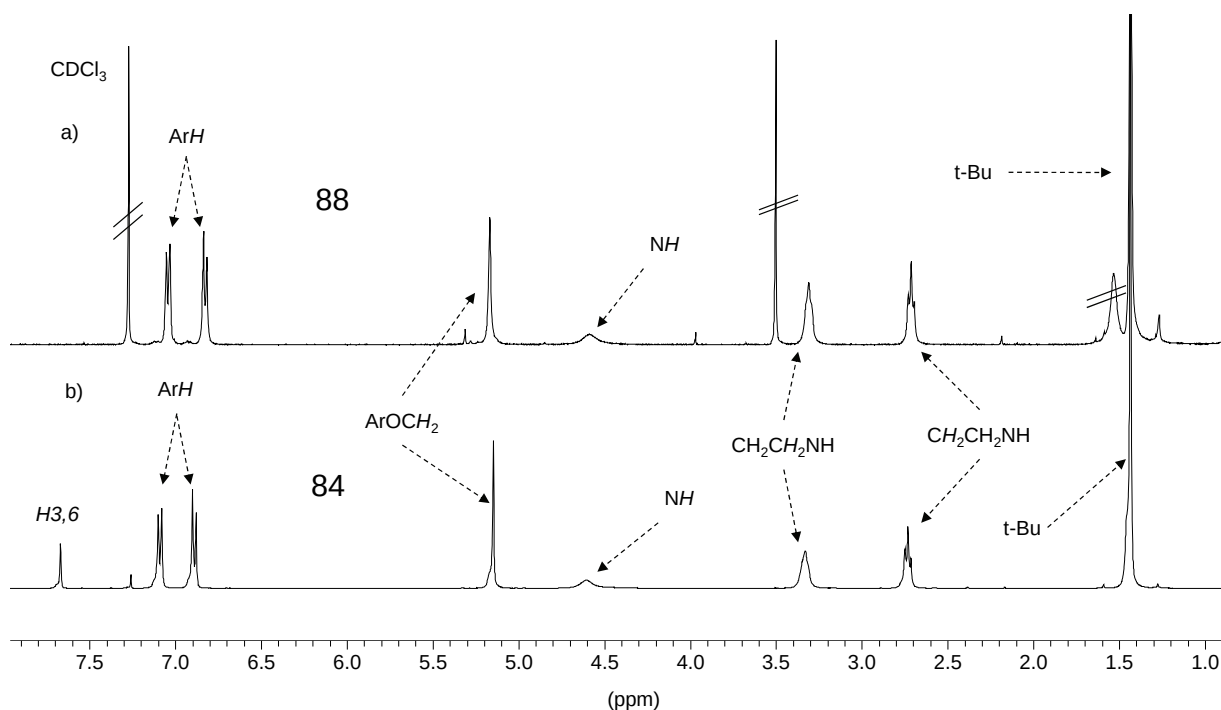


Fig. 30 : Spectres RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) des composés **84** et **88**.

La figure 31 suivante présente un exemple de spectre RMN ^{13}C (100 MHz), ici le composé **84** (Fig. 31) dans CDCl_3 à TA.

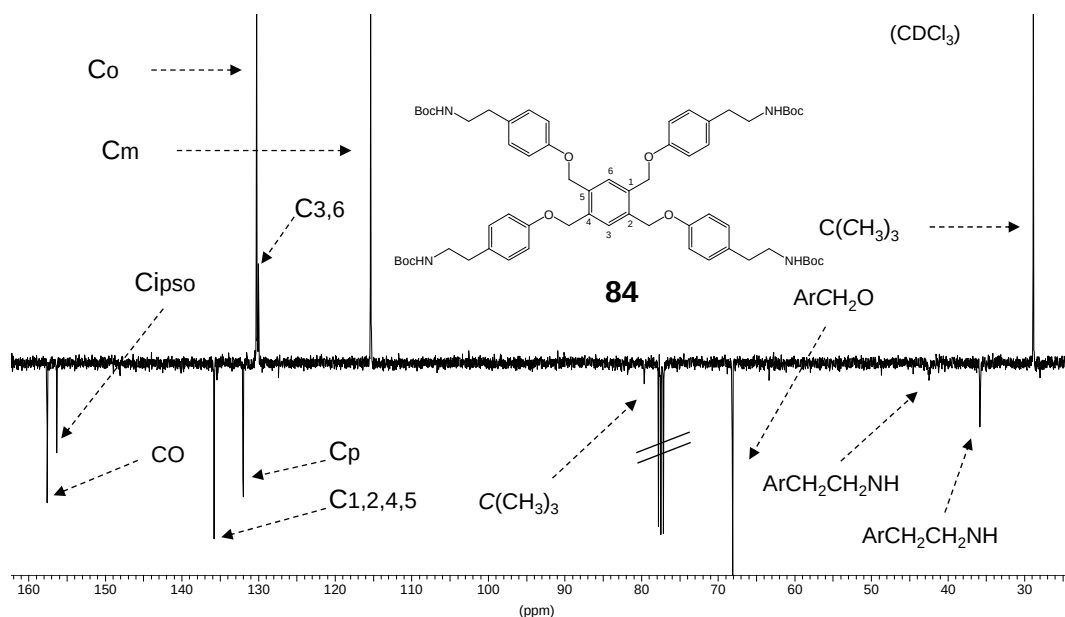


Fig. 31 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , TA) du composé **84**.

▪ **Etape 2 :** Après la réaction de couplage, on réalise la déprotection des fonctions guanidines en milieu acide trifluoroacétique. Les sels **85** et **89** sont obtenus après une nuit de réaction, à température ambiante et sous atmosphère d'argon.

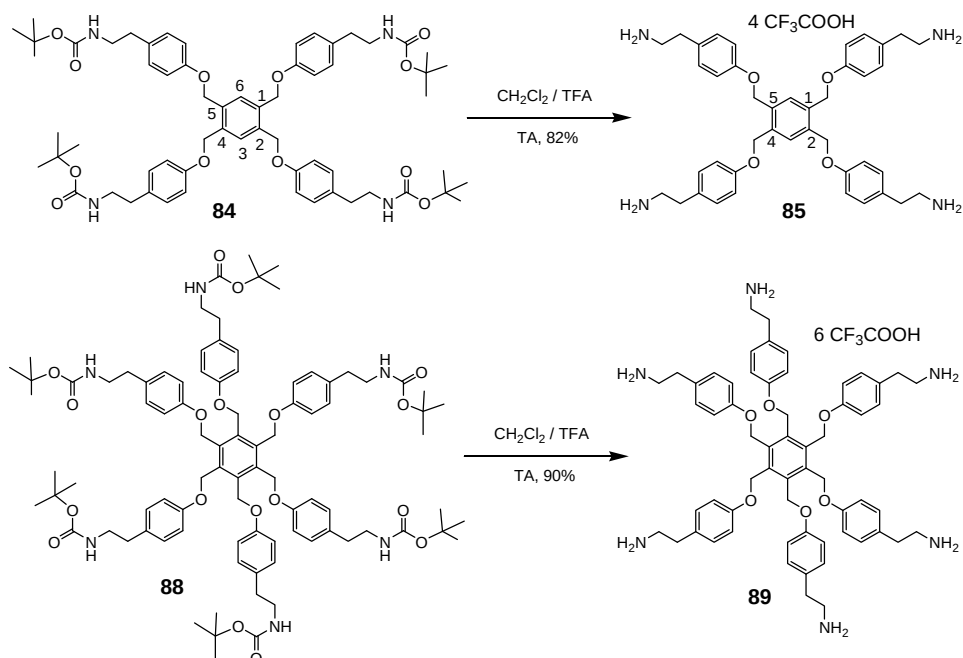


Fig. 32 : Synthèse des trifluoroacétates du 1,2,4,5-tétrakis-[para-(aminoéthyl)-phénoxyméthyl]benzène **85** et de l'hexakis-[para-(aminoéthyl)-phénoxyméthyl]benzène **89**.

Après le traitement précautionneux décrit précédemment et visant à ôter toute trace de TFA, les trifluoroacétates **88** et **89** sont obtenus avec des rendements respectifs de 82 et 90%.

La figure 33 représente les spectres RMN ^1H obtenus dans D_2O pour les deux intermédiaires **85** et **89**. On constate la disparition du signal correspondant aux protons des groupes protecteur Boc (1,49 ppm), preuve que la déprotection a été effective. Mais ces spectres montrent aussi que nos composés ne sont pas totalement purs. La prochaine étape de synthèse (création des fonctions guanidines) permettra d'affiner la purification en phase organique par chromatographie.

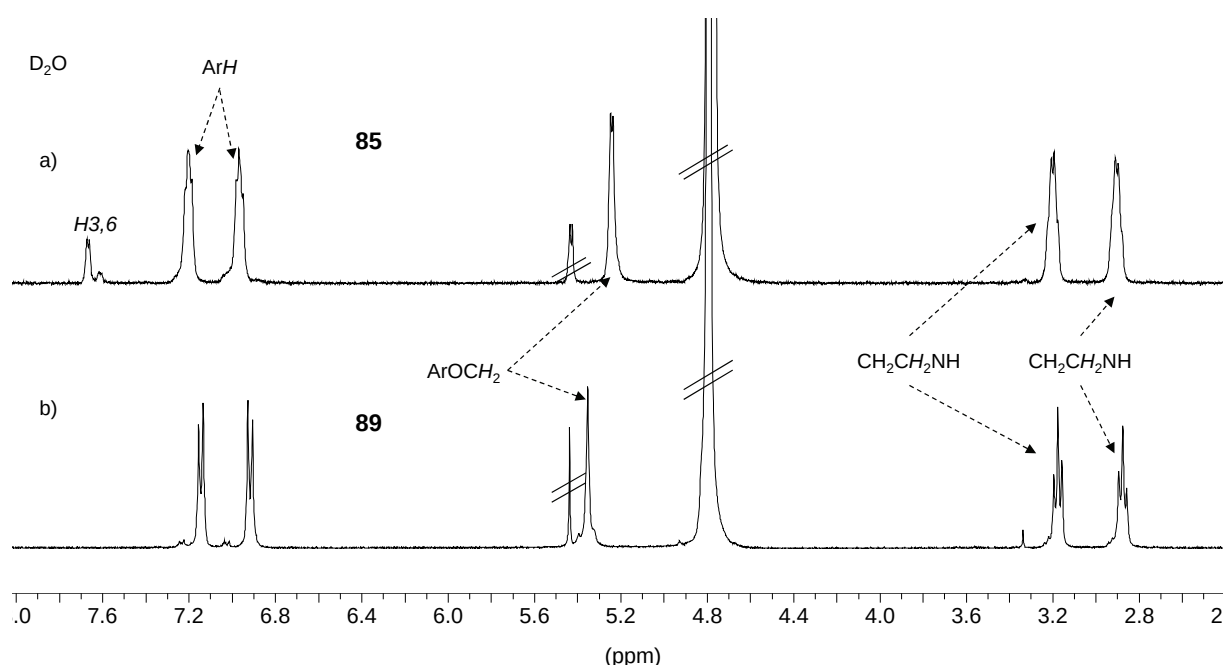


Fig. 33 : Spectres RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) des composés **85** et **89**.

La figure 34 représente le spectre RMN ^{13}C de **85** dans le $\text{DMSO}-\text{D}_6$. Nous notons le masquage du groupe CH_2NH_3^+ par le signal de résonance du solvant, et devinons le carbonyle des groupes trifluoroacétates vers 160 ppm.

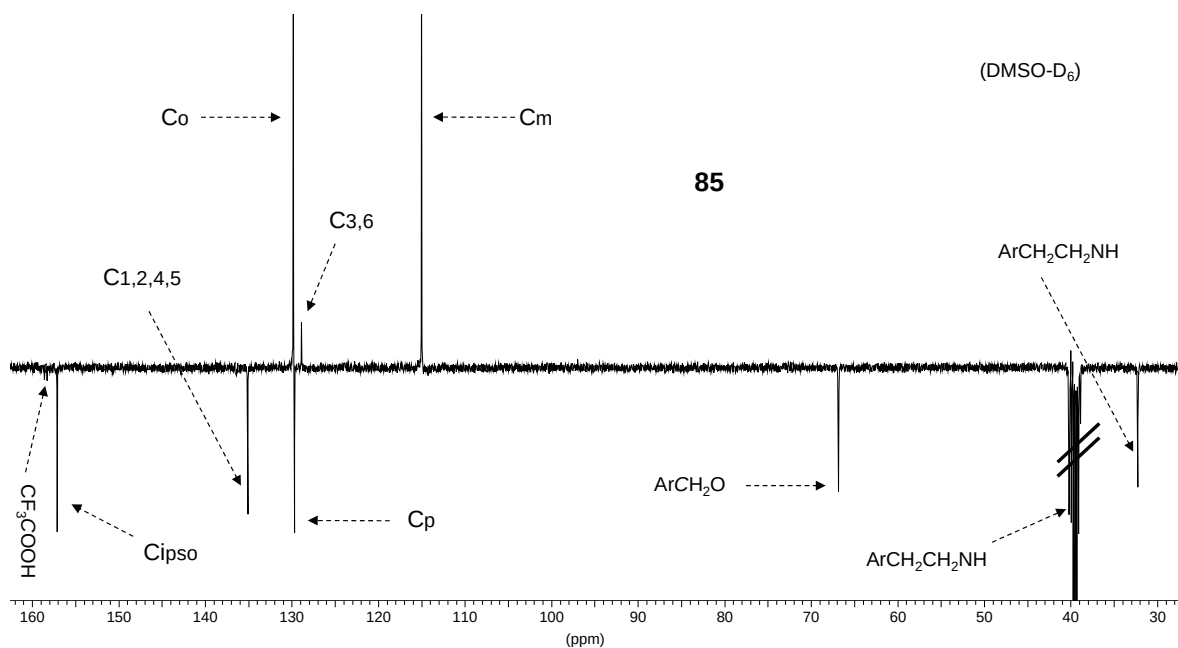


Fig. 34 : Spectres RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6) du composé **85**.

- **Etape 3 :** Nous avons ensuite procédé à la création des fonctions guanidines selon la méthode N° 2. (Fig. 35).

Nous avons obtenu les deux intermédiaires **86** et **90** avec des rendements respectifs de 58 et 85%.

Leurs spectres RMN ^1H sont représentés en figure 36, et sont conformes à nos attentes. Les signaux correspondant aux guanidines sortent dans tous les cas à environ 8.36 et 11.30 ppm (**86** et **90**).

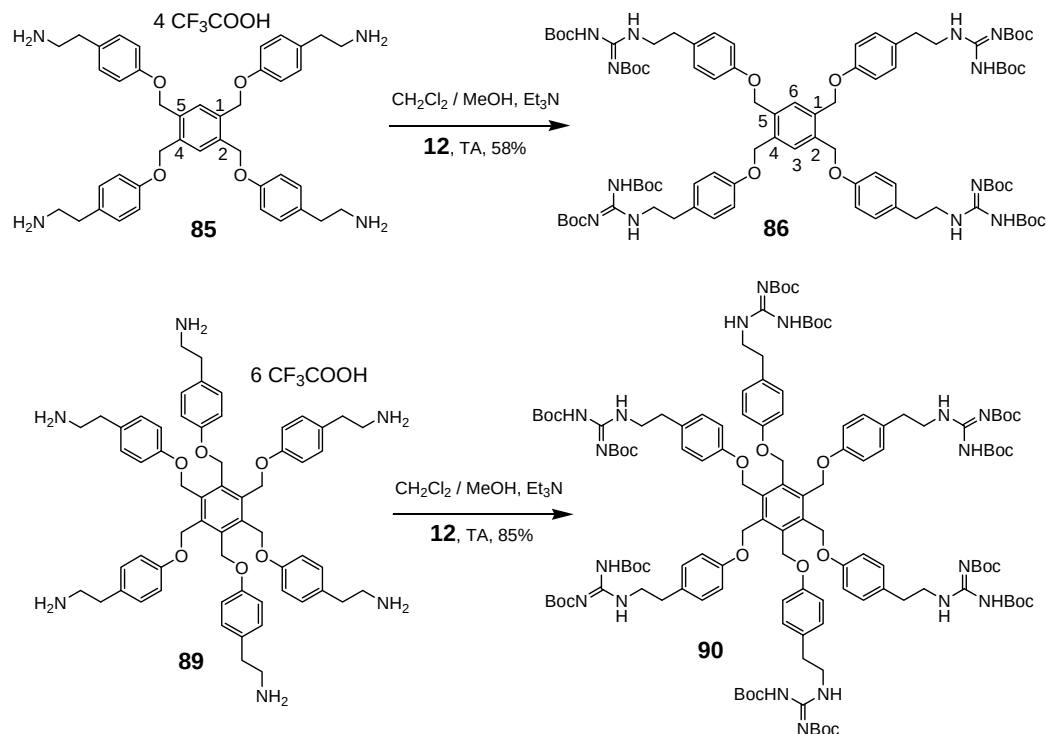


Fig. 35 : Synthèse du 1,2,4,5-tétrakis-[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy-méthyl]benzène **86** et de l'hexakis-[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy-méthyl]benzène **90**.

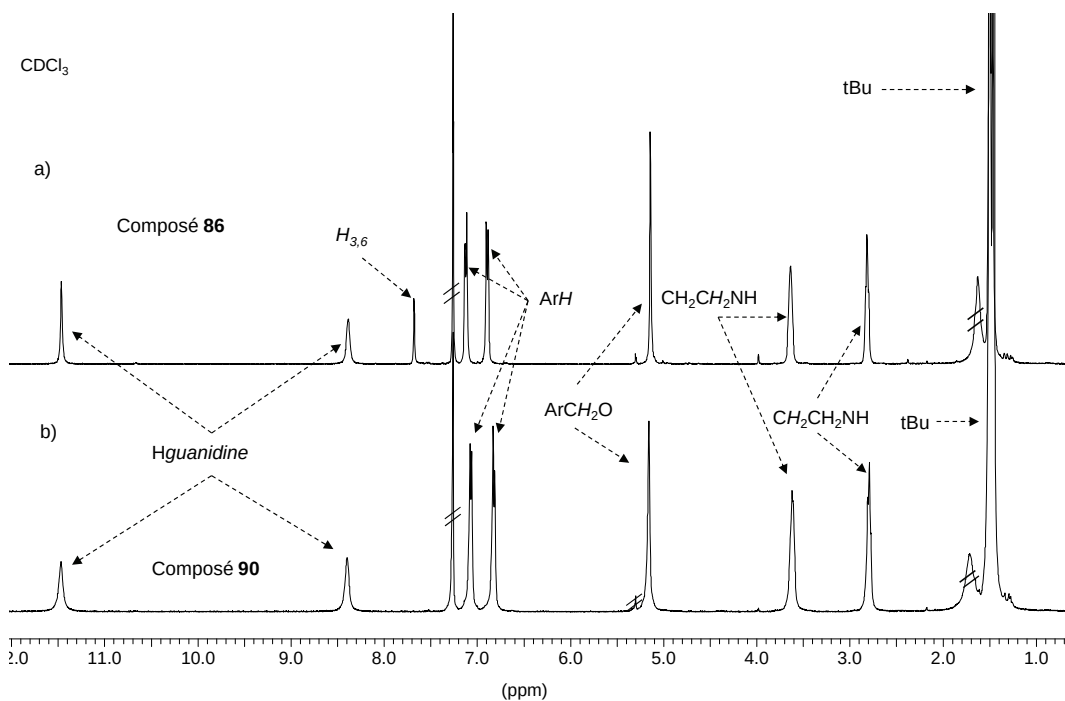


Fig. 36 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , TA) des composés a) **86** et b) **90**.

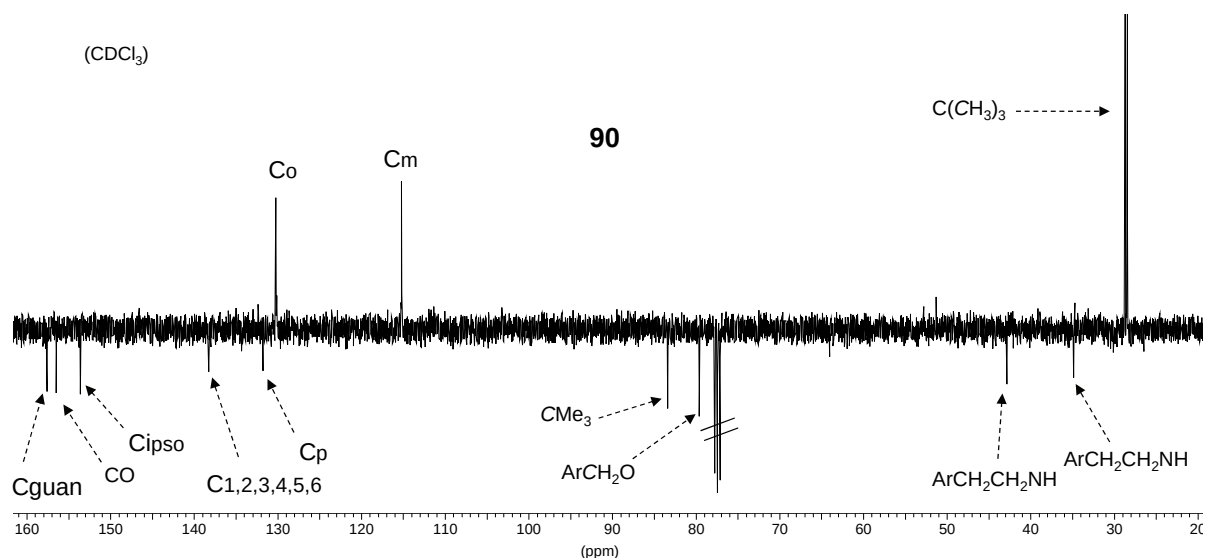


Fig. 37 : Spectres RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TA) du composé **90**.

L'étude par spectrométrie de masse électrospray mode positif ne montre pas de dégradation particulière pour le composé tétrasubstitué **86** qui apparaît sous ses formes mono-ionisées $[\text{M} + \text{H}^+]^+$, $[\text{M} + \text{Na}^+]^+$, et $[\text{M} + \text{K}^+]^+$, à 1643.8, 1666.8 et 1681.8 u.m.a., respectivement, contrairement au dérivé **90** qui exhibe outre un pic moléculaire $[\text{M} + \text{H}^+]^+$ à 2427.3 u.m.a., un pic à 2327.3 u.m.a. attribué à l'entité monochargée $[\text{M} - (\text{CO})\text{OCMe}_3 + \text{H}^+]^+$, ainsi qu'un ensemble de pics di- et tri-chargés dont les interprétations sont données en partie expérimentale.

▪ **Etape 4 :** la déprotection des groupements guanidines est effectuée dans les conditions déjà présentées (CH_2Cl_2 / TFA 85 :15, TA). Après le traitement de purification par précipitations et lavages à l'éther éthylique, suivis d'une lyophilisation, le 1,2,4,5-tétrakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy-méthyl]benzène **87** et l'hexakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy-méthyl]benzène **91** sont obtenus avec des rendements de 74% et 83%, respectivement (Fig. 38).

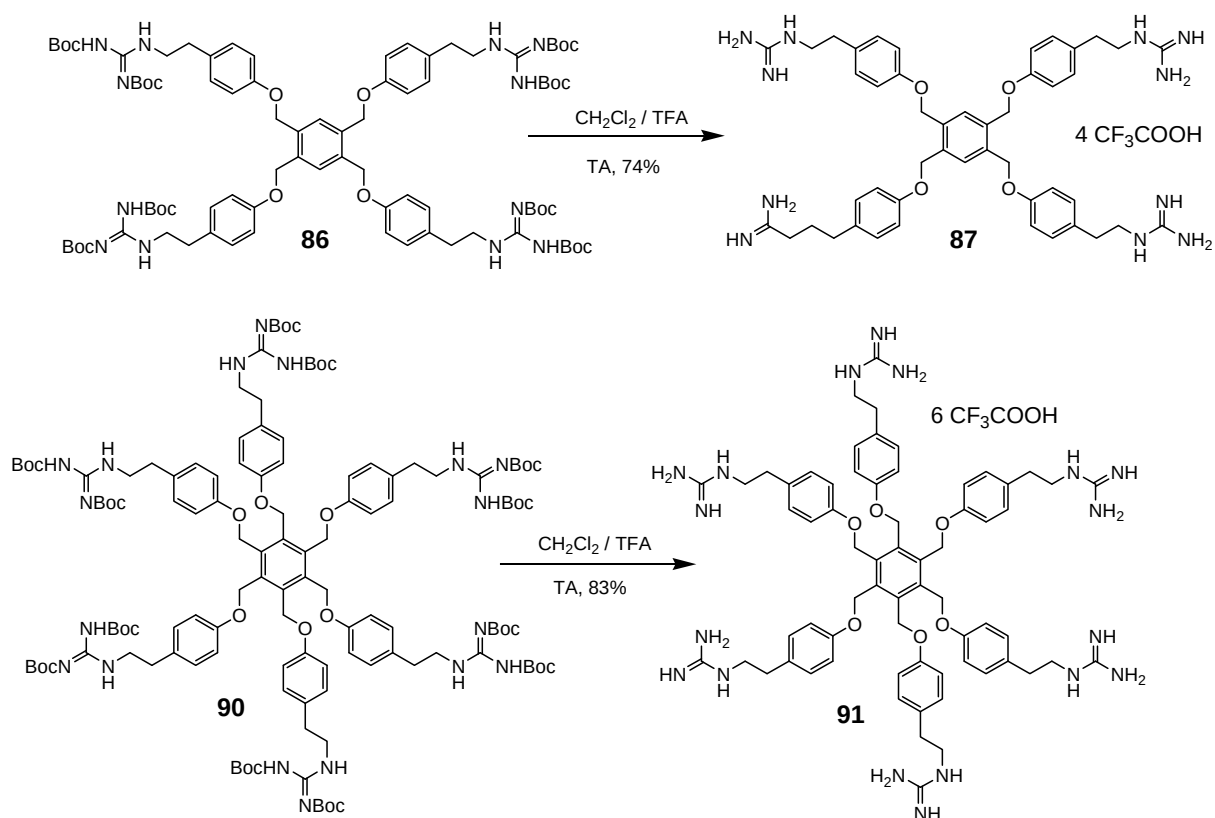


Fig. 38 : Synthèse du 1,2,4,5-tétrakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxyméthyl]benzène **87** et de l'hexakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxyméthyl]benzène **91**

IV.5.2. Analyses des composés **87** et **91**

- RMN ^1H

Les spectres RMN ^1H (400 MHz, TA) de ces deux composés ont été effectués dans D_2O ainsi qu'interprétés en figure 40.

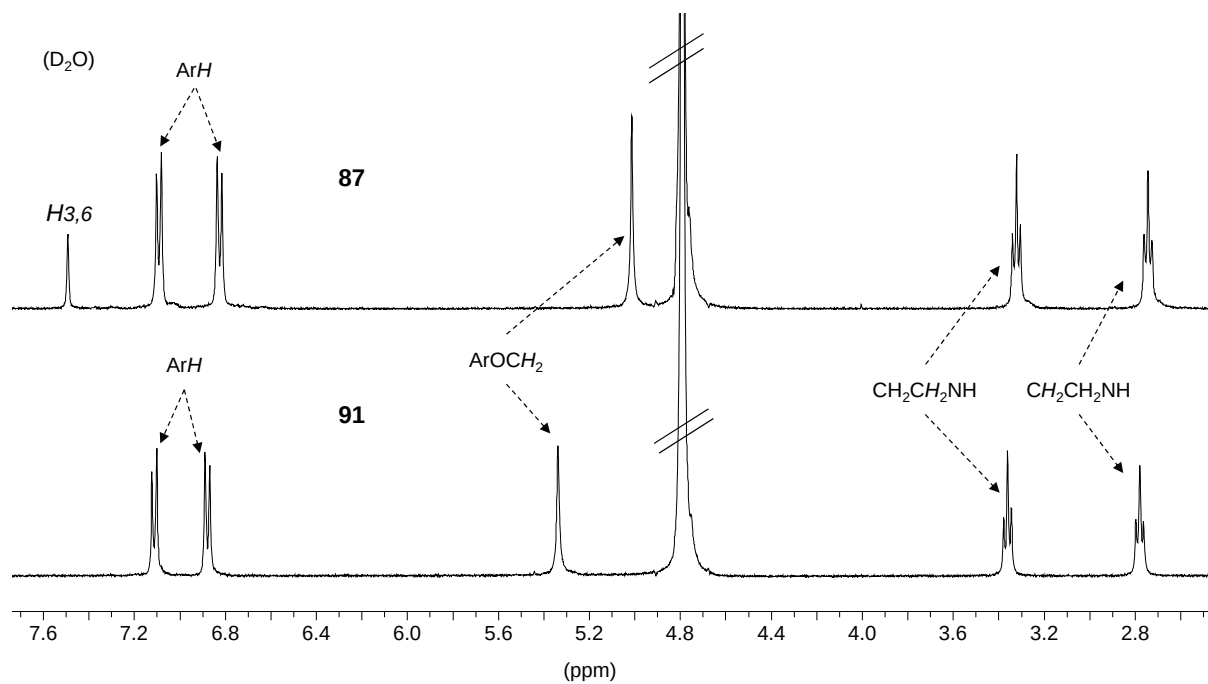


Fig. 39 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, D_2O , TA) des composés a) **87** et b) **91**.

▪ RMN ^{13}C :

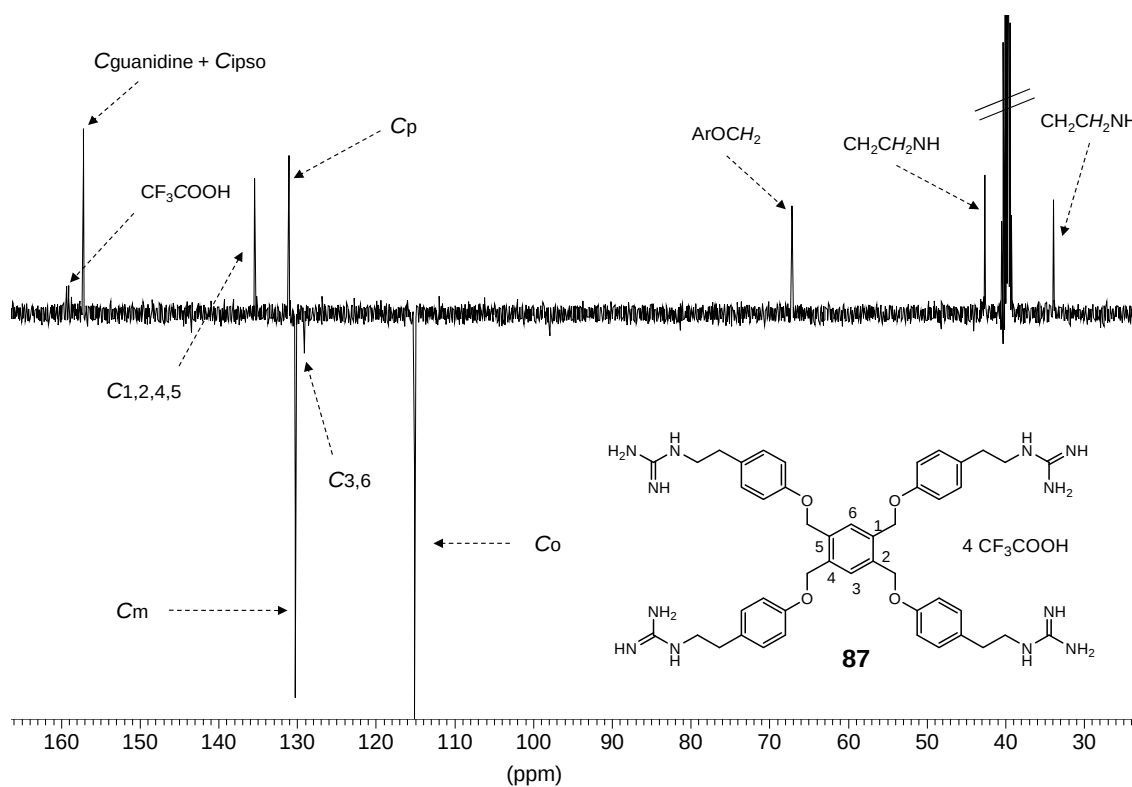


Fig. 40 : Spectre RMN ^{13}C du composé **87** (100 MHz, DMSO-D_6 , TA).

Nous avons choisi de présenter en figure 40 le spectre RMN ^{13}C interprété du composé **87** (100 MHz, DMSO- D_6 , TA).

- Les analyses élémentaires de ces deux sels donnent les résultats suivants :

-Le composé tétra-guanidylé **87** répond à la formule brute $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{O}_4\text{N}_{12}$, 4 CF_3COOH , H_2O pour une masse molaire de 1317,13 g /mol.

-L'hexa-guanidylé **91**, a pour formule brute $\text{C}_{66}\text{H}_{84}\text{N}_{18}\text{O}_6$, 6 CF_3COOH , 2.5 H_2O pour une masse molaire de 1954.66 g /mol.

- La spectrométrie de masse réalisée en électrospray mode positif, donne des profils conformes à nos attentes, ainsi que représenté (spectre en haute résolution) en figure 41 pour le composé tétra guanidinium **87** et figure 42 pour **91**. Les interprétations complètes sont données en partie expérimentale.

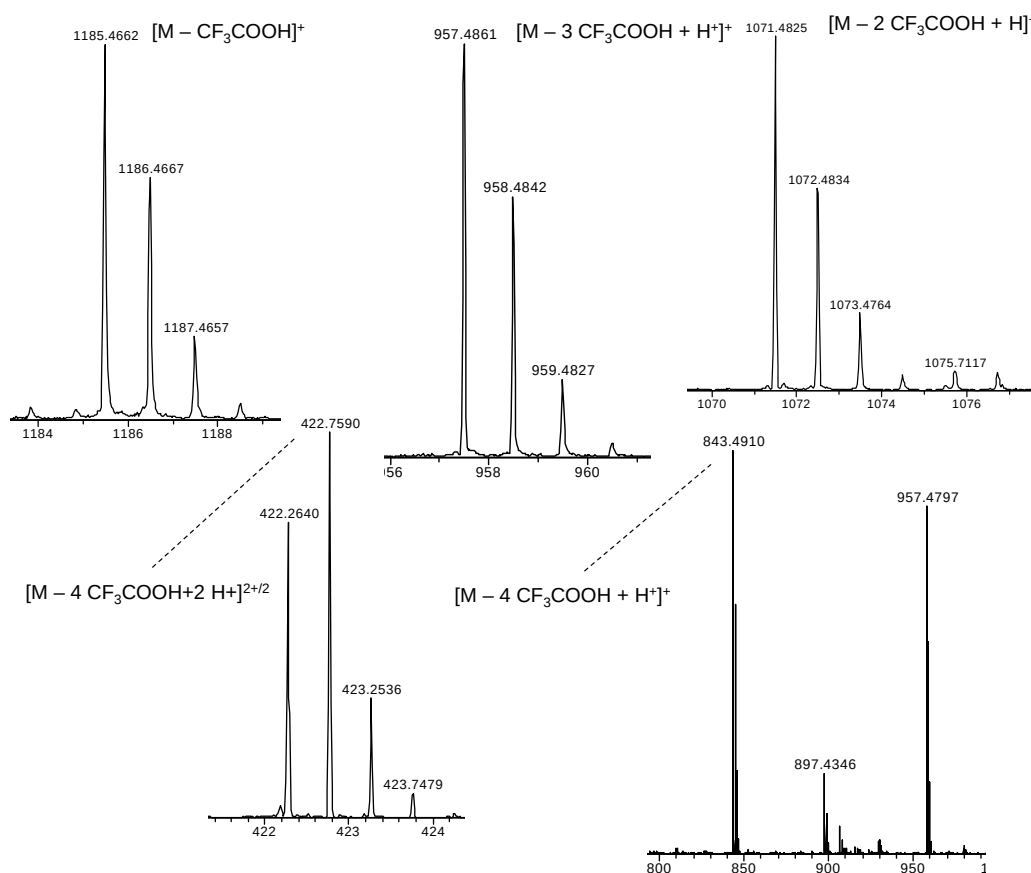


Fig. 41 : Spectre électrospray mode positif du composé **87**. Présentation par parties.

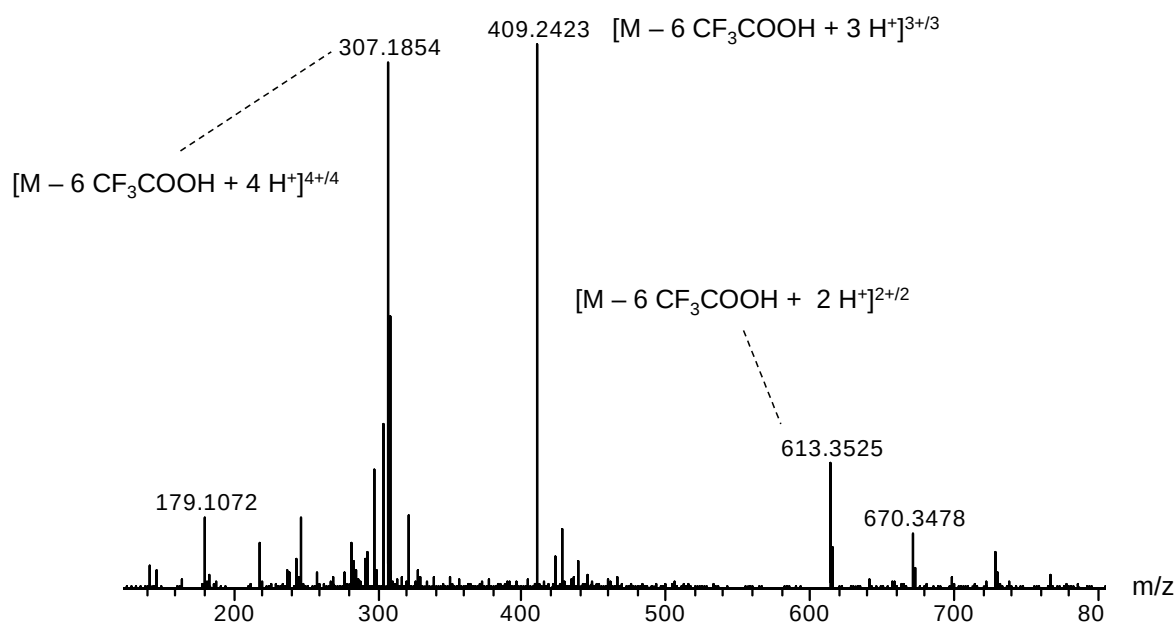


Fig. 42 : Spectre électrospray mode positif du composé **91**.

IV.6. Conclusion et perspectives

Nous avons réalisé la synthèse de 6 nouveaux composés porteurs de bras guanidinium autour d'une structure organisatrice de type benzène. Ces composés se différencient les uns des autres par le nombre de bras guanidiniums qui y ont été incorporés ($n = 1 ; 2 ; 3 ; 4$ et 6), et de leur position autour du cycle central. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre **V**.

Parmi les travaux restant à effectuer, il serait intéressant pour compléter cette famille de développer les dérivés suivants : bis-1,4; tris-1,2,3 et -1,2,4; tétra -1,2,3,5 et -1,2,3,4; penta -1,2,3,4,5.

Certains d'entre eux sont en cours de préparation (bis-1,4 et penta-1,2,3,4,5), les autres nécessitent un accès au (n)-méthylbenzènes correspondants que nous n'avons pas eu le temps d'élaborer.

Les produits « guanidinium » décrits dans ce chapitre seront l'objet d'étude microbiologiques dont les résultats sont présentés dans le chapitre **V**.

Références bibliographiques

- 1) M. Mourer, R.E Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Fonctional Organisation and Gain of Activity: The case of the Antibacterial tetra-*para*-guanidinoethyl-calix[4]arene". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 296-63.
- 2) R. Duval, M. Grare, M. Mourer, J. -B. Regnouf de Vains; "Nouveaux composés, leur utilisation comme médicaments, et leur procédé de préparation". FR 2933692, 2008 ; WO 2010004231.
- 3) C. Schmuck, M. Schwegmann; "A Molecular Flytrap for the Selective Binding of Citrate and Other Tricarboxylates in Water". *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3373-3379.
- 4) J. Li, D. Liu, Y. Li, C.S Lee, H.L Kwong, S. Lee; "A High Tg Carbazole-Based Hole-Transporting Material for Organic Light-Emitting Devices"; *Chem. Mater.* **2005**, *17*(5), 1208-1212.

