



HAL
open science

Composés polyioniques contraints bioactifs libres et supportés : accès à de nouveaux matériaux antibactériens

Frederic Lemee

► To cite this version:

Frederic Lemee. Composés polyioniques contraints bioactifs libres et supportés : accès à de nouveaux matériaux antibactériens. Chimie organique. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0047 . tel-01281770v2

HAL Id: tel-01281770

<https://hal.science/tel-01281770v2>

Submitted on 2 Mar 2016

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.

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

Ecole Doctorale SESAMES.

Département de Formation Doctorale Chimie et Physico-Chimie Moléculaires

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en Chimie et Physico-Chimie Moléculaire

par **Frédéric LEMÉE**

COMPOSES POLYIONIQUES CONTRAINTS BIOACTIFS LIBRES ET SUPPORTES. ACCES A DE NOUVEAUX MATERIAUX ANTIBACTERIENS

Soutenance publique prévue le 23/03/2015

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. J-C. Chambron	Directeur de recherche CNRS, Université de Bourgogne
	Mme. I. Bonnamour	MCU HDR, Université de Lyon
Examineurs :	M. E. Marchioni	Professeur, Université de Strasbourg
	M. J.-B. Regnouf de Vains	Professeur, Université de Lorraine (Directeur de thèse)
	M. M. Mourer	MCU, Université de Lorraine (Co-directeur de thèse)
	M. I. Clarot	MCU HDR, Université de Lorraine

Remerciements

Ce travail de thèse est le fruit de rencontres, de soutiens et de collaborations provenant de personnes qu'il m'est indispensable de remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier, tout particulièrement, le Professeur Jean-Bernard Regnouf de Vains, qui m'a proposé la réalisation de ce travail. Il m'a guidé de ses nombreux conseils tout au long de cette thèse en restant disponible, enthousiaste et motivant. Le partage de ses expériences n'a fait que confirmer mon goût pour la recherche et je l'en remercie tout particulièrement.

Mes remerciements vont également à mon co-directeur de thèse, le Dr Maxime Mourer qui aura pu répondre à mes questions et m'aider dans mes recherches.

J'adresse toute ma gratitude au Dr Igor Clarot pour son énergie débordante, sa motivation contagieuse et sa supervision de toute la partie analytique de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr Isabelle Bonnamour, Maître de conférences des Universités à l'Université de Lyon et au Dr Jean-Claude Chambron, Directeur de recherche CNRS à l'Université de Bourgogne, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

J'adresse à nouveau mes remerciements au Dr Eric Marchioni, Professeur à l'Université de Strasbourg, pour avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur.

Je remercie également Guillaume Sautrey, ATER du laboratoire et collègue de bureau, qui m'a beaucoup aidé d'un point de vue pratique en particulier pour faire fonctionner l'électrophorèse capillaire.

Je remercie l'ensemble des personnes de l'équipe MoBAT, en particulier les thésards ou anciens thésards avec lesquels j'ai passé de bons moments : Mylène Richard, Maxime Meyer, Sébastien Schmitt, Sahar Saliba, Guillaume Poisson et Charlotte Collet.

Un immense merci aux personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer, telles que Brigitte Fernet, Pascal Lemièrre, Stéphane Parant et Eric Dubs.

Je remercie l'ensemble du Club Jeunes de la Société Chimique de France de Lorraine avec particulièrement Philippe Gros, Andréa Pasc, Sandrine Lamandé-Langle, Charlène Gadais, Antoine Marion et Daniel Bonhenry avec lesquels j'ai pu prendre part à l'organisation d'un congrès régional de chimie, DocSciLor 2013.

Je tiens à exprimer un remerciement chaleureux aux stagiaires que j'ai eu le plaisir de côtoyer au sein du laboratoire et particulièrement Bin Son N'Guyen, Dorian Grosdemouges, Loic Ronin, Nicolas Henrion et Kévin Petitcolas.

Je tiens par la même occasion à remercier Aurélien, Hugo, Hubert et Laurent ainsi que les autres doctorants du Loria avec qui j'ai pu partager chaque mercredi un déjeuner fort sympathique.

Je remercie tout particulièrement Chloé qui m'a toujours soutenu et encouragé dans cette aventure tout au long de ces trois années y compris dans les moments difficiles ou stressants.

Enfin je remercie, mes proches, ma famille, en particulier mes parents et mes grands-parents, qui m'ont soutenu durant ces années sans forcément toujours comprendre le but de cette entreprise.

Un clin d'œil pour finir à mes amis : Nicolas et Christina, Marc et Caroline, Nicolas et Pauline, Agnès et Bertrand, Sarah et Jérémie, Antoine et Romain ainsi qu'à mon ami russe.

Table des matières

Introduction au sujet

1	La lutte contre les bactéries : un défi pour l'avenir	10
1.1	Un exemple de contamination bactérienne : les maladies nosocomiales	10
1.2	D'autres exemples de contamination bactérienne	11
1.3	Recherche de solutions	12
2	Une plateforme : le Calixarène	14
2.1	Généralités	14
2.2	Calixarènes complexant d'ions métalliques	17
2.3	Calixarènes bioactifs	19
2.4	Utilisation de calixarènes bioactifs en solution	23
3	La résine de Merrifield	29
3.1	Introduction	29
3.2	Utilisation de la résine de Merrifield pour la synthèse supportée	29
3.3	Autres utilisations de la résine de Merrifield	32
4	Résine de Wang et résine de Wang benzaldéhyde	34
5	Polymères incorporant des pyridines.....	36
6	Supports solides incorporant des calixarènes	40
7	Polymères aux propriétés antibactériennes.....	43
7.1	Les polymères possédant des propriétés antibactériennes	44

Résultats et discussion

Partie I Synthèses et caractérisations

8	Stratégies de synthèse	54
8.1	Introduction	54
8.2	Synthèse de l'espaceur	58
9	Développement d'un point d'ancrage pyridinium sur la résine de Merrifield ..	64
9.1	Introduction	64
9.2	Calcul du taux de greffage par la variation de masse	65
9.3	Calcul du taux de greffage par l'analyse élémentaire	67
9.4	Calcul théorique de la composition chimique des résines pyridinium	68