Chapitre V

EVALUATIONS BIOLOGIQUES

V.1. Cibles d'action de molécules antibactériennes

L'utilisation routinière d'antibiotiques et d'antiseptiques sont à l'origine de résistances de plus en plus accrues des bactéries, ce qui constitue la cause majeure d'infections nosocomiales. Cependant, très peu d'antibiotiques ont vu le jour ces dernières années. Découvrir de nouvelles thérapeutiques, avec un mécanisme d'action innovant, devient indispensable, afin de contourner les mécanismes de résistance actuels des bactéries.

Dans ce contexte, une partie des recherches faites au sein du GEVSM est dédiée au développement de nouveaux agents anti-infectieux, antiviraux [1-4] ou antibactériens [5,6].

Les structures qui ont été développées au cours de cette thèse, devraient avoir pour cibles :

- La paroi : dérivés du CX1, prodrogues hydrosolubles et poly-guanidiniums étoilés.
- l'ADN gyrase : Prodrogue hydrosoluble de quinolone.

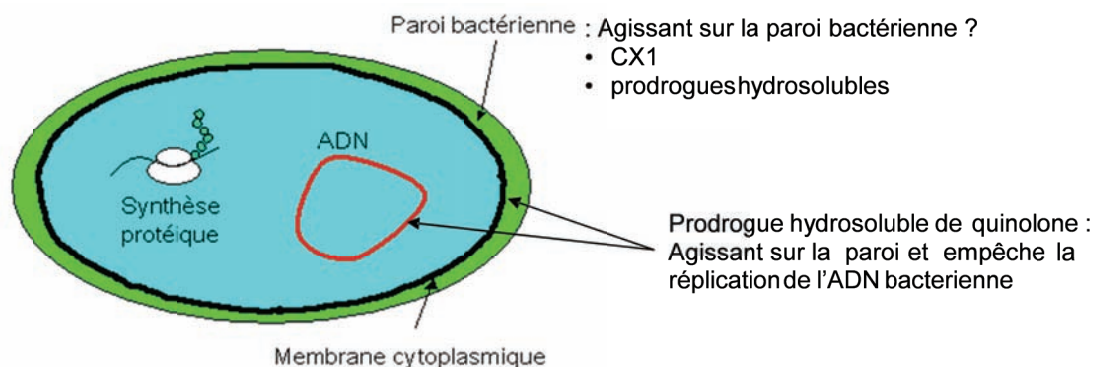


Fig. 1 : L'approche développée au GEVSM.

Une des approches antibactériennes développées au laboratoire repose sur l'hypothèse que, face à la charge globale nette de surface réputée négative chez les bactéries, l'opposition d'un ensemble pré-organisé et contraint spatialement de contre-charges positives, pourrait entraîner la réorganisation des anions de surfaces,

et de ce fait la désorganisation des parois et membranes bactériennes. Cette approche supramoléculaire devrait résulter en un effet délétère sur les bactéries.

Une représentation simpliste à l'extrême est donnée en figure 2.

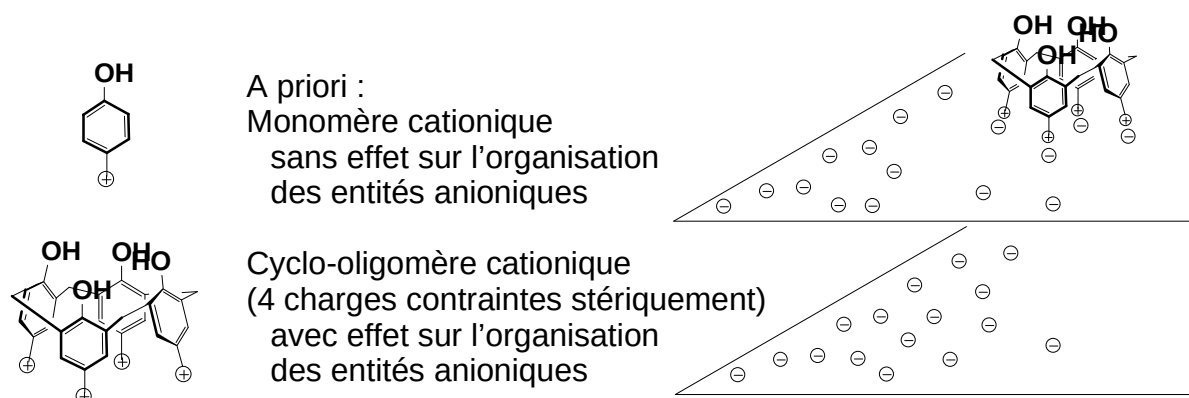


Fig. 2 : Représentation d'une préorganisation de **CX1/13** et son analogue monomérique **D** [5].

En effet, les nombreux travaux réalisés en microbiologie au sein du GEVSM, [5-11] montrent que la pré-organisation de monomères *para*-guanidinoéthylphénol en un tétramère cyclique tétra-*para*-(guanidinoéthyl)calix[4]arène **CX1/13**) (Fig. 2) résulte en la genèse d'une activité antibactérienne remarquable.

Ces mêmes travaux ont démontré que le *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène (**CX1 / 13**) apparaît comme un agent thérapeutique potentiel, conjuguant une activité antibactérienne très élevée à une *quasi*-absence de cytotoxicité sur les cellules eucaryotes HaCaT et MRC-5 [7,8].

D'autres composés de type **CX1/13** intégrant des systèmes bis-hétérocycliques (2,2'-bipyridine et 2,2'-bithiazoles) ont été également développés, intégrant une partie de ce travail de thèse [6]. Les études microbiologiques qui ont été faites sur ces composés ont confirmé l'importance de la pré-organisation des charges positives par la structure calixarénique.

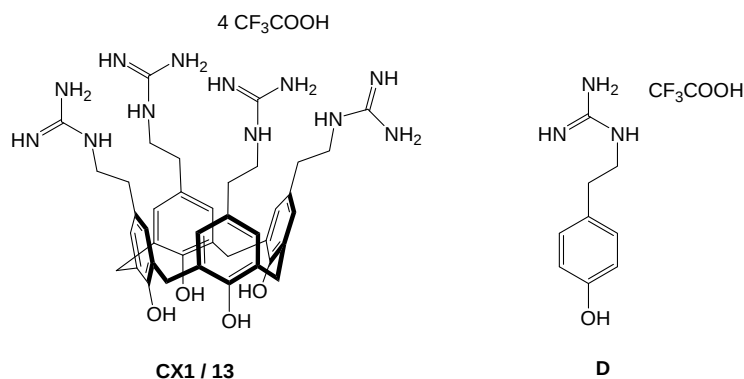


Fig. 3 : Structure du **CX1** et son analogue monomérique **D**.

V.2. Généralités sur les structures constantes, vitales des bactéries.

Les bactéries, coques, bacilles voire formes plus complexes sont caractérisées par des structures constantes qui sont indispensables à la vie cellulaire mais peuvent aussi avoir un rôle de virulence [12].

Ces structures vitales comprennent les structures d'enveloppe, de paroi et membrane cytoplasmique, ainsi que l'appareil nucléaire bactérien et les ribosomes dispersés dans le cytoplasme.

V.2.1. La paroi bactérienne

Un élément important de la bactérie est sa paroi cellulaire, c'est une structure vitale. Excepté les mycoplasmes et quelques archaebactériens, la plupart des bactéries ont une paroi qui est le support de la rigidité, de la forme bactérienne et qui a un rôle de protection.

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram négatif et Gram positif) (Fig. 4) basé sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence grâce à la coloration de Gram.

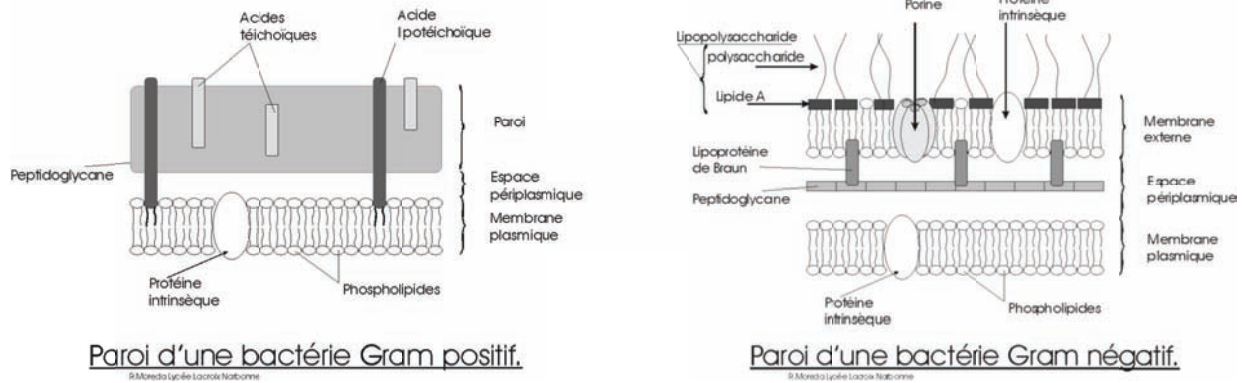


Fig. 4 : Schéma descriptif des enveloppes bactériennes [13].

V.2.1.1. Paroi des Gram positif

Les bactéries à Gram positif possèdent une paroi cellulaire contenant un peptidoglycane épais (20-80 nm), associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polysaccharidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...etc), ces dernières conférant aux bactéries une charge globale nette de surface négative [9].

V.2.1.1.1. Acides teichoïques (Gram +)

Les figures 5 et 6 représentent les structures chimiques des acides téichoïque et lipotéichoïque, présents dans la paroi des Grams positifs. Leur charge négative (PO_4^{2-}) est essentielle pour le maintien et la régulation près de la paroi une concentration en cations favorables.

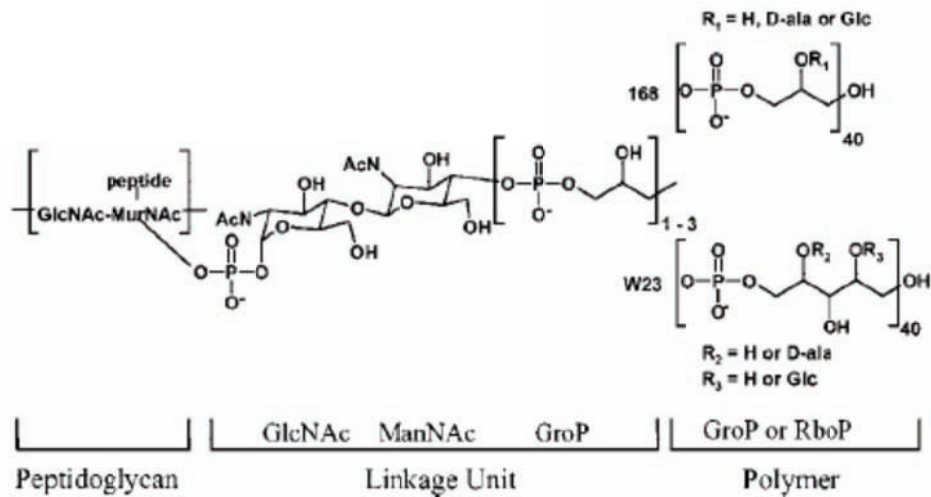


Fig. 5 : Structure chimique de l'acide téichoïque [14].

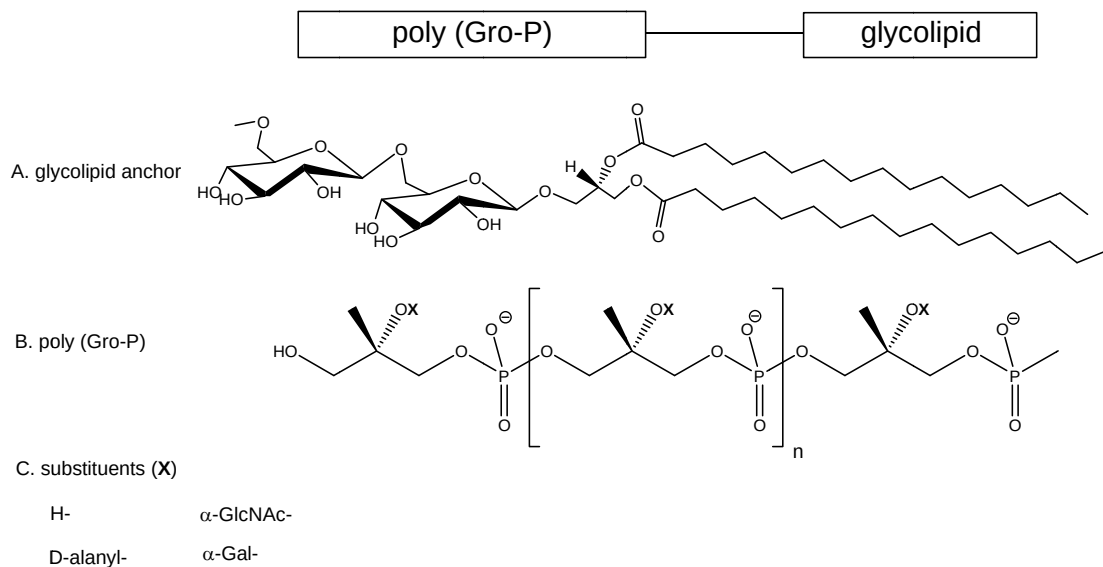


Fig. 6 : Structure chimique de l'acide lipotéichoïque [15].

V.2.1.1.2. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane (ou muréine, ou mucocomplexe, ou mucopeptide) forme la paroi bactérienne. Il est constitué en réseau tridimensionnel rigide mais, poreux au travers duquel les substances vont pouvoir diffuser. Sa structure est relativement identique chez les bactéries Gram positif et négatif.

Il est formé :

- d'une partie glucidique (polysaccharide) : le polysaccharide est un polymère de glycosaminopeptides dans lequel la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM, spécifique de la paroi bactérienne) sont liés par des liaisons osidiques $\beta(1-4)$.
- Un ensemble de chaînes latérales peptidiques identiques, composés de 4 acides aminés (L-alanine, D-alanine, aciede D-glutamique et acide diaminopimélique) et attachées à l'acide N-acétylmuramique.
- Un ensemble de «ponts interpeptidiques» identiques reliant certaines des chaînes latérales tétrapeptidiques appartenant à des chaînes glycaniques adjacentes assurant la rigidité du peptidoglycane.

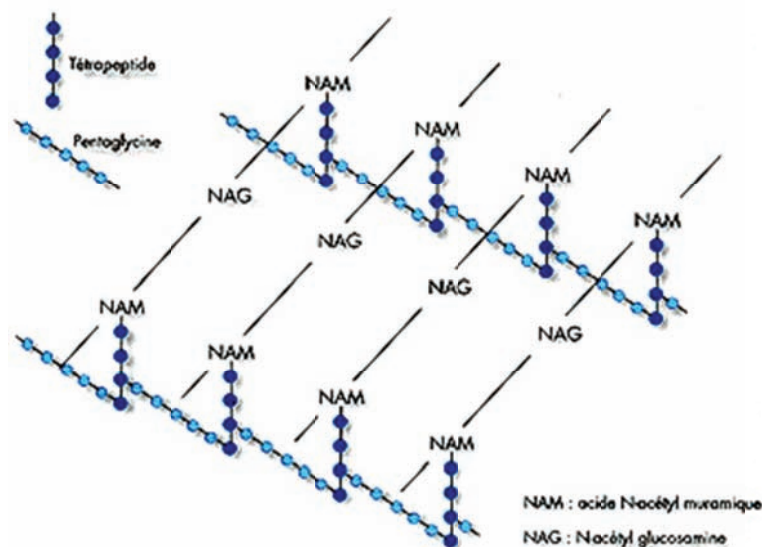


Fig.7 : Structure du peptidoglycane [16].

V.2.1.2. Paroi des Gram négatif

Elle est plus complexe et constitué d'une couche de peptidoglycane fine (7-8 nm) localisé dans le périplasma, entre la membrane cytoplasmique et une membrane cellulaire externe ou des lipoprotéines jouent le rôle de lien (Fig. 4).

V.2.1.2.1. Membrane externe

La membrane externe est située à la surface de l'enveloppe des bactéries Gram négatif. Elle est constituée d'un double feuillet lipidique asymétrique. Le feuillet interne est essentiellement constitué de phospholipides, alors que le feuillet externe contient une majorité de lipopolysaccharides (LPS).

Le lipopolysaccharide (ou LPS) est un composant essentiel (il n'existe pas de mutant sans LPS) de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif : c'est une endotoxine.

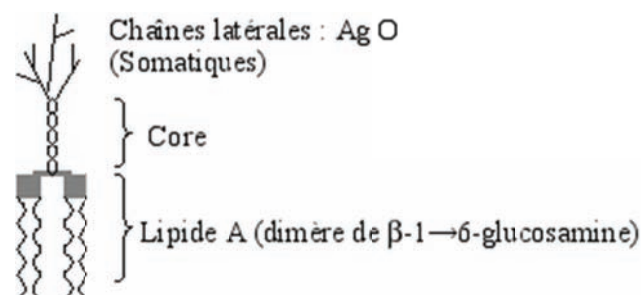


Fig.8 : Structure de la membrane externe.

- L'AgO est spécifique d'une espèce à une autre : il est composé de deux triosides et d'un dioside. C'est un groupement qui se répète de 2 à 40 fois. Son application est le sérogroupage.
- Les chaînes latérales ont une structure qui confère la spécificité antigénique. Lors du passage à l'état R (*rough*) des colonies, ce sont ces chaînes latérales qui sont perdues.

Le LPS induit chez l'homme des signes cliniques (hyperthermie, agrégation des hématies, choc septique – diminution de la pression artérielle). C'est la partie *lipide A* qui est considérée comme la plus toxique (action sur les granulocytes et les cellules épithéliales).

L'antigène représenté par le LPS permet le sérogroupage, étape essentielle dans l'identification des *Enterobacteriaceae* notamment des *Salmonella*. Dans la recherche fondamentale, le LPS est beaucoup utilisé pour induire l'inflammation tel

que l'induction de la Cyclooxygénase-2 sur des cellules ou des organes en culture, généralement il est utilisé à une concentration de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

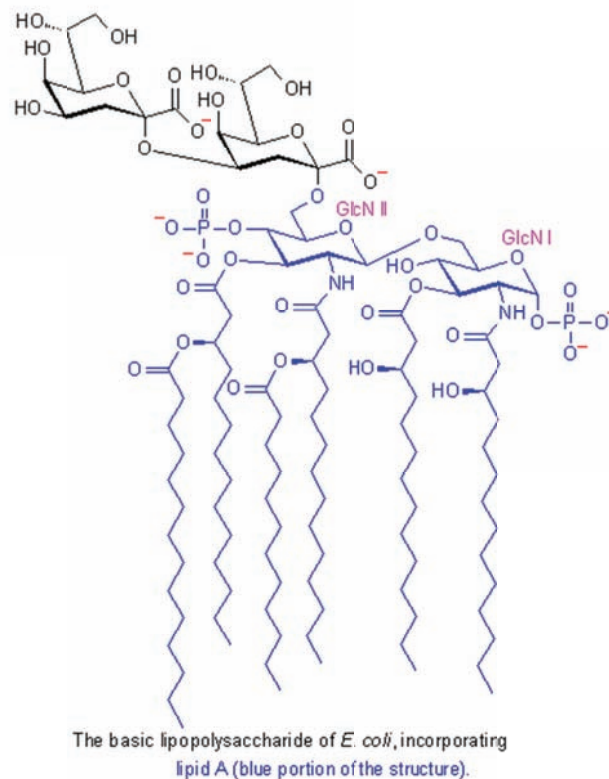


Fig. 9 : Structure d'un lipopolysaccharide [17].

Cette membrane contient également, différents types de protéines, comme par exemple les porines ou d'autres protéines de transport, des enzymes, des protéines intervenants dans le phénomène de conjugaison bactérienne. Il existe également des lipoprotéines de Braun insérées dans le feuillet interne de cette membrane et qui jouent un rôle important dans la stabilisation de la paroi. On peut noter que certaines des protéines de cette enveloppe servent de récepteurs à certains bactériophages, notamment les protéines intervenant dans la conjugaison.

V.2.2. Le cytoplasme

Il présente de nombreux niveaux de complicité structurelle. On y trouve principalement, un chromosome sous forme de filament d'ADN, support de l'hérédité.

De plus, les cellules bactériennes contiennent souvent des molécules d'ADN circulaire extra-chromosomiques appelées plasmides.

Les cellules contiennent aussi de nombreux ribosomes permettant la synthèse protéique grâce au mécanisme de la traduction. Le cytoplasme des procaryotes contient souvent des substances intracellulaires de réserve qui sont des stocks de nutriments sous forme de glycogène, amidon ...etc.

V.3. Les antibiotiques

Les substances antibiotiques sont des agents strictement antibactériens dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique. Ce sont donc des "médicaments" qui ont pour effet soit d'empêcher la prolifération des bactéries, soit de les tuer de façon ciblée. On parlera selon le cas d'antibiotiques "bactériostatiques" ou "bactéricides".

Il existe actuellement divers antibiotiques qui agissent sur la paroi bactérienne, sur la membrane cytoplasmique ou sur divers organites intracellulaires (Fig. 10)

Inhibition de la synthèse des protéines

MLSK, Phénicolés, Oxazolidinones,
Aminosides, Tétracyclines (tigécycline),
Acide fusidique

Paroi bactérienne : Inhibition de la synthèse de la paroi

β -lactamines
Glycopeptides
Fosfomycine

Agissant de façon indirecte sur une ou des voies métaboliques

Sulfamides et diaminopyridines
Nitro-5-imidazolés
Nitrofurantoïne

Membrane cytoplasmique : Agissant au niveau de la membrane

Polymyxines
Daptomycine

Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

Quinolones – Fluoroquinolones,
Rifamycines.

Fig. 10 : Cible d'action des principaux antibiotiques.

❖ Les quinolones

Les quinolones ciblent l'ADN gyrase et la topoisomérase II et IV, empêchant la réplication de l'ADN bactérien. Leur mode d'action comprend un effet oxydant sur les bactéries, mais leur effet principal est dû à la fixation de la molécule quinolone sur l'ADN lors de la phase de duplication de l'ADN au cours de la mitose. La topoisomérase II est la protéine qui permet à une bactérie ne mesurant que 2 μm sur 1 μm en moyenne de contenir un ADN long de 1700 μm (effet de surenroulement de l'ADN sur lui-même). L'inhibition de la topoisomérase II induit des cassures dans l'ADN (effet clastogène). Les quinolones se fixent par ailleurs sur les extrémités des brins d'ADN qui ne peuvent plus se réassembler. Cette formation d'un complexe ADN-quinolones est irréversible. L'étape suivante est celle de la mort cellulaire programmée (apoptose). Il semble cependant que de nombreux cas, la bactérie ne meure pas immédiatement : encore présente dans l'organisme, elle ne peut plus se reproduire. Cela pourrait expliquer le remarquable effet post-antibiotique que l'on observe avec les fluoroquinolones, effet qu'aucune étude n'explique de manière satisfaisante à ce jour.

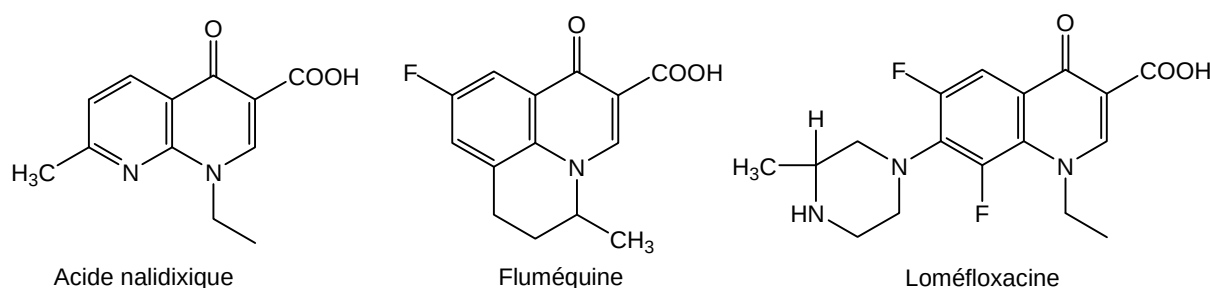


Fig. 11 : Exemples de quinolones.

V.4. Matériels et méthodes

L'ensemble des manipulations de microbiologie : évaluation des activités antibactériennes et des cytotoxicités, dont nous présentons ci-après les méthodologies, ont été effectuées par le Groupe de Microbiologie Moléculaire du GEVSM (Pr. C. Finance, Dr R.E. Duval, S. Fontanay technicien/doctorant, et M. Grare en doctorat jusqu'en 2009).

V.4.1. Souches bactériennes utilisés

• Selon les recommandations conjointes du « comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie » (CA-SFM) [18] et du « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI, anciennement « National Committee for Clinical Laboratory Standards » ou NCCLS) [19], cinq souches bactériennes de référence ont été utilisées pour nos études :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923
- deux *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 et ATCC 29313)
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Les différentes souches sont cultivées soit en bouillon Muller Hinton (Difco, 275730) à 35°C soit sur gélose Mueller Hinton (Difco, 225250).

V.4.2. Détermination des CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode standardisée de microdilution en milieu liquide (microplaque 96 puis à fond «U», Greiner), en bouillon Mueller-Hinton, avec un inoculum final de 10^5 - 10^6 UFC (Unités Formant Colonies)/mL, en fonction des espèces bactériennes, conformément aux recommandations du CLSI et du CA-SFM.

Chaque CMI a été déterminée au moins trois fois. Pour chacune, trois témoins ont été réalisés :

- Témoin milieu
- Témoin milieu + drogue
- Témoin bactéries.

Chaque drogue a été diluée de façon à obtenir : soit une gamme de 250 à 1 µg/mL (gamme réalisée une fois); soit une gamme de 1024 à 4 µg/ mL. (gamme réalisée deux fois). Les plaques ont étéensemencées avec un inoculum de 10^5 - 10^6 bactéries. La lecture de la turbidimétrie a été effectuée à 18 et 24 h par la lecture de l'absorbance à 540 nm.

V.4.3. Impact sur la viabilité / cytotoxicité

Des études de viabilité / cytotoxicité sur cellules eucaryotes ont été réalisées sur cellules MRC-5 et parfois sur cellules HaCat.

➤ MRC-5 : cellules pulmonaires embryonnaires humaines de type fibroblastique. Elles sont très proches des cellules primaires mais possèdent l'avantage de pouvoir être répliquées un très grand nombre de fois.

➤ HaCat : lignée cellulaire développées à partir de kératinocyte humains. Ces cellules ont une morphologie de type kératinocyte de l'épiderme et correspondent à un modèle de la lignée cellulaire *in vitro* pour l'étude des cancers humains de la peau.

- Tests de viabilité au MTT : le MTT ou bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium, est un colorant pouvant être réduit à différents niveaux de la chaîne respiratoire par des déshydrogénases mitochondriales en cristaux violets de formazan. Ces cristaux sont ensuite solubilisés à l'aide de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) puis quantifié par un lecteur de plaques à 540 nm, l'absorbance obtenue est proportionnelle au nombre de cellules viables.

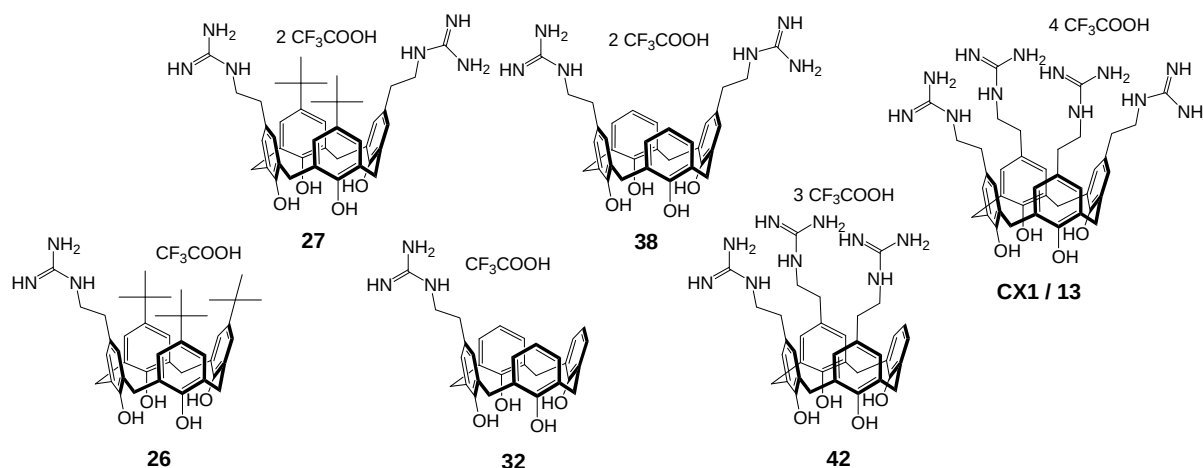
- Tests de Cytotoxicité au Rouge Neutre : le Rouge Neutre (RN) est un colorant vital, faiblement cationique qui pénètre dans les cellules par diffusion non ionique. Il s'accumule dans les lysosomes des cellules vivantes par un mécanisme actif ou passif. La lecture se fait également par mesure de l'absorbance à 540 nm.

V.5. Les Résultats

V.5.1. Les (n)-para-(guanidinoéthyl)calix[4]arènes

Nous avons repartis en deux groupes les résultats des études microbiologiques faites sur cette famille des calixarènes guanidylés.

Le tableau **1** présente les résultats obtenus avec les analogues du *para*-guanidinoéthylcalix[4]arène **CX1 / 13** (Fig. 3) partiellement substitués sur la partie haute du calixarène (**26**, **27**, **32**, **38** et **42**). Le **CX1 / 13** a été choisi comme principe actif de référence et les CMI, exprimées en µg/mL ont été obtenues sur les souches de références. Nous précisons que la valeur limite de CMI à partir de laquelle un composé est considéré comme non actif a été fixée au laboratoire à 128 µg/mL.



Souches de références CMI (µg/mL)	26	27	32	38	42	CX1/13
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	8	>256	256	32	4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	64	64	>256	32	16	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	64	2	>256	16	16	8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	64	2	>256	8	16	8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	64	4	>256	32	64	32

Tableau 1 : CMI en µg/mL sur souches de références ATCC des composés **26**, **27**, **32**, **38**, **42** et du **CX1 / 13**.

❖ Dérivés tert-butylés

Des deux composés tertio-butylés **26** et **27**, seul le composé **27** peut être considéré comme actif, proche, voire meilleur, de **CX1 / 13**. Par rapport à ce dernier, nous observons une nette amélioration sur les souches Gram positives : les deux *S. aureus*, avec une CMI = 2 µg/mL contre 8 µg/mL, et *E. faecalis* avec une CMI = 4 µg/mL contre 32 µg/mL. Nous notons également une bonne activité sur la souche

Gram négative *E. coli* avec une CMI = 8 µg/mL contre 4 µg/mL, et moyenne sur *P. aeruginosa* avec une CMI = 64 µg/mL contre 32 µg/mL.

Le composé **26**, qui comporte un seul groupement guanidinoéthyle et trois groupes tert-butyles, présente une activité moindre mais non négligeable cependant, sur toutes les souches bactériennes de référence avec une CMI = 64 µg/mL.

De cette première série d'évaluations, il ressort que le composé **27**, intégrant uniquement deux fonctions guanidinoéthyles et deux groupements tert-butyles en position alternée, présente la meilleure activité avec une « préférence » pour les Gram positifs. La présence des groupes tert-butyles peut être responsable de cet état en augmentant le paramètre coefficient de partage (lipophilie plus élevée) par rapport au **CX1 / 13**.

❖ Dérivés sans tert-butyles

Les dérivés non tert-butylés **32**, **38** et **42** sont moins actifs que le **CX1 / 13**, mais aussi moins actif que **27**. **32**, avec des CMI supérieures à 256 mg/mL, doit être considéré comme inactif. Toutefois, les composés **38** et **42** décorés de 2 et 3 groupements guanidinoéthyles sur le calix[4]arène présentent des CMI intéressantes, inférieures ou égales à 64 µg/mL, sur l'ensemble des souches de références.

❖ Bilan

L'évaluation de l'impact du nombre de groupements guanidinoéthyles sur la partie haute de calix[4]arène, avec ou non présence de groupes tert-butyles aux places laissées libres montre que les composés synthétisés sont tous actifs (sauf **32**), avec des CMI inférieures ou égales à 64 µg/mL (sauf **38** sur *E. coli*). Certains d'entre eux sont proches de composé de référence **CX1 / 13**.

Les résultats du tableau 1 permettent d'évoquer un rôle intéressant des groupes tert-butyles sur l'exacerbation d'activité.

Le composé bis-guanidinoéthyle bis-tert-butyle **27** est le plus proche de **CX1 / 13**, le dépassant sur les souches Gram positives. Son homologue non tert-butylé **38** est nettement moins performant, notamment sur *E. coli* (CMI = 256 µg/mL).

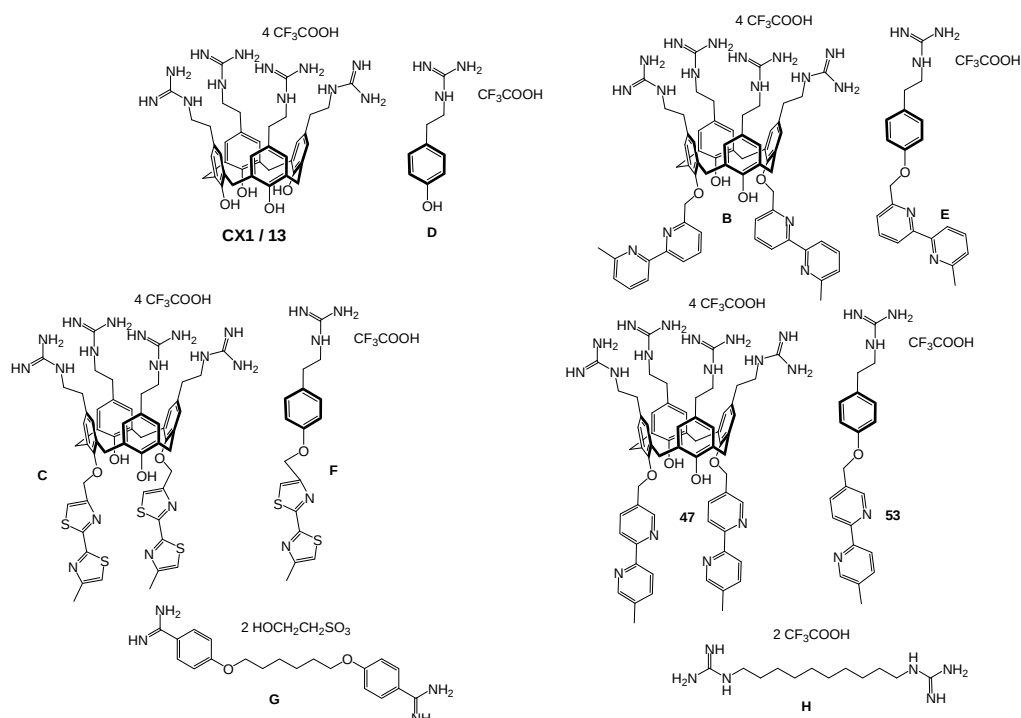
La comparaison des deux dérivés monoguanidinoéthyle **26** et **32** montre aussi une meilleure activité antibactérienne du composé **26**, par rapport à son analogue sans tert-butyle **32**.

Nous n'avons pas, à l'heure actuelle, obtenu le dérivé tris-guanidinoéthyle mono-tert-butyle. Son analogue **42** présente des activités intéressantes mais inférieures à celles du **CX1** / **13**, et du composé **27**. Nous devons noter cependant que **42** exhibe la meilleure activité sur la souche Gram négative *P. aeruginosa* ATCC 25923 (CMI = 16 µg/mL contre 32 ou 64 µg/mL pour les autres composés)

❖ Développements

Les développements en cours ou en prévision reposent sur l'accès aux structures manquantes pour compléter la famille : le tris-guanidinoéthyle mono-tert-butyle, les deux dérivés bis-guanidinoéthyle adjacents. D'autres développement portent sur la nature du substituant alkyl afin d'évaluer le rôle de la longueur de chaîne et ses ramifications sur l'activité antibactérienne, et la mesure du coefficient de partage de ces dérivés est envisagée à court terme. L'obtention des concentrations cytotoxiques de ces composés permettra l'évaluation des Index de Sélectivité ($IS = CC_{50} / CMI$), essentiels pour développer une molécule dans le champ thérapeutique.

Le deuxième groupe de résultats concernant les (guanidinoéthyl)calixarènes provient de l'étude microbiologique du dérivé bis-(5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine **47** et de son analogue monomérique **53**. Le tableau 2 résume les résultats obtenus en présentant les CMI déterminées vis-à-vis des souches de références. Dans ce même tableau, nous avons rappelé les CMI de trois composés analogues à **47** (les composés **13** / **CX1**, **B** et **C**), des monomères respectifs **D**, **E** et **F**, de la synthaline **A** et l'hexamidine **G** [2,6].

Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) in $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. Faecalis</i> ATCC 29212
CX1/13 (1239.0)	4 (3.2)	32 (26.0)	8 (6.5)	8 (6.5)	32 (26.0)
D (293.24)	512 (1750.0)	>512 (1750.0)	512 (1750.0)	512 (1750.0)	>512 (1750.0)
B (1867.53)	16 (8.6)	16 (8.6)	16 (8.6)	16 (8.6)	16 (8.6)
E (532.47)	128 (240.0)	128 (240.0)	16 (30.0)	8 (15.0)	64 (120.2)
47 (1885.56)	32 (17)	32 (17)	8 (4.2)	8 (4.2)	8 (4.2)
53 (475.46)	8 (16.8)	128 (270)	8 (16.8)	4 (8.4)	64 (135)
C (1695.49)	16 (9.5)	16 (9.5)	8 (4.7)	16 (9.5)	8 (4.7)
F (487.52)	64 (131.3)	128 (262.5)	16 (33.0)	8 (16.4)	64 (131.3)
G (498.45)	8 (12.0)	32 (47.9)	4 (6.0)	< 1 (1.5)	2 (3.0)
H (668.22)	64 (128.4)	128 (256.8)	64 (128.4)	16 (32.0)	2 56 (513.6)

Tableau 2 : CMI en $\mu\text{g/mL}$ et ($\mu\text{mol/L}$) avec le calixarène bis-bipyridine **47** et son monomère **53**, en comparaison avec divers analogues, l'hexamidine **G** et la synthaline A **H**. [6].

On s'aperçoit tous d'abord de l'homogénéité des résultats sur l'ensemble des souches bactériennes, autant sur les souches Gram positives que les Gram négatives. On remarque aussi, que le composé calixarénique bis-bipyridylé **47** que nous avons développé ici exhibe des activités similaires à ses analogues (**CX1 / 13**,

B et **C**) développés par Mourer et al. Il faut noter, une activité de **47** plus prononcée sur les souches Gram positives par rapport aux Grams négatives.

Toutefois, au regard de l'ensemble des résultats du Tableau 2, nous confirmons les observations déjà faites par M. Mourer dans sa thèse : l'introduction de groupes hétérocycliques (6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridyle, 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridyle et 4,4'-diméthyl-2,2'-bithiazole) sur le *tétra-para*-(guanidinoéthyl)calix[4]arène **CX1 / 13** n'est pas source d'amplification du pouvoir antibactérien par rapport à ce dernier.

Par contre, en ce qui concerne le composé monomérique **53**, les résultats montrent que l'introduction d'un groupe 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridyle sur le dérivé monomérique nu **D**, entraîne une amélioration de l'activité antibactérienne en comparaison à ce même dérivé. Nous avons avec le composé **D** des CMI qui sont supérieures à 512 µg/mL, tandis que celles du composé **53** sont de 8 µg/mL pour *E. coli* ATCC 25922 et 4 µg/mL pour *S. aureus* ATCC 29313.

Ce phénomène déjà observé avec les monomères **E** et **F** est à mettre en relation avec l'incorporation d'un système bihétérocyclique apolaire (par rapport au guanidinium), conférant un caractère amphiphile qui pourrait interagir avec la membrane bactérienne, d'une façon différente du monomère « nu » **D**.

Toxicité cellulaire

Les résultats présentés au tableau 3 démontrent que :

- Les composés **47** et **53** ont un impact moins négatif sur la viabilité des cellules MRC-5 en culture, par rapport à leurs analogues calixaréniques bipyridylé **B** et bithiazolé **C**, monomériques **E** et **F** et par rapport aux composés **G** et **H**.
- Les composés **47** et **53** ont un impact plus négatif sur la viabilité des cellules MRC-5 que le **CX1 / 13** et son analogue monomérique **D** (IC₅₀ >128 µg/mL pour **47** et **53** contre IC₅₀ = 256 µg/mL pour le **CX1** et **D**, et ce jusqu'à 48 heures d'exposition.
- Du fait de certains problèmes de troubles rencontrés avec **47** dans le milieu de culture cellulaire des tests au MTT, une méthode de détermination de la viabilité cellulaire par la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) a été employée.

IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)										
	CX1 / 13	D	B	E	43 ^a	57 ^a	C	F	G	H
	1239.0	293.2	1867.5	532.5	1885.5	475.5	1695.5	487.5	668.2	498.5
24 h	256<	256<	16-32	32-64	>128	>128	16-32	64-128	32-64	128-256
48 h	256<	256<	16-32	16-32	>128	>128	16-32	32-64	16-32	8-16
168 h	128-256	32-64	16-32	2-4	nd	nd	16-32	8-16	4-8	<1

a) test LDH

Tableau 3 : Test de viabilité au MTT (a) test au LDH) sur les cellules MRC-5 après 24 heures d'incubation [6].

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. Faecalis</i> ATCC 29212
CX1/ 13	>64	>8	>32	>32	>8
D	>0.5	0.5	>0.5	>0.5	0.5
B	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
E	0.25-0.5	0.25-0.5	2-4	4-8	0.5-1
43	>4	>4	>16	>16	>16
57	16	>1	>16	>32	>2
C	1-2	1-2	2-4	1-2	2-4
F	1-2	0.5-1	4-8	8-16	1-2
G	4-8	1-2	8-16	32-64	16-32
H	2-4	1-2	2-4	8-16	0.5-1

Tableau 4: Détermination de l'indice de sélectivité (IS) à 24 heures, pour les composés **43** et **57** comparés aux composés analogues [6].

Le tableau 4 recense, à côté de ceux des composés apparentés, les index de sélectivités (IS) (IC50 / CMI) calculés pour les composés **47** et **53** à 24 heures. Il apparaît :

- Que les valeurs d'IS obtenues pour le composé **47** sont plus intéressantes que celles de **B** et **D** et ce, quelle que soit la souche bactérienne concernée, et avec une sélectivité de **47** pour les souches bactériennes à Gram positif (IS >16 pour les deux *S. aureus* et *E. faecalis* contre IS >4 pour *E. coli* et *P. aeruginosa*).
- Que les valeurs d'IS de **47** et **53** sont nettement inférieures aux valeurs d'IS du **CX1 / 13**. Donc, le composé **47**, malgré une activité antibactérienne proche du **CX1 / 13** (composé de référence), reste tout de même plus toxique que ce dernier.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude confirment ceux des études préliminaires [5, 6] :

- L'activité antibactérienne du monomère **53** comme celles de ses analogues **E** et **F** est très intéressante car proche de celles des analogues calixaréniques. Le rôle que semble jouer la préorganisation spatiale de monomère *para*-guanidinoéthylphénol (**53**, **E** et **F**) en tétramère cyclique est minimisé, voire annulé pour l'obtention d'une activité antibactérienne. Un mode d'action spécifique des monomères substitués est donc à envisager, et ces composés doivent être considérés comme antibactériens.
- Avec **47**, l'introduction de deux 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridyle sur la partie basse du *tétra-para*-(guanidinoéthyl)calix[4]arène **CX1 / 13** n'apporte pas une modification nette de l'activité antibactérienne du **CX1 / 13**. Ce dernier apparaît donc toujours, dans cette série, comme la meilleure molécule, alliant une très bonne activité antibactérienne à une faible toxicité sur les cellules MRC-5.

V.5.2. Propriétés antibactériennes des prodrogues hydrosolubles

Comme nous l'avons vu, le chapitre III est dédié à la conception d'entités hydrosolubles potentiellement libératrices d'une quinolone antibactérienne, l'acide nalidixique, conférant à ces molécules un caractère affiché de prodrogue.

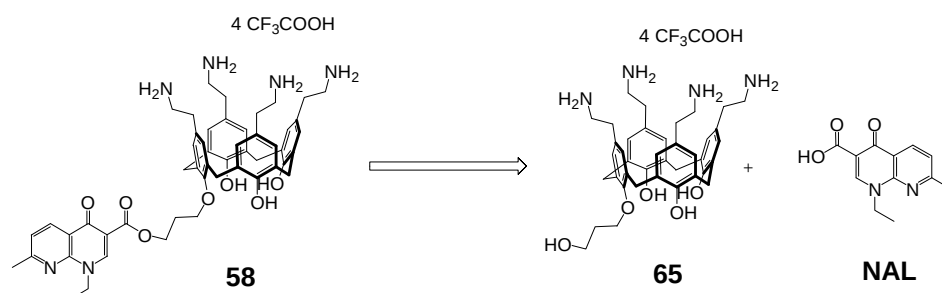
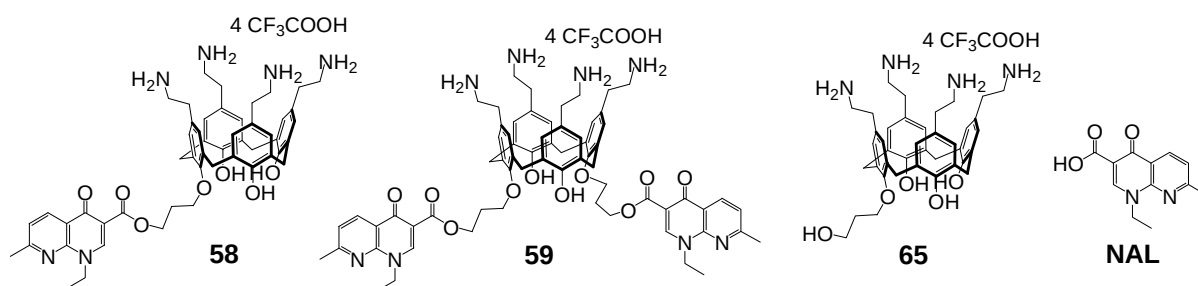


Fig. 12 : schéma théorique de la dégradation du prodrogue **58**.

Nous présentons dans le tableau 5, les CMI en $\mu\text{mol/L}$ et ($\mu\text{g/mL}$) de quatre composés: les prodrogues mono- **58** et bis- **59** nalidixate, l'analogue mono-alcool **65** puis l'acide nalidixique **NAL**. Les tests ont été menés sur deux souches à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853) et trois souches à Gram positif (les deux *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 29213 et *E. faecalis* ATCC 29212).



Souches de références	58 (1396.47)	59 (1721.50)	65 (1164.98)	NAL (232.24)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25 (35)	18.6 (32)	110 (128)	100 (23)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	100 (140)	37.2 (64)	220 (256)	200 (46)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	50 (70)	18.6 (32)	220 (256)	200 (46)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	50 (70)	18.6 (32)	220 (256)	200 (46)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	100 (140)	18.6 (32)	>220 >(256)	200 (46)

Tableau 5 : Valeurs de CMI en $\mu\text{mole/L}$ ($\mu\text{g/mL}$) des composés **58**, **59**, **65** et **NAL** sur les 5 souches bactériennes de références [20].

Les résultats du tableau 5 montrent que :

- l'activité de l'acide nalidixique **NAL** est conforme à la littérature [21], proche des 32 $\mu\text{g/mL}$ recommandés par la NCCLS.
- Les prodrogues mono-nalidixate **58** et bis-nalidixate **59** présentent une activité ($\mu\text{mol/L}$) sur l'ensemble des souches bactériennes (Gram positif et négatif) largement supérieure à celle de l'acide nalidixique (antibiotique de référence **NAL**). Si nous prenons l'exemple d'*E. coli*, nous observons une CMI de 25 $\mu\text{mol/L}$ pour le mono-nalidixate **58** et 18.6 $\mu\text{mol/L}$ pour le bis-nalidixate **59** contre 100 $\mu\text{mol/L}$ pour l'acide nalidixique **NAL** [21].
- Dans l'ensemble, l'activité du dérivé bis-nalidixate **59** est très élevée en regard de celle de **58**.
- L'analogue mono-alcool **65** présente une très faible activité antibactérienne ($>100 \mu\text{mol/L}$).
- L'analyse des CMI rapportées en $\mu\text{g/mL}$ montre que les quantités utiles, notamment pour **59**, sont faibles, de l'ordre de 19 $\mu\text{g/mL}$ (37 pour *P. aeruginosa*).

Ces résultats acquièrent une portée plus grande en faisant l'analyse du tableau 6. En effet, si nous admettons que l'hydrolyse du prodrogue **58** par exemple est totale (100%), nous pouvons donc de fait calculer les quantités théoriques (ou concentrations théoriques en $\mu\text{g/mL}$) de l'alcool **65** correspondant ainsi que celles de l'acide nalidixique (**NAL**) libérées. Ces valeurs sont ensuite comparées aux CMI ($\mu\text{g/mL}$) correspondant au mono-alcool **65** et à l'acide nalidixique **NAL**.

<i>Souches de références</i>	CMI ($\mu\text{g/mL}$) 58	Libération théorique de NAL ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ($\mu\text{g/mL}$) NAL	Libération théorique de 65 ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ($\mu\text{g/mL}$) 65
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35	5.8	23	29.2	128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	140	23.2	46	116.8	256
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	70	11.6	46	58.4	256
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	70	11.6	46	58.4	256
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	140	23.2	46	116.8	>256

Tableau 6 : Comparaison des CMI ($\mu\text{g/mL}$) de **58**, **NAL** et **65** avec les valeurs théoriques libérées de **NAL** et **65** pour une hydrolyse à 100%.

Les résultats du tableau 6 [20] montrent, pour ce qui concerne *E. coli* et *S. aureus*, les concentrations théoriques d'acide nalidixique libéré sont 4 fois plus petites que la CMI de l'acide nalidixique (5,8 µg/mL contre 23 µg/mL pour *E. coli*, et 11.6 µg/mL contre 46 µg/mL pour *S. aureus*), et 2 fois plus petites pour *E. faecalis* et *P. aeruginosa*. Le même calcul effectué pour l'alcool **65** donne des résultats similaires.

Il est donc manifeste que, même en considérant l'hypothèse idéalisée de 100% d'hydrolyse du prodrogue **58**, les valeurs de CMI obtenues pour ce dernier ne sont pas dues uniquement à l'acide nalidixique libéré.

A l'heure actuelle, les hypothèses que nous émettons sont les suivantes :

- a) Le prodrogue **58** possède une activité propre, indépendante de toute hydrolyse par les enzymes bactériennes, le milieu de culture Mueller Hinton étant non hydrolytique.
- b) Le prodrogue **58** partiellement conservé exhibe son activité, cumulée à celle de l'acide nalidixique libéré. L'alcool **65** réputé inactif n'est pas considéré ici.
- c) Le prodrogue **58** partiellement conservé, et / ou l'alcool **65** exercent un effet synergique avec l'acide nalidixique libéré. Nous pouvons considérer ici une « assistance » au passage transmembranaire de l'acide nalidixique.
- d) Une association des hypothèses b) et c).

<i>Souches de références</i>	CMI (µg/mL) 59	Libération théorique de NAL (µg/mL)	CMI (µg/mL) NAL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	32	8,6	23
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	64	17,3	46
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32	8,6	46
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	32	8,6	46
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	32	8,6	46

Tableau 7 : Comparaison des CMI (µg/mL) de **59** et **NAL** avec les valeurs théoriques libérées de **NAL** pour une hydrolyse à 100%.

La même étude peut être effectuée sur le prodrogue bis-nalidixate **59**, en nous concentrant seulement sur l'acide nalidixique. En effet, le dérivé bis-alcool analogue de **65** n'a pu être obtenu à ce jour de façon satisfaisante, et n'a donc pas été évalué en biologie. Les résultats sont donnés dans le tableau 7 précédent.

Nous notons que les quantités d'acide nalidixique libérables d'après les CMI de **59** restent toujours très inférieures à ses CMI. Les commentaires et hypothèses sont similaires à ceux qui ont été formulés pour **58** :

- a) Le prodrogue **59** possède une activité propre, indépendante de toute hydrolyse par les enzymes bactériennes, le milieu de culture Mueller Hinton étant non hydrolytique.
- b) Le prodrogue **59** partiellement conservé exhibe son activité, cumulée à celle de l'acide nalidixique libéré et à celle du di-alcool correspondant (à vérifier).
- c) Le produit d'hydrolyse partielle de **59** (perte d'un nalidixate) possède une activité propre, qui peut aussi être cumulée à celle de l'acide nalidixique libéré.
- d) Le prodrogue **59** partiellement conservé, et / ou son produit d'hydrolyse partielle (perte d'un nalidixate) et / ou le di-alcool exercent un effet synergique avec l'acide nalidixique libéré. Nous pouvons considérer ici une « assistance » au passage transmembranaire de l'acide nalidixique.
- e) Une association des hypothèses b), c) et d).

Quelles actions à mener ?

Nous avons démontré dans le chapitre III que le prodrogue **58** était parfaitement apte à libérer l'acide nalidixique lorsqu'il est en solution dans le sérum de rat, mais que le milieu de Mueller Hinton, utilisé pour les études microbiologiques, était inopérant en ce sens. En faisant abstraction d'une éventuelle activité propre (hypothèse a)), son bilan d'activité antibactérienne relativement élevée pourrait n'être explicable que par une action hydrolytique par enzymes bactériennes.

Le prodrogue **59**, quant à lui, n'est que très faiblement hydrolysé en milieu sérique (environ 10%). Ici aussi, en faisant abstraction d'une éventuelle activité propre (hypothèses a) et c)), son bilan activité antibactérienne élevée ne peut donc être expliquée que par une action hydrolytique par enzymes bactériennes.

Les actions qui doivent être menées sont les suivantes :

- ✓ Evaluer les cinétiques d'hydrolyse de **58** et **59** en milieux enzymatique d'origines bactériennes (certaines estérases commerciales disponibles).
- ✓ Développer une technique analytique ultra-sensible, apte à détecter les produits d'hydrolyse des prodrogues et les prodrogues directement en milieu de culture.
- ✓ Evaluer les activités antibactériennes de mélanges acide nalidixique – mono-alcool **65** ou di-alcool en devenir, afin de déterminer l'existence d'un phénomène synergique.

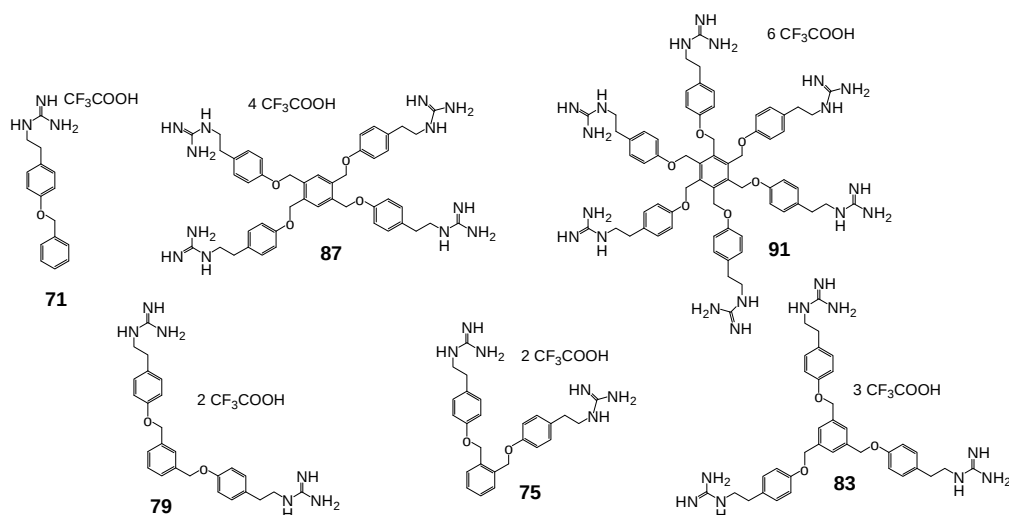
V.6. Evaluation des propriétés antibactériennes des guanidiniums étoilés

Nous avons également effectué les études de microbiologie visant à déterminer le potentiel antibactérien des composés de la famille des guanidiniums étoilés. Les résultats, CMI exprimées en $\mu\text{g/mL}$ et en ($\mu\text{mole/L}$), sont présentés dans le tableau 8.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent :

- Un potentiel antibactérien très intéressant pour l'ensemble des composés vis-à-vis des bactéries à Gram positif ou négatif, avec des CMI assez hétérogènes mais inférieures à $64 \mu\text{g/mL}$ et souvent proche de $1 \mu\text{g/mL}$ sur les deux souche de *S. aureus*.
- Un comportement de **têtes de séries** pour le dérivé tri-substitué **83** et le tétra-substitué **87**, avec une répartition du leadership assez homogène sur les souches Gram positives, une excellent activité ($\text{CMI} < 1 \mu\text{g/mL}$) sur *E. coli* pour **83**, et la meilleure activité ($\text{CMI} = 8 \mu\text{g/mL}$) sur *P. aeruginosa* pour **87**. Ces deux composés présentent de meilleures activités que le calixarène **CX1 / 13**, et que l'hexomédine **G** considérés initialement comme les références en terme d'activité.
- Une faiblesse manifeste pour le composé mono-guanidylé **71**, qui présente une activité antibactérienne modeste voire « nulle » sur *E. faecalis*, proche cependant de celles observées pour les monomères substitués par des bi-hétérocycles **E**, **F** et **53** sur *P. aeruginosa*.

- Une différence d'activité d'environ un facteur 2 entre le dérivé disubstitué *méta* **79** et son analogue ortho **75**, au profit de **75**, et avec un ciblage prononcé des *S. aureus*.
- Pour le composé hexa-substitué **91**, une activité homogène sur les souches Gram positives, et, pour les Gram négatives, identique à **75** et **83** sur *P. aeruginosa*, et irrégulière sur *E. coli*.



Souches de références	71	75	79	83	87	91
<i>E. coli</i> ATCC 25922	32 (82)	8 (11,5)	16 (22,5)	<1 (<0,98)	4 (3)	4-16-32 (2-8-16)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	64 (16)	16 (23)	32 (45)	16 (15,6)	8 (6)	16 (8)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16 (41)	<1 (<1,4)	<1 (<1,4)	<1 (<0,98)	2 (1,5)	8 (4)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8 (20)	<1 (<1,4)	2 (2,8)	<1 (<0,98)	<1 (<0,75)	8 (4)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	128 (325)	8 (11,5)	16 (22,5)	8 (7,8)	4 (3)	8 (4)

Tableau 8: Valeurs de CMI en $\mu\text{g/mL}$ et en ($\mu\text{mole/L}$) obtenues pour les 6 composés de la famille des guanidiniums étoilés **71**, **75**, **79**, **83**, **87** et **91** sur les différentes souches bactériennes testées.

Quelles actions à mener ?

La famille des guanidiniums étoilés constitue effectivement une nouvelle catégorie d'agents antibactériens, avec des activités très élevées pour certains d'entre eux. Le concept d'organisation spatiale d'entités guanidinium, initiée avec les calixarènes, **s'exporte avec succès** sur un organisateur spatial simple, le cycle benzénique. Les activités antibactériennes sont supérieures à celle mesurées avec le **CX1 / 13**, leader originel.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre IV, cette famille est encore incomplète. La sensibilité de la relation structure-activité préliminaire, perceptible avec les 6 composés actuels, appelle à la synthèse et l'évaluation des structures manquantes pour affiner le bilan.

Il est nécessaire d'évaluer les toxicités cellulaires de ces composés, afin de déterminer les index de sélectivité qui en feront peut-être de véritables candidats en tant qu'agents thérapeutiques anti-infectieux.

D'autres organisateurs spatiaux plus élaborés sont envisagés, gardant toujours à l'esprit la nécessité d'un contrôle sur la répartition structurale des groupements réputés actifs, les guanidiniums.

V.7. Bilan global sur les activités antibactériennes des nouvelles structures développées dans ce travail et des composés initiaux:

Faire un bilan d'activités sur l'ensemble des composés développés ou évoqués dans ce traité est une opération délicate car les structures sont relativement hétérogènes. Les structures calixaréniques peuvent être assez aisément comparées entre elles, mais plus difficilement avec la famille des guanidinium étoilés.

Plusieurs tableaux comparatifs peuvent être établis. Nous présentons ici un tableau récapitulatif (Tableau 9) des activités des composés étudiés dans ce traité, intégrant une colonne particulière intitulée "**score**". Ce dernier est en fait la moyenne des activités de chaque composé sur l'ensemble des cinq souches de références testées, qui a pour avantage, **toute raison gardée quant à sa représentativité**, de

donner rapidement les leaders potentiels. Il est nécessaire de rappeler ici que quelques composés présentent une activité très faible qui risque, en augmentant cette moyenne (ce score), de faire laisser de côté d'intéressantes structures. Cependant, ce tableau montre que les meilleurs scores sont atteints avec les composés étoilés 7((bis ortho), 83 (tris), et 87 (tétra), autour de 5 µg/mL.

composés	Souches de références					score
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	
26	64	64	64	64	64	64
27	8	64	2	2	4	16
32	>256	>256	>256	>256	>256	>256
38	256	32	16	8	32	69
42	32	16	16	16	64	29
CX1 / 13	4	32	8	8	32	16
B	16	16	16	16	16	16
47	32	32	8	8	8	17,6
C	16	16	8	16	8	12.8
G	64	128	64	16	256	105
H	8	32	4	<1	2	9.4
D	512	<512	512	512	<512	512
E	128	128	16	8	64	69
F	64	128	16	8	64	56
53	8	128	8	4	64	42
71	32	64	16	8	128	49.6
75	8	16	<1	<1	8	6.8
79	16	32	<1	2	16	13.4
83	<1	16	<1	<1	8	5.4
87	4	8	2	<1	4	3.8
91	4-16-32	16	8	8	8	11.2

Tableau 9: Bilan des CMI en µg/mL des composés de cette étude. Détermination d'un score.

Références bibliographiques

- 1) N. Psychogios, Thèse d'Université, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2003.
- 2) M. Mourer, Thèse d'Université, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2006.
- 3) M. Mourer, N. Psychogios, G. Laumond, A.-M. Aubertin, J. -B. Regnouf-de-Vains; "Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands"; *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 36-45.
- 4) C. Geller, S. Fontanay, M. Mourer, H. Massimba Dibama, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Antiseptic properties of two calix[4]arenes derivatives on the human coronavirus 229E"; *Antiviral Research*. **2010**, *88*, 343–346.
- 5) M. Mourer, R.E Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Fonctional Organisation and Gain of Activity: The case of the Antibacterial tetra-*para*-guanidinoethyl-calix[4]arene"; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 296-63.
- 6) M. Mourer, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R.E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains; "p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities; Synthesis and biological evaluation"; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496-5509.
- 7) M. Grare, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Towards news antibacterial drugs. Interest of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene". *Pathol. Biol.* **2006**, *54*, 470-476.
- 8) M. Grare, M. Mourer, S. Fontanay, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "*In vitro* activity of *para*-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2007**, *60*, 575-581.
- 9) M. Grare, E. Dague, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, J.-F.L. Duval, R.E. Duval; "Microelectrophoresis and atomic force microscopy: new tools to explore mechanism of action of antibacterial compounds". *Pathol. Biol.* **2007**, *55*, 465-471.
- 10) M. Grare, S. Fontanay, H. Massimba Dibama, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Time-kill curves and evolution of membrane

- permeability after *para*-guanidinoethylcalix[4]arene exposure". *Pathol. Biol.* **2010**, *46*, 46-51.
- 11) M. Grare, H. Massimba Dibama, S. Lafosse, M. Mourer, J.-B. Regnouf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics hexamidine and chlorhexidine". *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 432-438.
 - 12) Microbiologies générale et santé, éditions ESKA **2003**.
 - 13) R. Moreda - Lycée Lacroix–Narbonne; schémas disponibles sur le site académique de Montpellier : page Microbiologie du site de Montpellier.
 - 14) A. P. Bhavsar, L. K. Erdman, J. W. Schertzer, E. D. Brown; "Teichoic Acid Is an Essential Polymer in *Bacillus subtilis* That Is Functionally Distinct from Teichuronic Acid"; *Journal of bacteriology*, **2004**, *186*, 7865–7873.
 - 15) <http://www.sante.univ-nantes.fr/med/ticem/ressources/1439.pdf>.
 - 16) <http://www.microbe-edu.org/etudiant/anatomie.html>.
 - 17) <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/lipidA/index.html>.
 - 18) CA-SFM. Communiqué 2006 (édition janvier 2006). <http://www.sfm.asso.fr>.
 - 19) NCCLS. 2003 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically; approved standard M7-A6, 6th ed. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA.
 - 20) H. Massimba Dibama, I. Clarot, S. Fontanay, A. Ben Salem, M. Mourer, C. Finance, R.E. Duval, J.-B. Regnouf-de-Vains; "Towards calixarene-based prodrugs : Drug release and antibacterial behaviour of a water soluble nalidixic acid / Calix[4]arene ester adduct", *Bioorg. Med.Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2679-2682.
 - 21) J.A. See Orden, J.A Ruize-Santa-Quiteria, S. Garcia, D. Cid, R. De La Fuente; "In Vitro Activities of Cephalosporins and Quinolones against *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrheic Dairy Calves", *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy.* **1999**, *43*, 510-513.

Conclusion Générale

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au développement de nouveaux composés antibactériens, capables selon le concept initial, d'interagir avec la paroi bactérienne. Les structures qui ont été développées sont de nature polycationiques, intégrant sur une plate-forme organisatrice rigide, tridimensionnelle de type calix[4]arène ou plane de type aromatique, des fonctions guanidinium en nombre variable.

Nous avons réalisé dans la première partie de notre travail, la synthèse et la caractérisation de nouveaux composés calixaréniques hydrosolubles partiellement guanidylés sur la partie haute, puis de calixarènes bis-hétérocycle et de leurs monomères constitutifs. Les dérivés calixaréniques partiellement substitués ont été développés dans l'objectif d'appréhender le rôle et l'importance du nombre et du positionnement des fonctions guanidines sur le calixarène, ainsi que l'influence de la présence ou l'absence de groupes tertio-butyles résiduels sur l'activité antibactérienne. L'analyse des résultats recueillis en biologie montre que certains composés présentent des activités antibactériennes intéressantes à divers degrés, notamment les dérivés calixaréniques guanidylés sans *tert*-butyles en *para* (**38**, **42**), le calix[4]arène bis-5,5'-bipyridine et son analogues monomérique (**47** et **53**). Plus particulièrement, un composé, le bis-[(*tert*-butyl)-bis-(guanidinoéthyl)]calix[4]arène **27**, présente une excellente activité proche de celle de la référence tétra-guanidinoéthylcalix[4]arène **CX1 / 13** (composé leader présentant une très intéressante activité antibactérienne, obtenu au cours d'un précédent travail de thèse).

En ciblant un comportement de prodrogue et dispenseur multidrogues, nous avons apporté un caractère hydrosoluble à des podants calixaréniques porteurs, *via* une liaison ester labile de un ou deux motifs quinolones (acide nalidixique) susceptible d'inhiber la réplication de l'ADN bactérien. Malgré les nombreux problèmes rencontrés tant niveau de l'adaptation des voies de synthèse (greffage de la quinolone sur le calixarène) que des protocoles de purification (en phase organique), nous sommes parvenus à atteindre une partie des objectifs fixés au départ. Nous avons réalisé la synthèse et la caractérisation de trois prodrogues hydrosolubles, deux ammoniums, le mono- et le bis-nalidixate **58** et **59** respectivement et un guanidinium de type mono-nalidixate **62**. Nous nous sommes

ensuite intéressés à la mise au point d'une étude visant à évaluer et valider le concept prodrogue des composé **58** et **59** au moyen d'un système CLHP en mode phase inverse.

Les résultats de cette étude ont permis d'attester le caractère prodrogue du mono-nalidixate **58**, en montrant l'hydrolyse de cette dernière dans le plasma de rat (à 37°C) et la libération de l'acide nalidixique (80-90%), tandis que le bis-nalidixate **59** ne libère que près de 10% d'acide nalidixique. Deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat. Dans la première, nous pensons que la présence du deuxième groupe propylnalidixate en position alternée (-1,3) génère une gêne stérique qui empêche l'hydrolyse de se faire. La deuxième hypothèse est que la présence du groupe hydroxyle en position opposée au propylnalidixate sur le dérivé monosubstitué **58** est indispensable pour l'hydrolyse du prodrogue. L'ensemble des travaux effectués sur ces structures nous a permis de présenter et de discuter sur les résultats biologiques obtenus. Nous montrons que les prodrogues hydrosolubles **58** et même **59** présentent des activités antibactériennes fort intéressantes sur les diverses souches de référence à Gram positifs et à Gram négatifs choisies pour l'étude

Enfin, nous décrivons les synthèses et caractérisations de nouvelles structures poly-ioniques, intégrant un motif central de type benzène, porteur d'un nombre variable de motifs latéraux para-(guanidinoéthyl)phényléther, et conçues comme une alternative aux calixarènes précédemment développés. Les résultats des évaluations biologiques de l'ensemble de ces composés, Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) sont obtenues sur un ensemble de souches bactériennes de référence. Nous montrons qu'un certain nombre des dérivés de cette famille, notamment les composés **83** et **87** présentent un potentiel antibactérien extrêmement intéressant.

Globalement, le travail engagé dans cette thèse devra se poursuivre en ouvrant de nouvelles voies permettant d'agrandir la famille des calixarènes guanidiniums, des calixarènes guanidiniums bis-hétérocycle ou non hétérocycles. Il sera également judicieux de prévoir la synthèse de calixarènes hydrosolubles intégrant deux principes actifs différents (pénicilline-quinolone) ou identiques (pénicilline-pénicilline). Enfin, des travaux sont actuellement en cours pour permettre d'élargir la famille des poly-guanidiniums étoilés.

Face à l'urgence actuelle de découvrir de nouveaux agents antiinfectieux, ainsi que les alertes publiques très récentes (journeaux télévisés de septembre 2010) l'ont exprimé –témoignage du transfert d'un constat « scientifique » à une alerte publique, nos travaux, cumulés à ceux des thèses menées au sein du laboratoire ces dernières années (N. Psychogios, M. Mourer, M. Grare, C. Geller) pourraient représenter un début de réponse à cette demande.

PARTIE EXPERIMENTALE

- Analyses
- Calix[4]arènes ammoniums
- Monomères ammoniums
- Prodrogues
- Famille guanidines étoilées

Analyses

❖ Les spectres RMN ont été enregistrés sur appareil BRUKER DRX 400 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm en référence aux différents solvants utilisés :

En ^1H : CDCl_3 : 7.26 ppm ; DMSO-D_6 : 2.50 ppm et D_2O : 4.79 ppm.

En ^{13}C : CDCl_3 : 77.16 ppm ; DMSO-D_6 : 39.52 ppm.

❖ Les points de fusion ont été mesurés sur appareil à point de fusion capillaire ELECTROTHERMAL IA 9200.

❖ La spectroscopie Infra-Rouge a été réalisée sur un appareil BRUKER Vector 22. Les échantillons ont été préparés par pastillage en matrice de KBr.

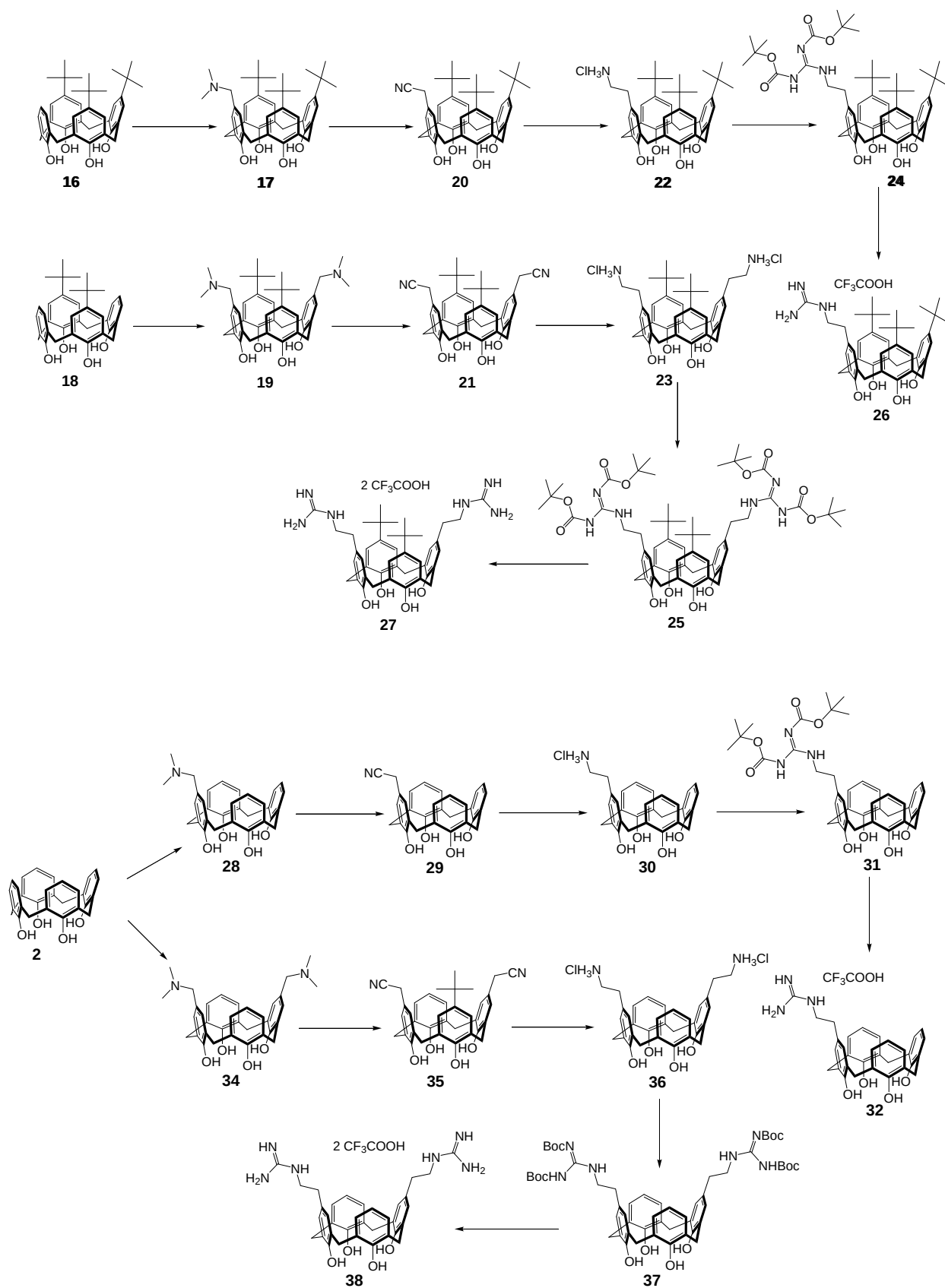
❖ Les spectres de masse ont été réalisés à l'aide d'un appareil Micromass Platform (ES).

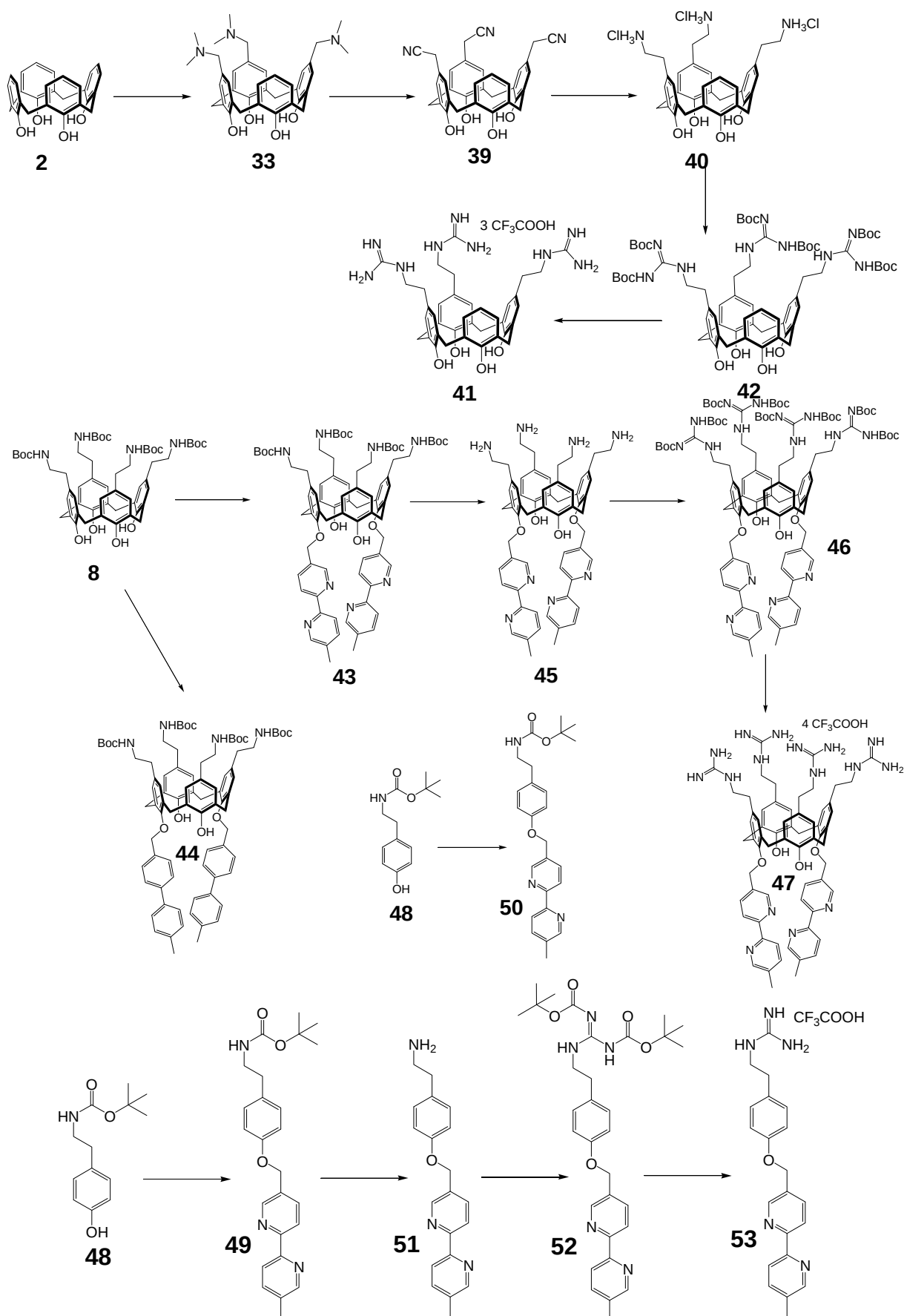
❖ Les analyses UV-Visible ont été réalisées sur un appareil SAFAS-Monaco Uvmc2. Les valeurs sont données en nm pour les λ_{max} et en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour les coefficients d'absorption molaire.