9.5	Conclusion sur le taux de greffage des résines pyridinium	76
9.6	Caractérisation de la résine pyridinium par spectroscopie infrarouge	76
9.7	Microscopie électronique à balayage	78
9.8	Synthèse d'analogues de la résine pyridinium	80
9.9	Synthèse et caractérisations d'un analogue fluorescent de la résine pyridinium	84
9.10	Synthèse d'un calixarène fluorescent	89
9.11	Conclusion	90
10	Tentatives de greffage de calixarènes sur la résine de Merrifield	92
10.1	Introduction	92
10.2	Synthèse Bottom-Up	92
10.3	Synthèse Top-Down	103
10.4	Synthèse Top-Down sur la résine de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde	106
10.5	Conclusion sur les tentatives de greffage de calixarènes sur la résine de Merrifield	114
11	Tentatives de greffage de calixarènes sur la résine de Wang benzaldéhyde	116
11.1	Introduction	116
11.2	Stratégie de synthèse Bottom-Up	116
11.3	Stratégie de synthèse Top-down	124
11.4	Conclusion sur les taux de greffage sur résines de Wang benzaldéhyde	130
12	Synthèse et évaluation biologique de calixarènes bioactifs	132
12.1	Synthèse	132
12.2	Évaluation biologique	138
12.3	Conclusion	142

Partie II Capture / Séquestration

13	Etude d'échange d'anions	145
13.1	Introduction	145
13.2	Etude d'échange d'ions sur la résine pyridinium 67b par spectroscopie UV	147
13.3	Chromatographie Liquide Haute Performances	152
13.4	Conclusion	161
14	Electrophorèse capillaire.....	163
14.1	Quantification de bactéries par une méthode électrophorétique	163
14.2	Matériel et méthode	172
14.3	Validation de la quantification de bactéries par la méthode électrophorétique	174
14.4	Détermination des capacités de capture de bactéries des résines greffées	177
14.5	Conclusion	200
15	Validation de la fixation de bactéries par microscopie confocale	202

15.1	Principe de fonctionnement ¹⁵⁴	202
15.2	Application à notre étude	203
16	Conclusion générale	209

Analyses et protocoles de synthèse des molécules

17	Synthons de base	216
18	Dérivés monomériques et pyréniques	225
19	Voie de synthèse des calixarènes monosubstitués	232
20	Voie de synthèse des Bis-calixarènes	249
21	Calixarènes greffés en mode bottom-up sur résine de Merrifield	255
22	Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Merrifield	255
23	Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Merrifield-Pyridinium carboxaldéhyde	256
24	Dérivés pyridinium non calixaréniques sur résine de Merrifield	263
25	Calixarènes greffés en mode bottom-up sur résine de Wang benzaldéhyde	270
26	Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Wang benzaldéhyde	271
27	Monomères greffés sur résine de Wang benzaldéhyde	271

Bibliographie

Liste des abréviations

CC₅₀ : Concentration Cytotoxique 50

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

CHCl₃ : Chloroforme

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Cx1 : Tétra-*p*-(diBocguanidinoéthyl)calix[4]arène

CZE : Electrophorèse Capillaire de Zone

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EM : Electrolyte Meneur

ET : Electrolyte Terminal

Et₂O : Ether diéthylique

EtOH : Ethanol

IN : Infection Nosocomiale

IS : Indice de Sélectivité

MEB : Microscope électronique à balayage

MeOH : Méthanol

SOCl₂ : Chlorure de thionyle

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

Introduction au sujet

1 La lutte contre les bactéries : un défi pour l'avenir

1.1 Un exemple de contamination bactérienne : les maladies nosocomiales

À l'échelle internationale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)¹ estime qu'en 2008, 1,4 million de personnes souffraient à tout moment d'une infection contractée à l'hôpital (infection nosocomiale ou IN). Selon l'INSERM², en France, la probabilité actuelle de contracter une infection nosocomiale est d'une chance sur vingt. Les infections nosocomiales représentent donc un problème de santé publique à l'échelle planétaire. Les raisons sont principalement l'augmentation des populations, le surpeuplement ainsi que les déficits immunitaires (âge, maladies, traitements entraînant des immunodéficiences). L'apparition de nouveaux micro-organismes et l'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques sont également des facteurs aggravants du phénomène.

Parmi ces micro-organismes, en France ce sont les bactéries *Escherichia coli* (24.7 %), *Staphylococcus aureus* (18.9%) et *Pseudomonas aeruginosa* (10 %) qui sont responsables de la plus grande partie des IN³. Les antibiotiques, moyens de lutte contre ces bactéries pathogènes, se révèlent de moins en moins efficaces car les bactéries développent des mécanismes de défense de plus en plus complexes. Alexander Fleming, ayant découvert le premier antibiotique (la pénicilline) en 1928, avait déjà prédit en 1946 l'apparition de cette résistance⁴. Ce phénomène se caractérise alors par une résistance partielle ou totale aux antibiotiques (usage interne) et/ou antiseptiques (usage externe).

On peut citer par exemple les SARM (*Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline) qui, comme le décrivent Petrelli *et al.*⁵, représentent un problème clinique et épidémiologique grave. En effet, cette bactérie est entre autre résistante à toute la famille d'antibiotique des β -lactames. Cette bactérie est également un parfait exemple de maladie nosocomiale puisqu'elle est capable de se développer sous forme de biofilms dans les cathéters (type voie veineuse centrale par exemple) et ainsi d'infecter directement le patient.

Sans mettre de côté l'aspect humain, qui reste le plus important, un aspect économique est également à mettre en avant. Wenzel⁶ calcule, en 1995 aux Etats-Unis, le coût théorique des maladies nosocomiales d'un hôpital d'une taille de 250 lits sur 1 an. Sur une base de 5%

d'infections nosocomiales, ce coût est estimé dans cet hôpital entre 840 000 et 2,52 millions de dollars par an. Si l'on ajoute qu'aux Etats-Unis il y a environ 3 lits pour 1000 habitants⁷ et que la population des Etats-Unis est d'environ 316 millions de personnes, le coût est alors compris entre 3 et 10 milliards de dollars par an. Il met également en avant qu'un programme de prévention, en tenant compte de son coût, permettrait à la fois d'économiser beaucoup plus d'argent qu'il n'en coûterait et de sauver des vies.