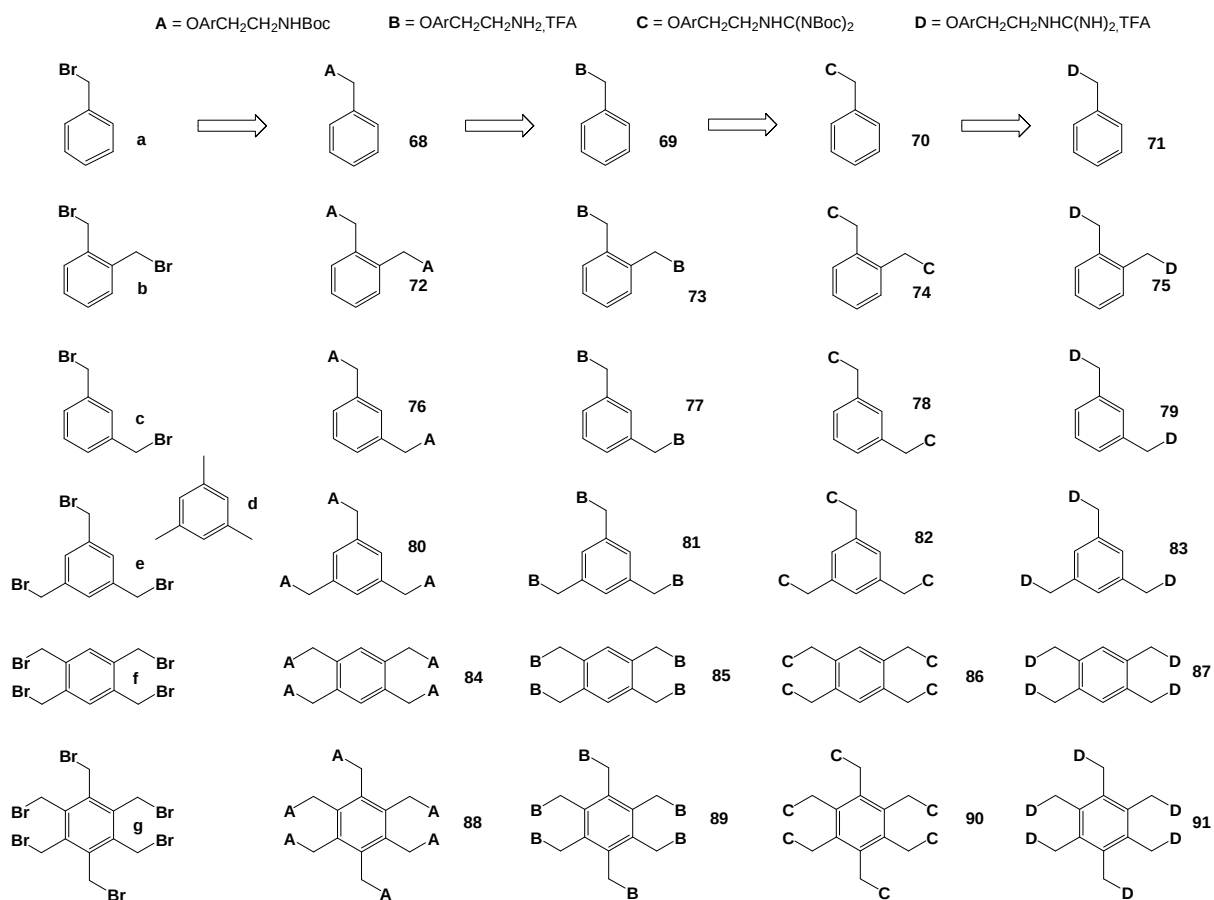
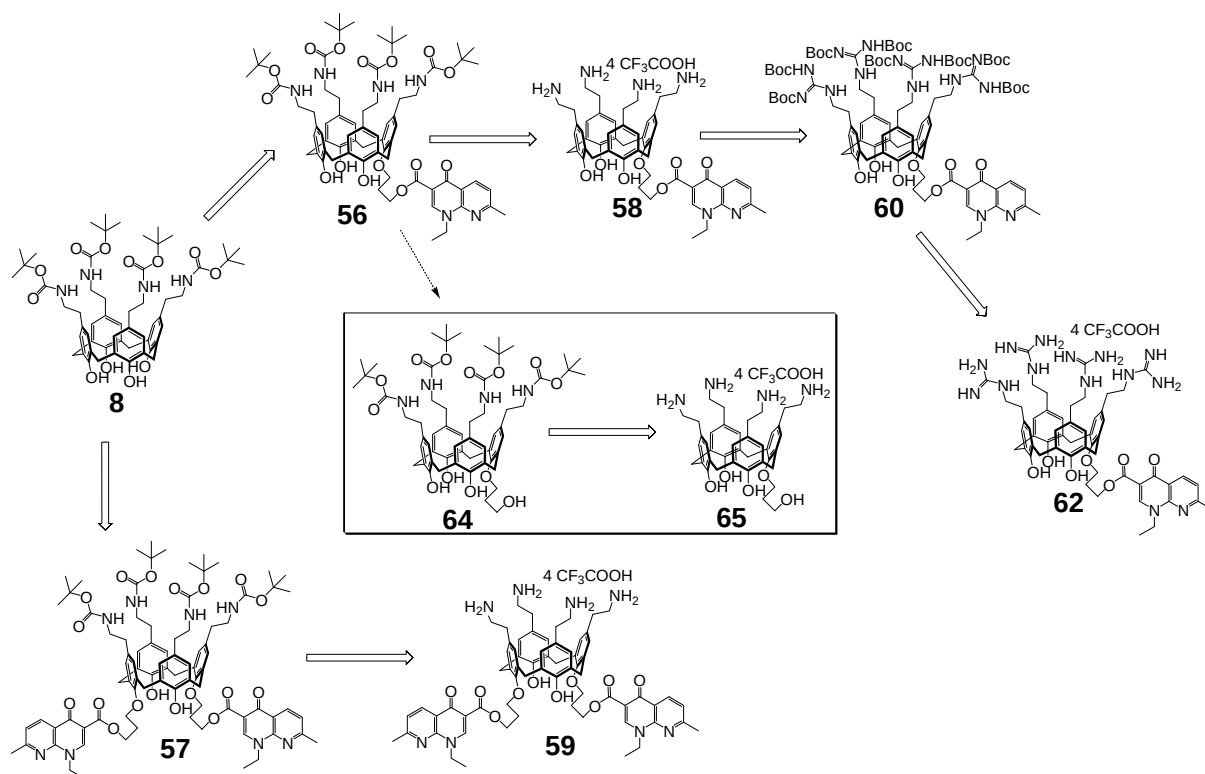
- ❖ Les analyses élémentaires sont effectuées sur un appareil Thermofinnigan FlashEA.

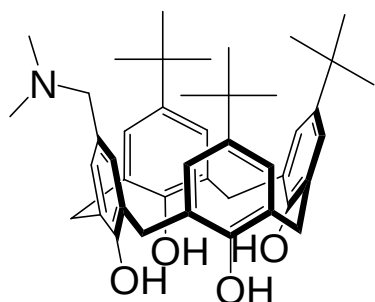
- ❖ Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur les supports suivants :
 - Silice : MACHERAY-NAGEL, Gel de Silice 60 M, 40-63 μm ;
 - Alumine : MERCK, Aluminium Oxyde 90 standardisé.

- ❖ Les chromatographies sur couches minces ont été réalisées sur les supports suivants :
 - Silice : MACHERAY-NAGEL, ALUGRAM® G/UV₂₅₄ ;
 - Alumine : MERCK, Aluminium 60 F₂₅₄ neutral.





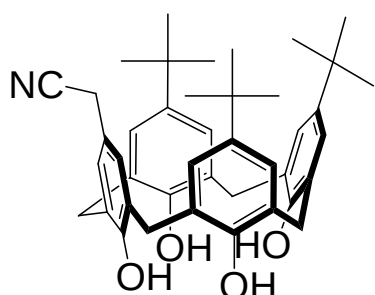




**5,11,17-tris(tert-butyl)-23-mono(diméthylamino-méthyl)-
25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calixarène 17.**

A une solution de calix[4]arène **16** (0.5 g, 0.84 mmol, 1 éq.) dans 10 ml de THF sont ajoutés 1.92 ml d'acide acétique, 114 μ l de diméthylamine à 45% dans l'eau (2.27 mmol, 2.7 éq.) et 68 μ l de formaldéhyde à 37% dans l'eau (2.27 mmol, 2.7 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante. Après 24 heures de réaction, les solvants sont évaporés. Le résidu solide est repris avec 30 ml d'eau et neutralisé par une solution de K_2CO_3 10%. On extrait la phase organique avec 2x25 ml de CH_2Cl_2 . Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le produit attendu est sous forme de poudre blanche (0.51 g, 92%).

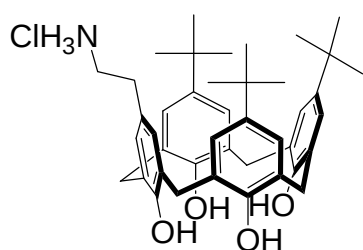
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.12 -1.14 (m, 27 H, tBu); 2.19 (s large, 6 H, NMe_2); 3.24 (s large, 2 H, $ArCH_2NMe_2$); 3.42 (s large, 4 H, $ArCH_2Ar$); 4.17 (s large, 4 H, $ArCH_2Ar$); 6.95-6.99 (m, 8 H, ArH).



**5,11,17-tris(tert-butyl)-23-mono-(cyanométhyl)-25,26,27,28-
tétra(hydroxy)-calix[4]arène 20.**

A une solution de calix[4]arène **17** (0.19 g, 0.29 mmol, 1 éq.) dans 20 ml de DMSO (sur tamis moléculaire) est additionné CH_3I (27 μ l, 0.43 mmol, 1.5 éq.) goutte à goutte. On laisse sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante, avant l'ajout de KCN (0.03 g, 0.549 mmol, 1.88 éq.). Le mélange reste sous agitation pendant 24 heures, à 80°C sous atmosphère d'argon. Après retour à température ambiante, le brut est d'abord additionné à 100 ml d' H_2O glacée puis acidifié par une solution HCl 1M, entraînant la précipitation du produit. Le précipité est rincé abondamment à l'eau puis filtré sur fritté et séché sous vide pour donner le produit attendu sous forme d'une poudre jaune (0.13 g, 74%).

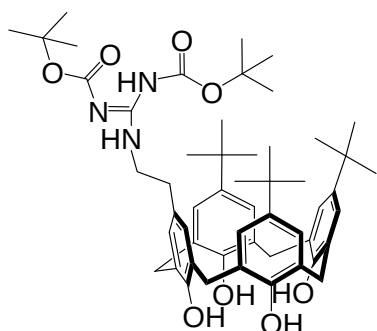
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.21-1.24 (m, 27 H, tBu); 3.51-3.56 (m, 6 H, $ArCH_2CN$ + $ArCH_2Ar$); 4.25 (s large, 4 H, $ArCH_2Ar$); 7.02-7.06 (m, 8 H, ArH), 10.26 (s large, 4 H, OH).



Chlorhydrate de 5,11,17-tris(tert-butyl)-23-(aminoéthyl)-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calixarène 22.

Le calixarène **20** (0.48 g, 0.76 mmol, 1 éq.) est solubilisé à TA, dans 20 ml de THF fraîchement distillé sur Na et additionné de BH_3 1M dans le THF (4.31 ml, 3.79 mmol, 5 éq.). Le tout est porté à reflux sous agitation et sous argon pendant 24 heures. Après retour à température ambiante, le brut est additionné à une solution de MeOH (destruction du borane résiduel). Le méthanol est évaporé pour obtenir résidu blanc qui est hydrolysé dans un mélange MeOH / HCl / H_2O (19 / 4 / 4 ml) qui est porté 1h30 à reflux. Les solvants sont de nouveau évaporés et le brut est additionné de 50 ml d'acétone. Le précipité qui se forme est filtré sur fritté, rincé à l'acétone puis séché sous vide poussé. On obtient une poudre blanche (0.43g, 85%).

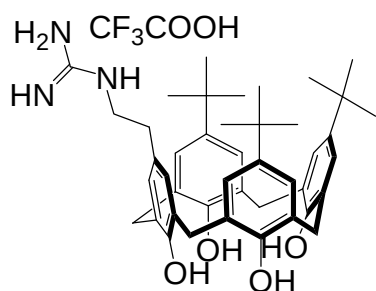
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.21-1.25 (m, 27 H, tBu); 2.60 (s large, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.64 (t, $J = 5.58$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.47-4.22 (m, 8 H, ArCH_2Ar); 6.67 (s, 2 H, ArH); 7.02-7.05 (m, 6 H, ArH).



5,11,17-tris(tert-butyl)-23-(diBoc-guanidinoéthyl)-25, 26, 27, 28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 24.

Le chlorhydrate d'aminoéthyl-calix[4]arène **22** (0.15 g, 0.22 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 30 ml d'un mélange CH_2Cl_2 / MeOH et l'on additionne Et_3N (93 μl , 0.67 mmol, 3 éq.) puis la *N,N'*-Bis(tert-butoxycarbonyl)-*N''*-triflylguanidine (0.09 g, 0.22 mmol, 1 éq.). Après 24 heures de réaction, les solvants sont évaporés. Le résidu est solubilisé dans CH_2Cl_2 et lavé par (2 x 20 ml) d' H_2O . Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na_2SO_4 puis filtrées et concentrées. Le brut subit alors une purification par colonne chromatographique (SiO_2 , CH_2Cl_2 / MeOH 99 :1) pour donner le produit attendu sous forme de solide blanc (0.15 g, 78%).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.21-1.25 (m, 27 H, tBu); 1.52-1.56 (m, 18 H, tBu); 2.66 (t, $J = 7.18$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.63 (t, $J = 6.46$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.51-4.27 (AB, $J_{\text{AB}} = 12.32$ Hz, 8 H, ArCH_2Ar); 6.93 (s, 2 H, ArH); 7.04 (s, 2 H, ArH); 7.06 (d, $J = 2.28$ Hz, 2 H, ArH); 7.10 (d, $J = 2.52$ Hz, 2 H, ArH); 8.0 (s large, 1 H, NH guanidine); 10.30 (s, 4 H, OH); 11.51 (s large, 1 H, NCH guanidine).



5,11,17-tris(tert-butyl)-23-(guanidinoéthyl)-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 26

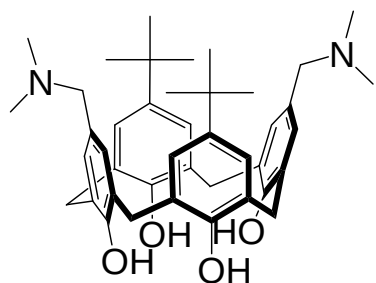
Le Calixarène **24** (0.13 g, 0.15 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 12 ml de CH_2Cl_2 anhydre et 4 ml de TFA. Le mélange est laissé, sous agitation et sous argon à température ambiante pendant 24 heures. Les solvants sont alors évaporés et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise au CH_2Cl_2 et évaporée afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le résidu est par la suite séché sous vide poussé. Le brut est alors repris et trituré dans Et_2O pour donner une poudre blanche qui est filtrée sur fritté, lavée à l' Et_2O et séchée sous vide avant une dernière étape de lyophilisation (0.12 g, 93%).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 1.14 (s, 9 H, tBu); 1.17 (m, 18 H, tBu); 2.55 (t, $j = 7.24$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.16 (s large, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.43-4.17 (AB, 8 H, ArCH_2Ar); 7.01 (s, 2 H, ArH); 7.12 (d, $j = 2.12$ Hz, 2 H, ArH); 7.14 (s, 2 H, ArH); 7.19 (d, $j = 2.08$ Hz, 2 H, ArH), 7.32 (s large, NH_{guan}); 7.57 (m, 1 H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 31.51 (CMe_3); 31.55 (ArCH_2Ar); 31.64 (CMe_3); 31.71 (ArCH_2Ar); 33.88 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 34.11 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.48 (CMe_3); 125.63, 125.73, 125.93 (Cm); 128.15, 128.54, 128.63 (Co); 129.06 (Cm); 129.40 (Co); 131.23 (Cp); 143.65, 143.70 (Cp); 147.19 147.74 147.36 (C_{ipso}); 157.04 (C_{guan}).

Analyse élémentaire calculé pour $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_4$, CF_3COOH , 1.6 H_2O (935.49) : C : 65.85% ; H : 7.27% ; N : 5.12%, trouvée : C : 65.50% ; H : 7.15 % ; N : 5.84%.

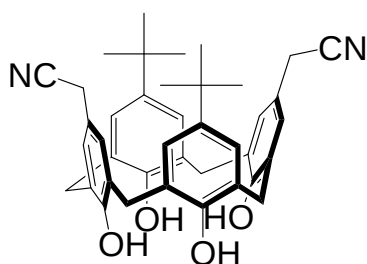
ES-MS (ES+): 678.56 $[\text{M} - \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+]^+$.



5,17-bis(tert-butyl)-11,23-bis(diméthylaminométhyl)-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 19.

A une solution de 5,17-bis(tert-butyl)-calix[4]arène **18** (0.5 g, 0.916 mmol, 1 éq.) dans 5 ml de THF sont ajoutés 1 ml d'acide acétique, 280 μl de diméthylamine à 45% dans l'eau (6.27 mmol, 5.84 éq.) et 185 μl de formaldéhyde à 37% dans l'eau (6.27 mmol, 5.84 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante. Après 24 heures de réaction, les solvants sont évaporés. Le résidu solide est repris avec 50 ml de CH_2Cl_2 puis lavé à l'eau (2x30 ml). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée. Le produit attendu est sous forme de poudre blanche (0.56 g, 93%).

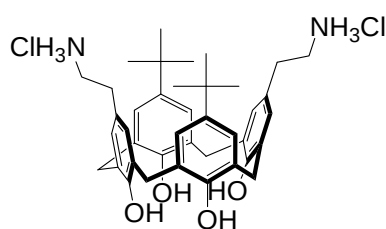
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.21 (s, 18 H, *t*Bu); 2.23 (s, 12 H, $\text{N}(\text{Me}_3)_2$); 3.30 (s, 4 H, ArCH_2N); 3.52-4.23 (AB $J_{\text{AB}} = 13.84$ Hz, 8 H, ArCH_2Ar); 6.97 (s, 4 H, ArH); 7.05 (s, 4 H, ArH); 10.20 (s large, 4 H, OH).



5,17-bis(tert-butyl)-11,23-bis(cyanométhyl)-25,26,27,28-tétra(hydroxy)calix[4]arène 21

A une solution de calix[4]arène **19** (0.33 g, 0.508 mmol, 1 éq.) dans 15 ml de DMSO (sur tamis moléculaire) est additionné CH_3I (82 μl , 1.322 mmol, 2.6 éq.) goutte à goutte. On laisse sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante, avant l'ajout de 3.76 équivalents de KCN (0.12 g, 1.912 mmol). Le mélange reste sous agitation pendant une nuit à 80°C sous atmosphère d'argon. Après retour à température ambiante, le brut est d'abord additionné à 100 ml d' H_2O glacée puis acidifié par une solution HCl 1M, entraînant la précipitation du produit. Ce dernier est rincé abondamment à l'eau puis filtré sur fritté, lavé abondamment à l'eau puis séché sous vide pour donner le produit attendu sous forme d'une poudre jaune (0.28 g, 70%).

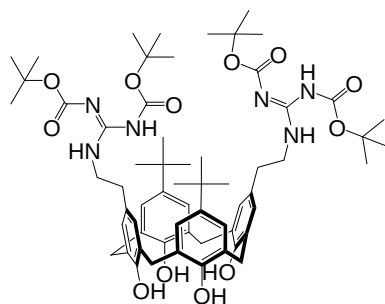
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.16 (s, 18 H, *t*Bu); 3.43 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 3.44 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 4.18 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 6.90 (s, 4 H, ArH); 7.01 (s, 4 H, ArH); 10.08 (s large, 4 H, OH).



Chlorhydrate de 5,17-bis(tert-butyl)-11,23-bis-(aminoéthyl)-25,26,27,28-tétra-(hydroxy)-calix[4]arène 23.

Le calixarène **21** (0.56 g, 0.91 mmol, 1 éq.) est solubilisé à température ambiante, dans 20 ml de THF fraîchement distillé sur Na et additionné de 10 équivalent de B_2H_6 1M dans le THF (8.61 ml, 9.02 mmol, 10 éq.). Le tout est porté à reflux sous agitation et sous argon pendant 24 heures. Après le retour à température ambiante, le brut est additionné à une solution de MeOH détruisant ainsi le borane résiduel. Après évaporation du méthanol, on ajoute alors au résidu blanc obtenu un mélange MeOH, HCl, H_2O (19, 4 et 4 ml) et l'on porte pendant 1h30 à reflux. Les solvants sont de nouveau évaporés et le brut est additionné de 50 ml d'acétone. Le précipité qui se forme est filtré sur fritté, rincé à l'acétone puis séché sous vide poussé. On obtient une poudre blanche (0.58 g, 91%).

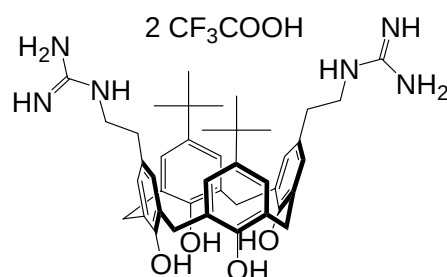
RMN ^1H (DMSO- D_6): 1.19 (s, 18 H, *tBu*); 2.64 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.87 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.38 - 4.16 (s large 8 H, ArCH_2Ar), 7.00 (s, 4 H, ArH); 7.16 (s, 4 H, ArH); 8.12 (s large, 4 H, NH); 9.89. (s large, 4 H, OH).



**5,17-bis(tert-butyl)-11,23-bis(diBoc-guanidinoéthyl)-
25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 25.**

Le chlorhydrate **23** (0.14 g, 0.19 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 25 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ et l'on additionne Et_3N (166 μl , 1.19 mmol, 6 éq.) puis la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-triflylguanidine (0.15 g, 0.39 mmol, 2 éq.). Après 24 heures de réaction, les solvants sont évaporés et le résidu obtenu est solubilisé dans CH_2Cl_2 puis la phase organique est extraite par 20 ml d' H_2O . La phase aqueuse est lavée avec 3 x 20 ml de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le brut subit alors une purification par colonne de chromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99 :1). Le produit attendu a un aspect huileux (0.14 g, 65%).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.23 (s, 18 H, *tBu*); 1.49 (s, 18 H, *tBu*); 1.52 (s, 18 H, *tBu*); 2.59 (t $J = 7.18$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.58 (q $J = 6.46$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.47-4.22 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.08$ Hz, 8 H, ArCH_2Ar); 6.86 (s, 4 H, ArH); 7.06 (s, 4 H, ArH); 8.12 (s large, 2 H, NH *guanidine*); 10.20 (s, 4 H, OH), 11.40 (s, 2 H, CNH *guanidine*).



**5,17-bis-(tert-butyl)-11,23-bis-(guanidinoéthyl)- 25,
26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 27.**

Le calixarène **25** (0.15 g, 0.16 mmol) est mis en solution dans 24 mL de CH_2Cl_2 anhydre et additionné de 8 mL de TFA, on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise dans CH_2Cl_2 (4 fois) et évaporée pour éliminer le maximum de TFA résiduel puis séché sous vide poussé. Le brut est alors repris et trituré dans l' Et_2O pour donner une poudre blanche qui est filtrée sur fritté, lavée à l' Et_2O et séchée (0.12 g, 91%).

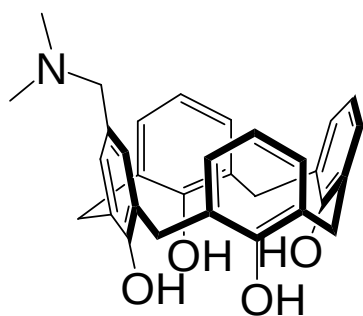
UV-Vis (DMSO): 289.0 (8429); 313.0 (1116) épaulement.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6): 1.19 (s, 18 H, *t*Bu); 2.64 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.87 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.39-4.16 (AB, 8 H, ArCH_2Ar); 6.60 – 7.60 (bande large, 8 H, *NH* guanidine); 7.00 (s, 4 H, *ArH*); 7.16 (s, 4 H, *ArH*); 8.12 (s large, 2 H, *NH* guanidine); 9.89 (s large, 4 H, *OH*).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- D_6): 31.57 (ArCH_2Ar); 31.71 (CMe_3); 33.96 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 34.11($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.73 (CMe_3); 125.68 (*Cm* de *ArH-tert*); 128.30 (*Co* de *ArH-tert*); 129.04 (*Co* de *ArH*); 129.56 (*Cm* de *ArH*); 131.02 (*Cp* de *ArH-tert*); 143.48 (*Cp* de *ArH*); 148.18 (*C_{ipso}* de *ArH-tert*); 148.54 (*C_{ipso}* de *ArH*); 157.09 (*C_{guan}*).

Analyse élémentaire calculé pour $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_4$, 2 CF_3COOH , H_2O (952.98) : C : 57.98% ; H : 6.13% ; N : 8.82%; trouvée : C : 58.07% ; H : 5.71% ; N : 8.87%.

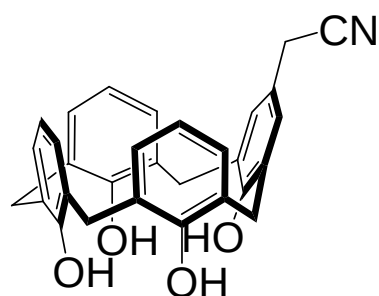
ES-MS (ES $^+$): 354.34 [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^{2+/2}$; 707.61 [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$.



5-[(diméthylamino)méthyl]-25, 26, 27, 28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 28.

Le calix[4]arène **2** (0.56 g, 1.33 mmol, 1 2q.) est mis en suspension dans 18 ml de THF, additionné de 0.166 mL diméthylamine à 45% dans l'eau (1.33 mmol, 2.05 éq.), et 0.272 mL de formaldéhyde à 37% dans l'eau (2.73 mmol, 2.05 éq.). La solution est laissée sous agitation et sous argon pendant une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu est précipité dans H_2O glacée, filtré, rincé à l'eau puis séché sous vide. Le produit **28** attendu est sous forme solide blanc (0.61 g, 95%).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6): 2.20 (s, 6 H, CH_3); 3.20 (s large, 2 H, ArCH_2N), 3.56 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 4.27 (s large, 4 H, ArCH_2Ar), 6.74 (t, $J = 7.56 \text{ Hz}$, 3 H, *ArH para*); 7.01 (s, 2 H, *ArH meta*); 7.07 (s, 4 H, *ArH*); 10.20 (s large, 4 H, *OH*).

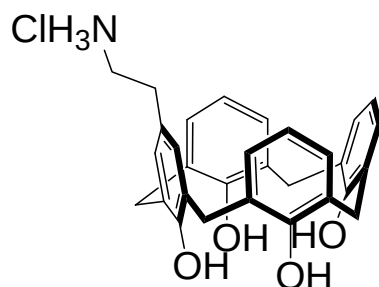


5-(Cyanométhyl)-25, 26, 27, 28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 29.

A une solution de 5-(diméthylaminométhyl)-calix[4]arène **28** (0.20 g, 0.42 mmol, 1 éq.) dans 15 ml de DMSO (sur tamis moléculaire) est additionné CH_3I (38 μl , 0.09 g, 0.62 mmol, 1.5 éq.) goutte à goutte. On laisse sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante (solubilisation du calix[4]arène), avant l'ajout de 12

équivalents de KCN (0.101 g, 1.24 mmol, 3 éq.). Le mélange reste sous agitation pendant une nuit à 80°C sous atmosphère d'argon. Après retour à température ambiante, le brut réactionnel est ajouté à 50 ml d'une solution glacée d' HCl (1M)/H₂O 75:25, entraînant la précipitation du produit. Ce dernier est filtré sur fritté, lavé abondamment à l'eau puis séché sous vide pour donner le produit attendu sous forme d'une poudre jaune (0.18 g, 96%).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆): 3.53 (s large, 6 H, ArCH₂CN + ArCH₂Ar), 4.26 (s large, 4 H, ArCH₂Ar); 6.73 (m, 3 H, ArH); 6.98 (s, 2 H, ArH); 7.07 (s, 6 H, ArH); 10.15 (s, 4 H, OH).



Chlohydrate de 5-(aminoéthyl)-25, 26, 27, 28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 30

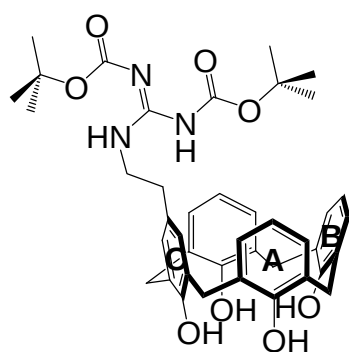
Le mono-(cyanométhyl)-calix[4]arène **29** (0.46 g, 0.957 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 30 ml de THF fraîchement distillé sur Na et additionné de 5 équivalents de BH₃ 1M (4.31 ml, 4.31 mmol, 5 éq.) entraînant la solubilisation du calixarène. Le mélange est alors porté à reflux sous agitation et sous argon. Après 8 heures de réaction le lait formé est de nouveau additionné de 3 équivalents de BH₃ et laissé à reflux durant une nuit.

Le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. On ajoute alors au résidu blanc obtenu un mélange MeOH, HCl, H₂O (35, 7.5 et 7.5 ml respectivement) et l'on porte pendant 1h30 à reflux. Les solvants sont de nouveau évaporés et le brut est additionné de 50 ml d'acétone. Le précipité qui se forme est filtré sur fritté, rincé à l'acétone puis séché sous vide poussé. On obtient une poudre blanche (0.40 g, 91%).

IR (KBr): 3193.64 (OH); 1592.28 (NH₃⁺); 1453.45 (NH₃⁺).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆): 2.62 (m, 2 H, ArCH₂CH₂NH); 2.93 (s large, 2 H, ArCH₂CH₂NH); 3.87 (s large, 8 H, ArCH₂Ar); 6.64 (m, 3 H, ArH); 6.99 (s, 2 H, ArH); 7.11 (m, 6 H, ArH), 7.81 (s large, 3 H, NH), 9.85 (s large, 4 H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-D₆): 30.61, 30.70 (ArCH₂Ar); 32.13 (ArCH₂CH₂NH₃Cl); 60.00 (ArCH₂CH₂NH₃Cl); 121.09, 130.00 (Cp); 128.53, 128.71, 128.81 (Cm); 128.83, 129.88, 129.93 (Co); 148.19, 149.44, 149.73 (C_{ipso}).



5-(diBoc-guanidinoéthyl)-25, 26, 27, 28-tetra(hydroxy)-calix[4]arène 31

Le calix[4]arène **30** (0.31 g, 0.611 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 50 ml de mélange CH_2Cl_2 / MeOH. On ajoute alors Et_3N (255 μl , 1.83 mmol, 3 éq.), et on laisse 10 min sous agitation avant l'ajout de la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-triflylguanidine (0.24 g, 0.61 mmol, 1 éq.), la réaction se fait sous argon, à température ambiante (contrôle CCM: SiO_2 , CH_2Cl_2 / MeOH 98:1). Après 24 heures de réaction, le solvant est évaporé et le résidu est repris dans 50 ml de CH_2Cl_2 puis lavé avec H_2O (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée pour donner un produit qui subit une dernière purification sur colonne (SiO_2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). Le produit attendu est sous forme huileuse (0.26 g, 60%).

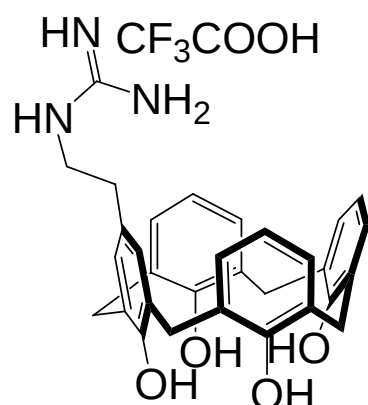
IR (KBr): 3179.21 (OH); 2977.45 (CH_3); 1720.19 (COO); 1637.36 (NH).

UV-Vis (CDCl_3): 276.0 (8240).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.51, 1.57 (s, 18 H, *tBu*); 2.71 (t, $J = 6.92$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.66 (q, $J = 6.29$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.59-4.31 (s large, 8 H, ArCH_2Ar), 6.79 (m, 3 H, *ArH*); 6.98 (s, 2 H, *ArH*); 7.12 (m, 6 H, *ArH*); 8.45 (s large, 1 H, NH *guanidine*); 10.24 (s large, 4 H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.47, 28.71 (Me_3C); 32.28, 32.37 (ArCH_2Ar); 34.85 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.64 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 79.70 (C Me_3); 83.45 (C Me_3); 122.59, 122.71 (Cp de A et B); 128.53, 128.60 (Co de A et B); 128.69 (Co de C); 129.71 (Cm de C); 130.38, 131.15 (Cm de A et B); 132.57 (Cp de C); 147.84, 149.47 (C_{ipso}); 153.57 (CO); 156.49 (C *guanidine*); 164.00 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_8$, 2/3 CH_2Cl_2 (766.45) : C : 65.29% ; H : 6.36% ; N : 5.48% ; trouvée : C : 65.35% ; H : 6.29% ; N : 6.17%.



5-(guanidinoéthyl)-25,26,27,28-tetra(hydroxy)-calix-[4]arène 32.

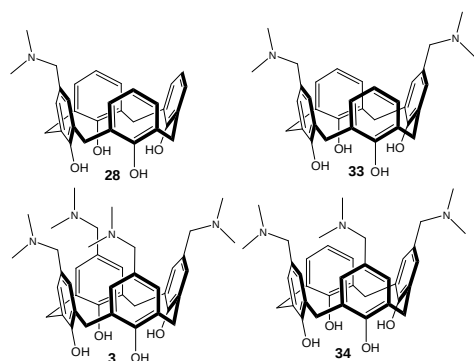
Le composé **31** (0.15 g, 0.211 mmol, 1 éq.), est mis en solution dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (75:25), et laissé à température ambiante sous argon et sous agitation (contrôle CCM SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2). Après une nuit de réaction les solvants sont évaporés, le résidu huileux est repris au CH_2Cl_2 et évaporé (4 fois de suite) puis séché sous vide. Le résidu final est précipité dans l' Et_2O avant

d'être filtré, séché et lyophilisé. On obtient le sel de guanidinium **32** attendu (0.12 g, 93%) sous forme d'un coton.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6): 2.55 (t, $J = 7.18$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.20 (s large, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.82 (s large, 8 H, ArCH_2Ar), 6.56 - 6.64 (m, 3 H, ArH); 6.95 (s, 2 H, ArH); 7.07 (t, $J = 8.48$ Hz, 6 H, ArH); 7.44 (s large, 1 H, NH); 10.16 (s large, 4 H, OH); 6.70-7.41 (s large, 3 H, NH_{guan}).

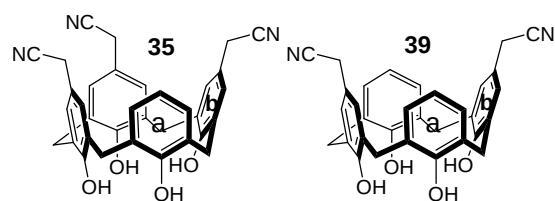
RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- D_6): 31.23, 31.34 (ArCH_2Ar); 33.67 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.32 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 120.95 (C_{ArH}); 128.84, 128.94 (C_m); 129.29, 129.28, 129.32 129.40 (C_o); 130.61 (C_p); 149.03; 150.66; 150.86 (C_{ipso}); 156.9 (C_{guan}).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$, CF_3COOH , H_2O (641.23). C : 61.77% ; H : 5.33% ; N : 6.55%; trouvée C : 62.04% ; H : 5.13% ; N : 6.72%.



Synthèse du mélange contenant quatre calix[4]arènes amino-méthylé **3**, **28**, **33**, **34**.

Le calix[4]arène dé-tertobutylé **1** (2.00 g, 4.71 mmol, 1 2q.) est mis en solution dans 50 ml de THF, additionné de 5.5 mL de AcOH et 1.6 mL de diméthylamine à 45% dans l'eau (12.71 mmol, 2.70 éq.), et 1.3 mL de formaldéhyde à 37% dans l'eau (12.71 mmol, 2.70 éq.). Après 2 heures de réaction (contrôle CCM Al_2O_3 , CH_2Cl_2 / MeOH 90:10 + quelques gouttes de Et_3N) La solution est laissée sous agitation et sous argon pendant une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu est repris dans 30 mL H_2O pour être lavé avec (25 mL x 2) Et_2O . les phases aqueuses sont rassemblées et précipitées par addition d'une solution de K_2CO_3 10%. Le précipité formé est filtré sur fritté et séchée sous vide. On obtiens une solide blanc contenant un mélange de **28** **33** **34** et des traces de **3** sur la base de la CCM (2.23 g). Le brut réactionnel est engagé directement dans l'étape suivante.



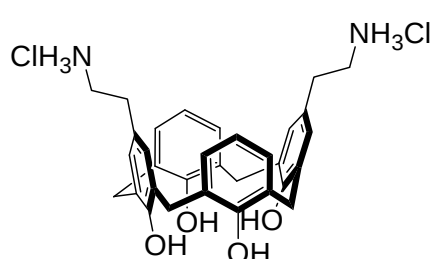
Bis-(cyanométhyl)-calix[4]arène **35** et Tris-(cyanométhyl)-calix[4]arène **39**.

Le mélange contenant contenant les mono-, bis-, tris- et tétra-aminonométhyl-calix[4]arènes (2,23 g) est

solubilisé dans le DMSO (sur tamis moléculaire), puis est additionné CH_3I (1.3 ml, 20.87 mmol). Le mélange est laissé sous agitation 30 mn à TA. On additionne le KCN (2.7 g, 41.46 mmol), et le mélange est agité durant une nuit entre 70 et 80°C sous atmosphère d'argon. Après retour à TA (contrôle CCM, SiO_2 CH_2Cl_2), le mélange est ajouté de 120 ml de HCl 2M entraînant la précipitation du produit. Ce dernier est filtré sur fritté, lavé abondamment à l'eau puis séché sous vide pour donner un mélange de produits. La séparation des différents constituants est réalisée par colonne chromatographique, pour donner, majoritaires, le bis-cyano **35** (0.791 g) et le tris-cyano **39** (0.184 g) sous forme de solides jaune pale.

RMN ^1H de 35: (400 MHz, CDCl_3): 3.53 (s, 4 H, ArCH_2CN); 3.56 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 4.25 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 6.77 (m, 2 H, ArH) 6.98 (s large, 4 H, ArH); 7.07 (m, 4 H, ArH), 10.14 (s large, 4 H, OH);

RMN ^1H de 39: (400 MHz, CDCl_3): 3.56 (s, 6 H ArCH_2CN), 3.59-4.25 (s large, 8H, ArCH_2Ar), 6.78 (t, J = 15,08 Hz, 1H, ArH); 6.98 (s large, 2 H, ArH), 7.03 (m, 2 H, ArH), 7.09 (d, J = 7.56 Hz, 4 H, ArH), 10.10 (s large, 4 H, OH).



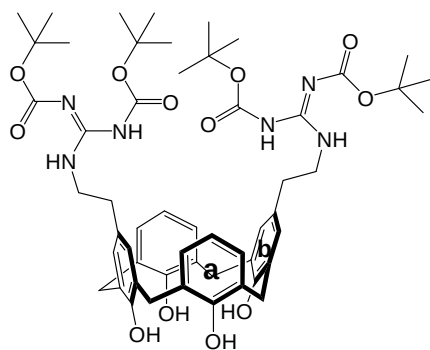
Chlorhydrate de 5,17-[bis-(aminoéthyl)]-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 36

Le bis-(cyanométhyl)-calix[4]arène **35** (0.172 g, 0.32 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 30 ml de THF fraîchement distillé sur Na et additionné de 10 équivalents de BH_3/THF 1M (10 mL, 10 mmol) entraînant la solubilisation du calixarène. Le

mélange est alors porté à reflux sous agitation et sous argon. Après 8 heures de réaction, le lait formé est de nouveau additionné de 6 équivalents de BH_3/THF et laissé à reflux durant une nuit. Le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. On ajoute alors au résidu blanc obtenu un mélange MeOH, HCl, H_2O (35, 7.5 et 7.5 ml respectivement) et l'ensemble est porté pendant 1h30 à reflux. Les solvants sont de nouveau évaporés et le brut est additionné de 50 ml d'acétone. Le précipité qui se forme est filtré sur fritté, rincé à l'acétone puis séché sous vide poussé. On obtient une poudre blanche (0.19 g, 95%).

IR (KBr): 3193.64 (OH); 1592.28 (NH_3^+); 1453.45 (NH_3^+).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 2.66 (4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.90 (s large, 4 H $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.38 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 3.83 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 6.63 (m, 2 H, ArH); 7.00 (s large, 4 H, ArH); 7.09 (s large, 4 H, ArH); 8.13 (s large, 4 H, NH); 9.95 (s large, 4 H, OH).

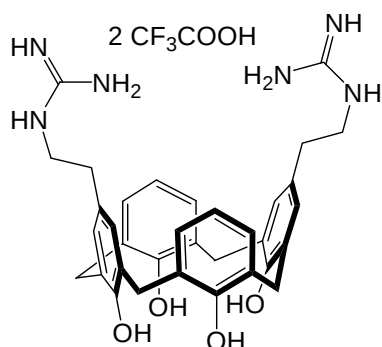


5,17-[bis-[(di-Boc)-guanidinoéthyl]]- 25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 37.