1.2 D'autres exemples de contamination bactérienne

Les maladies nosocomiales ne sont pas l'unique préoccupation dans la lutte contre les bactéries. En effet, la contamination des sources d'eau potable par des bactéries pathogènes rend ces eaux dangereuses à la consommation et peuvent entraîner la propagation de maladies pouvant conduire à des épidémies. Par exemple, le choléra est une maladie causée par la bactérie *Vibrio cholerae* qui se développe lorsque les eaux sont souillées par des matières fécales. Cette maladie contamine de 3 à 5 millions de personnes par an et tue entre 100 000 et 120 000 personnes⁸.

Un autre exemple, la tuberculose, est une maladie grave et contagieuse causée par *Mycobacterium tuberculosis*. Cette mycobactérie aéroportée a conduit à la contamination estimée de 8,8 millions de personnes en 2010⁹ dont 1,4 millions sont mortes. Cette maladie, évitable et soignable, est la cause du plus grand nombre de morts par un agent pathogène à travers le monde.

Si l'on s'intéresse à la propagation des maladies, il faut alors également parler des moyens de transports qui sont des vecteurs privilégiés de la propagation de bactéries. L'avion, comme le décrivent Mc Manus et Kelley¹⁰, est un moyen de transport de personnes et de bactéries potentiellement pathogènes tels que des *Staphylococcus* ou des *Streptococcus*. Les souches trouvées par exemple sur le sol, les poignées de porte, les éviers ou les cuvettes des toilettes ne sont pas des souches résistantes aux antibiotiques, cependant, ces chercheurs concluent quant au potentiel important d'un avion à propager des bactéries à travers le monde.

Dans le domaine médical, des contaminations oculaires dues à l'utilisation de collyres de manière répétée (dans le cadre de traitements chroniques de glaucomes ou de sécheresses oculaires par exemple) peuvent également entraîner de graves problèmes de contamination de l'œil comme le décrivent Golberg *et al.*¹¹.

1.3 Recherche de solutions

Face aux dangers de contaminations, d'épidémies ainsi qu'à l'émergence de nouvelles bactéries résistantes, il est primordial de développer de nouvelles molécules aux propriétés antibactériennes (nouvelles classes d'antibiotiques ou d'antiseptiques). Si rien n'est fait, le risque de se trouver dans une impasse thérapeutique existe.

C'est dans cette optique que l'équipe MoBAT développe de nouveaux composés thérapeutiques. En utilisant le savoir-faire de la chimie supramoléculaire, il a été développé au laboratoire depuis 1998 (publications¹² à partir de 2006) une approche thérapeutique antibactérienne faisant appel à l'utilisation de macrocycles synthétiques fonctionnalisables : les calixarènes.

C'est dans le prolongement de ces recherches que ces travaux s'inscrivent, en testant de nouvelles molécules antibactériennes en solution, afin de donner des structures de molécules originales permettant d'aboutir à de nouvelles classes de médicaments. Cette approche est une approche traitant le problème en aval (lutte contre les bactéries à l'aide d'antibiotiques après la contamination).

Une autre approche sera développée en travaillant en amont de la contamination, c'est à dire en tentant d'éviter le développement de bactéries pathogènes sur différentes surfaces. Pour cela, il va être tenté de transférer l'activité en solution des composés issus des synthèses du laboratoire, sur de nouveaux supports solides. L'enjeu consiste donc à trouver et à développer des supports sur lesquels le développement bactérien soit limité voire enrayé.

Ces nouveaux supports antibactériens permettraient d'obtenir des outils dans la lutte contre les maladies nosocomiales, en créant par exemple des cathéters qui resteraient durablement stériles. Dans l'environnement, la décontamination des eaux pourrait être imaginée par la rétention des bactéries qu'elles contiennent à l'aide de ces nouveaux matériaux. Dans le domaine médical, des solutions devant rester stériles (comme les collyres) pourraient être conservées sur ce type de matériaux ou le développement de polymères dentaires biocides permettraient d'éviter les infections orales (type gingivites par exemple).

Pour concevoir ce type de nouveaux matériaux, des calixarènes antibactériens en solution sont greffés à la surface de polymères. La suite de ce document présentera dans un premier temps ce qu'est un calixarène ainsi que les propriétés antibactériennes qui ont été découvertes lors de sa substitution. Puis, dans un deuxième temps, les polymères utilisés

pour le greffage de ces molécules (résines de Merrifield et de Wang benzaldéhyde) seront présentés, ainsi que les polymères aux propriétés antibactériennes déjà connus de la littérature.

2 Une plateforme : le Calixarène

2.1 Généralités

Un calixarène (ou [1_n] métacyclophane) est un macrocycle (ou oligomère cyclique) issu de la réaction d'un phénol sur un aldéhyde. Parmi les macrocycles connus, on trouve par exemple, les cyclodextrines, les éthers couronnes et leurs dérivés azotés, ou encore l'hème ou la chlorophylle comme exemples de biomolécules.

Les calixarènes possèdent une structure rigide, générant une cavité naturelle permettant une organisation spatiale qui, par diverses fonctionnalisations, dirigées en para du phénol ou sur la fonction phénolique, assurent d'obtenir des propriétés physico-chimiques, chimiques ou biologiques remarquables.

Le nom « calixarène » vient de l'association du préfixe « calix » (dû à la ressemblance morphologique entre le tétramère cyclique et un type de vase grec appelé « calix crater ») et du suffixe « arène » dû à la présence d'unités phénoliques.

Par définition, un calixarène est un macrocycle (oligomère cyclique) constitué de n unités phénoliques ($n = 4$ à 16) *para*-substitués ou non, et reliées entre elles par des ponts méthyléniques. Le nombre n d'unités phénoliques dont il est constitué est représenté entre crochets dans son nom : calix[n]arène. La nomenclature IUPAC officielle du *p*-*tert*-butylcalix[4]arène est 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). Du fait de sa complexité, cette nomenclature n'est que très rarement utilisée.

Selon Gutsche¹³ et Wang¹⁴, sa découverte remonte aux premières synthèses réalisées par l'australien Zinke¹⁵ entre 1939 et 1956, qui décrit pour la première fois la réaction mettant en présence des *para*-alkyl phénols avec du formaldéhyde en milieu basique. Cette expérience conduit selon Zinke à la formation de « cyclischen mehrkernmethylenephenolverbindungen »¹⁶, cependant la difficulté de purification et de caractérisation des différents dérivés lors de sa synthèse ne permit pas d'exploiter ces molécules avant le début des années 1980. Son nom lui a été attribué par David Gutsche en 1978^{17,18}.

C'est la mise au point de synthèses efficaces de *p*-*tert*-butylcalix[4]arènes, *p*-*tert*-butylcalix[6]arènes et *p*-*tert*-butylcalix[8]arènes¹⁹ (Fig. 1) qui ouvrirent la voie à la synthèse de nouveaux dérivés de ces composés.

*Fig. 1 : Représentation graphique des *p*-tert-butylcalix[4]arènes, *p*-tert-butylcalix[6]arènes et *p*-tert-butylcalix[8]arènes.*

Au niveau de la synthèse, ces 3 composés sont obtenus en une étape par Gutsche²⁰ avec des rendements d'environ 60% (Fig. 2). Cette synthèse s'opère en mettant en réaction le *p*-tert-butyl-phénol avec du formaldéhyde à 37% en milieu basique. Selon la nature, la quantité de base, la température et le solvant, la taille du calixarène obtenu peut-être partiellement contrôlée (calix[*n*]arènes avec *n* = 4, 6 ou 8).

*Fig. 2 : Synthèse en une seule étape des *p*-tert-butyl-calixarènes.*

La synthèse des calixarènes d'autres tailles et différemment substitués ne peut s'obtenir que par une synthèse multi-étape. En 1987, Böehmer²¹ montre la possibilité de synthétiser des calix[4]arènes *para*-substitués avec 4 substituants différents en utilisant une synthèse convergente en 7 étapes. L'année suivante, Böehmer²² montrera la synthèse de calixarènes ayant deux positions *para*-connectées en position alternée par une chaîne aliphatique (Fig. 3).

*Fig. 3 : Calixarènes *para*-connectées par une chaîne aliphatique.*

Il est nécessaire de souligner que plusieurs conformations des calixarènes existent. Dans le cas du calix[4]arène, quatre conformations limites différentes peuvent être adoptées. Cet

effet est dû à la libre rotation autour des liaisons σ des ponts méthyléniques reliant les cycles phénoliques (Fig. 4).

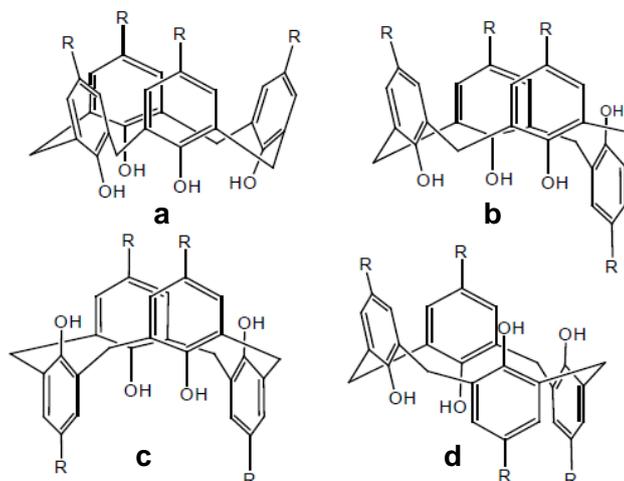


Fig. 4 : Conformations limites du calix[4]arène : a) cône b) cône partiel c) 1,3-alterné et d) 1,2-alterné.

La conformation thermodynamiquement la plus stable est la conformation cône (a) grâce à la formation d'une couronne d'interactions hydrogènes entre les phénols.

Les calixarènes forment une plateforme modifiable « à volonté » sur laquelle des chimies variées peuvent être imaginées. Ils sont facilement fonctionnalisables sur leurs parties hautes (Upper Rim) ou sur leur partie basse (Lower Rim) (Fig. 5).

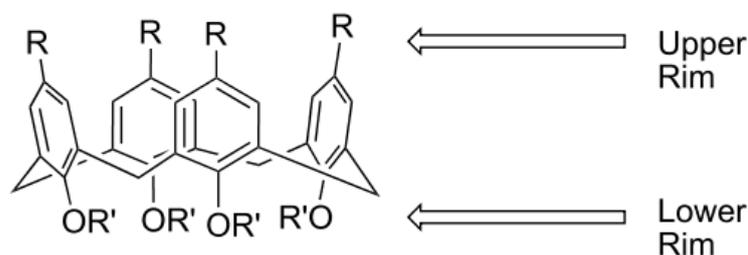


Fig. 5 : Calix[4]arène substitué sur la partie haute (Upper Rim) et/ou sur la partie basse (Lower Rim).

Les applications potentielles sont très nombreuses, en voici quelques exemples non exhaustifs :

- **Capture / échange d'ions métalliques**
- **Thérapeutiques : antibactériens, antiviraux, transport de principes actifs, biomimétiques d'enzymes ...**
- Chimiosenseurs : nez et langue électronique
- Catalyse: transfert de phase, formation de molécules chirales
- Traitement de déchets radioactifs : récupération du césium, américium
- Nanotechnologies : films de Langmuir-Blodgett
- Optoélectronique: matériels optiques non linéaire
- Stockage de gaz : H₂, CH₄, CO_x, NO_x
- Reconnaissance moléculaire
- Sonde fluorescente
- Phase stationnaire en chromatographie : séparation de molécules chirales
- ...

La suite de ce chapitre décrit quelques exemples d'utilisation de ces calixarènes en rapport avec la chimie développée depuis plusieurs années au laboratoire.

2.2 Calixarènes complexant d'ions métalliques

D'un point de vue économique et environnemental, l'extraction d'ions métalliques est un enjeu majeur. Le défi est de trouver des complexants qui peuvent extraire et relarguer sélectivement les métaux des mélanges dans lesquels ils peuvent se trouver sous formes neutres (oxydes), d'anions ou de cations.

Des centaines de travaux démontrent les propriétés de complexations spécifiques d'ions métalliques de calixarènes substitués. La structure du calixarène offre une plateforme d'une taille idéale permettant la substitution de ligands complexants de nombreux ions métalliques.

Par exemple, Georgiev *et al.*²³ décrivent l'extraction (en milieu acide) et le relargage (en milieu basique) du Cr(VI), anion hautement toxique et présent dans les sols et dans l'eau, en utilisant le *tetra-tert*-butyl-bis(2-aminoéthoxy)-dihydroxycalix[4]arène (Fig. 6).