Le calix[4]arène **36** (0.15 g, 0.264 mmol, 1 éq) est mis en suspension dans 25 ml de CH_2Cl_2 anhydre, et solubilisé dans un minimum de MeOH. On ajoute alors Et_3N (294 μl , 2.111 mmol, 8 éq.), et on laisse 10 min sous agitation avant l'ajout de la *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-triflylguanidine (0.21 g, 0.528 mmol, 1 éq.), la réaction se fait sous argon, à température ambiante (contrôle CCM : SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:1). Après 23 h de réaction, le solvant est évaporé et le résidu est repris dans 50 mL de CH_2Cl_2 puis lavé avec H_2O (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée pour donner un produit qui subit une dernière purification sur colonne (SiO_2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). Le produit attendu est sous forme huileuse (0.22 g, 85.5%).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.45-1.51 (m, 36 H, tert); 2.65 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.52 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 3.60 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4.23 (s large, 4 H, ArCH_2Ar); 6.74 (m, 2 H, ArH); 6.92 (d, $J = 7.52$ Hz, 2 H, ArH); 7.05 (d, $J = 7.80$ Hz, 2 H, ArH); 7.06-7.08 (s large, 4 H, ArH), 8.40 (s large, 2 H, NH); 10.02 (s large, 4 H, OH); 11.42 (s large, 2 H, NH_{guan}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.46, 28.73 (CMe_3), 32.11 (ArCH_2Ar); 34.485 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.49 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 79.71, 83.47 (CMe_3); 122.67 (C_p de **a**); 128.53, 128.59, 128.61, 128.63, 128.70, 128.75, 128.78 (C_o de **a** et **b**); 129.39, 129.44, 129.72, 129.78 (C_m de **a** et **b**), 132.57 (C_p de **b**); 147.74, 147.82, 149.17, 149.25 (C_{ipso} de **a** et **b**) 153.61 (CO), 156.52 (C_{guan}), 164.00 (CO).



5,17-[bis-(guanidinoéthyl)]- 25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 38

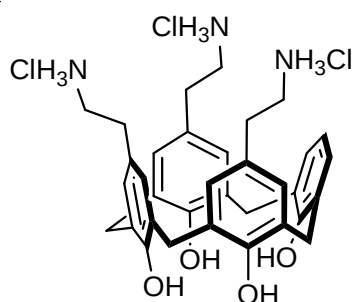
Le calixarène **37** (0.20 g, 0.20 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (75:25). L'ensemble est laissé sous argon et à température ambiante. Après une nuit d'agitation, les solvant sont évaporé. le résidu est plusieurs (4 à 5 fois de suite) fois repris au dichlorométhane afin d'éliminer le maximum de TFA encore présent. Le résidu final est séché sous vide avant d'être repris à l'éther, ce qui entraîne la formation d'un précipité. Ce dernier est trituré, filtré et rincé à l'éther. Le produit finale (poudre blanche) est alors séché sous vide poussé (0.15 g, 93.00%).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6): 2.56 (t, $J = 7.30$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.22 (s large, 4 H $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.76 (s large, 8 H, ArCH_2Ar); 6.63 (m, 2 H, ArH); 6.98 (s large, 4 H, ArH); 7.09 (s large, 4 H, ArH); 7.20-7.68 (s large, 8 H guanidine).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- D_6): 31.30, 32.17 (ArCH_2Ar); 33.84 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$) 42.43, 42.54 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 121.01 (Cp); 129.28 (Cm); 129.35 (Co); 130.72 (Cp); 149.10 (Cipso); 150.66 (Cipso); 157.12, 159.51 (Cguanidine).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot 2 \text{CF}_3\text{COOH} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (858.3). C : 53.15% ; H : 5.16% ; N : 9.79%; trouvée C : 53.23% ; H : 5.00% ; N : 9.73%.

ES-MS (ES^+): 595.47 [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$, pic de très faible intensité à 553.50 [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COOH} - \text{HN}=\text{NH}_2 + \text{H}^+$] $^+$.



Chlorhydrate de 5,11,17-tris[aminoéthyl]- 25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 40.

Le tris-cyano-méthyl-calix[4]arène **39** (0.771 g, 1.42 mmol, 1 éq) est mis en suspension dans 30 ml de THF fraîchement distillé sur Na et additionné de 13 équivalents de BH_3 1M dans THF (13 ml, 18.46 mmol) entraînant la solubilisation du calixarène. Le mélange est alors porté à reflux sous agitation et sous argon. Après 8 h de réaction, le lait formé est de nouveau additionné de 8 équivalents de B_2H_6 1M et laissé à reflux toute une nuit. Le retour à température ambiante est suivie d'une évaporation du solvant. On ajoute au résidu blanc obtenu un mélange: MeOH, HCl, H_2O (35, 7.5 7.5 ml respectivement) et l'on porte 1h30 à reflux. Les solvants sont de nouveau évaporés et le brut est additionné de 75 ml d'acétone. Le précipité est filtré sur fritté, rincé à l'acétone puis séché sous vide. La dernière étape consiste à purifier le sel, par solubilisation dans le MeOH suivi d'une précipitation par ajout d'un excès de Et_2O . Après filtration et séchage on obtient le sel attendu sous forme de fine poudre blanche (0.82 g, 87%).

F°: 157-158°C.

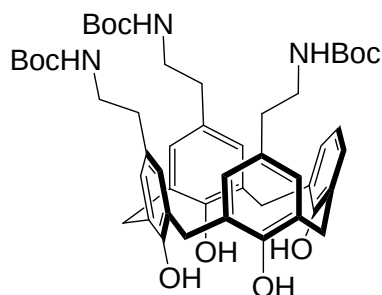
IR (KBr): 3197.63 (OH); 2947.33 (NH_3^+); 1699.60 (NH_3^+); 1604.47 (NH_3^+).

UV-Vis (D_2O): 284 (7333.70).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6): 2.65 (s large, 6 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.90 (s large, 6 H $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.38 (s large, 8 H, ArCH_2Ar); 6.64 (s large, 1 H, ArH); 7.01 (s large, 6 H, ArH); 7.11 (s large, 2 H, ArH); 8.13 (s large, 6 H, NH), 9.92 (s large, 4 H, OH).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{34}H_{39}N_3O_4$, 4.5 HCl (717.76) : C : 61.59% ; H : 6.38 % ; N : 6.34%. Trouvée : C : 56.91% ; H : 6.37 % ; N : 5.39 %.

ES-MS (ES^+): 554 $[M+H^+]^+$; 1107.7 $[2M+H^+]^+$.



5,11,17-Tris-(Boc-aminoéthyl)-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène X

Le calix[4]arène **40** (0.766 g, 1.158 mmol, 1 éq) est mise en solution dans un mélange dioxane/ H_2O (30, 18 mL respectivement) puis additionné d'une solution 1M NaOH (10.5 mL, 0.26 g, 6.6 mmol, 6 éq). Agitation durant 10 min, avant l'ajout du di-tert-butyl-dicarbonate (Boc_2O) (0.727 g, 3.33 mmol, 3 éq). Le mélange est laissé durant 20 heures sous agitation et sous argon à température ambiante (contrôle CCM, SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2) avant évaporation du dioxane. On ajoute à la phase aqueuse résiduelle l'AcOEt (40 mL) puis l'on abaisse le pH à environ 8 à l'aide d'une solution HCl 1M.

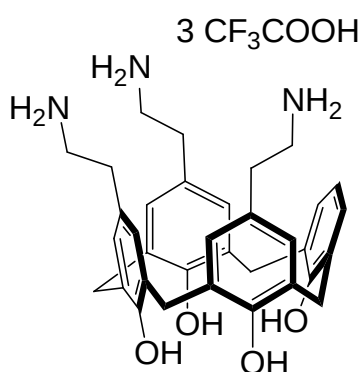
Après la séparation des phases, la phase aqueuse est lavée par l'AcOEt (2x30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. Une dernière purification est effectuée sur le résidu d'évaporation, sur colonne chromatographique (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2). On obtient le produit attendu sous forme d'huile (0.676 g, 68%).

IR (KBr): 3169.06 (OH); 1702.14 (CO); 1509.14 (NH).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.39 (s large, 27 H, tert); 2.58 (s large, 6 H, CH_2CH_2NH); 3.26 (s large, 6 H, CH_2CH_2NH); 3.47 (s large, 4 H, $ArCH_2Ar$); 4.22 (s large, 4 H, $ArCH_2Ar$); 6.71 (t, $J = 7.56$ Hz, 1 H, ArH de **c**); 6.88 (s large, 6 H, ArH de **a** et **b**); 7.03 (d, $J = 7.56$ Hz, 2 H, ArH de **c**); 10.21 (s, 4 H, OH).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{49}H_{63}N_3O_{10}$, 1/3 CH_2Cl_2 (882.35) : C : 67.15% ; H : 7.27 % ; N : 4.76%. Trouvée : C : 66.90% ; H : 7.16 % ; N : 4.69 %

ES-MS (ES^+): 754.63 $[M-Boc+H^+]^+$, 876.65 $[M+Na^+]^+$.



5,11,17-Tris-(aminoéthyl)-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène, tris-trifluoroacetate Y

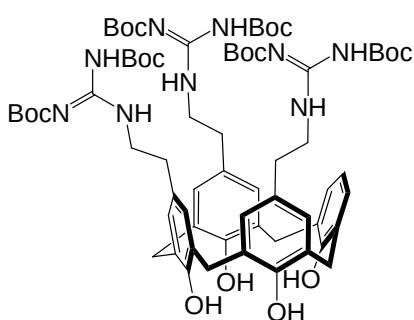
Le calixarène **X** (0.62 g, 0.71 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans un mélange CH_2Cl_2 / TFA (40 mL, 75 : 25) et placé sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Les solvants sont alors évaporés et le résidu obtenu est plusieurs fois repris au dichlorométhane (4 à 5 fois de suite). Le résidu final est séché sous vide avant d'être repris à l' Et_2O , ce qui entraîne la formation d'un précipité blanc. Ce dernier est trituré, filtré et rincé à l' Et_2O . Le produit final (poudre blanche) est alors séché sous vide poussé (0.61 g, 95%).

UV-Vis (D_2O): 282.0 (7703.10).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.59 (t, $J = 7.30$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.76 (t, $J = 7.30$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 2.95 (t, $J = 7.18$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.11 (t, $J = 7.30$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.87 (s large, 8 H, ArCH_2Ar); 6.38 (s large, 2 H, ArH); 6.79 (d, $J = 7.08$ Hz, 2 H, ArH); 6.95 (s large, 4 H, ArH); 7.07 (s, 2 H, ArH).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_4$, 3 CF_3COOH , 2.5 H_2O (940.8) : C : 51.07%; H : 5.04%; N : 4.47%. Trouvée : C : 50.90%; H : 4.67%; N : 4.48%.

ES-MS (ES^+): 554.48 [$\text{M} - 3 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$; 555.50 [$\text{M} - 3 \text{CF}_3\text{COOH} + 2 \text{H}^+$] $^+$.



5,11,17-Tris-[(diBoc-guanidinoéthyl)]-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 41.

Le sel de calix[4]arène **40** (0.59 g, 0.66 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 40 ml de mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ avant l'ajout de Et_3N (0.832 mL, 5.97 mmol, 9 éq.) et la N,N' -Bis(*tert*-butoxycarbonyl), N' -triflylguanidine (0.908 g, 2.32 mmol, 3.5 éq.). Après une nuit de réaction (contrôle CCM: SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%), le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est repris dans CH_2Cl_2 (30 mL) puis lavé avec H_2O (2 x 20 mL). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le brut obtenu subit alors une purification par colonne chromatographique. (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1). On obtient le produit attendu sous forme d'une huile visqueuse (0.59 g, 70%).

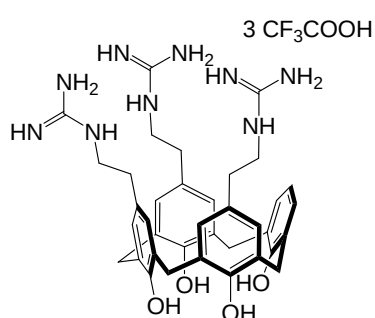
F°: 156-157°C

UV-Vis (CDCl₃): 283.0 (10954.21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.47, 1.50 (s, 54 H, tert); 2.66 (s large, 6 H, CH₂CH₂NH); 3.47 (s large, 4 H, ArCH₂Ar); 3.60 (s large, 6 H, CH₂CH₂NH); 4.21 (s large, 4 H, ArCH₂Ar); 6.72 (s large, 3 H, CH₂CH₂NH); 3.30 (t, J = 6.42 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH); 3.85 (s large, 8 H, ArCH₂Ar); 6.72 (t, J = 3.76 Hz, 1 H, ArH); 6.90 (s large, 6 H, ArH); 7.05 (d, J = 7.56 Hz, 2 H, ArH); 8.38 (s large, 3 H, NH); 10.14 (s large, 4 H, OH); 11.49 (s, 3 H, NH_{guan}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 28.47, 28.71 (CMe₃); 32.11 (ArCH₂Ar); 34.85 (CH₂CH₂NH); 42.47 (CH₂CH₂NH); 79.64, 83.41 (CMe₃); 123.00 (Cp); 128.74, 129.22 (Cm); 129.71 (Co), 132.57, 134.42, (Cp); 147.80, 149.47 (C_{ipso}), 153.57, 156.49 (C_{guanidine}).

Analyse élémentaire calculée pour C₆₇H₉₃N₉O₁₆, (1279.67) : C : 62.84%; H : 7.32%; N : 9.84%.
Trouvée : C : 62.87%; H : 7.14%; N : 9.92%.



5,11,17-tris-(guanidinoéthyl)- 25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arène 42.

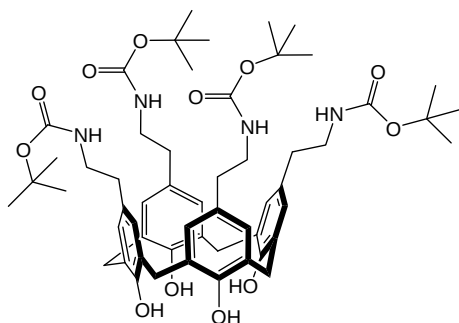
Le calixarène **41** (0.15 g, 0.12 mmol, 1 éq) est mis en solution dans un mélange CH₂Cl₂/TFA (75:25), on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction, le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise au CH₂Cl₂ et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le résidu est par la suite séché sous vide poussé. Le brut est alors repris et trituré dans l'Et₂O pour donner une poudre blanche qui est filtrée sur fritté, lavée à l'Et₂O et séchée puis lyophilisée (0.115 g, 95 %).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): 2.30 (s large, 3 H, CH₂CH₂NH); 2.66 (t, J = 6.04 Hz, 2 H CH₂CH₂NH); 3.00 (s large, 3 H, CH₂CH₂NH); 3.30 (t, J = 6.42 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH); 3.85 (s large, 8 H, ArCH₂Ar); 6.27 (s large, 1 H, ArH); 6.73 (s large, 2 H, ArH); 6.85 (s, 2 H, ArH); 6.90 (s, 2 H, ArH); 7.32 (s large, 2 H, ArH).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): 30.83, 30.89 (ArCH₂Ar); 33.41, 33.80 (CH₂CH₂NH); 42.55, 42.78 (CH₂CH₂NH); 116.77 (q, J = 290.92 Hz, CF₃COO⁻); 122.24 (C_p); 128.53, 129.27, 129.50, 129.63 (C_o et C_m); 132.08, 132.29 (C_p); 147.53, 148.22, 149.07 (C_{ipso}) 15.84, 157.03 (C_{guan}), 163.26 (q, J = 35.73 Hz, CF₃COO⁻).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{37}H_{45}N_9O_4$, 3 CF_3COOH , 3 H_2O (1075.93) : C : 48.00%; H : 5.06%; N : 11.72% ; trouvée : C : 47.82%; H : 4.82%; N : 12.15%.

ES-MS (ES^+): 908.58 $[M + 2 CF_3COOH + H^+]^+$; 794.49 $[M + CF_3COOH + H^+]^+$; 680.52 $[M + H^+]^+$.



5,11,17,23-Tétra-*para*-(Boc-aminoéthyl)-25,26,27,28-tétra(hydroxy)-calix[4]arene 8

Le calix[4]arène **7** (0.83 g, 1.05 mmol, 1 éq) est mis en solution dans un mélange dioxane/ H_2O (40 et 24 mL, respectivement) puis additionné d'une solution 1 M de NaOH (14 mL, 0.35 g, 8.8 mmol, 8 éq). Le mélange est agité durant 10 min avant l'ajout du di-*tert*-butyl-dicarbonat (Boc_2O) (0.97 g, 4.44 mmol, 4 éq). Le mélange est laissé une vingtaine d'heures sous agitation et sous argon à température ambiante (contrôle CCM, Al_2O_3 , $CH_2Cl_2/MeOH$, 98:2) avant évaporation du dioxane. On ajoute à la phase aqueuse résiduelle AcOEt (40 mL) puis l'on abaisse le pH (7-8) à l'aide d'une solution de HCl 1M. Les phases sont alors séparées, la phase aqueuse lavée à l'aide d'AcOEt (2 x 30 mL) et les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. On effectue ensuite sur le filtrat une purification par colonne chromatographique (Al_2O_3 , $CH_2Cl_2/MeOH$, 99:1) pour obtenir le produit attendu sous forme d'une poudre blanche (0.93 g, 90%).

F°: 131-131°C.

IR (KBr): 3351.6 (OH); 1701.3 (CO); 1509.6 (NH).

UV-Vis (CH_2Cl_2): 280 (31186).

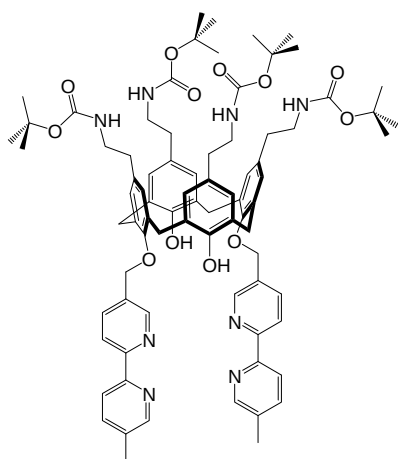
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.27 (m, 36 H, Me_3C); 2.59 (t, $J = 6.6$ Hz, 8 H, CH_2CH_2N); 3.27 (s large, 8 H, CH_2CH_2N); 3.44-4.21 (AB, $J_{AB} = 13.6$ Hz; 8 H, $ArCH_2Ar$); 6.86 (s, 8 H, ArH); 10.26 (s, 4 H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 28.64 (Me_3C); 32.34 ($ArCH_2Ar$); 35.73 (CH_2CH_2N); 42.17 (CH_2CH_2N); 79.54 (Me_3C); 128.57 (C_o); 129.91 (C_m); 132.96 (C_p); 147.75 (C_{ipso}); 156.40 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{56}H_{76}O_{12}N_4$ (997.31): C : 67.44, H : 7.68, N : 5.61; trouvée: C : 67.43, H : 7.35, N : 5.61.

ES-MS (ES^+): 1019.08 $[M + Na^+]^+$.

ES-MS (ES^-): 995.15 $[M - H^+]$



5,11,17,23-Tétra-(Boc-aminoéthyl)-25,27-Bis(5-méthyleneoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridyl)-26,28-dihydroxycalix[4]arène 44.

Le calixarène **8** (0.3 g, 0.3 mmol, 1 éq), est mis en solution dans 30 mL de CH₃CN (fraîchement distillé sur CaH₂) avec K₂CO₃ (0.105 g, 0.8 mmol, 2.6 éq) et placé à reflux sous atmosphère d'argon pendant 30 minutes. On additionne alors le 5-bromométhyl-5'-méthyl-2-2'-bipyridine (0.158 g, 0.6 mmol, 2 éq) puis on laisse à reflux environ 4 à 5 heures (contrôle CCM, SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. Le résidu obtenu est solubilisé dans

CH₂Cl₂ et filtré sur fritté afin d'éliminer les impuretés minérales. La phase organique subit ensuite une purification sur colonne chromatographique (SiO₂, CH₂Cl₂) ce qui permet d'obtenir le composé attendu sous la forme d'une poudre blanche (0.251 g, 61.4%).

M.p.: 127-128°C.

IR (KBr): 3365.02 (OH); 1708.98 (CO).

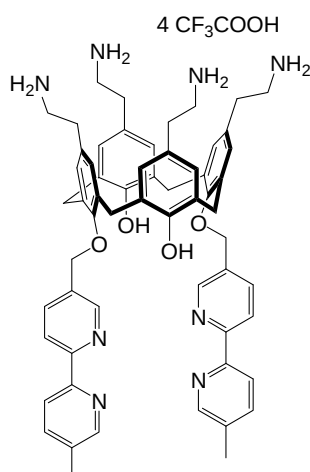
UV-Vis (CH₂Cl₂): 290 (68214).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.42 (s large, 36 H, Me₃C); 3.13 (m, *J* = 5.8 Hz; 4 H, CH₂CH₂N de **B**); 3.27 (m, 4 H, CH₂CH₂N de **A**); 3.26-4.20 (AB, *J*_{AB} = 13.08 Hz, 8 H, ArCH₂Ar); 5.14 (s, 4 H, OCH₂bpy); 6.72 (s, 4 H, ArH de **B**); 6.83 (s, 4 H, ArH de **A**); 7.51 (dd, *J* = 7.2 Hz, 2 H, H_{4'} bpy); 7.61 (s large, 2 H, OH); 8.12 (dd, *J* = 8.04 Hz, 2 H, H_{3'} bpy); 8.23 (d, *J* = 8.04 Hz, 2 H, H₄ bpy); 8.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H, H₃ bpy); 8.39 (s, 2 H, H_{6'} bpy); 8.87 (s, 2 H, H₆ bpy).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 18.72 (Mebpy); 28.86 Me₃C; 32.14 (ArCH₂Ar); 35.64, 36.18 (CH₂CH₂N); 42.25, 42.52 (CH₂CH₂N); 76.09 (OCH₂bpy); 79.45 (Me₃C); 121.14, 121.27, 136.95, 137.72, 148.82, 149.83 (C₃, C_{3'}, C₄, C_{4'}, C₆, C_{6'}, de bpy); 129.27, 129.89 (C_m de Ar); 128.26, 132.20, 133.68, 136.39, 150.90 (C_O et C_P de Ar, C₅, C_{5'}, de bpy); 151.96, 153.56 (C_i de Ar); 156.25 (COO); 156.40, 156.52 (C₂, C_{2'}, de bpy).

Analyse élémentaire calculée pour C₈₀H₉₆N₈O₁₂, 0.25 CH₂Cl₂ (1444.66): C : 69.70, H : 7.03, N : 8.10; trouvée: C : 69.87, H : 6.98, N : 8.09.

ES-MS (ES⁺): 1361.5 [M + H]⁺, 1383.5 [M + Na]⁺, 1389.2 [3 M + 3H + CH₂Cl₂]^{3+/3}.



5,11,17,23-Tétra-(aminoéthyl)-25,27-Bis(5-méthyleneoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridyl)-26,28-dihydroxycalix[4]arène, hexa-trifluoroacetate 45.

Le calix[4]arène **44** (0.2 g, 0.15 mmol, 1 éq) est mis en solution dans 20 mL de CH_2Cl_2 anhydre et additionné de 7 mL TFA, on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après trois heures de réaction, le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise dans CH_2Cl_2 (environ 5 fois) et évaporée. Le résidu final solide est séché sous vide avant d'être repris et trituré dans Et_2O . La poudre blanche obtenue est filtrée sur fritté, lavée à Et_2O et séchée (0.199 g, 96%).

M.p.: 129-130°C.

IR (KBr): 3400.2 (OH); 2900.8 (NH_3^+); 1660.1 (COO).

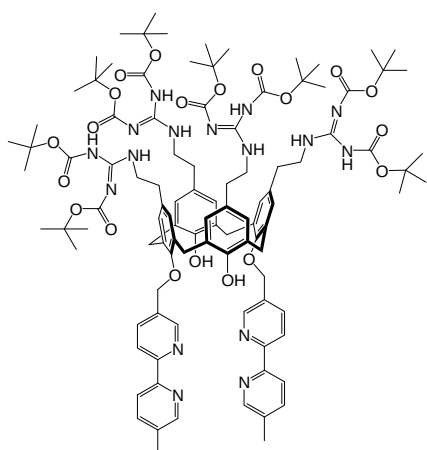
UV-Vis (H_2O): 286 (38304).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.41 (s, 6 H, Mebpy); 2.65 (t, $J = 7.42$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ de **A**); 2.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **B**); 3.04 (t, $J = 7.54$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **A**); 3.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **B**); 3.55-4.21 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.6$ Hz, 8 H, ArCH_2Ar); 5.23 (s, 4 H, OCH_2 bpy); 6.97 (s, 4 H, ArH de **B**); 7.16 (s, 4 H, ArH de **A**); 7.82-7.89 (m, 2 $H_{4'}$ and 4 $H_{3',3}$ de bpy); 8.26 (s, 2 H, $H_{6'}$ bpy); 8.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H, H_4 bpy); 9.03 (s, 2 H, H_6 bpy).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 17.74 (Mebpy); 30.93 (ArCH_2Ar); 32.25, 32.29 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 40.47, 41.00 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 74.47 (OCH_2bpy); 116.71 (q, $J = 291.8$ Hz, CF_3COO^-); 122.00, 122.31, 129.55, 129.93, 137.78, 142.94, 145.55, 146.68 ($\text{C}_3, \text{C}_{3'}, \text{C}_4, \text{C}_{4'}, \text{C}_6, \text{C}_{6'}$, de bpy et C_m de Ar); 128.11, 128.70, 133.79, 135.00, 135.58, 137.69, 147.10, 149.05, 150.26, 151.30 ($\text{C}_2, \text{C}_{2'}, \text{C}_5, \text{C}_{5'}$ de bpy; C_p, C_o et C_i de Ar); 163.21 (q, $J = 35.2$ Hz, CF_3COO^-).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{60}\text{H}_{64}\text{O}_4\text{N}_8$, 6 CF_3COOH , 1.5 H_2O (1671.48): C : 51.71, H : 4.40, N : 6.70; trouvée : C : 51.69, H 4.19, N 6.87.

ES-MS (ES^+): 1075.3 [$\text{M} - 3 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$, 961.3 [$\text{M} - 4 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$, 481.29 [$\text{M} - 4 \text{CF}_3\text{COOH} + 2\text{H}^+$] $^{2+/2}$.



5,11,17,23-Tétra-[(N,N'-di-Boc)guanidinoéthyl]-25,27-Bis(5-méthylèneoxy-5'-methyl-2,2'-bipyridyl)-26,28-dihydroxy calix[4]arène 46.

Le sel amino-tétra-éthyl-calix[4]arène **45** (0.205 g, 0.144mmol, 1 éq) est mis en suspension dans 20mL de CH₂Cl₂ anhydre puis solubilisé par le minimum de MeOH, avant l'ajout de Et₃N (241 µl, 1.735 mmol, 12 éq) et de *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-triflylguanidine (0,23 g, 0,578 mmol, 4 éq). Le mélange est maintenu sous agitation et sous argon pendant 16 h (contôle CCM: Al₂O₃, CH₂Cl₂). Le solvant est évaporé pour donner un

brut qui est solubilisé dans CH₂Cl₂ (50 ml), lavée par H₂O (2 x 30 ml). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. On effectue ensuite une purification sur colonne chromatographique (Al₂O₃, CH₂Cl₂), et l'on obtient le produit attendu sous forme d'une poudre rose (0,234 g, 84%).

M.p.: 125-126 °C.

IR (KBr): 3334.06 (OH); 1721.1 (COO); 1638.76 (NCO, NHCO).

UV-Vis (CH₂Cl₂): 289 (52921).

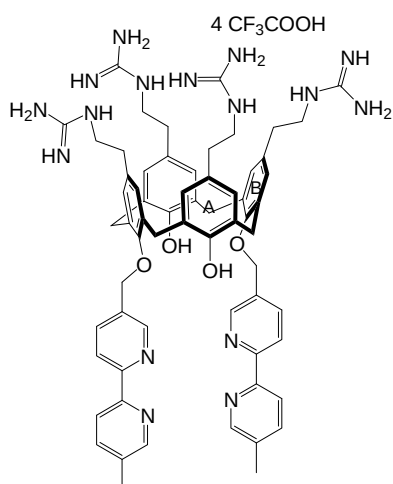
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 1.39-1.51 (m, 72 H, Me₃C); 2.34 (s, 6 H, CH₃ bpy); 2.57 (t, *J* = 7.17 Hz, 4 H, CH₂CH₂N de **B**); 2.72 (t, *J* = 7.18 Hz, 4H, CH₂CH₂N de **A**); 3.27-4.22 (AB, *J*_{AB} = 13.1 Hz, 8 H, ArCH₂Ar); 3.52 (q, *J* = 6.86 Hz, 4 H, CH₂CH₂N de **B**); 3.6 (q, *J* = 6.79 Hz; 4H, CH₂CH₂N de **A**); 5.13 (s, 4 H, OCH₂bpy); 6.78 (s, 4 H, ArH de **B**); 6.87 (s, 4 H, ArH de **A**); 7.47 (dd, *J* = 8,3 Hz, 2 H, H_{4'} bpy); 7.76 (s, 2 H, OH); 8.14 (dd, *J* = 8.06 Hz, 2 H, H₄ bpy); 8.21 (d, *J* = 8.06 Hz, 2 H, H_{3'} bpy); 8.29 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH₂NH de **B** ou **A**); 8.35-8.41 (m, 6 H, 2H₃, 2H₆ de bpy et 2 CH₂NH de **B** ou **A**); 8.89 (dd, *J* = 1.51 Hz, 2 H, H₆ de **A**); 11.46 (s, 4 H, NH guan).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 18.74 (Me bpy); 28.41, 28.48, 28.72 (Me₃C); 32.06 (ArCH₂Ar); 34.85, 35.15 (CH₂CH₂N); 42.55, 42.89 (CH₂CH₂N); 76.17 (OCH₂ bpy); 79.58, 79.63, 83.29, 83.34 (CMe₃); 121.08, 121.25, 128.15, 130.16, 136.69, 137.55, 148.66, 149.88 (C₃, C_{3'}, C₄, C_{4'}, C₆, C_{6'}, de bpy et C_m de Ar); 128.18, 129.33, 132.28, 133.50, 133.61, 135.92, 137.59, 150.96, 152.22, 153.52, 153.73, 156.43, 156.49, 156.59 (C₂, C_{2'}, C₅, C_{5'} de bpy; C_p, C_o et C_i de Ar; C guan, CO); 153.57, 164.03 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour C₁₀₄H₁₃₆O₂₀N₁₆, CH₂Cl₂ (2013.94): C : 62.62, H : 6.90, N : 11.12; trouvée: C : 62.85, H : 7.03, N : 11.36.

ES-MS (ES⁺): 1930.7 [M + H]⁺, 1831.0 [M-Boc + H + H]⁺, 965.5 [M + 2 H]^{2+/2}, 915.6 [M - Boc + H + 2 H]^{2+/2}; 644.5 [M + 3 H]^{3+/3}, 610.8 [M - Boc + H + 3 H]^{3+/3}, 577.4 [M - 2 Boc + 2 H + 3 H]^{3+/3}, 544.1

$[M - 3 \text{ Boc} + 3 \text{ H} + 3 \text{ H}]^{3+/3}$, 510.51 $[M - 4 \text{ Boc} + 4 \text{ H} + 3 \text{ H}]^{3+/3}$, 477.4 $[M - 5 \text{ Boc} + 5 \text{ H} + 3 \text{ H}]^{3+/3}$, 444.0 $[M - 6 \text{ Boc} + 6 \text{ H} + 3 \text{ H}]^{3+/3}$, 410.6 $[M - 7 \text{ Boc} + 7 \text{ H} + 3 \text{ H}]^{3+/3}$, 377.4 $[M - 8 \text{ Boc} + 8 \text{ H} + 3 \text{ H}]^{3+/3}$.



5,11,17,23-Tétra-(guanidinoéthyl)-25,27-Bis(5-méthyleneoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridyl)-26,28-dihydroxycalix[4]arène, hexa-trifluoroacetate 47.

Le calixarène **46** (0.2 g, 0.104 mmol, 1 éq) est mis en solution dans un mélange CH_2Cl_2 anhydre (20 mL) et TFA (6 mL), on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le résidu est par la suite séché sous vide poussé. Le brut est alors repris et trituré dans Et_2O pour donner une poudre légèrement colorée qui est filtrée sur fritté,

lavée à l' Et_2O et séchée sous vide. Le produit attendu est obtenu sous une forme lyophilisée de couleur rose (0.16 g, 83%).

F°: 120-121°C.

IR (KBr): 3357.88 (OH); 1673.88 (NH).

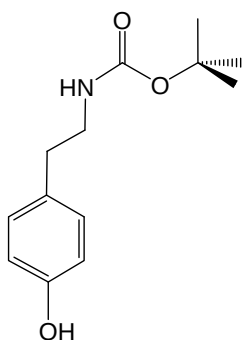
UV-Vis (H_2O): 287 (40098).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.38 (s, 6 H, *Me* bpy); 2.56 (t, $J = 6.42$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **A**); 2.75 (t, $J = 6.5$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **B**); 3.23 (t, $J = 6.42$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **A**); 3.39 (t, $J = 6.67$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **B**); 3.56-4.25 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.34$ Hz, 8 H, ArCH_2Ar); 5.24 (s, 4 H, OCH_2 bpy); 6.96 (s, 4 H, *ArH* de **B**); 7.13 (s, 4 H, *ArH* de **A**); 7.80 (s, 4 H, $H_{4'}$, 4 bpy); 7.84 (d, $J = 8.31$ Hz, 2 H, $H_{3'}$ bpy); 8.24 (s, 2 H, $H_{6'}$ bpy); 8.35 (d, $J = 9.32$ Hz, 2 H, H_3 bpy); 8.99 (s, 2 H, H_6 bpy).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 18.10 (*Me* bpy); 31.20 (ArCH_2Ar); 33.96 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **B**); 34.36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **A**); 42.24 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **A**); 42.91 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de **B**); 75.84 (OCH_2 bpy); 117.65 (q, $J = 298.6$ Hz, CF_3COO^-); 120.61, 120.65, 136.71, 138.40, 148.33, 148.98 (C_3 , C_3' , C_4 , C_4' , C_6 , C_6' de bpy); 127.66 (C_o de **Ar B**); 129.40 (C_m de **Ar A**); 129.51 (C_p de **B**); 129.84 (C_m de **Ar B**); 133.94 (C_o de **Ar A**); 136.08 (C_p de **Ar A**); 150.90, 151.37 (C_i de **Ar A** et **Ar B**); 133.02, 134.23, 151.81, 154.56 (C_2 , C_2' , C_5 , C_5' de bpy); 157.25 (*C* guan); 163.17 (q, $J = 35.5$ Hz, CF_3COO^-).

Analyse élémentaire calculé pour $C_{64}H_{72}O_4N_{16}$, 6 CF_3COOH , 4 H_2O (1885.56): C: 48.41, H: 4.60, N: 11.89; trouvée: C: 48.82, H: 4.21, N: 11.98.

ES-MS (ES^+): 1471.4 $[M - 2 CF_3COOH - CF_3COO]^+$, 1357.3 $[M - 3 CF_3COOH - CF_3COO]^+$, 1243.4 $[M - 4 CF_3COOH - CF_3COO]^+$, 1129.3 $[M - 5 CF_3COOH - CF_3COO]^+$, 565.3 $[M - 6 CF_3COOH + 2 H^+]^{2+/2}$, 377.3 $[M - 6 CF_3COOH + 3 H^+]^{3+/3}$.



Para-éthylamino-Boc-phénol 48

La tyramine chlorhydrate (1.00 g, 5.76 mmol, 1 éq) est mise en solution dans un mélange dioxane/ H_2O distillée (25/12 ml), puis l'on additionne NaOH en solution dans 10 ml d'eau distillée. Agitation 10 min avant l'ajout du di-tert-butyl-dicarbonate (Boc_2O) (1.26 g, 5.76 mmol, 1 éq). La réaction est laissée une nuit sous agitation, sous argon et à température ambiante. Après évaporation du dioxane la phase aqueuse résiduelle est additionnée de 40 ml d'AcOEt, et le pH

du mélange est abaissé par l'addition d'une solution aqueuse de HCl 1M. Les phases sont en suite séparées et la phase aqueuse est lavée par 2x15 ml d'AcOEt. Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. Le brut est purifié sur colonne chromatographique (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 99 : 1) pour donner une huile qui est reprise dans l'hexane ou l'heptane, trituré, soniqué. Le précipité blanc qui se forme est filtré et séché pour donner un produit solide blanc **48** (0.98 g, 73%).

F°: 61 - 62°C

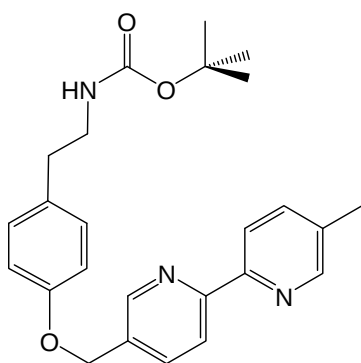
IR (KBr): 3378.9 (-OH; -CONH-); 1686.6 (CO).

UV-Vis (CH_2CH_2): 277 (1803).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.44 (s, 9 H, tert) 2.70 (t, $J = 7.90$ Hz, 2 H, $ArCH_2CH_2NH$); 3.32 (m, 2 H, $ArCH_2CH_2NH$); 4.60 (s large, 1 H, NH ou OH); 6.02 (s large, 1 H, NH ou OH); 6.77 (d, $J = 8.30$ Hz, 2 H, ArH); 7.01 (d, $J = 8.30$ Hz, 2 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 28.84 (CMe_3); 35.64 ($ArCH_2CH_2NH$); 42.49 ($ArCH_2CH_2NH$); 80.15 (CMe_3); 115.97 (C_m); 130.18 (C_o); 130.50 (C_p); 155.38 (C_{ipso}); 156.84 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{13}H_{19}O_3N$: C: 65.80%; H: 8.07%; N: 5.90% trouvée: C: 65.77%; H: 8.09%; N: 5.90%.



N-Boc-aminoéthyl-4-[5-méthyleneoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridyl]-benzene 49.

La tyramine boquée (0.2 g, 0.843 mmol, 1 éq) est mise en solution avec K_2CO_3 (0.12 g, 0.843 mmol, 1 éq) dans 30 mL de CH_3CN fraîchement distillée sur CaH_2 et laissé à reflux pendant 30 min avant l'ajout du 5-bromométhyl-5'-méthyl-2,2'-bipyridine (0.22 g, 0.843 mmol, 1 éq). On laisse ensuite sous agitation, à reflux et sous argon.

Après 23 h (contrôle CCM: SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 et quelques gouttes de Et_3N), le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. Le résidu obtenu est repris dans le CH_2Cl_2 et filtré sur fritté afin d'éliminer les impuretés minérales. Le brut est ensuite purifié par colonne chromatographique (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 99.4:0.6) pour obtenir le composé attendu **49**, sous forme d'une poudre blanche (0.28 g, 80%).

M.p.: 134-135 °C.

IR (KBr): 3378.32 (-CONH-); 1689.06 (CO).

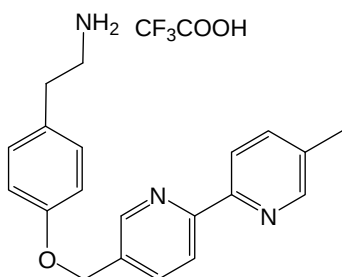
UV-Vis (CH_2Cl_2): 289 (26079).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.43 (s, 9 H, Me_3C); 2.39 (s, 3 H, $Mebpy$); 2.73 (t, $J = 6.8$ Hz, 2 H, CH_2CH_2NH); 3.34 (s large, 2 H, CH_2CH_2NH); 4.53 (s large, 1 H, NH); 5.11 (s, 2 H, OCH_2bpy); 6.93 (d, $J = 8.56$ Hz, 2 H, ArH); 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, ArH); 7.26 (dd, $J = 8.06$ Hz, 1 H, H bpy); 7.87 (dd, $J = 8.31$ Hz, 1 H, H bpy); 8.28 (d, $J = 8.06$ Hz, 1 H, H bpy); 8.38 (d, $J = 8.06$ Hz, 2 H, H bpy); 8.50 (s, 1 H, H bpy); 8.71 (dd, $J = 1.26$ Hz, 1 H, H bpy).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 18.78 ($Mebpy$); 28.82 (Me_3C); 35.71 (CH_2CH_2NH); 42.33 (CH_2CH_2NH); 68.00 (Me_3C); 79.59 (OCH_2bpy); 115.40, 130.27 (C_o et C_m de Ar); 121.00, 121.04 ($C_{3'}$, 3 de bpy); 132.18 (C_p de Ar); 136.64, 137.89, 148.73, 150.09 (C_4 , $C_{4'}$, C_6 , $C_{6'}$ de bpy); 132.66, 133.95, 156.28, 156.50 (C_2 , $C_{2'}$, C_5 , $C_{5'}$ de bpy); 153.72 (C_i de Ar); 157.46 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{25}H_{29}O_3N_3$ (419.52): C : 71.57, H : 6.97, N : 10.02; trouvé: C : 71.65, H : 6.88, N : 9.93.