Fig. 6 : Extraction et relargage du Cr(VI) par Georgiev et al.²³.

On peut également citer la synthèse du premier cryptant calixarèniq ue par Beer *et al.*²⁴ en 1992 (Fig. 7). Ce calixarène possède des propriétés de coordination des métaux de transition tels que Cu(I), Cu(II) et Ag (I).

Fig. 7 : Premier calixarène cryptant par Beer et al.²⁴ complexant du Cu(II).

L'équipe MoBAT (anciennement GEVSM) a également contribué aux travaux de complexations d'ions métalliques. Nous pouvons citer les travaux de Regnouf de Vains *et coll.*²⁵ (complexation sélective de Ag⁺ en compétition avec Pb²⁺) ou plus récemment²⁶ (complexation d'ions Cu(I)) utilisant des calixarènes bipyridinés (Fig. 8).

Fig. 8 : Synthèse de calixarènes bipyridinés complexants de Cu(I)²⁶.

Le laboratoire a également développé des dérivés calixarèniq ues possédant d'autres propriétés, antibactériennes ou antivirales, comme nous allons le voir par la suite.

2.3 Calixarènes bioactifs

2.3.1 Rappels de biologie²⁷

Les bactéries (du grec *bacterion* qui signifie bâtonnet) sont des organismes vivants prokaryotes qui ont pour particularité fondamentale l'absence de noyau cellulaire. Les bactéries possèdent à la fois une membrane cellulaire et une paroi extracellulaire. Cette dernière les protège des dommages venus de l'extérieur. Sans cela, les bactéries ne résisteraient pas à la pression osmotique considérable qui s'exerce sur elles.

La forme des bactéries est la première approche de classification possible. Cette forme peut être de trois types : cocci (forme de arrondie), bacilles (forme de bâtonnets allongés) ou d'une autre forme (par exemple spiralées) qui comprend toutes les formes qui n'entrent pas dans les deux premières catégories.

La seconde approche de classification est réalisée par la coloration de Gram. Celle-ci consiste à déterminer si la bactérie est capable de fixer ou non un colorant bleu-violet (bactéries à Gram-positives) ou rouge (bactéries à Gram-négatives). Cette différence est due à une différence de structure et de composition chimique de la paroi bactérienne (Fig. 9).

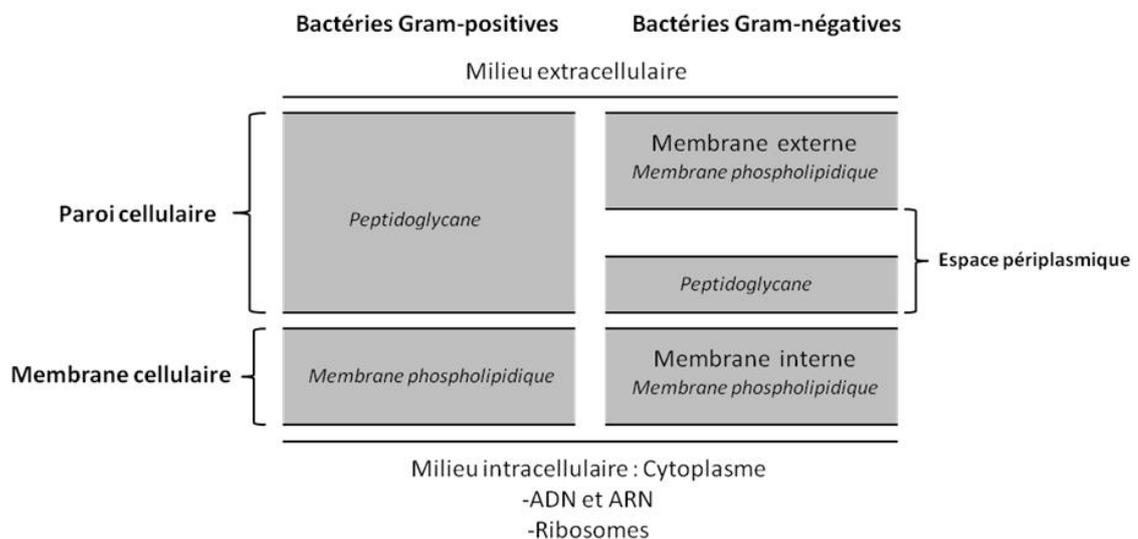


Fig. 9 : Représentations des membranes et parois d'une bactérie à Gram-positif et d'une bactérie à Gram-négatif.

Les bactéries à Gram positif possèdent simplement une paroi qui entoure la membrane cellulaire alors que les bactéries à Gram négatif possèdent deux membranes cellulaires séparées par une paroi relativement fine. L'espace entre les deux membranes est appelé

espace périplasmique. Quelques exemples sont présentés ci-dessous de bactéries à Gram positifs et négatifs (Tableau 1).

Gram positif	Gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Streptococcus pneumonia</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>

Tableau 1 : Exemples de bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs.

Les bactéries deviennent visibles à l'œil nu en formant des colonies sur des milieux solides appropriés (boîtes gélosées). Le comptage de ces colonies devient alors possible et l'on peut parler d'unités formant des colonies (UFC).

2.3.2 Principaux mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques combattent les infections bactériennes de la manière la plus sélective possible, c'est à dire en visant les bactéries et non les cellules saines de l'organisme. Le but d'un antibiotique va être de lutter contre la division cellulaire des bactéries. Ci-dessous sont présentés les deux mécanismes d'action mis en œuvre avec des exemples non exhaustifs de familles d'antibiotiques :

- **Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne**

Ils regroupent deux grandes familles d'antibiotiques, à savoir les pénicillines et les céphalosporines qui sont elles-mêmes regroupées sous l'appellation de β -lactames (Fig. 10). Ces deux familles de composés représentent 50% des ventes d'antibiotiques dans le monde.

Fig. 10 : β -lactames : structure chimique d'une pénicilline (à gauche) et d'une céphalosporine (à droite).

Ces deux familles d'antibiotiques ont des mécanismes d'action bactériostatique par blocage de la biosynthèse de la paroi bactérienne, au niveau du peptidoglycane. Ce sont des

inhibiteurs des carboxypeptidases intervenant dans l'épate de réticulation du peptidoglycane. Ces carboxypeptidases sont également appelées PFP : Protéines Fixant les Pénicillines.