ES-MS (ES^+): 420.1 $[M + H]^+$, 442.2 $[M + Na]^+$.



Aminoéthyl-4-[5-méthylèneoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridyl]-benzène, trifluoroacétate 51.

Le composé **49** (0.25 g, 0.6 mmol, 1 éq) est mis en solution dans 20 mL CH_2Cl_2 anhydre et additionné de 6 mL TFA. La réaction est laissée sous agitation, sous argon et à température ambiante environ deux heures (contrôle CCM : Al_2O_3 , CH_2Cl_2) avant l'évaporation du solvant.

Le résidu huileux est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel, puis séché sous vide. Le brut obtenu est alors repris et trituré dans Et_2O pour donner une poudre orange (0.255 g, 96%).

M.p.: 169-170°C.

IR (KBr): 3007 (NH_3^+); 1676 (COO); 1554 (C=N).

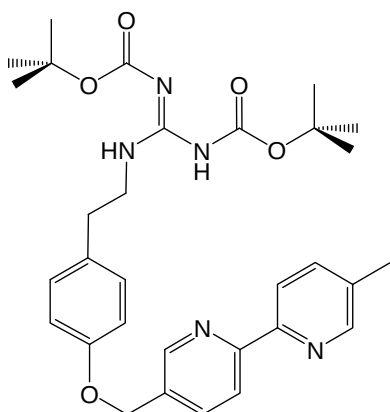
UV-Vis (H_2O): 288 (27679), 240 (22009), 228 (20464).

RMN^1H (400 MHz, D_2O) 2.36 (s, 3 H, *Mebpy*); 2.92 (t, $J = 7.17$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.22 (t, $J = 7.17$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5.19 (s, 2 H, OCH_2bpy); 7.04 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, *ArH*); 7.25 (d, $J = 8.31$ Hz, 2 H, *ArH*); 7.78 (d, $J = 8.56$ Hz, 1 H, *H bpy*); 7.89 (d, $J = 7.81$ Hz, 1 H, *H bpy*); 7.98 (s, 2 H, *H bpy*); 8.41 (s, 1 H, *H bpy*); 8.61 (s, 1 H, *H bpy*).

RMN^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): 18.18 (*Mebpy*); 32.56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 40.52 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 67.08 (OCH_2bpy); 115.38, 130.16 (C_o et C_m de *Ar*); 120.24, 120.38, 137.03, 137.99, 148.93, 149.92 (C_3 , C_3' , C_4 , C_4' , C_6 , C_6' de *bpy*); 133.10, 134.10, 152.82, 155.36 (C_2 , C_2' , C_5 , C_5' de *bpy*); 130.02 (C_p de *Ar*); 157.30 (C_i de *Ar*); le signal du TFA est non visible.

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ON}_3$, CF_3COOH , 0.5 H_2O (442.17): C : 59.72, H : 5.24, N : 9.50; found: C : 59.77, H : 5.20, N : 9.57.

ES-MS (ES^+): 320.0 [$\text{M} - \text{CF}_3\text{COO}$] $^+$.



[(N,N'-di-Boc)-guanidinoéthyl]-4-[5-méthylèneoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridyl]-benzène 52.

Le composé **51** (0.233 g, 0.54 mmol, 1 éq) est mis en suspension dans 25 mL de CH_2Cl_2 anhydre, et solubilisé dans un minimum de MeOH. On ajoute alors la Et_3N (0.3 mL, 2.15 mmol, 4 éq), et on laisse 10 min sous agitation avant l'ajout de la *N,N'*-Bis(*tert*-

butoxycarbonyl)-*N''*-triflylguanidine (0,21 g, 0,54 mmol, 1 éq), la réaction se fait sous argon, à température ambiante (contrôle CCM : SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2 et quelques gouttes de Et₃N). Après 23 h de réaction, le solvant est évaporé et le résidu est repris dans 50 mL de CH₂Cl₂ puis lavé avec H₂O (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée pour donner un produit qui subit une dernière purification sur colonne Chromatographique SiO₂ préalablement désactivé par un mélange CH₂Cl₂/NEt₃ 90:10 et élué par CH₂Cl₂. Le produit **52** attendu est sous forme de poudre rose (0.234 g, 84%).

F°: 148-149 °C.

IR (KBr): 3331.55 (CONH); 1709.01(CO); 1636.81 (NCO); 1512.12 (NH).

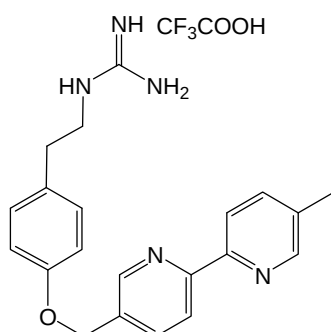
UV-Vis (CH₂Cl₂): 289 (28230).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 1.47 (s, 9 H, Me₃C); 1.50 (s, 9 H, Me₃C); 2.41 (s, 3 H, Mebpy); 2.82 (t, *J* = 7.16 Hz, 2 H, CH₂CH₂N); 3.64 (q, *J* = 7.0 Hz, 2 H, CH₂CH₂N); 5.29 (s, 2 H, OCH₂bpy); 6.92 (d, *J* = 8.56 Hz, 2 H, Ar*H*); 7.15 (d, *J* = 8.56 Hz, 2 H, Ar*H*); 7.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H* bpy); 7.9 (dd, *J* = 8.2 Hz, 1 H, *H* bpy); 8.33 (d, *J* = 8.08 Hz, 1 H, *H* bpy); 8.37 (br s, 1 H, NH); 8.43 (d, *J* = 8.04 Hz, 1 H, *H* bpy); 8.52 (s, 1 H, *H* bpy); 8.72 (s, 1 H, *H* bpy); 11.46 (s, 1 H, NH guan).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 18.78 (Mebpy); 28.44, 28.71 (Me₃C); 34.81 (CH₂CH₂N); 42.79 (CH₂CH₂N); 67.99 (Me₃C); 79.63 (OCH₂bpy); 83.41 (Me₃C); 115.37, 130.30 (C_o et C_m de Ar); 120.99, 121.05, 136.64, 137.87, 148.73, 150.07 (C₃, C_{3'}, C₄, C_{4'}, C₆, C_{6'} de bpy); 131.73 (C_p de Ar); 132.67, 133.91, 156.53, 157.55 (C₂, C_{2'}, C₅, C_{5'} de bpy); 153.57, 153.74 (C_{ipso} de Ar, CO); 157.55 (C₂ de bpy); 156.47 (C guan); 164.02 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour C₃₁H₃₉N₅O₅, 0.33 CH₂Cl₂ (589.98): C : 63.79, H : 6.78, N : 11.87; trouvée: C : 63.70, H : 5.57, N : 11.96.

MS - EI (ES⁺): 320.1 [M – (BocNH-C=NBoc)]⁺; 342.0 [M – (BocNH-C=NBoc) + Na⁺]⁺; 639.3 [2(M – (BocNH-C=NBoc)) + H⁺]⁺.



Guanidinoéthyl-4-[5-méthylénoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridyl]-benzène, trifluoroacetate **53.**

Le composé **52** (0.244 g, 0.434 mmol, 1 éq), est mis en solution dans un mélange CH₂Cl₂/TFA (25:6 mL), et laissé à température ambiante sous argon et sous agitation (contrôle CCM SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Après environ 22 h de réaction les solvants sont évaporés, le résidu

huileux est repris au CH_2Cl_2 et évaporé (4 fois de suite) puis séché sous vide. Le résidu solide rose obtenu est repris et trituré dans l' Et_2O puis filtré, séché et lyophilisé pour donner le sel de guanidinium **53** attendu (0.195 g, 95%).

M.p.: 162-163°C.

IR (KBr): 3392.73 (NH_2); 3116.38 (NH_3^+); 1673.98 (C=O); 1626.79, 1513.25 (NH_3^+).

UV-Vis (H_2O): 288 (19072), 240 (15422), 228 (14836).

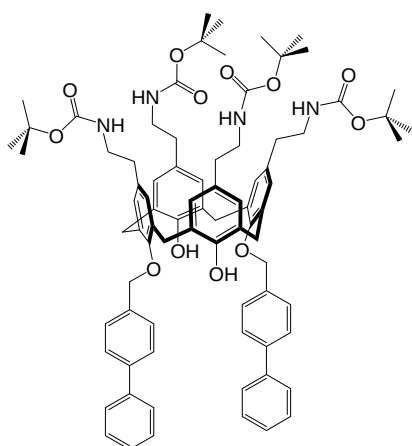
RMN- ^1H (400 MHz, D_2O): 2.35 (s, 3 H, *Mebpy*); 2.79 (t, $J = 6.28$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.43 (t, $J = 6.54$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5.16 (s, 2 H, OCH_2bpy); 7.00 (d, $J = 8.04$ Hz, 2 H, *ArH*); 7.20 (d, $J = 8.28$ Hz, 2 H, *ArH*); 7.76 (d, $J = 7.04$ Hz, 1 H, *H bpy*); 7.87 (d, $J = 7.28$ Hz, 1 H, *H bpy*); 7.96 (s, 2 H, *H bpy*); 8.40 (s, 1 H, *H bpy*); 8.58 (s, 1 H, *H bpy*).

RMN- ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 2.64 (s, 3 H, *Mebpy*); 2.86 (t, $J = 7.16$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.45 (q, $J = 4.78$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5.33 (s, 2 H, OCH_2bpy); 7.14 (d, $J = 8.32$ Hz, 2 H, *ArH*); 7.34 (d, $J = 8.32$ Hz, 2 H, *ArH*); 6.9 -7.77 (s large, 3 H, *NH guan*); 7.79 (s large, 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 7.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, *H bpy*); 8.12 (d, $J = 8.28$ Hz, 1 H, *H bpy*); 8.42 (t, $J = 8.04$ Hz, 1 H, *H bpy*); 8.51 (d, $J = 8.08$ Hz, 1 H, *H bpy*); 8.66 (s, 1 H, *H bpy*); 8.87 (s, 1 H, *H bpy*).

RMN- ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 18.19 (*Mebpy*); 33.93 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 42.59 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 67.08 (OCH_2bpy); 115.16, 130.24 (C_o ou C_m de *Ar*); 120.22, 120.37, 137.02, 137.98, 148.95, 149.94 (C_3 , C_3' , C_4 , C_4' , C_6 , C_6' de *bpy*); 131.09 (C_p de *Ar*); 133.13, 134.09, 152.84, 155.37 (C_2 , C_2' , C_5 , C_5' de *bpy*); 157.10, 157.14 (C_{guan} ; C_{ipso} de *Ar*); 158.85 (q, $J = 30.9$ Hz, CF_3COO^-); CF_3COO^- pas observé.

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ON}_5$, CF_3COOH (475.46): C : 58.10, H : 5.09, N : 14.73; trouvée: C : 57.96, H : 5.20, N : 14.63.

ES-MS (ES^+): 362.1 [$\text{M} - \text{CF}_3\text{COO}^-$] $^+$.

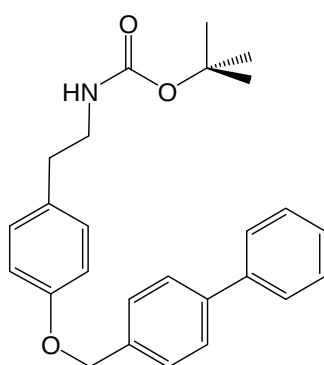


25,27-Bis-[(para-phényl)benzyloxy]-26,28-dihydroxy-5,11,17,23-tétra-(Bocaminoéthyl)-calix[4] arène **44.**

Le calixarène **8** (0.4 g, 0.401 mmol, 1 éq.), est mis en solution dans 50 ml de CH_3CN (fraîchement distillé sur CaH_2) en présence de K_2CO_3 (0.11 g, 0.802 mmol, 2 éq.) et placé à reflux sous atmosphère d'argon pendant 30 minutes. On additionne alors le composé bromé (0.198 g, 0.802 mmol, 2 éq.). Le tout est

laissé à reflux durant 4 à 5 heures (contrôle CCM, SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. Le résidu obtenu est solubilisé dans CH₂Cl₂ et lavé par H₂O (3 x 20 ml) afin d'éliminer les impuretés minérales. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄ et subissent en une purification sur colonne chromatographique (SiO₂, CH₂Cl₂). Le composé **44** attendu est ainsi obtenu sous forme de poudre blanche (0.412 g, 77 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.34 – 1.36 (m, 36 H, *t*bu); 2.40 (s large, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 2.59 (s large, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 3.06 (s large, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 3.19 – 3.22 (m, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 3.20 – 4.22 (AB, J_{AB} = 13.06 Hz, 8 H, ArCH₂Ar); 5.22 (s, 4 H, ArOCH₂); 6.64 (s, 4 H, ArH); 6.72 (s, 4 H, ArH); 7.23 – 7.25 (m, 8 H, H_{bph}); 7.41 (dd, J = 7.80, 1.72 Hz, 4 H, H_{bph}); 7.51 (d, J = 8.00 Hz, 4 H, H_{bph}); 7.63 (d, J = 8.08 Hz, H_{bph}).

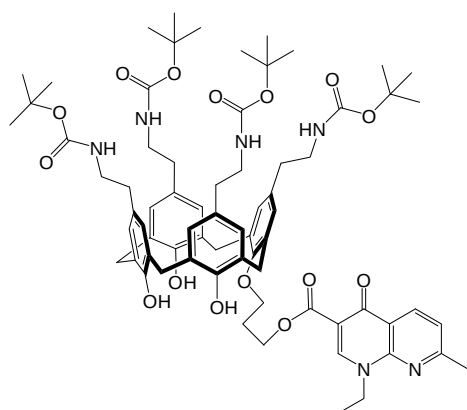


N-Boc-aminoéthyl-4-[4-méthylèneoxy-1,1'-biphenyl]-benzène **50**.

La tyramine boquée **48** (0.20 g, 0.843 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 30 mL de CH₃CN fraîchement distillée sur CaH₂ en présence de K₂CO₃ (0.12 g, 0.843 mmol, 1 éq.) et laissé à reflux pendant 30 min avant l'ajout du composé bromé (0.22 g, 0.843 mmol, 1 éq.). On laisse ensuite sous agitation, à reflux et sous argon. Après 23 heures de réaction (contrôle CCM: SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. Le résidu est repris au CH₂Cl₂ et filtré sur fritté afin d'éliminer les impuretés minérales. Le brut est ensuite purifié par colonne chromatographique (Al₂O₃, CH₂Cl₂). Le produit attendu est poudre blanche (0.30 g, 88%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.43 (s, 9 H, *tert*); 2.74 (t, J = 6.8 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH); 3.34 (s large, 2 H, CH₂CH₂NH); 4.53 (s large, 1 H, NH); 5.09 (s, 2 H, ArOCH₂); 6.94 (d, J = 8.56 Hz, 2 H, ArH); 7.12 (d, J = 8.32 Hz, 2 H, ArH); 7.35 (t, J = 7.44 Hz, 1 H, H_{bph}); 7.44 (t, J = 7.56 Hz, 1 H, H_{bph}); 7.50 (d, J = 8.04 Hz, 2 H, H_{bph}); 7.61 (t, J = 8.8 Hz, 4 H, H_{bph}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 28.83 (CMe₃); 35.71 (CH₂CH₂NH); 42.13 (CH₂CH₂NH); 70.22 (OCH₂bpy); 79.52 (CMe₃); 115.36 (C_o); 127.54, 127.78, 128.38, 130.20 (C_{bph}); 129.20 (C_o); 136.49, 141.20, 141.36 (C_{bph}); 156.29 (C_{ipso}); 157.86 (CO).



5,11,17,23-Tétra-(Boc-aminoéthyl)-25 (oxypropyl-nalidixate)-26,27,28-trihydroxycalix[4]arène 56

Le tétra-*para*-(bocaminoéthyl)-calix[4]arène **8** (0.2 g, 0.20 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 20 ml d'acétonitrile (fraîchement distillée sur CaH_2) en présence de K_2CO_3 (0,016 g, 0.12 mmol, 0,6 éq.). On porte le tout à reflux (90°C), sous argon pendant 30 minutes. Puis on additionne le bromopropylnalidixate **55** (0,035g, 0.10 mmol, 0,5 éq.) et

KI (une dizaine de cristaux). La réaction est suivie par CCM (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3). Après environ 24 heures de réaction, le solvant est évaporé, le résidu est repris au CH_2Cl_2 , filtré sur papier, afin d'éliminer des résidus minéraux. La phase organique subit ensuite une purification par chromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1% à 3%) pour donner le composé attendu sous forme d'huile (0,078 g, 61 %).

F° : $169 - 170^\circ\text{C}$

IR : 3334.75 (OH); 1701.50 (CO).

UV-Vis : 257 (15436); 287 (9799); 335 (10806).

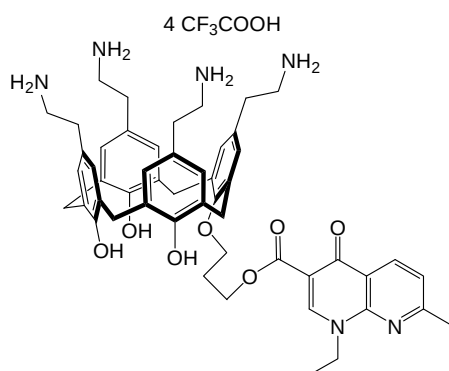
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : 1.38 (s large, 36 H, tert); 1.62 (s large, 3 H, NCH_2CH_3); 2.58 (s large, 10 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} + \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 2.67 (s, 3 H, CH_3); 3.27 (t, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 4.47 (t + q, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO} + \text{NCH}_2\text{CH}_3$); 3.35 – 4.48 (AB, $J_{\text{AB}} = 13$ Hz, 8 H, ArCH_2Ar); 4.82 (s large, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 6.86 (s large, 4 H, ArH); 6.89 (s large, 4 H, ArH); 7.23 (s large, 2 H, H(6)); 8.64 (d, $J = 7.91$ Hz, 2 H, H(5)); 8.68 (s, 2 H, H(2)); 9.42 (s, 2 H, OH); 9.81 (s, 1 H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : 15.57 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 25.45 (CH_3); 28.04 (CMe_3); 29.69 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 31.98, 32.52 (ArCH_2Ar); 35.72, 35.87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 42.18 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de A et B); 46.9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 61.75 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 74.20 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 79.51 (CMe_3); 122.20 (C_3); 121.54 (C_6); 121.95 (C_9); 128.59, 128.83, 129.20 (C_0); 129.57 (C_m); 130.23 (C_m de b); 131.61 (C_p); 132.42 (C_p de b); 134.59 (C_p); 137.21 (C_5); 148.36, 149.02 (C_{ipso}); 149.34 (C_2); 150.34 (C_{ipso}); 156.33, 156.36 (NCOO); 163.06 (C_{10}); 166.07 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 175.06 (C_4).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{71}\text{H}_{92}\text{N}_6\text{O}_{15}$ (1268.66) : C : 67.17%; H : 7.3%; N : 6.62%; trouvée C : 67.33%; H : 7.42%; N : 6.5%.

ES-MS (ES^+) : 1269.63 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 1291.63 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 657.30 [$(\text{M} + \text{H})^+ / 2 + \text{Na}$] $^{++}$

ES-MS (ES^-) : 1169.59 [$\text{M} - (\text{CH}_3)_3\text{COCO} + 2\text{H}^+$] $^+$, 1267.63 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$.



5,11,17,23-Tétra-(aminoéthyl)-25-(oxypropyl)nalidixate-26,27,28-trihydroxycalix[4]arène, tétra-trifluoroacetate 58

Le calixarène **56** (0,07 g, 0.056 mmol, 1éq.) est mise en solution dans un mélange CH_2Cl_2 anhydre et TFA (75:25), on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le brut est ensuite

séchée sous vide poussé avant d'être repris et trituré dans l' Et_2O pour donner une poudre légèrement colorée, filtrée, lavée à l' Et_2O et séchée. Le produit subit une dernière lyophilisation pour donner un solide (0.070 g, 95%).

F° : 144 - 145°C

IR (KBr): 3056.54 (OH); 1679.11 (NH_3^+).

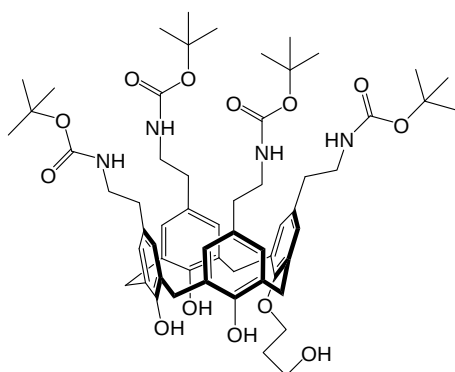
UV-Vi (H_2O): 257.0 (30970); 287.0 (14988); 328.0 (13527).

RMN ^1H (D_2O): 1.39 (t, $J = 6.5$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 2.54 (m, 6 H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$ + $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 2.66 (s large, 7 H, CH_3 quinolone + 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.95 (t + t, 4H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$ **a** et **c**); 3.09 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$ **b**); 3.30 – 3.95 (q, AB, $J_{\text{AB}} = 13.6$ Hz, 4 H, ArCH_2Ar); 3.41 - 4.13 (q, AB, $J_{\text{AB}} = 13.6$ Hz, 4 H, ArCH_2Ar); 4.31 (s large, 4 H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ + $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 4.73 (s large, 2 H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 6.72 (s, 2 H, ArH **a** ou **c**); 6.84 (s, 2H, ArH **a** ou **c**); 6.88 (d large, 4 H, ArH **b**); 7.39 (d, $J = 8.1$ Hz, H(6) ou H(5), quinolone); 8.33 (d, $J = 8.3$ Hz, H(6) ou H(5), quinolone); 8.83 (s, 1H, H(2) de quinolone).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 14.63 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 24.51 (CH_3 quinolone); 30.90 (ArCH_2Ar); 31.96, 32.15, 32.23 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$ **a**, **c** et **b** $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 40.50, 40.65 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$ **a** et **c**); 40.87 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$ **b**); 47.58 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 46.95 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 73.64 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 110.63 (C(3)); 116.73 (CF_3COO); 120.61 (C(9)); 122.60 (C(6)); 128.03, 128.46; 129.09, 134.07 (C_O Ar **a** et **b**); 129.13, 129.24 (C_m Ar **b**); 129.38, 129.99 (C_m Ar **a** et **c**); 128.91, 130.62, 134.07, 134.61 (C_p ArH **a**, **c** et **b**); 136.28 (C(5)); 145.47 (C_{ipso} ArH **a** ou **c**); 148.18 (C(10)); 149.87 (C(2)); 150.27 (C_i Ar **b**); 150.52 (C_{ipso} ArH **a** ou **c**); 163.23 (CF_3COO); 164.60 (C(7)); 166.78 (COO); 176.30 (C(4)).

Analyse élémentaire calculée pour : $\text{C}_{51}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{O}_7$, 4 CF_3COOH , 4 H_2O (1396,47) : C : 50.72%; H : 5.19%; N : 6.01%; trouvée : C : 50.86%; H : 5.20%; N : 6.24%.

ES-MS (ES^+): 435.47 [$\text{M} - 4 \text{CF}_3\text{COOH} + 2\text{H}^+$] $^{2+/2}$.



5,11,17,23-Tétra-(Boc-aminoéthyl)-25-[1-oxy-(3-hydroxy)propyl]-26,27,28-trihydroxycalix[4]arène 64.

Le calixarène **56** (0.146 g, 0.11 mmol) est mis en solution dans 10 ml d'EtOH en présence de K_2CO_3 (0.108 g, 0.79 mmol, 7 éq.). Le mélange est laissé sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction, le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris au CH_2Cl_2 , pour une filtration. Le filtrat est concentré et purifié sur support chromatographique (SiO_2 , CH_2Cl_2 / MeOH 99 : 01).

Le produit obtenu est huileux, mais la précipitation à froid dans un mélange CH_2Cl_2 / hexane permet d'obtenir après filtration et séchage une poudre légèrement jaune (0.10 g, 61%).

F°: 147-148°C.

IR (KBr): 3335.20 (OH); 1700.02 (COO); 1510.04 (NH).

UV-Vis (D_2O): 2282.0 (9510.30).

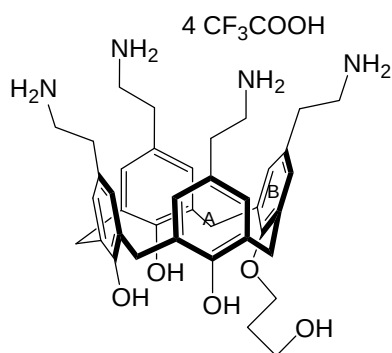
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.37 (s large, 36 H, tert); 2.29 (q, $J = 5 - 8$ Hz, $CH_2CH_2CH_2OH$); 2.58 (s large, 8 H, $ArCH_2CH_2NH$); 3.26 (s large, 8 H, $ArCH_2CH_2NH$); 3.39 (d, $J = 13.6$ Hz, 2 H, $ArCH_2Ar$); 3.40 (d, $J = 12.8$ Hz, 2 H, $ArCH_2Ar$); 4.18 - 4.33 (d + t, 6 H et 4 H, $ArCH_2Ar + OCH_2CH_2CH_2OH$); 6.82 (s, 4 H, ArH); 6.88 (s, 2 H, ArH); 6.91 (s, 2 H, ArH); 9.59 (s, 2 H, OH); 9.89 (s, 1 H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 28.75 (CMe_3); 31.98, 32.35 ($ArCH_2Ar$); 35.74 ($CH_2CH_2CH_2OH$); 36.17, 36.30 ($ArCH_2CH_2NH$ de **a**, **b** et **c**); 42.25 ($ArCH_2CH_2NH$ de **a**, **b** et **c**); 54.48 ($ArOCH_2CH_2CH_2OH$); 74.69 ($ArOCH_2CH_2CH_2OH$); 79.54 (CMe_3); 128.75, 129.12 (C_m de **a**, **b** et **c**); 129.31, 129.71 (C_o de **a**, **b** et **c**); 130.33 134.43 (C_p de **a**, **b** et **c**); 148.17, 149.33 (C_{ipso} de **a**, **b** et **c**); 150.22, 156.37 (CO).

Analyse élémentaire calculé pour $C_{59}H_{82}N_4O_{13}$, $\frac{1}{2} CH_2Cl_2$ (1096.60): C : 65.10%; H : 7.62%; N : 5.10%; trouvée : C : 65.43%; H : 7.64%; N : 5.18%.

ES-MS (ES^+): 1055.5 [$M + H^+$] $^+$; 1077.48 [$M + Na$] $^+$.

ES-MS (ES^-): 665 [$M - 4 CF_3COOH$].



**5,11,17,23-Tétra-(aminoéthyl)-25-[1-oxy-(3-hydroxy)propyl]-
26,27,28-trihydroxycalix[4]arène, tétra-trifluoroacetate 65**

Le calixarène **64** (0.15 g, 0.12 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans un mélange CH_2Cl_2 anhydre et TFA (75:25), on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le résidu est par la suite séchée sous vide poussé. Le

brut est alors repris et trituré dans Et_2O pour donner un précipité légèrement colorée. La précipité est filtré sur fritté, lavé à l' Et_2O et séchée puis lyophilisé pour donner le produit attendu (0.12 g, 95%).

F°: 164-165°C

IR (KBr): 3144.5 (OH); 1686.6 (NH_3^+).

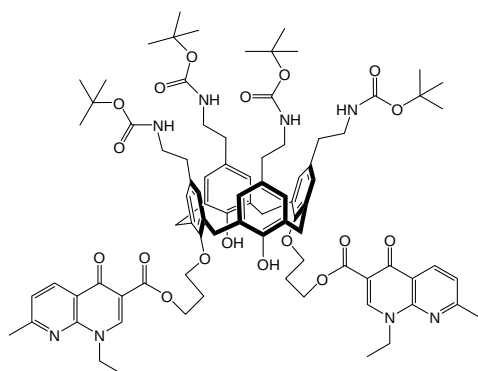
UV-Vis (D_2O): 303.0 (9430).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) : 2.26 (t, $J = 5.6$ Hz, 2 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 2.66 (); 2.86 (); 3.05 (); 3.22 (); 3.54 (); 3.622 (); 3.98 (); 4.11 – 4.33 (); 6.91(); 7.00 (); 7.16 ().

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 30.96 31.12 ($\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{Ar}$); 32.05 32.24 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ et $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 40.58 40.73 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ **a** ou **c**); 40.97 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ **b**); 59.27 ($\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 74.75 ($\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 116.67 (q, $J_{\text{C-F}} = 362$ Hz, CF_3); 129.43, 129.46 (C_m Ar **a**, **b** et **c**); 129.56 (C_m Ar **b**); 130.06 (C_m Ar **a** ou **c**); 129.53 (C_p Ar **b**); 130.73 (C_p Ar **a** ou **c**); 134.48 (C_p Ar **a** ou **c**); 128.88 129.34 129.66 134.71(C_o Ar **a** ou **c** et **b**); 147.68, 150.83 (C_i Ar **a** ou **c**); 150.15 (C_i Ar **b**); 163.27 (q, $J_{\text{C-F}} = 53$ Hz, COO).

Analyse élémentaire calculé pour $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_5$, 4 CF_3COOH , 3 H_2O (116.98) : C : 48.46% ; H : 5.19% ; N : 4.81%. Trouvée : C : 48.36% ; H : 4.84% ; N : 4.76%.

ES-MS (ES^+): 655.40 [$\text{M} - 4 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$, 328.24 [$\text{M} - 4 \text{CF}_3\text{COOH} + 2 \text{H}^+$] $^{2+/2}$, 219.17 [$\text{M} - 4 \text{CF}_3\text{COOH} + 3 \text{H}^+$] $^{3+/3}$.



5,11,17,23-Tétra-(Boc-aminoéthyl)-25,27-bis

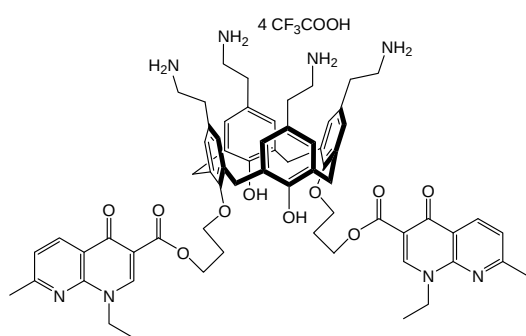
(oxypropylnalidixate)-26,28-dihydroxycalix[4]arène 57

Le tétra-para(bocaminoéthyl)-calix[4]arène **8** (0.39g, 0.38 mmol, 1éq.) est mis en solution dans 30 ml de CH_3CN (fraîchement distillée sur CaH_2) en présence de K_2CO_3

(0.10 g, 0.75 mmol, 2 éq.). On porte la réaction à reflux (90°C), sous argon pendant 30 minutes, avant l'addition du bromopropynalidixate (0.27 g, 0.75 mmol, 2 éq.) et KI (une dizaine de cristaux). La réaction est suivie par CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 3%). Après environ 24 h, le solvant est évaporé, le résidu est repris au CH₂Cl₂, filtré sur papier filtre afin d'éliminer des résidus minéraux. La phase organique subit ensuite une purification par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 1% à 3%) pour donner le composé attendu sous forme d'huile coloré (0.23 g, 40%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.38–1.43 (m, 72 H, *t*bu + CH₃CH₂N); 2.46 (s large, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 2.53 – 2.68 (m, 8 H, ArCH₂CH₂NH + ArOCH₂CH₂CH₂OCO); 2.63 (s, 3 H, CH₃); 3.16 (s large, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 3.2 – 3.3 (m, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 3.26–4.27 (AB, J_{AB} = 13.04 Hz, 8 H, ArCH₂Ar); 4.20 (s large, 4 H, ArOCH₂CH₂CH₂OCO); 4.34 (s large, 4 H, CH₃CH₂N); 4.86 (t, J = 5.68 Hz, ArOCH₂CH₂CH₂OCO); 6.71 (s, 4 H, ArH); 6.76 (s, 4 H, ArH); 7.18 (d, J = 8.04 Hz, 2 H, H(6)); 8.22 (s large, 2 H, OH); 8.54 (d, J = 8.04 Hz, 2 H, H(5)); 8.63 (s large, 2 H, H(2)).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 15.58 (CH₃CH₂N); 25.44 (CH₃); 28.87 (CMe₃); 29.71 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 31.97 (ArCH₂Ar); 35.64, 36.25 (ArCH₂CH₂NH); 41.18, 42.54 (ArCH₂CH₂NH); 47.00 (CH₃CH₂N); 61.95 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 73.34 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 79.48 (CMe₃); 112.05 (C(3)); 121.45 (C(6)); 121.69 (C(9)); 128.32 (C₀); 129.08 (C_m); 129.68 (C₀); 129.76 (C_m); 133.83, 136.01 (C_p); 137.11 (C(5)); 148.90 (C(7)); 149.14 (C(2)); 150.85 (C_{ipso}); 152.09 (C_{ipso}); 156.25, 156.37 (NCOO); 163.01 (C₁₀); 165.67 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 175.15 (C₄).



5,11,17,23-Tétra-(aminoéthyl)-25,27-Bis[oxy propynalidixate]- 26,28-Bis (hydroxy)-calix[4] arène, tétra-trifluoroacétate 59

Le calixarène **57** (0.088 g, 0.057 mmol, 1 eq) est mise en solution dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre et additionné de 3.5 ml de TFA, on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction, le solvant est évaporé et le résidu huileux obtenu est plusieurs fois repris et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le résidu est ensuite séché sous vide poussé, le brut est repris et trituré dans l'Et₂O pour donner une poudre légèrement coloré, qui est filtrée sur fritté et lavée à l'Et₂O suivi d'une lyophilisation (0.087g, 96%).

F°: 156-157°C.

IR (KBr): 3403.04 (OH); 2934.02 (NH₃⁺); 1682.37 (NH₃⁺).

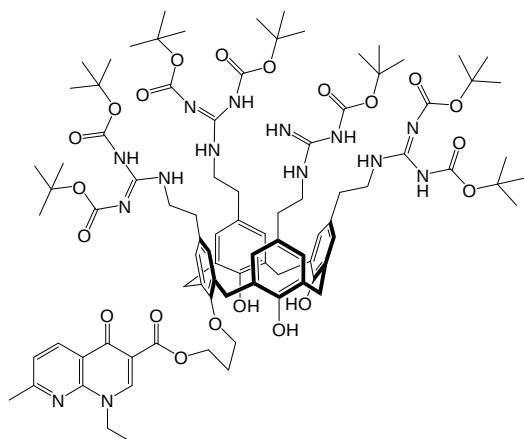
UV-Vis (D₂O): 250.0 (14775.05); 288.0 (4670.32); 330.0 (7298.26).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): 1.35 (t, J = 7.18 Hz, 6 H, CH₃); 2.40 – 2.69 (m, 12 H, ArOCH₂CH₂CH₂O + ArCH₂CH₂NH + ArCH₂CH₂NH); 2.65 (s, 6 H, CH₃); 2.88 (t, J = 6.80 Hz, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 3.03 (t, J = 7.18 Hz, 4 H, ArCH₂CH₂NH); 3.28 – 4.14 (AB, J = 13.36 Hz, 8 H, ArCH₂Ar); 4.20 – 4.30 (m, 8 H, NHCH₂CH₃ + ArOCH₂CH₂CH₂OCO); 4.83 (s large, 4 H, ArOCH₂CH₂CH₂OCO); 6.71 (s, 4 H, ArH); 6.73 (s, 4 H, ArH); 7.39 (d, J = 8.28 Hz, 2 H, H(6)_{quinolone}); 8.34 (d, J = 8.32 Hz, 2 H, H(5)_{quinolone}); 8.73 (s, 2 H, H(2)_{quinolone}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): 14.55 (CH₃CH₂N); 24.55 (CH₃ quinolone); 28.22 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 30.77 (ArCH₂Ar); 32.09, 32.27 (ArCH₂CH₂NH); 40.48, 40.82 (ArCH₂CH₂NH); 47.62 (CH₃CH₂N); 63.63 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 73.45 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 110.79 (C(3)); 120.60 (C(9)); 122.56 (C(6)); 127.58, 127.79 (C_O); 129.14, 129.65 (C_m); 133.90, 134.05 (C_p); 136.22 (C(5)); 148.21 (C(7)); 149.97 ((C(2)); 151.25, 151.54 (C_{ipso}); 164.60 ((C(10)); 166.68 (COO); 176.40 ((C(4)).

Analyse élémentaire calculée pour C₆₅H₈₀N₈O₁₀, 5 CF₃COOH, H₂O (1721.5): C : 52.78% ; H : 4.84% ; N : 6.48%, trouvée : C : 52.87% ; H : 4.98% ; N : 6.56%.

ES-MS (ES⁺): 1141.58 [M – 4 CF₃COOH – H⁺]⁺, 1163.55 [M – 4 CF₃COOH + Na – 2 H⁺]⁺.



5,11,17,23-Tétra-[(N,N'-di-Boc)guanidino éthyl]-25-[oxy propylinalidixate]- 26,27,28-Tris(hydroxy)-calix [4]arène 60

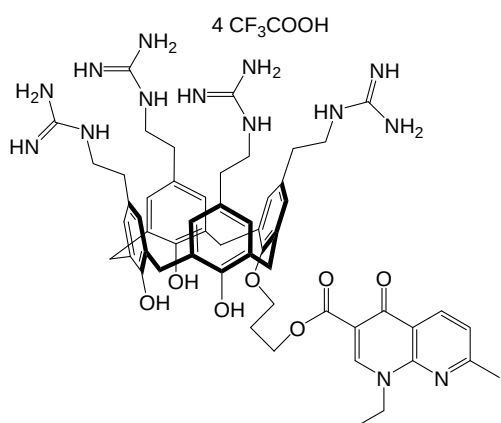
Le sel du calix[4]arène **58** (0.13 g, 0.10 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 20 ml de CH₂Cl₂ anhydre puis solubilisé par le minimum de MeOH avant ajout de Et₃N (164 µl, 1.177 mmol, 12 éq.), et de N,N'-Bis(tert-butoxycarbonyl), N''triflylguanidine (0.15 g; 0.39 mmol, 4 éq.). Le mélange est maintenu sous agitation et sous

argon pendant une nuit (contrôle CCM: SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 2%). Le solvant est évaporé pour donner un brut qui est solubilisé dans CH₂Cl₂ (30 ml) et lavé par 2 x 20 ml de H₂O. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. On effectue ensuite une purification sur colonne chromatographique (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 2%) pour obtenir le produit attendu sous forme d'huile (0.12 g, 65%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.46 - 1.49 (m, 72 H, tert); 2.5 – 2.8 (m, 13 H, ArCH₂CH₂NH + CH₂CH₂CH₂ + CH₃); 3.56 (m, 8 H, ArCH₂CH₂NH); 3.39 - 4.20 (1/2 AB, J = 13.56 Hz, 4 H, ArCH₂Ar);

3.35 - 4.31 (1/2 AB, $J = 12.84$ Hz, 4 H, ArCH_2Ar); 4.32 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 4.39 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 4.80 (t, $J = 6.18$ Hz, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 6.87 (s, 2 H, ArH); 6.90 (s, 2 H, ArH); 7.23 (d, $J = 8.04$ Hz, H_6 quinolone); 8.39 (m, 4 H, NH guanidine); 8.62 (d, $J = 8.04$ Hz, 1 H, H_5 quinolone); 8.70 (s, 1 H, H_2 quinolone); 9.33 (s, 2 H, OH); 9.67 (s, 1 H, OH); 11.46 (s large, 4 H, NCH guanidine).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 15.59 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 25.48 (CH_3 quinolone), 28.46, 28.72 (CMe_3); 29.72 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 31.81, 32.32 (ArCH_2Ar); 34.87, 35.16 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.39, 42.66 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 46.98 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 61.75 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 74.10 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 79.62, 83.38 (CMe_3); 112.17 ($\text{C}(3)$); 121.53 ($\text{C}(6)$); 121.93 ($\text{C}(9)$); 128.71, 128.86, 129.24 (C_0); 129.12, 129.57, 130.27 (C_m); 131.08, 132.07, 134.56 (C_p); 136.53 ($\text{C}(5)$); 137.25 ($\text{C}(2)$); 148.26 (); 149.01 (); 149.33 (); 149.84 (); 150.40 (); 153.56 (C_{ipso}); 156.48 (C guanidine); 163.03 (CO); 164.02 ($\text{C}(4)$); 165.88 (OCO).