- **Inhibition de la machinerie génétique bactérienne**

Ces antibiotiques empêchent la réplication des bactéries par quatre mécanismes différents :

1. Inhibition de la biosynthèse de l'acide folique : les sulfamides par exemple empêchent la bactérie de fabriquer l'acide folique et ses dérivés. Les bactéries ne meurent pas, mais leur division cellulaire est stoppée. Cet effet est appelé un effet bactériostatique.
2. Inhibition de la transcription de l'ADN en ARN messager : la rifampicine joue ce rôle. Cet antibiotique a d'ailleurs vu son utilisation réservée au traitement de la tuberculose et de la lèpre, malgré un spectre d'action plus large, afin d'éviter l'émergence de résistances bactériennes.
3. Inhibition de la traduction (cible le ribosome bactérien) : cette classe d'antibiotiques comprend par exemple les tétracyclines ou les aminoglycosides (Streptomycine, Gentamycine).
4. Inhibition de réplication de l'ADN : ce sont les inhibiteurs de l'ADN gyrase qui entraînent un effet bactéricide. Cette famille de molécules est constituée de quinolones (ou fluoroquinolones) dont la structure est la suivante (Fig. 11).

Fig. 11 : Structure chimique d'une quinolone.

2.3.3 Evaluation de l'activité d'un antibactérien²⁸

Pour qu'un antibactérien soit efficace, il faut qu'il possède une toxicité sélective, c'est à dire la capacité de tuer ou d'inhiber le germe pathogène tout en ne développant pas de toxicité pour l'hôte. Cet agent (bactéricide ou bactériostatique) a une activité face à une espèce bactérienne donnée qui dépend de sa concentration dans le milieu. Il peut d'ailleurs être bactéricide à une concentration et bactériostatique à une plus faible concentration.

Une idée de l'efficacité d'un antibiotique contre une bactérie peut être obtenue par la concentration minimale inhibitrice (CMI). Celle-ci correspond par définition à la concentration la plus faible à partir de laquelle l'antibiotique est capable d'empêcher le développement d'un micro-organisme particulier. Les concentrations minimales inhibitrices sont importantes dans les laboratoires de diagnostic pour confirmer la résistance de microorganismes à un antibiotique mais aussi pour mesurer l'activité de nouveaux antibactériens.

Par analogie, une valeur de la concentration minimale bactéricide (CMB) est une valeur de la concentration à partir de laquelle l'antibiotique est capable de tuer les bactéries.

Les CMI et CMB (exprimées en $\mu\text{g/ml}$) peuvent être déterminées par deux méthodes principales :

- **Méthode de dilution**

Une série de tubes de bouillon (type Mueller-Hinton) est préparée contenant des concentrations d'antibiotiques différentes. Ces tubes sont inoculés avec une population standard de la bactérie à tester. La concentration la plus faible de l'antibiotique inhibant la croissance après 16 à 20 heures d'incubation est la CMI. La CMB est déterminée en transférant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance dans un milieu frais dépourvu d'antibiotique. La CMB est déterminée par la concentration d'antibiotique la plus basse à partir de laquelle les bactéries ne se développent pas dans le nouveau milieu.

- **Méthode de diffusion (méthode des disques)**

Le principe consiste à imprégner un disque d'antibiotique et de le placer sur une gélose préalablement inoculée avec la bactérie à tester. Le disque s'humidifie et diffuse de manière radiale l'antibiotique dans la gélose en formant un gradient de concentration. Après incubation, une zone circulaire entourant le disque apparaît si l'antibiotique inhibe la croissance bactérienne. Le diamètre de la zone obtenue (mesuré en mm) est fonction de la concentration initiale en antibiotique, de sa solubilité et de sa vitesse de diffusion à travers la gélose, ce qui empêche de comparer par cette technique l'efficacité de deux antibiotiques

différents. Cependant la CMI peut être estimée par une corrélation linéaire entre le logarithme de la concentration d'un antibiotique donné et son diamètre de zone d'inhibition.

2.3.4 Evaluation de la cytotoxicité d'une molécule

Afin d'évaluer si un antibiotique est cytotoxique, deux grandeurs sont mesurées : la concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) qui correspond à la concentration à laquelle la croissance des cellules est réduite de 50% et la concentration cytotoxique 50 (CC_{50}) qui correspond à la concentration à laquelle survivent 50% des cellules.

2.3.5 Indice de sélectivité

Le rapport de la concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) sur la concentration minimum inhibitrice (CMI) permet d'obtenir une grandeur appelée indice de sélectivité (IS). L'indice de sélectivité permet de quantifier l'efficacité d'une molécule en comparant son action sur les cellules saines et sur les bactéries. Plus l'indice de sélectivité sera grand, plus la molécule considérée sera sélective des bactéries considérées.

2.4 Utilisation de calixarènes bioactifs en solution

L'utilisation de dérivés de calixarènes pour l'obtention d'activités thérapeutiques n'est pas très fréquente. La première occurrence apparaît en 1955 avec les travaux de Cornforth *et al.*²⁹ sur le « Macrocyclon » (Fig. 12), un calix[8]arène dont l'activité antibactérienne a été testée sur la tuberculose et d'autres micobactéries.

Fig. 12 : Premier calixarène antibactérien, le Macrocyclon décrit par Cornforth et al.²⁹ en 1955.

En 1996, Ungaro *et coll.*³⁰ publient la synthèse d'un calix[4]arène substitué sur sa partie haute par une chaîne pontante mimant l'activité de la vancomycine. La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides. C'est une molécule inhibitrice de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Le modèle utilisé pour prouver cette interaction est l'utilisation du peptide *N*-acétyl-D-alanyl-D-alanine mimant la paroi bactérienne comme décrit dans les travaux de Williams *et al.*^{31,32} (Fig. 13).

Fig. 13 : Interactions entre le peptide N-acétyl-D-alanyl-D-alanine et la vancomycine par Williams et al^{31,32}.

La synthèse d'Ungaro lui permet d'obtenir en peu d'étapes, un calixarène ponté, respectant à la fois la poche nécessaire (rôle joué par le calixarène) et les liaisons hydrogènes (NH amine et amides de la chaîne pontante) (Fig. 14).