5,11,17,23-Tétra-(guanidinoéthyl)-25,26,27-Tris(hydroxy)-28-propyl-nalidixate-calix[4] arène, tétra-trifluoroacetate 62

Le calixarène **60** (0.127 g, 0.069 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans un mélange CH_2Cl_2 anhydre et TFA (75:25) et on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante. Après une nuit de réaction le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum

de TFA résiduel. Le résidu est par la suite séchée sous vide poussé. Le brut est alors repris et trituré dans Et_2O pour donner une poudre légèrement colorée qui est filtrée sur fritté, lavée à l' Et_2O et séchée, puis lyophilisée. (0.095 g, 91.3%).

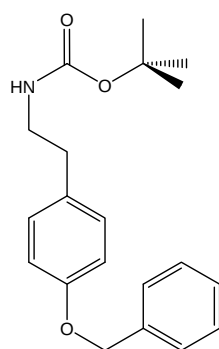
RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 1.38 (t, $J = 7.04$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 2.43 – 2.61 (m, 6 H, 2 $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH} + \text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 2.69 (s, 3 H, CH_3 quino); 3.14 (s large, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.27 (t, $J = 6.92$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.36-4.03 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.06$ Hz, 4H, ArCH_2Ar), 3.41 – 4.19 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.06$ Hz, 4 H, ArCH_2Ar); 4.43 (t, $J = 7.042$ Hz, 2 H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 4.60 – 4.70 (m, 4 H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 6.65 (s, 2 H, ArH); 6.71 (s, 2 H, ArH); 6.76 (s, 2 H, ArH); 6.80 (s, 2 H, ArH); 7.36 (d, $J = 8.04$ Hz, 2 H, $\text{H}(6)$); 8.32 (d, $J = 8.28$ Hz, 2 H, $\text{H}(5)$); 8.80 (s, 2 H, $\text{H}(2)$).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) : 14.39 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$); 24.49 (CH_3 quinolone); 28.00 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$); 30.96 (ArCH_2Ar); 33.54, 33.85 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$); 42.48, 42.73 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$); 47.56 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$);

63.03 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 73.71 (OCH₂CH₂CH₂OCO); 78.74 5° 110.63 (C(3)); 116.73 (CF₃COO); 120.61 (C₉); 122.60 (C₆); 128.03, 128.46; 129.09, 134.07 (C_O Ar **a** et **b**); 129.13, 129.24 (C_m Ar **b**); 129.38, 129.99 (C_m Ar **a** et **c**); 128.91, 130.62, 134.07, 134.61 (C_p ArH **a**, **c** et **b**); 136.28 (C₅); 145.47 (C_{ipso} ArH **a** ou **c**); 148.18 (C₁₀); 149.87 (C₂); 150.27 (C_i Ar **b**); 150.52 (C_{ipso} ArH **a** ou **c**); 163.23 (CF₃COO); 164.60 (C₇); 166.78 (COO); 176.30 (C₄).

Analyse élémentaire calculée pour C₆₅H₈₀N₈O₁₀, 5 CF₃COOH, H₂O (1721.5) : C : 52.78% ; H : 4.84% ; N : 6.48%, trouvée : C : 52.87% ; H : 4.98% ; N : 6.56%

ES-MS (ES⁺): 519.60 [M-4 CF₃COOH + 2 H⁺]^{2+/2}; 823.83 [M-NAL-4 CF₃COOH + H + H⁺]⁺; 1037.82 [M-4 CF₃COOH + H⁺]⁺.



α-[para-(Boc-aminoéthyl)-phénoxy] toluène **68**

La tyramine boquée **48** (0.10 g, 0.42 mmol, 1 éq) est mise en solution avec K₂CO₃ (0.58g, 0.42 mmol, 1 éq) dans 15 ml de CH₃CN fraîchement distillée sur CaH₂ et laissé à reflux 30 minutes avant l'ajout du bromure de benzyle **a** (50 µL, 0.42 mmol, 1 éq). On laisse ensuite sous agitation, à reflux (90°C) et sous argon. Une fois le produit de départ consommés, environ 24 heures (contrôle CCM : SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 2%), Le retour à température ambiante est suivie d'une évaporation du solvant. Le résidu obtenu est repris dans le CH₂Cl₂ et filtré sur papier filtre afin de d'éliminer les impuretés minérales. On concentre le filtrat et le brut est purifié par colonne chromatographique (SiO₂ : CH₂Cl₂/MeOH 0 à 2%) pour ainsi obtenir le composé attendu, sous forme d'une poudre blanche **68** (0.124g, 89.8 %).

F°: 151 – 152°C.

IR (KBr): 3360.66 (-CONH-); 1681.61 (CO).

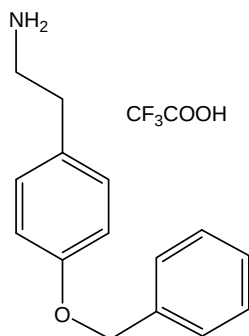
UV-Vis (CDCl₃): 277 (2960.29).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.46 (s, 9 H, tert); 2.74 (t, J = 7.04 Hz, 2 H, ArCH₂CH₂NH); 3.34 (s large, 2 H, ArCH₂CH₂NH); 5.05 (s, 2 H, ArOCH₂); 6.93 (d, J = 8.56 Hz, 2 H, ArH); 7.12 (d, J = 8.56 Hz, 2 H, ArH); 7.33 – 7.44 (m, 5 H, ArH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 28.53 (CMe₃); 35.60 (CH₂CH₂NH); 42.21 (CH₂CH₂NH); 70.70 (ArCH₂O); 79.52 (CMe₃); 114.20 (C_O ou C_m); 127.21, 128.32, 128.80, 141.20 (C_{Ar}); 129.00 (C_m ou C_O); 131.80 (C_p); 151.02 (C_{ipso}); 157.90 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{20}H_{25}N O_3$ (327.42): C: 73.37 %; H: 7.70 %; N: 4.28 % ; trouvée: C: 73.45 %; H: 7.64 %; N: 4.34 %.

ES-MS (ES^+): 373.49 $[M + 2Na]^+$, 350.20 $[M + Na]^+$, 228.05 $[M-Boc+2H]^+$, 211.02 $[M-Boc-NH]^+$.



Trifluoroacétate d' α -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]toluène 69

Le composé **68** (0.1g, 0.30 mmol), est mis en solution dans 11 ml de CH_2Cl_2 anhydres puis 4 ml de TFA est additionné. La réaction est laissée sous agitation, sous argon et à température ambiante. Après 5 heures, les solvants sont évaporés. L'huile obtenue est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel, puis séchée sous vide. Le résidu est alors repris et trituré dans Et_2O pour donner une poudre blanche qui est filtrée sur fritté, lavée à l' Et_2O pour donner une poudre blanche **69** (0.10 g, 96%).

F°: 151 - 152°C.

IR (KBr): 3037.75 ($-NH_3^+$); 1676.29 ($-NH_3^+$); 1514.12 ($-NH_3^+$).

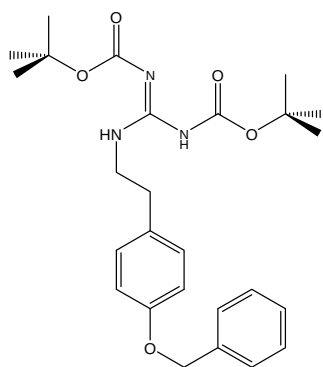
UV-Vis (D_2O): 273 (1641.87).

RMN 1H (400 MHz, D_2O): 2.89 (t, $J = 7.04$ Hz, 2 H, $ArCH_2CH_2NH$); 3.19 (t, $J = 7.18$ Hz, 2 H, $ArCH_2CH_2NH$); 5.13 (s, 2 H, $ArOCH_2$); 7.02 (d, $J = 8.56$ Hz, 2 H, ArH); 7.22 (d, $J = 8.28$ Hz, 2 H, ArH); 7.37 – 7.47 (m, 5 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 36.02 (CH_2CH_2NH); 38.10 (CH_2CH_2NH); 70.77 ($ArOCH_2$); 114.21 (C_o ou C_m); 130.16 (C_m ou C_o); 127.21, 128.72, 140.20 (C_{Ar}); 130.78 (C_p); 157.91 (C_{ipso}).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{15}H_{17}NO$, CF_3COOH , 0.25 H_2O (345.82) : C: 59.04 %; H: 53.9 %; N: 4.05; trouvée : C: 59.37 %; H : 5.29 %; N : 4.05 %.

ES-MS (ES^+): 228.05 $[M-CF_3COOH+H]^+$, 211 $[M-CF_3COOH-NH]^+$.



α-[para-(di-Boc-guanidinoéthyl)-phénoxy] toluène 70

Le sel **69** (0.10 g, 0.29 mmol, 1^{eq}) est mis en suspension dans 10 mL de CH₂Cl₂ anhydre puis solubilisé par le minimum de MeOH avant l'ajout de Et₃N (112 μ L, 0.87 mmol, 3^{eq}) et de N,N'-bis(tert-butoxycarbonyl),N''triflylguanidine (0.114 g, 0.29 mmol, 1^{eq}). Le mélange est maintenu sous agitation et sous argon pendant 9 heures (contrôle CCM : SiO₂, CH₂Cl₂ / MeOH, 0.1%). Le solvant est évaporé pour donner un brut qui est solubilisé dans le CH₂Cl₂ (30 ml), lavée par 30 ml d'H₂O.

La phase organique est reprises par 2 x 20 mL de CH₂Cl₂, les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, filtré et évaporée. On effectue ensuite une purification sur colonne chromatographique (SiO₂, CH₂Cl₂ / MeOH 0 à 0.5%) et l'on obtient le produit attendu **70**, sous forme d'huile (0.116 g, 85%).

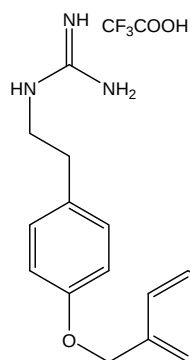
F°: 131-132°C.

IR (KBr): 3402.5 (-CONH-), 1730.4 (CO), 1516.3 (-NH-).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.48 (s, 9 H, tert); 1.51 (s, 9 H, tert); 2.81 (t, J = 7.18 Hz, 2 H, ArCH₂CH₂NH); 3.64 (t, J = 6.54 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH); 5.03 (s, 2H, ArOCH₂); 6.91 (d, J = 8.56 Hz, 2 H, ArH); 7.13 (d, J = 8.56 Hz, 2 H, ArH); 7.37 – 7.43 (m, 5 H, ArH); 8.37 (t, J = 6.54 Hz, 1 H, NH); 11.49 (s large, 1 H, NHguan).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 28.46 (CMe₃); 28.74 (CMe₃); 34.80 (CH₂CH₂NH); 42.85 (CH₂CH₂NH); 70.42 (ArOCH₂); 79.61 (CMe₃); 83.38 (CMe₃); 115.36 (C_O); 127.87; 128.32; 128.97 (C_{Ar}); 130.19 (C_m); 131.29 (C_p); 137.52 (C_{Ar}); 153.56 (CO); 156.55 (C_{guan}); 157.93 (C_{ipso}); 164.03 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour C₂₆H₃₅O₅N₃ (469.57): C: 66.50%; H: 7.51%; N: 8.95%; trouvée: C: 66.56%; H: 7.50%; N: 8.84%.



Trifluoroacétate d'α-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]toluène 71

Le composé **70** (0,150 g, 0,319 mmol, 1 ^{eq}) est mis en solution dans un mélange CH₂Cl₂/CF₃COOH (15 ml, 75 :25) et est placé sous agitation pendant 6 heures à température ambiante. Les solvants sont alors évaporés et le résidu obtenu est trituré dans Et₂O pour donner une poudre blanche qui est filtré sur fritté, rincé à l'Et₂O et séché. Puis il subit une dernière purification par lyophilisation pour

donner le produit attendu **71** (0.12 g, 96.7%).

F°: 148 - 149°C.

IR (KBr): 3522.2 (-NH₂); 3167.7 (-NH₃⁺); 1664.5 (CO); 1513.2 (-NH₃⁺).

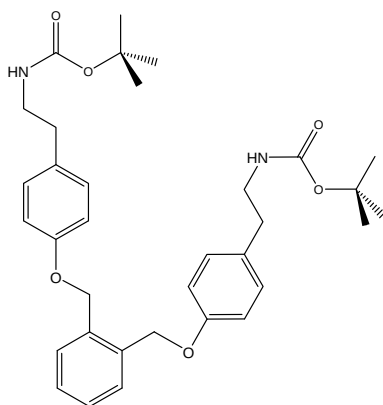
UV-Vis (D₂O): 273.0 (1947.25)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): 2.81 (t, J = 6.68 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH); 3.40 (t, J = 6.68 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH); 5.15 (s, 2H, ArOCH₂); 7.02 (d, J = 8.56 Hz, 2 H, ArH); 7.22 (d, J = 8.28 Hz, 2 H, ArH); 7.38 – 7.46 (m, 5 H, ArH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-D₆): 33.91(CH₂CH₂NH); 42.62 (CH₂CH₂NH); 69.50 (ArOCH₂); 115.05 (C_o ou C_m); 127.98 (C_m ou C_o); 128.13, 128.78, 130.16, 137.55 (C_{Ar}); 130.78 (C_p); 157.15, 157.34 (C_{ipso} et C_{gua}).

Analyse Élémentaire calculée pour C₁₆H₁₉ON₃, CF₃COOH, 0.5 H₂O (392,37) : C : 55,10 %; H : 5,43 %; N : 10,97 % trouvée : C : 55,03 %; H : 5,43 %; N : 10,97 %.

ES-MS (ES⁺) : 270 [M – CF₃COO]⁺.



Bis-[α,α'-[para-(Boc-aminoéthyl)-phénoxy]]- o-xylène **72**

La tyramine boquée **48** (0.36 g, 1.51 mmol, 2 éq) est mise en solution avec K₂CO₃ (0.21 g, 1.51 mmol, 2 éq) dans 20 ml de CH₃CN fraîchement distillée sur CaH₂ et laissé à reflux 30 minutes avant l'ajout du O-dibromo-méthyl benzène **b** (0.20 g, 0.757 mmol, 1 éq). On laisse ensuite sous agitation, à reflux (90°C) et sous argon. Une fois le produit de départ consommés, environ 24 heures (contrôle CCM : SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 2%), Le retour à température ambiante est suivie d'une évaporation du solvant. Le résidu obtenu est repris dans le CH₂Cl₂ et filtré sur papier filtre afin de d'éliminer les impuretés minérales. On concentre le filtrat et le brut est purifié par colonne chromatographique (SiO₂ : CH₂Cl₂/MeOH 0 à 2%) pour ainsi obtenir le composé attendu, sous forme d'une poudre blanche **72** (0.27 g, 62.00%).

F°: 181 – 182°C.

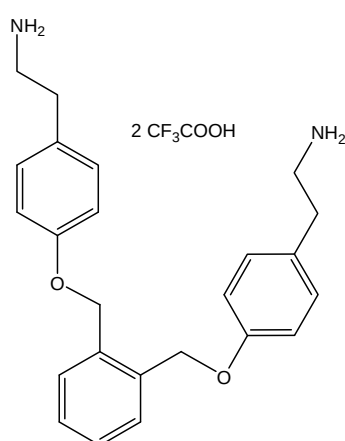
IR (KBr): 3360.55 (-CONH-); 1681.84 (CO).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.43 (s, 18 H, tert); 2.72 (t, $J = 6.80$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.33 (s large, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 4.53 (s large, 2 H, NH); 5.14 (s, 4 H, ArOCH_2); 6.90 (d, $J = 8.56$ Hz, 4 H, ArH); 7.09 (d, $J = 8.28$ Hz, 4 H, ArH); 7.36 (m, 2 H, ArH); 7.50 (m, 2 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.82 (CMe_3); 35.04 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.30 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 68.55 (ArOCH_2); 77.00 (Me_3C). 115.34 (C_o ou C_m); 128.83, 129.34 (C_{ArH}); 130.19 (C_o ou C_m); 131.91 (C_p); 135.59 (C_{ArH}); 156.27 (CO); 157.69 (C_{ipso}).

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{N}_2$ (576.32): C: 70.81%; H: 7.69%; N: 4.86% ; trouvée: C: 70.32%; H: 7.80%; N: 4.86%.

ES-MS (ES^+): 577.41 [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$, 599.31 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.



Bis-[α,α' -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]-o-xylène, bis-trifluoroacétate 73

Le composé **72** (g, mmol), est mis en solution dans 20 ml de CH_2Cl_2 et TFA (75 : 25). La réaction est laissée sous agitation, sous argon et à température ambiante environ cinq heures avant évaporation du solvant. L'huile obtenue est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel, puis séchée sous vide. Le brut obtenu est alors repris et trituré dans Et_2O pour donner une poudre blanche. Cette dernière est plusieurs fois rincées à l' Et_2O , puis filtrée et séchée sous vide poussé (0.20 g, 81.00%).

F°: 134-135°C

IR (KBr): 3035.79 ($-\text{NH}_3^+$); 1678.40 ($-\text{NH}_3^+$).

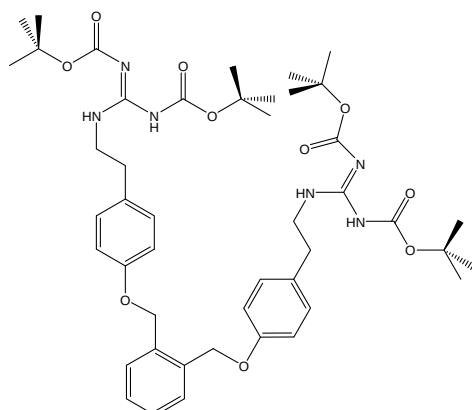
UV-Vis (D_2O): 273.0 (4076.49).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.81 (t, $J = 7.18$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.11 (t, $J = 7.18$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.15 (s, 4 H, ArOCH_2); 6.89 (d, $J = 8.32$ Hz, 4 H, ArH); 7.12 (d, $J = 8.32$ Hz, 4 H, ArH); 7.35 (m, 2 H, ArH); 7.45 (m, 2 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 32.56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 40.60 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 67.04 (ArOCH_2); 115.30 (C_m); 128.39, 128.83 (C_{ArH}); 129.93 (C_p); 130.12 (C_o); 135.56 (C_{ArH}); 157.43 (C_{ipso}); 158.79 (q, $J = 30.62$ Hz, CF_3COO^-).

Analyse élémentaire : calculée pour $C_{24}H_{28}O_2N_2$, 2 CF_3COOH , H_2O (640.22): C: 54.02%; H: 5.18%; N: 4.50% ; trouvée : C: 54.35%; H: 5.40%; N: 4.60%.

ES-MS (ES^+): 377.00 $[M - 2 (CF_3COOH) + H]^+$.



Bis-[α,α' -[para-(di(Boc)guanidino éthyl)-phénoxy]]-o-xylène 74

Le composé salin **73** (0.30 g, 1.14 mmol, 1 éq.) est mis en solution 30 mL de DMF (fraîchement distillée sous vide) et additionnée de Et_3N (0.81 g, 7.95 mmol, 7 éq.), de méthylthiourée-di-boc-guanidine **K** (0.726 g, 2.50 mmol, 2.2 éq.) et le tout est placé à 4°C avant l'ajout en une seule portion de $HgCl_2$ (0.68 g, 2.5 mmol, 2.2 éq.). Après une nuit de réaction, le solvant est évaporé sous vide, le solide obtenu

est repris au CH_2Cl_2 avant d'être filtré sur célite. On obtient, après purification sur colonne chromatographique (Al_2O_3 , CH_2Cl_2) le produit attendu **74** sous forme d'une poudre blanche (0.39 g, 40.00%).

F°: 80 - 90°C

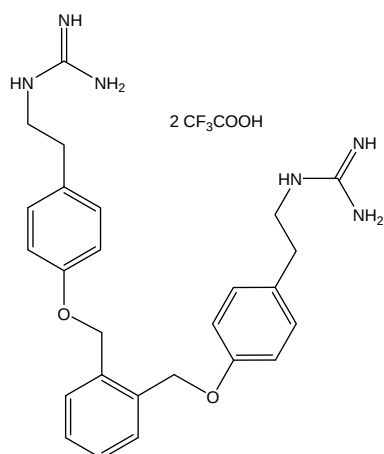
IR (KBr): 3332.88 (-CONH-); 1721.70 (CO); 1638.94 (NCO); 1511.12 (-NH-).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.47 (s, 18H, tert); 1.50 (s, 18 H, tert); 2,80 (t, J = 7,30 Hz, 4 H, $CH_2CH_2NH_2$); 3,62 (q, J = 6,55 Hz, 4 H, $CH_2CH_2NH_2$); 5,14 (s, 4 H, $ArOCH_2$), 6,90 (d, J = 8,52 Hz, 4 H, ArH); 7,12 (d, J = 8,56 Hz, 4 H, ArH); 7,35 (dd, J = 5,56 Hz, 2 H, ArH); 7,51 (dd, J = 5,56 Hz, 2 H, ArH); 8,36 (s large, 2 H, NH); 11,47 (s, 2 H, NH_{guan}).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 28.46, 28.72 (CMe_3); 34.82 ($CH_2CH_2NH_2$); 42.85 ($CH_2CH_2NH_2$); 70.30 ($ArOCH_2$); 79.64, 83.41 (CMe_3); 115.33 (C_m); 126.87, 127.43, 127.48 (C_{ArH}); 130.14 (C_o); 131.35 (C_p); 137.89 (C_{ArH}); 153.57 (C_{guan}); 156.52 (C_{ipso}); 157.87, 163.95 (CO).

Analyse élémentaire : calculée pour $C_{46}H_{64}O_{10}N_6$, $\frac{1}{4} CH_2Cl_2$ (860.47) : C: 64.17%; H: 7.49%; N: 9.76% ; trouvée: C: 64.06%; H: 7.71%; N: 9.91%.

ES-MS (ES^+): 861.59 $[M + H]^+$, 761.42 $[M - COOCMe_3 + H]^+$, 431 $[M + H]^{+2+2/2}$.



Bis-[α,α'-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]]-o-xylène, bis-trifluoroacétate 75

Le composé **74** (0.50 g, 0.581 mmol) est solubilisé dans 30 ml de mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CF}_3\text{COOH}$ (75 :25). Le tout est agité durant 24 heures, à température ambiante et sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés, le résidu est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 et évaporé afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel, puis séchée sous vide. obtenu est trituré dans l' Et_2O pour donner une fine poudre blanche qui est filtré sur fritté, rincée à l' Et_2O et séchée. Après lyophilisation on obtient **75** (0.30 g, 75.60 %).

F°: 78 – 79 °C

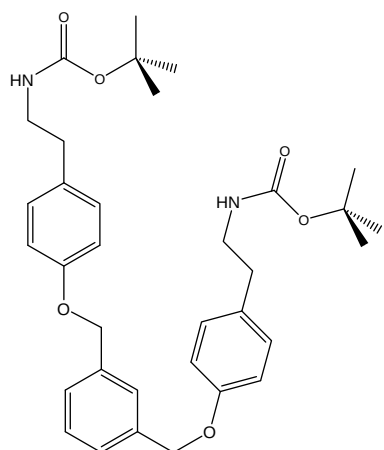
IR (KBr): 3522.2 ($-\text{NH}_2$); 3167.7 ($-\text{NH}_3^+$); 1513.2 ($-\text{NH}_3^+$).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.80 (t, $J = 6.42$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.39 (t, $J = 6.66$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.24 (s, 4 H, ArOCH_2); 6.96 (d, $J = 8.32$ Hz, 4 H, ArH); 7.18 (d, $J = 8.56$ Hz, 4 H, ArH); 7.45 (m, 2 H, ArH); 7.53 (m, 2 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 33.55 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.74 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 68.12 (ArOCH_2); 115.25 (C_o ou C_m); 128.86 (C_{ArH}); 129.58 (C_{ArH}); 130.18 (C_o ou C_m); 131.32 (C_p); 135.21 (C_{ArH}); 156.96 (Cipso); 157.01 (Cguan).

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{N}_6$, 2 CF_3COOH , H_2O (706.63): C: 50.99%; H: 5.14%; N: 11.89%; trouvée: C: 51.09%; H: 4.92%; N: 11.54%.

ES-MS (ES^+): 461.26 [$\text{M}-2(\text{CF}_3\text{COOH}) + \text{H}$] $^+$.



Bis-[α,α'-[para-(Boc-aminoéthyl)-phénoxy]]- m-xylène 76

La tyramine boquée **48** (0.36 g, 1.52 mmol, 2 éq) est mise en solution avec K_2CO_3 (0.21 g, 1.52 mmol, 2 éq) dans 25 ml de CH_3CN fraîchement distillée sur CaH_2 et laissé à reflux 30 minutes avant l'ajout du dérivé *m*-dibromométhylbenzène **c** (0.2 g, 0.76 mmol, 1éq). On laisse ensuite sous agitation, à reflux et sous argon. Après environs 24 heures de réaction, le produit de départ est consommés (contrôle CCM : SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1%). Le retour à

température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. Le résidu obtenu est repris dans le CH_2Cl_2 et filtré sur papier filtre afin de d'éliminer les impuretés minérales. Le filtrat est ensuite concentré et le brut purifié sur colonne chromatographique (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) pour ainsi obtenir le composé **76** attendu sous forme d'une poudre blanche (0.41 g, 93.00 %).

F°: 180-181°C

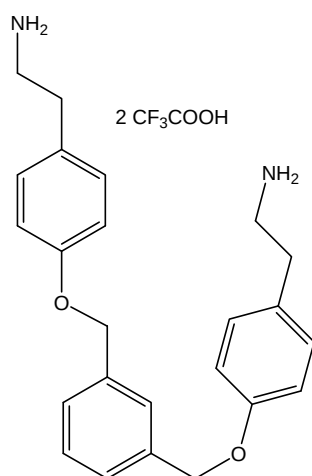
IR (KBr): 3350.55 (-CONH-); 1681.74 (CO)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : 1.43 (s, 18 H, tert); 2.73 (t, $J = 6.54$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.34 (s large, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 4.52 (s large, 2 H, NH); 5.06 (s, 4 H, ArOCH_2); 6.91 (d, $J = 8.32$ Hz, 4 H, ArH); 7.10 (d, $J = 8.04$ Hz, 4 H, ArH); 7.39 (s large, 3 H, ArH); 7.50 (s, 1 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.46, 28.71 (CMe_3); 34.82 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.85 ($\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 70.30 (ArCH_2O); 79.64 (CMe_3); 115.33 (C_0); 126.80; 127.43; 129.25 (C de $\text{Ar}[\text{CH}_2\text{O}]_2$); 130.20 (Cm); 131.35 (Cp); 137.89 (C de $\text{Ar}[\text{CH}_2\text{O}]_2$); 156.52 (CO) 157.87 (Cipso).

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{N}_2$ (576.32): C: 70.81%; H: 7.69%; N: 4.86% ; trouvée: C: 70.52%; H: 7.79%; N: 4.88%.

ES-MS (ES^+): 577.23 [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$, 599,25 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$,



**Bis-[α,α' -[para-(aminoéthyl)-phénoxy]]-m-xylène, bis-trifluoroacétate
77**

Le composé **76** (0.39 g, 0,68 mmol), est mis en solution dans 30 ml de CH_2Cl_2 et TFA (75 : 25). La réaction est laissée sous agitation, sous argon et à température ambiante pendant une nuit. Les solvants sont évaporés, le résidu est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 dans le but d'éliminer le maximum de TFA résiduel. On sèche sous vide le résidu huileux obtenu, qui est ensuite repris à l' Et_2O . Le précipité blanc qui se forme est rincé abondamment avec de l' Et_2O , avant d'être filtré et séché sous vide. On obtient une poudre blanche (0.38 g, 94.00%).

F°: 133-1334°C

IR (KBr): 3045.79 ($-\text{NH}_3^+$); 1678.45 ($-\text{NH}_3^+$).

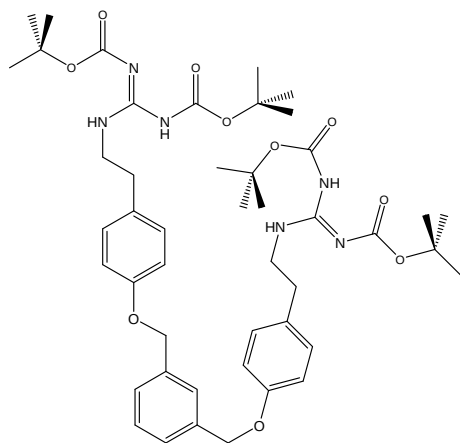
UV-Vis (D_2O): 273.0 (4079.49).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.81 (t, $J = 7.30$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.11 (t, $J = 7.30$ Hz, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.03 (s, 4 H, ArOCH_2); 6.91 (d, $J = 8.56$ Hz, 4 H, ArH); 7.13 (d, $J = 8.56$ Hz, 4 H, ArH); 7.34 (s, 3 H, ArH); 7.41 (s, 1 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 32.56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 40.60 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 67.04 (ArOCH_2); 126.10, 127.83, 129.93 (C_{ArH}); 130.12 (C_0); 135.56 (C_p); 157.43 (C_{ipso}).

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_2$, 2 CF_3COOH , $\frac{1}{2}$ H_2O (613.54): C 54.81, H 5.09, N 4.57; *found*: C 55.05, H 5.00, N 4.59.

ES-MS (ES^+): 377.17 [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$, 230.07 [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COOH} - \text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO} + 3\text{H}^+$] $^+$.



Bis-[α,α' -[para-(di(Boc)guanidino éthyl)-phénoxy]]-m-xylène 78

Le composé salin **77** (0.17 g, 0.28 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 15 ml de CH_2Cl_2 anhydre et solubilisé par le minimum de MeOH avant l'ajout de Et_3N (250 μl , 1.66 mmol, 6 éq) et de N,N'-Bis(tert-butoxycarbonyl),N''triflylguanidine (0.22 g, 0.55 mmol, 2 éq.). Le mélange est maintenu sous agitation et sous argon pendant environ 24 heures. Le solvant est par la suite évaporé, pour donner un brut qui est solubilisé dans CH_2Cl_2 (50 ml) et lavée par H_2O (40 ml). La

phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. On effectue ensuite une purification sur colonne chromatographique (SiO_2 , CH_2Cl_2) et l'on obtient le produit attendu **78** sous la forme d'une poudre blanche (0.23 mg, 98.80 %).

F°: 79 - 80°C

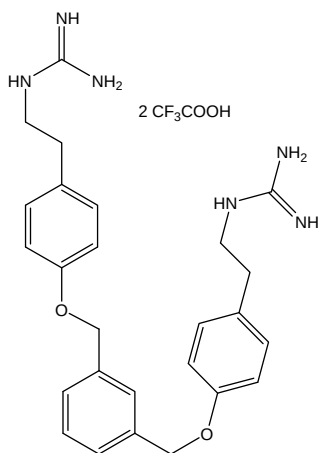
IR (KBr): 3332.88 (-CONH-); 1721.70 (CO); 1638.94 (NCO); 1511.12 (-NH-).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.47 (s, 18 H, tert); 1.50 (s, 18 H, tert); 2.81 (t, $J = 7.30$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 3.62 (q, $J = 6.55$ Hz, 4 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 5.14 (s, 4 H, ArOCH_2); 6.90 (d, $J = 8.52$ Hz, 4 H, ArH); 7.12 (d, $J = 8.56$ Hz, 4 H, ArH); 7.39 (s large, 3 H, ArH); 7.50 (s, 1 H, ArH); 8.36 (s large, 2 H, NH); 11.47 (s, 2 H, NH_{guan}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.44, 28.70 (CH_3); 34.77 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 42.87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 70.29 (ArOCH_2); 79.64, 83.41 (CMe_3); 115.33 (C_m); 126.87, 127.43, 129.24 (C_{ArH}); 130.14 (C_0); 131.35 (C_p); 137.89 (C_{ArH}); 153.57 (C_{guan}); 156.52 (C_{ipso}); 157.87, 163.92 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{46}H_{64}O_{10}N_6$, $\frac{3}{4} CH_2Cl_2$ (924.16) : C: 64.17%; H: 7.49%; N: 9.71%
trouvée: C: 64.06%; H: 7.71%; N: 9.91%.

ES-MS (ES^+): 883.43 $[M + Na]^+$, 861.59 $[M + H]^+$, 761.42 $[M - COOCMe_3 + H]^+$, 431 $[M + H]^{+2/2}$.



Bis- $[\alpha,\alpha'$ -[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy]]-m-xylènes, bis-trifluoroacétate **79**

Le composé **78** (0.15 g, 0.180 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans un mélange CH_2Cl_2 / CF_3COOH (20 ml, 75 : 25) et placé sous agitation pendant 5 heure, à température ambiante. Les solvants sont évaporés, le résidu obtenu est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 puis évaporé. Le mélange huileux-solide obtenu est séché sous vide, puis repris à l' Et_2O pour donner une fine poudre blanche. Cette dernière est filtrée, rincé à l' Et_2O et séchée sous vide. Le produit **79** final est obtenu après lyophilisation (0.12 g, 97.00 %)

F°: 77-78°C

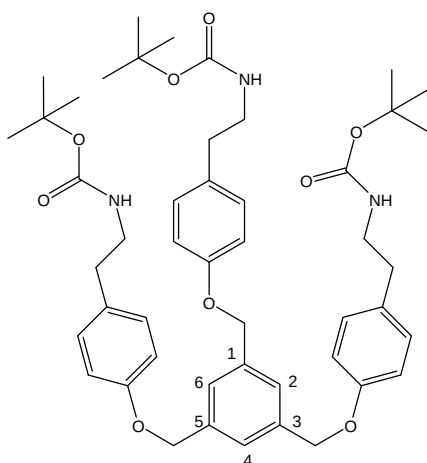
IR (KBr): 3522.2 ($-NH_2$); 3167.7 ($-NH_3^+$); 1664.5 (CO); 1513.2 ($-NH_3^+$).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) : 2.78 (t, $J = 6.56$ Hz, 4 H, CH_2CH_2NH); 3.36 (t, $J = 6.66$ Hz, 4 H, CH_2CH_2NH); 5.03 (s, 4 H, $ArOCH_2$); 6.92 (d, $J = 8.28$ Hz, 4 H, ArH); 7.15 (d, $J = 8.32$ Hz, 4 H, ArH); 7.38 (s large, 3 H, ArH); 7.41 (s large, 1 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $DMSO-D_6$): 33.55 (CH_2CH_2NH); 42.74 (CH_2CH_2NH); 68.12 ($ArOCH_2$); 115.25 (C_o ou C_m); 128.86 (C_{ArH}); 129.58 (C_{ArH}); 130.18 (C_o ou C_m); 131.32 (C_p); 135.21 (C_{ArH}); 156.96 (Cipso); 157.01 (Cguan).

Analyse élémentaire: Calculée pour $C_{26}H_{32}O_2N_6$, 2 CF_3COOH , $\frac{1}{2} H_2O$ (697.53) : C: 51.65 %; H: 5.06 %; N:12.05%; trouvée: C: 51.60%; H: 4.86%; N:12.06%.

ES-MS (ES^+): 461.25 $[M - 2 CF_3COOH + H]^+$.



**Tris-[α,α',α'']-[para-((Boc)aminoéthyl)-phénoxy] mésitylène
80**

La tyramine boquée **48** (0.39 g, 1.64 mmol, 3 équ.) est mise en solution avec K_2CO_3 (0.23 g, 1.64 mmol, 3 équ.) dans 30 ml de CH_3CN fraîchement distillée sur CaH_2 et laissé à reflux 30 min avant l'ajout du bromo mésitylène **e** (0.2 g, 0.56 mmol, 1 équ.). Le tout est laissé, sous agitation et sous argon. Après 24 h de réaction (contrôle CCM : SiO_2 ; $CH_2Cl_2/MeOH$ 0.2 %) le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. Le résidu obtenu est repris dans le CH_2Cl_2 et filtré sur fritté afin

d'éliminer les impuretés minérales. le filtrat est concentré et le brut est purifié sur colonne chromatographique (SiO_2 ; $CH_2Cl_2/MeOH$ 0.2%). On obtient ainsi, le composé solide attendu (0.32 g, 69.00 %).

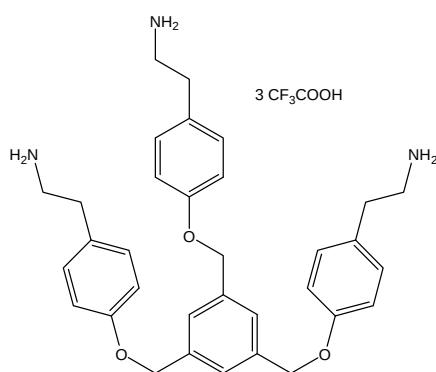
F°: 104 – 105°C

IR (KBr): 3361.81 (CONH); 1697.23 (CO); 1510.34 (NH).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.43 (s, 27 H, tert); 2.73 (t, $J = 6.80$ Hz, 6 H, CH_2CH_2NH); 3.34 (s large, 6 H, CH_2CH_2NH); 4.55 (s large, 3 H, NH); 5.06 (s, 6 H, $ArCH_2O$); 6.91 (d, $J = 8.80$ Hz, 6 H, ArH); 7.10 (d, $J = 7.56$ Hz, 6 H, ArH); 7.46 (s, 3 H, $H_{2,4,6}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 28.82 (CMe_3); 35.72 (CH_2CH_2NH); 42.33 (CH_2CH_2NH); 69.53 ($ArCH_2O$); 70.17 (CMe_3); 115.36 (C_m); 128.32 ($C_{2,4,6}$); 130.29 (C_o); 131.85 (C_p); 138.38 ($C_{1,3,5}$); 156.31 (C_{ipso}); 157.73 (CO).

Analyse élémentaire: Calculée pour $C_{48}H_{63}O_9N_3$, (826.03) : C: 76.79%; H: 7.69%; N: 5.09%; trouvée: C: 76.53%; H: 6.79%; N:4.91%.



**tris-[α,α',α'']-[para-(amino éthyl)-phénoxy]mésitylène, tris
trifluoroacétate 81.**

Le composé **80** (0.15 g, 0.18 mmol, 1 équ.) est mis en solution dans un mélange CH_2Cl_2 / CF_3COOH (15 ml, 75 : 25) et placé sous agitation pendant une nuit, à température ambiante. Les solvants sont évaporés et le résidu obtenu est plusieurs fois repris au CH_2Cl_2 puis évaporé. Le mélange huileux-solide

obtenu est séché sous vide, puis repris à l'Et₂O pour donner une fine poudre blanche. Cette dernière est filtrée, rincé à l'Et₂O et séchée sous vide. Le produit **81** final est obtenu après lyophilisation (0.15 g, 97.00%).

F°: 130 – 131 °C.

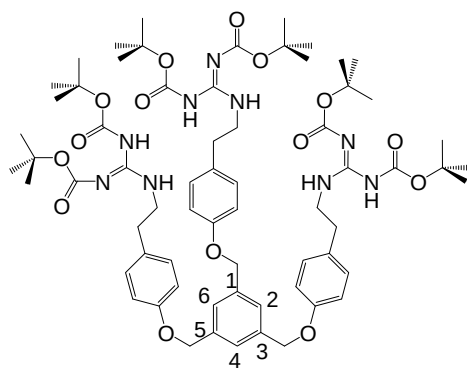
IR (KBr): 3037.14; 2932.42 (-NH₂); 1677.34 (-NH₂); 1512.53 (-NH₂).

UV-Vis (D₂O): 273.0 (43496).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O): 2.84 (t, J = 7.44 Hz, 6 H, CH₂CH₂NH); 3.13 (t, J = 7.42 Hz, 6 H, CH₂CH₂NH); 4.81 (s, 6 H, ArOCH₂); 6.84 (t, J = 8.56 Hz, 6 H, ArH); 7.13 (t, J = 7.56 Hz, 6 H, ArH); 7.25 (s, 3 H, H_{2,4,6}).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): 33.51 (CH₂CH₂NH); 42.75 (CH₂CH₂NH); 69.25 (ArOCH₂) 115.09 (C_o ou C_m); 126.21 (C_{2,4,6}); 130.08 (C_o ou C_m); 131.07 (C_p); 137.68 (C_{1,3,5}); 157.05 (C_{ipso}).

Analyse élémentaire: calculée pour: C₃₃H₃₉N₃O₃, 3 CF₃COOH (867.28) C : 53.98% H : 4.88% N : 4.84%; trouvée : C : 53.59%; H : 4.74% ; N : 5.24%.



**tris-[α,α',α'']-[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy] -
mésitylène 82**

Le sel **81** (0.14 g, 0.16 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 5.2 ml de CH₂Cl₂ anhydre et solubilisé par 3 ml de MeOH avant l'ajout de Et₃N (271 µl, 1.90 mmol, 11 éq.). Puis, nous additionnons après une dizaine de minutes le N,N'-bis(tert-butoxycarbonyl), N''triflylguanidine (0.19 g, 0.49 mmol, 3 éq.). Le mélange est maintenu sous agitation

et sous argon pendant environ 24 heures. Le solvant est par la suite évaporé, pour donner un brut qui est solubilisé dans CH₂Cl₂ et lavée par H₂O (10 ml). La phase aqueuse est lavée par 3 x 10 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. On effectue ensuite, une purification sur colonne chromatographique (SiO₂, CH₂Cl₂) pour obtenir le produit attendu, sous la forme d'une poudre blanche (0.18 g, 87.60 %).

F°: 103 – 104°C.

IR (KBr): 3361.81 (CONH); 1697.23 (CO); 1510.34 (NH).

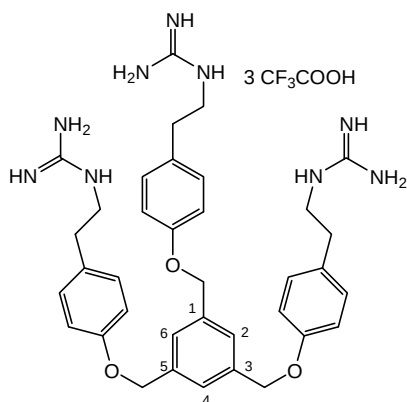
UV-Vis (CDCl₃): 288 (43496).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.47 (s, 27 H, tert); 1.50 (s, 27 H, tert); 2.81 (t, $J = 7.30$ Hz, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.63 (t, $J = 6.53$ Hz, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.06 (s, 6 H, ArOCH_2); 6.91 (d, $J = 8.56$ Hz, 6 H, ArH); 7.13 (d, $J = 7.80$ Hz, 6H, ArH); 7.47 (s, 3 H, ArH); 8,36 (t, $J = 4.78$ Hz, 3 H, NH); 11.46 (s, 3 H, NHguan).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.46, 28.71 (CH_3); 34.83 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.85 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 70.18 (ArOCH_2); 79.64, 83.41 (CMe_3); 115.32 (C_o ou C_m); 126.40 ($\text{C}_{2,4,6}$); 130.22 (C_o ou C_m); 131.42 (C_p); 138.34, 138.40 ($\text{C}_{1,3,5}$); 143.57 (CO); 156.52 (C_{ipso}); 157.83 (CO); 164.02 ($\text{C}_{\text{guanidine}}$).

Analyse élémentaire : Calculée pour $\text{C}_{66}\text{H}_{93}\text{O}_{15}\text{N}_9$ (1251.68): C: 63.29%; H: 7.48%; N: 10.06%; trouvée: C: 62.97%; H: 7.59%; N: 10.36%.

ES-MS (ES^+): 1252 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 626 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+/2}$.



Tris-[α,α',α'']-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy] mésitylène, tris trifluoroacétate **83**

Le composé **82** (0.16 mg, 0.13 mmol, 1 eq) est mis en solution dans un mélange CH_2Cl_2 sur tamis moléculaire / CF_3COOH (15 ml, 75:25) et est placé sous agitation pendant 6 heure à température ambiante et sous atmosphère d'argon (contrôle CCM : SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 2 %). Les solvants sont alors évaporés et le résidu huileux obtenu est repris deux à trois au CH_2Cl_2 et soumis aux ultrasons afin d'éliminer le maximum de

TFA résiduel par évaporation. Le produit résiduel final (solide blanc) est trituré dans l' Et_2O pour donner une fine poudre blanche qui est filtrée sur fritté, rincée à l' Et_2O , séchée puis lyophilisée pour donner le produit attendu (0.11 g, 86.00 %).

F°: 78 – 79 °C

IR (KBr): 3522.2 ($-\text{NH}_2$); 1664.5 (CO); 1513.2 ($-\text{NH}_3^+$).

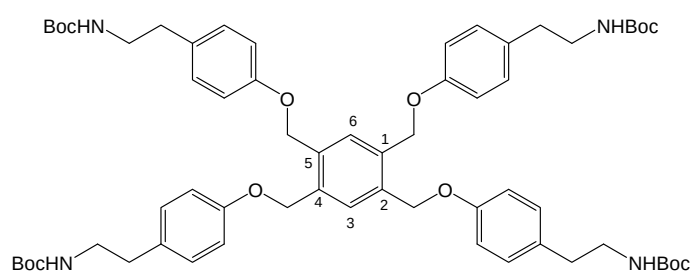
UV-Vis (D_2O): 288 (43496).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.67 (t, $J = 6.04$ Hz, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.24 (t, $J = 6.04$ Hz, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 4.80 (s, 6 H, ArOCH_2); 6.74 (t, $J = 7.32$ Hz, 6 H, ArH); 7.02 (t, $J = 7.56$ Hz, 6 H, ArH); 7.20 (s, 3 H, $\text{H}_{2,4,6}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 33.51 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.75 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 69.25 (ArOCH_2) 115.09 (C_o ou C_m); 126.21 ($\text{C}_{2,4,6}$); 130.08 (C_o ou C_m); 131.07 (C_p); 137.68 ($\text{C}_{1,3,5}$); 156.91 (C_{ipso}), 157.05 (C_{guan}).

Analyse élémentaire: calculée pour $C_{36}H_{45}N_9O_3$, 3 CF_3COOH , 3/2 H_2O (1020.87) : C : 49.41%; H : 5.04%; N : 12.35%; trouvée : C : 49.15%; H : 5.08%; N : 12.94%.

ES-MS (positive mode): 880 $[M - CF_3COOH + H]^+$; 766 $[M - 2 CF_3COOH + H]^+$; 652 $[M - 3 CF_3COOH + H]^+$.



1,2,4,5-tétrakis-[para-Boc(guanidino éthyl)-phénoxyméthyl]benzène **84**

Le para-éthylamino-Boc-phénol **48** (0.21g, 0.89 mmol, 4 éq.) est mise en solution dans 20 ml de CH_3CN fraîchement distillé, en présence de K_2CO_3 (0.13 g, 0.93 mmol, 6 éq.) et placé à reflux sous atmosphère d'argon pendant une trentaine de minutes. On additionne alors le composé bromé : 1,2,4,5-tétra-(bromométhyl) benzène (0,1 g, 0.222 mmol, 1 éq.). Le tout est laissé à reflux pendant 24 heures (contrôle CCM, SiO_2 , CH_2Cl_2 / MeOH).

Le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du solvant. Le solide résiduel est repris au CH_2Cl_2 puis lavé à l'eau distillée pour éliminer les sels minéraux, les phases aqueuses sont lavée avec 3 x 20 ml de CH_2Cl_2 . les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. On effectue une chromatographie sur la fraction organique (SiO_2 , CH_2Cl_2 /MeOH 97 : 3) afin d'éliminer les impuretés ainsi que la boctyramine résiduel. On obtient le composé **84** attendu sous forme solide (0.23 g, 99.00 %).

F°: 124 – 125 °C

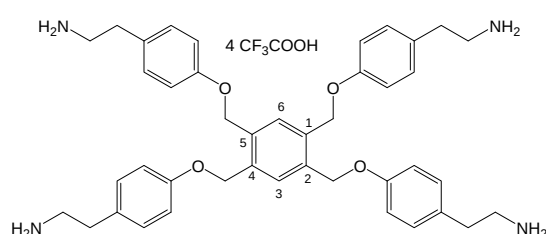
IR (KBr): 3342.44 (-CONH-) 1688.54 (CO).

UV-Vis ($CDCl_3$): 276.0 (10206)

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.43 (s, 36 H, tert); 2.73 (t, J = 6.92 Hz, 8 H, CH_2CH_2NH); 3.33 (s large, 8 H, CH_2CH_2NH); 4.60 (s large, 4 H, NH); 5.14 (s, 8H, $ArOCH_2$); 6.89 (d, J = 8.56 Hz, 8 H, ArH); 7.09 (d, J = 8.56 Hz, 8 H, ArH); 7.66 (s, 2 H, $H_{3,6}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 28.83 (CMe_3); 35.79 (CH_2CH_2NH); 42.44 (CH_2CH_2NH); 68.10 ($ArOCH_2$); 79.64 (CMe_3); 115.32 (C_0); 130.00 ($C_{3,6}$); 130.22 (C_0); 131.99 (C_p); 135.75 ($C_{1,2,4,5}$); 156.30 (C_{ipso}); 157.58 (CO).

Analyse élémentaire : calculée pour $C_{62}H_{82}O_{12}N_4$ (1074.59): C: 69.25%; H: 7.69%; N: 5.21% ; trouvée: C: 68.9%; H: 7.59%; N: 5.18%.



1,2,4,5-tétrakis-[para-(aminoéthyl)-phénoxy méthyl] benzène, tétra(trifluoroacétate) 85

Le composé **84** (0,218 g, 0.203 mmol, 1 eq) est mis en solution dans 15 ml de mélange CH_2Cl_2 anhydre et TFA (75:25). La réaction est laissée sous agitation et sous argon à température ambiante.

Après 24 heures de réaction (contrôle CCM : SiO_2 , CH_2Cl_2/CH_3OH 2 %), le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise au CH_2Cl_2 et évaporée afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le brut est ensuite séché sous vide poussé, avant d'être repris et trituré à l'éther. On obtient une poudre, qui est filtrée sur fritté, rincé à l' Et_2O et séchée sous vide (0.06 mmol, 71 %).

F°: 142 - 143 °C

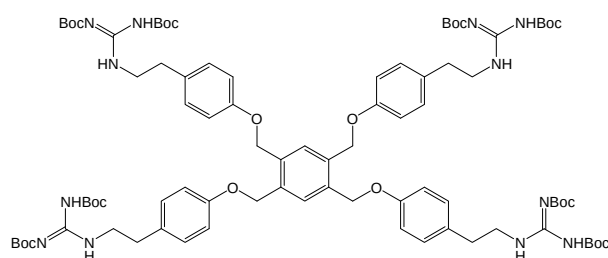
IR (KBr): 3454.32 ($-NH_3^+$); 1681.42 ($-NH_3^+$); 1560.15 ($-NH_3^+$).

RMN 1H (400 MHz, D_2O): 2.81 (m, 8 H, CH_2CH_2NH) ; 3.24 (m, J = 5.92 Hz, 8 H, ACH_2CH_2NH) ; 5.15 (s, 8 H, $ArOCH_2$) ; 6.87 (m, 8 H, ArH) ; 7.11 (m, 8 H, ArH) ; 7.58 (s, 2 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $DMSO-D_6$): 32.26 (CH_2CH_2NH); 40.22 (CH_2CH_2NH); 66.84 ($ArOCH_2$); 114.98 (Co); 128.88 (C_{ArH}); 129.69 (C_m); 129.82 (C_p); 135.08 (C_{ArH}); 157.11 (C_{ipso}).

Analyse élémentaire : Calculée pour $C_{42}H_{50}O_4N_4$, 4 CF_3COOH , 4/3 H_2O (1144.33): C: 52.00 %; H: 4.95 %; N: 4.85 %; trouvée: C: 51.94% ; H: 4.84 % ; N: 4.87 %.

ES-MS (positive mode): 789.28 [$M + H^+$] $^+$; 338.22 [$M + 2H^+$] $^{2+/2}$.



1,2,4,5-tétrakis-[para-(di(Boc) guanidino éthyl)-phénoxy méthyl] benzène 86

Le composé **85** (0.18g, 0.16 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 20 ml de $CH_2Cl_2/MeOH$ (1:1) puis on additionne la Et_3N (0.28 ml, 1.99

mmol, 12 éq.). Puis, on additionne le *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N'*-triflylguanidine (0.26 g, 0.66 mmol, 4 éq.). La réaction est placée sous agitation, sous argon à température ambiante (contrôle CCM: SiO₂/MeOH). Après 24 heures de réaction, les solvants sont évaporés, le résidu obtenu est solubilisé dans 20 ml de CH₂Cl₂ puis lavé par 2 x 25 ml d'H₂O. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le brut obtenu subit alors une purification par colonne de chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂ à CH₂Cl₂/MeOH 99:1). On obtient le produit attendu **86** sous forme de solide blanc (0.16 g, 58.00 %).

F°: 129 – 130°C

IR (KBr): 3334.05 (-CONH-); 1721.54 (CO); 1638.74, (NCO); 1510.69 (-NH-).

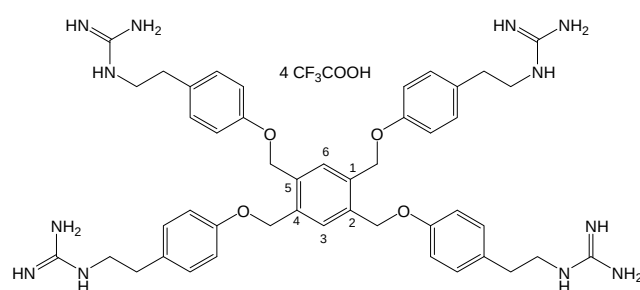
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.45 (s, 36 H, tert); 1.48 (s, 36 H, tert); 2.80 (t, J = 7.16 Hz, 8 H, CH₂CH₂NH); 3.61(q, J = 6.20 Hz, 8 H, CH₂CH₂NH); 5.13 (s, 8 H, ArOCH₂); 6.88 (d, J = 8.08 Hz, 8 H, ArH); 7.11 (d, J = 7.84 Hz, 8 H, ArH); 7.67 (s, 4 H, ArH); 8.36 (s, 4 H, NH); 11.30 (s large, 4 H, NH_{guan}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 28.17, 28.43 (CMe₃); 34.55 (CH₂CH₂N); 42.56 (CH₂CH₂N); 67.79 (OCH₂Ar); 79.36, 83.13 (CMe₃); 115.02 (C_O); 129.71 (C_{ArH}); 129.96 (Cm); 131.25 (Cp); 135.43 (C_{ArH}); 153.29 (C_{ipso}); 156.24 (CO); 157.40 (C_{guan}); 163.73 (CO).

Analyse élémentaire : calculée pour C₈₆H₁₂₂O₂₀N₁₂ (1643.96): C: 62.83 %; H: 7.48 %; N: 10.22 %; trouvée: C: 62.77% ; H: 7.12 % ; N: 9.99 %.

ES-MS (ES⁺): 1643.88 [M + H]⁺; 1643.8 [M + Na]⁺; 822.9 [M + 2 H]^{2+/2}.

ES-MS (ES⁻): 1641.88 [M - H]⁺.



1,2,4,5-tétrakis-[*para*-(guanidino éthyl)-phénoxy-méthyl]benzène, tétra(trifluoroacétate **87)**

Le composé **86** (0.14 g, 0.08 mmol) est mis en solution dans un mélange CH₂Cl₂/CF₃COOH (15 ml, 75:25). Le tout est placé sous agitation (24 heures), à température ambiante, et sous atmosphère d'argon (contrôle CCM: SiO₂, CH₂Cl₂/CH₃OH).

Les solvants sont alors évaporés et le résidu huileux obtenu est repris deux à trois au CH_2Cl_2 et soumis aux ultrasons afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le produit résiduel final (solide blanc) est trituré dans l' Et_2O pour donner une fine poudre blanche qui est filtrée sur fritté, rincée à l' Et_2O , séchée puis lyophilisée pour donner le produit attendu **87** (0.79 g, 74%).

F°: 91-92°C

IR (KBr): 3360.16 ($-\text{NH}_2$); 3184.31 ($-\text{NH}_3^+$); 1671.14 (CO); 1511.63 ($-\text{NH}_3^+$).

UV-Vis (D_2O): 272 (6088)

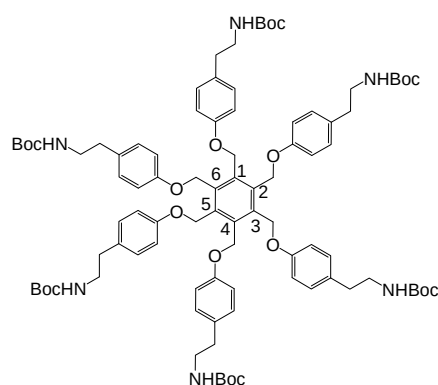
RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.74 (t, $J = 6.78$ Hz, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.31 (t, $J = 6.92$ Hz, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.01 (s, 8 H, ArOCH_2); 6.82 (d, $J = 8.32$ Hz, 8 H, ArH); 7.08 (d, $J = 8.28$ Hz, 8 H, ArH); 7.49 (s, 2 H, $H_{3,6}$).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): 2.71 (t, $J = 7.16$ Hz, 8 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.30 (q, $J = 6.80$ Hz, 8 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.19 (s, 8 H, ArOCH_2); 6.96 (d, $J = 8.56$ Hz, 8 H, ArH); 7.18 (d, $J = 8.32$ Hz, 8 H, ArH); 6.94 – 7.67 (s large, 12 H, NHguan); 7.70 (s large, 4 H, NH guan).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): 33.91 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.63 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 67.14 (ArOCH_2); 115.07 (C_0); 129.12 ($\text{C}_{3,6}$); 130.05 (C_m); 131.05 (C_p); 135.38 ($\text{C}_{1,2,4,5}$); 157.15 (C_{ipso}); 157.21 (C_{guan}); 159.35 (q, $J = 32.02$ Hz, CF_3COOH).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{O}_4\text{N}_{12}$, 4 CF_3COOH , H_2O (1317.13): C: 49.24%; H: 4.90%; N: 12.76%; trouvée: C: 49.00%; H: 5.27%; N: 12.63%.

ES-MS (ES^+): 1185.47 [$\text{M} - \text{CF}_3\text{COOH}$] $^+$, 1071.48 [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COOH}$] $^+$, 957.48 [$\text{M} - 3 \text{CF}_3\text{COOH} - 2\text{H}$] $^+$, 422.26 [$\text{M} - 4 \text{CF}_3\text{COOH} - 2\text{H}$] $^{+2/2}$.



Hexakis-[para-(Boc-guanidinoéthyl)-phénoxy-méthyl] benzène **88**.

Une solution de boctyramine **48** (0.22 g, 0.93 mmol, 6 éq.) dans 20 ml d'acétonitrile préalablement distillé est additionnée de K_2CO_3 (0.13 mg, 0.93 mmol, 6 éq.). Le mélange est laissé à température ambiante, sous argon pendant 30 minutes. On ajoute l'hexa (bromométhyl) benzène (**g**) (0.1 g, 0.167 mmol, 1 éq.). La réaction est suivie par CCM (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1). Après 24 heures de réaction, le mélange réactionnel est

évaporé. Le solide résiduel est repris au CH_2Cl_2 puis lavé à l'eau distillée pour éliminer les sels minéraux, les phases aqueuses sont lavées avec 3 x 20 ml de CH_2Cl_2 . Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. On effectue une chromatographie sur la fraction organique (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 97:3) pour éliminer les impuretés ainsi que la boc-tyramine résiduel. On obtient le composé sous forme solide (0.27 g, 93.00%).

F°: 129 – 130°C

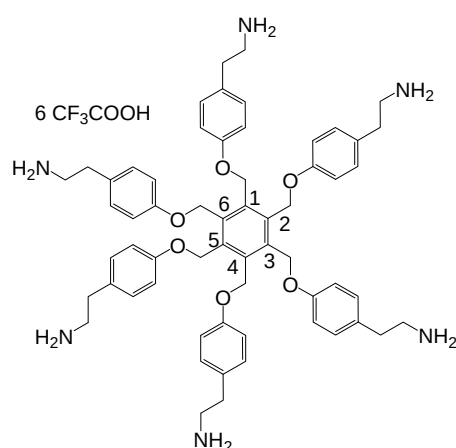
IR (KBr): 3366.59 (-CONH-); 1699.77 (CO); 1509.20 (-NH).

UV-Vis (CDCl_3): 275.0 (18590).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.41 (s, 54 H, tert); 2.69 (t, $J = 6.80$ Hz, 12 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.29 (s large, 12 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 4.57 (s large, 6 H, NH); 5.15 (s, 12 H, ArCH_2O); 6.81 (d, $J = 8.56$ Hz, 12 H, ArH); 7.02 (d, $J = 8.56$ Hz, 12 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.52 (CMe_3); 35.47 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.11 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 67.79 (ArCH_2O); 79.30 (CMe_3); 115.00 (C_0); 129.69 (C_m); 131.69 (C_p); 135.44 (C_{ArH}); 155.98 (C_{ipso}); 157.26 (CO).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{90}\text{H}_{120}\text{O}_{18}\text{N}_6$ (1572,87) : C: 68.68%; H: 7.68%; N: 5.34%; trouvée: C: 68.58%; H: 7.20%; N: 5.03%.



Hexakis-[para-(aminoéthyl)-phénoxy méthyl] benzène, hexa-trifluoroacétate 89.

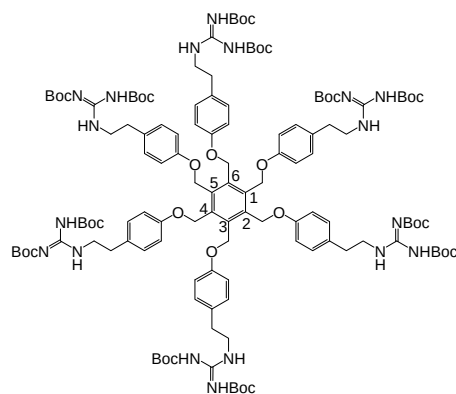
Le composé **88** (0,205 mg, 0,133 mmol) est mis en solution dans 16 ml de CH_2Cl_2 anhydre et additionné de 4 ml de TFA, on laisse sous agitation et sous argon à température ambiante (contrôle CCM, SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%) . Après environ trois heures de réaction le solvant est évaporé et l'huile obtenue est plusieurs fois reprise et évaporée pour éliminer le maximum de TFA résiduel puis séchée sous vide poussé. Le brut est alors repris et trituré dans Et_2O , pour donner une poudre blanche qui est ensuite filtrée sur fritté, lavée à Et_2O et séchée (0,19 mg, 90.00%).

IR (KBr): 3453.32 ($-\text{NH}_3^+$); 1681.42 ($-\text{NH}_3^+$).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O): 2.87 (t, $J = 7.30$ Hz, 12 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.17 (t, $J = 7.42$ Hz, 12 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.35 (s, 12 H, ArCH_2O); 6.91 (d, $J = 8.56$ Hz, 12 H, ArH); 7.14 (d, $J = 8.80$ Hz, 12 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): 35.47 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.11 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 67.79 (ArCH_2O); 79.30 (CMe_3); 115.00 (C_O); 129.69 (C_m); 131.69 (C_P); 135.44 (C_{ArH}); 155.98 (C_{ipso}).

Analyse élémentaire: Calculée pour $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_6$, 6 CF_3COOH , $\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (1686.48): C: 51.62%; H: 4.81%; N: 5.02%; trouvée: C: 51.64%; H: 4.25%; N: 4.86%.



Hexakis-[para-(di(Boc)guanidinoéthyl)-phénoxy-méthyl] benzène 90.

Le sel **89** 187 (0.18 g, 0.108 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans un mélange CH_2Cl_2 / MeOH (20 mL, 1:1). On additionne la Et_3N (0.28 ml, 1.98 mmol, 18 éq.) avant l'ajout de la *N,N'*-Bis (tert-butoxycarbonyl) - *N'* -triflylguanidine (0.26 g, 0.66 mmol, 6 éq.). La réaction est placée sous agitation, sous argon à température ambiante (contrôle CCM, SiO_2/MeOH). Après 15 heures de réaction, le solvant est évaporé et le résidu obtenu est solubilisé dans 20 ml de CH_2Cl_2 puis lavé par 3 x 25 ml d' H_2O . On rassemble les phases organiques qui sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le brut obtenu subit alors une purification sur colonne de chromatographique (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1). On obtient le produit attendu sous forme de solide blanc (0.22 g, 85.00 %).

F°: 127-128°C

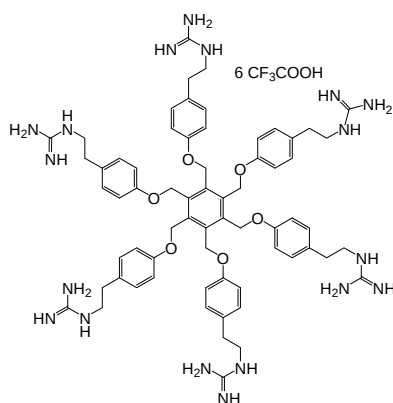
IR (KBr): 3330.89 (-CONH-); 1721.91 (CO); 1638.39 (NCO); 1615.16 (NCO); 1509.63 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): 1.45 (s, 54 H, tert); 1.49 (s, 54 H, tert); 2.79 (t, $J = 6.80$ Hz, 3 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.60 (t large, 3 H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 5.15 (s, 12 H, ArCH_2O); 6.81 (d, $J = 8.08$ Hz, 12 H, ArH); 7.06 (d, $J = 8.04$ Hz, 12 H, ArH); 8.39 (s large, 6 H, NH); 11.46 (s large, 6 H, NH_{guan}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 28.17, 28.43 (CMe_3); 33.87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42.61 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 63.94 (ArCH_2O); 115.16, 130.22 (C_O ou C_m); 131.38 (C_P); 137.86 (C_{ArH}); 143.42 (C_{ipso}); 156.24 (CO); 157.40 (C_{guan}); 163.73 (CO).

Analyse élémentaire: Calculée pour $\text{C}_{126}\text{H}_{180}\text{O}_{30}\text{N}_{18}$ (2426.88): C: 62.38%; H: 7.48%; N: 10.39%; trouvée: C: 62.37%; H: 7.10%; N: 10.07%.

ES-MS (ES^+): 2426.32 $[M + H]^+$; 2427.32 $[M + 2 H]^+$; 2326.27 $[M - C_5O_2H_8 + H]$; 2327.27 $[M - C_5O_2H_8 + H]$; 2328.27 $[M - C_5O_2H_8 + H]$; 2330.26 $[M - C_5O_2H_8 + H]$; 1214.18 $[M - C_5O_2H_8 + 2 H]^{2+/2}$; 1164.15 $[M - C_5O_2H_8]^{2+/2}$; 1114.12 $[M - 2C_5O_2H_8 + H]^{2+/2}$; 809.79 $[M + 3H]^{3+/3}$; 776.44 $[M + 3H]^{3+/3}$; 357.20 $[[M - 10C_5O_2H_8 + 4H]^{4+/4}]$; 382.22 $[[M - 9C_5O_2H_8] + 4H]^{4+/4}$



Hexakis-[para-(guanidinoéthyl)-phénoxy méthyl]benzène, hexa(trifluoroacétate) 91

Le composé **90** (0.15 g, 0.06 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans un mélange CH_2Cl_2 / CF_3COOH (20 ml, 75 : 25) et est placé sous agitation pendant 24 heures à température ambiante et sous atmosphère d'argon (contrôle CCM: SiO_2 , CH_2Cl_2 /MeOH).

Les solvants sont évaporés et le résidu huileux obtenu est repris deux à trois au CH_2Cl_2 est soumis aux ultrasons afin d'éliminer le maximum de TFA résiduel. Le produit résiduel final (solide blanc) est trituré dans l' Et_2O pour donner une fine poudre blanche. Cette dernière est filtrée sur fritté, rincée à l' Et_2O puis séchée avant d'être lyophilisé pour donner le produit attendu (0.95 g, 83.00 %).

F°: 95-96°C

IR (KBr): 3359.31 ($-NH_2$); 3182.36 ($-NH_3^+$); 1670.26 (CO); 1510.43 ($-NH_3^+$).

UV-Vis (D_2O): 288 (43496).

RMN 1H (400 MHz, D_2O): 2.77 (t, $J = 6.80$ Hz, 12 H, $ArCH_2CH_2NH$); 3.35 (t, $J = 6.80$ Hz, 12 H, $ArCH_2CH_2NH$); 5.33 (s, 12 H, $ArOCH_2$); 6.87 (d, $J = 8.56$ Hz, 12 H, ArH); 7.11 (d, $J = 8.56$ Hz, 12 H, ArH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $DMSO-D_6$): 33.87 (CH_2CH_2NH); 42.61 (CH_2CH_2NH); 63.94 ($ArCH_2O$); 115.16, 130.22 (C_O ou C_m); 131.38 (C_P); 137.86 (C_{ArH}); 143.42 (C_{ipso}); 157.26 (C_{guan}); 159.35 (q, $J = 32.02$ Hz, CF_3COOH).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{66}H_{84}N_{18}O_6$, 6 CF_3COOH , 2.5 H_2O (1954.66) : C : 47.93%; H : 4.90%; N : 12.90%; trouvée C : 47.91%; H : 5.05%; N : 12.86%;

ES-MS (ES^+): 613.3 $[M - 6 CF_3COOH + 2H]^2+$; 409.2 $[M - 6 CF_3COOH + 3H]^3+$; 307.2 $[M - 6 CF_3COOH + 4H]^4+$; 245.9 $[M - 6 CF_3COOH + 5H]^5+$.

PUBLICATIONS

- 2,604 • Towards calixarene-based prodrugs : Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid / calix[4]arene ester adduct.
Bioorg. Med. Chem. Lett. **2009**, 19, 2679-2682.
H. Massimba Dibama., I. Clarot., S. Fontanay., A. Ben Salem., M. Mourer., C. Finance., R.E Duval., J.B. Regnoulf-de-Vains.
- 2,980 • Cationic compounds vs. multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound versus two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine.
Clin. Microbiol. Infect. **2010**, 16, 432-438.
M. Grare., H. Massimba Dibama., S. Lafosse., A. Ribon., M. Mourer., J.B. Regnoulf-de-Vain., C. Finance., R.E Duval.
- 2,662 • p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation.
Bioorg. Med. Chem. (2009) 17, 5496-5509. (FI 2.662).
M. Mourer., H. Massimba Dibama., S. Fontanay., M. Grare., R.E. Duval., C. Finance., J.B. Regnoulf-de-Vains.
- M. Grare, S. Fontanay, H. Massimba Dibama, M. Mourer, J.-B. Regnoulf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Time-kill curves and evolution of membrane permeability after *para*-guanidinoethylcalix[4]arene exposure". *Pathol. Biol.* **2010**, 46, 46-51.
- C. Geller, S. Fontanay, M. Mourer, H. Massimba Dibama, J.-B. Regnoulf-de-Vains, C. Finance, R.E. Duval; "Antiseptic properties of two calix[4]arenes derivatives on the human coronavirus 229E" *Antiviral Research.* **2010**, 88, 343–346.

COMMUNICATIONS NATIONALES ET INTERNATIONALES

AFFICHES

- **Journée de l'école doctorale SESAMES, Metz, 2 octobre 2007.**
Massimba Dibama H., Clarot I., Mourer M., Fontanay S., Duval R.E. & Regnoulf de Vains J.B.
«Vers de nouveaux prodrogues. Exemple d'un podant calixarene-quinolone antibiotique».
- **Journées Pharma-Recherche, Nancy, 20 mars 2008.**
Grare M., Massimba Dibama H., Mourer M., Regnoulf de Vains J.B., Finance C. & Duval R.E.
Le para-guanidinoéthylcalix[4]arène : activité sur SARM, ERG et sur Entérobactéries productrices de BLSE... Cytotoxicité... Cible d'action ?

- **27^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 6-7 décembre 2007.**

Grare M., Massimba Dibama H., Mourer M., Regnouf de Vains J.B., Finance C. & Duval R.E.

«Le para-guanidinoéthylcalix[4]arène : activité sur SARM, ERG et sur Entérobactéries productrices de BLSE... Cytotoxicité... Cible d'action ?»

- **48th annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)/ Infectious Diseases Society of America (IDSA), Washington, DC, USA, 25-28 October 2008.**

Grare M., Ribon A., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.B., Finance C. & Duval R.E.

«*In vitro* mutation studies with a new promising compound, the para-guanidinoethylcalix[4]arene».

- **28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 4-5 décembre 2008.**

Grare M., Fontanay S., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.B., Finance C. & Duval R.E.

«Bénéfices de l'association *in vitro* du para-guanidinoéthylcalix[4]arène avec d'autres antibiotiques».

- **28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 4-5 décembre 2008.**

Grare M., Fontanay S., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.B., Finance C. & Duval R.E.

«Cinétique d'action du para-guanidinoéthylcalix[4]arène, et évolution de la perméabilité membranaire».

- **12 ièmes journées du club français de cyclodextrines, Lyon 3-4 décembre 2009**

H. Massimba Dibama., I. Clarot., S. Fontanay, C. Finance., R. E. Duval., M. Mourer., J-B. Regnouf-de-Vains.,

«Towards calixarene-based prodrugs: the case of the antibacterial nalidixic acid»

- **Congrès de la Société Française de Chimie, Strasbourg , 20-21 Mai 2010**

H. Massimba Dibama., I. Clarot., S. Fontanay, R. E. Duval., M. Mourer., J-B. Regnouf-de-Vains.

«Hydrophilic labile Quinolone-Calixarene adducts. Looking for an anti-bacterial prodrug».

- **4th European Congress of virology, Como Lake, Italy, 7-11 avril 2010**

Geller C., Fontanay S., Mourer M., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.B., Finance C., Duval R.E; "Evaluation of the antiseptic virucidal activity of 2 new calix[4]arenes on the human coronavirus 229E thanks to an original method using sephadexTM columns".

- **14th SarLorLux Workshop on Virus Research, Hombourg, 27 September 2010**

Geller C., Fontanay S., Mourer M., Massimba Dibama H., Regnouf-de-Vains J.-B., Finance C., Duval R.E.* Evaluation of the antiseptic virucidal activity of 2 new calix[4]arenes on the Human coronavirus 229E thanks to an original method using SephadexTM columns.

- Maxime Mourer, Hugues Massimba Dibama, Patricia Constant, Mamadou Daffé, Jean-Bernard Regnouf-de-Vains ; « Evaluation of anti-mycobacterial activities of some cationic and anionic calix[4]arene derivatives », 13^{ème} journée du club français des cyclodextrines ; 9-10 décembre **2010** : Université du Littoral Côte d'Opale - Dunkerque 1.

ORALES

- **Journées Pharma-Recherche, Nancy, 29 mars 2007**

H. Massimba Dibama., I. Clarot., Mourer M., S. Fontanay., R.E. Duval., J.B. Regnouf-de-Vains.

«Vers de nouveaux prodrogues. Exemple d'un podant calixarene-quinolone antibiotique».

- **Congrès de la Société Française de Chimie, Grand-Est, Nancy, 22-23 Mai 2008**

H. Massimba Dibama., I. Clarot., Mourer M., S. Fontanay., R.E. Duval., J.B. Regnouf-de-Vains.

«Vers de nouveaux prodrogues. Exemple d'un podant calixarene-quinolone antibiotique».

- **Congrès de la Société Française de Chimie, Strasbourg , 20-21 Mai 2010**

H. Massimba Dibama., I. Clarot., S. Fontanay, R. E. Duval., M. Mourer., J-B. Regnouf-de-Vains.

«Hydrophilic labile Quinolone-Calixarene adducts. Looking for an anti-bacterial prodrug»

- M. Mourer, H. Massimba Dibama, S. Fontanay, M. Grare, R. E. Duval, C. Finance, J.-B. Regnouf-de-Vains ; « Vers un nouvel antibactérien » ; 12^{ème} journée du club français des cyclodextrines ; 3-4 décembre **2009** : Université Claude Bernard - Lyon 1

1) Enveloppe Soleau n° 357384

2) Enveloppe Soleau n° 357386

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1

Mention Chimie et Physico-Chimie Moléculaires

Titre : Calixarènes et composés apparentés à propriétés anti-infectieuses.

Nom et Prénom : MASSIMBA DIBAMA Hugues

Ecole doctorale : SESAMES

Equipe contractualisée : GEVSM SRSMC, UMR 7565 Nancy-Université CNRS, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, 54001 Nancy

Date de soutenance : 15 Novembre 2010, 14h00

Membre du jury :

Rapporteurs : Hélène PARROT-LOPEZ, Professeur, Université Claude Bernard, Lyon I

Catherine JEUNESSE, HDR, MCU, Université Louis Pasteur de Strasbourg

Examineurs : Philippe C. GROS, Dir. de recherche CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy 1 (Membre invité)

Maxime MOURER, MCU, Université Henri Poincaré, Nancy 1 (Membre invité)

Igor CLAROT MCU, Université Henri Poincaré, Nancy 1 (Co-directeur de Thèse)

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1 (Directeur de Thèse)

Résumé

L'objet de ce travail repose sur la recherche et le développement de nouveaux composés antibactériens, devant, selon le concept initial, interagir avec la paroi bactérienne. Ces derniers sont de nature polycationique, intégrant sur une plateforme organisatrice rigide, tridimensionnelle de type calixarène ou plane de type aromatique, des fonctions guanidinium en nombre variable. Certains ont été développés en tant que prodrogues hydrosolubles, susceptibles de libérer *in vivo* un principe actif déjà éprouvé, la quinolone acide nalidixique. Après une introduction et une étude bibliographique (chapitre I) sur les calixarènes, notamment sur leurs applications en biologie, sont présentés en chapitre II les résultats obtenus pour la synthèse et la caractérisation des parents partiellement substitués du *tétra-para*-(guanidinoéthyl)calix[4]arène, composé antibactérien originel de cette série. L'objectif de ces synthèses est d'appréhender le rôle et l'importance du nombre et du positionnement des fonctions guanidines sur le calixarène, ainsi que l'influence de la présence de groupe tertio-butyles résiduels sur l'activité antibactérienne. Dans le chapitre III, sont abordées les différentes étapes menant à la synthèse, la caractérisation et l'évaluation par voies physico-chimiques de nouveaux composés conçus comme prodrogues hydrosolubles de principes actifs antibactériens connus. Le travail est centré sur un ensemble de dérivés ioniques de calix[4]arènes porteurs de motifs acide nalidixique ; le comportement de prodrogue potentiel est ainsi démontré pour l'un d'entre eux. Dans le quatrième chapitre sont décrites les synthèses et caractérisations de nouvelles structures poly-ioniques, intégrant un motif central de type benzène, porteur d'un nombre variable de motifs latéraux *para*-(guanidinoéthyl)phényléther, et conçues comme une alternative aux calixarènes précédemment développés. Le chapitre V est dédié aux résultats des évaluations biologiques de l'ensemble de ces composés. Les Concentrations Minimales Inhibitrices ont été obtenues sur un ensemble de souches bactériennes de référence et, pour certains composés, la viabilité et la toxicité cellulaire ont été évaluées sur cellules eucaryotes. Nous montrons que plusieurs des dérivés préparés, prodrogues ou non, présentent une activité anti-bactérienne très intéressante.

Mots clés : Calixarènes, composés hétérocycliques, guanidinium, prodrogue, libération, CLHP, anti-infectieux.

Summary

The main objective of this work is based on the search and the development of new antibacterial compounds, and according to the initial concept, able to interact with a bacterial wall.

The proposed compounds are of polycationic nature, elaborated on a rigid three-dimensional calixarene structure or a flat organizing aromatic platform and containing guanidinium functions in various number and position. Some of them were developed as water-soluble prodrugs of the quinolone already described nalidixic acid. After an introduction and a bibliographical study (chapter I) on calixarenes, in particular on their applications in biology, the chapter II presents the results obtained for the synthesis and the characterization of the partially substituted analogues of the *tétra-para*-(guanidinoéthyl) calix[4]arene, the first antibacterial compound at the origin of this family. The objective of this part is to understand the role and the importance of the number and the positioning of the guanidines functions on the calixarene core, as well as the influence of residual tertio-butyl groups on the antibacterial activity. In chapter III, are presented the various steps leading to the synthesis, the characterization and the evaluation by physicochemical ways of new compounds designed like water-soluble prodrugs of known antibacterial active compounds. The work is centered on a set of ionic derivatives of calix[4]arenes carriers of nalidixic acid. The prodrug behavior was demonstrated for one of them. In the fourth chapter, the syntheses and characterizations of star-like poly-ionic structures are described, based on a benzene core, including a variable number of *para*-(guanidinoéthyl) phényléther subunits. These compounds were constructed as an interesting alternative to calixarenes previously developed. The chapter V is dedicated to the results of the biological evaluations of all the structure synthesized. Minimum Inhibitory Concentrations were evaluated on a set of bacterial reference strains. For some compounds, viability and cellular toxicity were evaluated on eukaryotic cells. We show that many of the new prepared derivatives, prodrugs or not, present very interesting anti-bacterial activities.

Key-words: Calixarene, benzene ring, guanidinium, heterocyclic compounds, prodrug, release, HPLC, anti-infectious.