Fig. 14 : Calixarène macro bicyclo-peptidique complexant la N-acétyl-D-alanyl-D-alanine.

Ce calixarène a été testé en microbiologie et possède des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) comparables à celles de la vancomycine (Tableau 2).

Bactéries		CMI (mg/L)	
		Vancomycine	Peptido-calixarène
Gram positif	<i>S. aureus</i> 663	2	8
	<i>S. aureus</i> 853	2	16
	<i>S. aureus</i> 1131	2	4
	<i>S. epidermidis</i>	2	4
	<i>B. cereus</i>	2	16
Gram négatif	<i>S. cerevisiae</i>	>128	>128
	<i>C. albicans</i>	>128	>128
	<i>A. laidlawii</i>	>128	>128

Tableau 2 : Comparaison des CMI du peptido-calixarène avec la vancomycine.

Assez récemment en 2008, Ungaro *et coll.*³³ se sont intéressés au processus de transfection en développant des dérivés de calixarènes spécifiques. La transfection est un processus de transfert de gènes qui permet l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes, sans utiliser de virus. Ses travaux ont aboutis à la synthèse de calix[4]arènes substitués sur la partie basse par quatre groupements guanidiniums (Fig. 15).

Fig. 15 : Dérivés tétra-guanidiniums calix[4]arènes par Ungaro *et coll.*³³

Ces calixarènes, associés à un lipide DOPE (dioleoylphosphatidyléthanolamine) en proportion molaire 1:2, permettent de faire de la transfection d'un ADN de plasmide pEGFP-C1. Dans les cas où R = tBu et Hex, la transfection est peu efficace (4 et 7%), par contre quand R = H, la transfection devient très efficace (48%) tout en conservant une faible cytotoxicité. Pour comparaison, la Lipofectamine®, produit commercial, n'autorise une transfection que de 30%.

Comme nous l'avons vu dans ces exemples, le calixarène est une molécule qui permet d'obtenir une fonctionnalisation contrainte et hautement organisée, permettant à la fois une

meilleur hydrosolubilité de la molécule, des interactions avec les parois cellulaires et le plus souvent une faible cytotoxicité.

C'est en partant de ces hypothèses que le laboratoire MoBAT (anciennement GEVSM) a développé depuis 2003 avec N. Psychogios dans le cadre de sa thèse³⁴, M. Mourer et Regnouf-de-Vains, des calixarènes polyanioniques et polycationiques possédant des propriétés antibactériennes en solution^{12,35-38}. La Fig. **16** présente un panel des différentes molécules sulfonées, carboxylées et phosphonées synthétisées dans le but de trouver des activités antivirales.

Fig. 16 : Panel des calixarènes carboxylés, sulfonés et phosphonés synthétisés dans le but de trouver de nouveaux composés antiviraux³⁸.

Parmi ces travaux, Mourer et Regnouf-de-Vains³⁹ ont mis au point en 2006 une autre série de composés de type *para*-guanidinoéthylcalix[4]arènes (Fig. 17) avec une activité antibactérienne importante³⁵ vis-à-vis d'*E. coli* et de *S. aureus*.

Fig. 17 : para-guanidinoéthylcalix[4]arènes ou Cx1 possédant une activité antibactérienne importante par Regnouf-de-Vains et coll.³⁸.

2.4.1 Interactions supposées des calixarènes antibactériens sur la paroi cellulaire

Depuis la découverte des propriétés antibactériennes du **Cx1**, les chercheurs du laboratoire se sont posé beaucoup de questions quant à son mécanisme d'action sur les bactéries.

Il a tout d'abord été supposé que le calixarène, avec sa tête polycationique, présente des interactions électrostatiques avec la membrane bactérienne, globalement chargée négativement. Cet argument est appuyé par les travaux de Yin *et al.*⁴⁰ qui présentent la synthèse de peptides polycationiques capables de former des trous dans un modèle de bicouche lipidique de membrane bactérienne visibles par microscopie à force atomique. Cette étude a été reproduite en observant l'action du **Cx1** sur un modèle de paroi bactérienne dans les travaux de Formosa *et al.*⁴¹. L'effet observé est clairement identique et le schéma d'interaction suivant peut donc être postulé (Fig. 18).

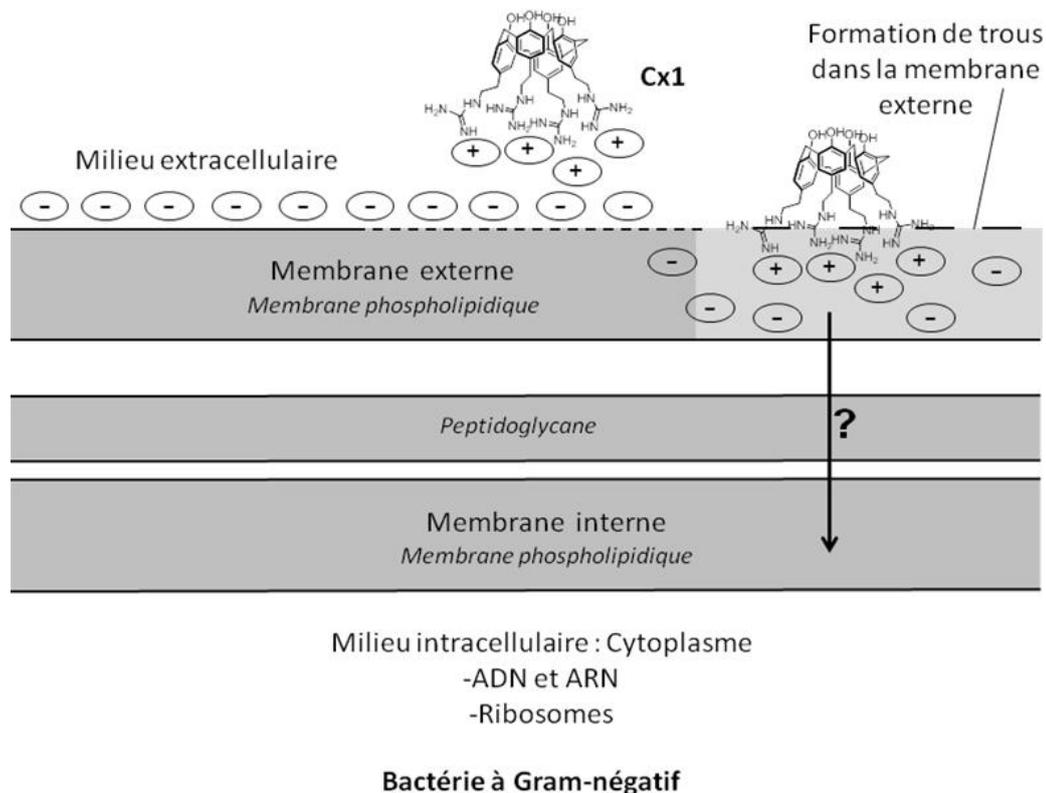


Fig. 18 : Schéma de l'action supposée du **Cx1** sur la paroi bactérienne.

La question n'ayant pas encore été élucidée jusqu'à présent est la capacité du **Cx1** à pénétrer dans le milieu intracellulaire de la bactérie, voir à interagir avec certaines cibles intracellulaires. Cependant, les travaux de Sautrey et al.⁴² utilisant des modèles de parois bactériennes (bicouches phospholipidiques anioniques) en présence de **Cx1** dans l'eau ont permis, par la mesure des isothermes de compression, de prouver avec certitude l'inclusion du **Cx1** à l'intérieur de la membrane modèle.

Le but est désormais de transférer l'activité des calixarènes antibactériens en solution sur de nouveaux matériaux afin de transmettre les propriétés antibactériennes au support. Pour parvenir à cet objectif, des polymères synthétiques ont été employés et la suite de ce manuscrit en décrit l'utilisation.

Les polymères synthétiques

3 La résine de Merrifield

3.1 Introduction

La résine de Merrifield est une résine polystyrène (PS) composée d'un copolymère de styrène et de chlorométhylstyrène (Fig. 19). Elle peut être réticulée en utilisant du divinylbenzène (DVB). La réticulation permet d'abaisser la solubilité et d'augmenter le durcissement de la résine. Le réseau tridimensionnel du polymère étant plus resserré, le gonflement du polymère est également moins important dans les polymères plus réticulés.

Cette résine a été synthétisée et publiée pour la première fois par le chimiste américain Robert Bruce Merrifield en 1963⁴³. Il gagnera le prix Nobel de chimie en 1984 pour cette découverte et ses applications en synthèse peptidique en phase solide.

Il est intéressant de souligner que la synthèse de la résine de Merrifield s'opère non pas en une mais en deux étapes : la formation du polystyrène, puis sa chlorométhylation avec SnCl_4 dans un mélange chloroforme/chlorométhyle méthyle éther.

Fig. 19 : Composition de la résine de Merrifield⁴³ avec x motifs DVB, y motifs styrènes et z motifs chlorométhylstyrènes.

3.2 Utilisation de la résine de Merrifield pour la synthèse supportée

La résine de Merrifield a trouvé immédiatement son intérêt dans la synthèse peptidique. B. Gutte et R. B. Merrifield⁴⁴ décrivent en 1971 la synthèse de la ribonucléase A, protéine naturelle composée de 124 acides aminés.

Pour cela, ils utilisent les principes de la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS en anglais) qui consistent en une répétition d'étapes de couplages et de déprotections des acides aminés jusqu'à obtention du peptide désiré, qui est ensuite séparé du support par clivage chimique, purifié et analysé (Fig. 20).

Fig. 20 : Principe de la synthèse peptidique en phase solide⁴⁵.

Comme le décrivent F. Albericio et F. G. Martin⁴⁵, un premier avantage de la synthèse peptidique en phase solide est que le composé intermédiaire d'intérêt est ancré sur la phase solide, ce qui supprime les étapes de purification. Un simple lavage suffit pour éliminer les réactifs restés en solution.

Le second avantage de l'ancrage de molécules sur un support solide est que la synthèse sur support solide permet l'utilisation d'un excès de réactifs. La molécule d'intérêt reste sur le support solide jusqu'à la fin de la synthèse et à nouveau l'excès peut être éliminé par un simple lavage. La protection de l'acide aminé à incorporer est indispensable pour éviter qu'il ne réagisse sur lui-même.

Il est très souvent ajouté, lors de l'ajout en excès de l'acide aminé N-protégé, un agent de couplage, permettant d'améliorer l'électrophilie du groupe carboxylate de l'acide aminé

déprotoné à ajouter. En effet, l'atome d'oxygène chargé négativement doit d'abord être activé en un meilleur groupe partant.

L'agent de couplage le plus utilisé est le Dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Dans ce cas, l'atome d'oxygène nucléophile, attaque facilement l'atome de carbone central du DCC qui est donc temporairement attaché au groupe carboxylate et forme un intermédiaire hautement électrophile. Cela rend l'attaque nucléophile par le groupe amino terminal du peptide en construction bien plus efficace (Fig. 21).

Fig. 21 : Synthèse peptidique utilisant le DCC comme agent de couplage

Le sous-produit après réaction de la DCC est la dicyclohexyle urée (DCU) qui peut être facilement retirée par filtration car non-soluble dans beaucoup de solvants.

Il existe de nos jours des centaines d'exemples de synthèses peptidiques dans la littérature. Pour ne donner qu'un exemple d'application concrète et récente, l'équipe de Popova⁴⁶ a réalisé la synthèse d'un peptide non naturel, analogue de l'octréotide. L'octréotide (Fig. 22) est la molécule du Sandostatine®, médicament découvert par Bauer *et al.*⁴⁷ en 1982, qui agit par régulation des niveaux d'hormones de croissance dans le plasma et dans les tumeurs possédant des récepteurs à somastostatine (l'hormone naturelle).

Fig. 22 : L'octréotide synthétisée par Bauer et al.⁴⁷.

Ce médicament provoque des effets secondaires importants et c'est dans l'optique d'améliorer sa sélectivité que ces chercheurs russes ont mis au point la synthèse de cet analogue (Fig. 23).

Fig. 23 : Schéma de synthèse d'un analogue de l'octréotide incorporant un groupement tétrazolyle par Popova et al.⁴⁶.

Pour améliorer ce principe actif, ils ont tenté d'ajouter un acide aminé synthétique de type 1,2,3-triazolyle. Ils en décrivent la synthèse, puis son utilisation dans la création du peptide sur support solide. La résine utilisée est une résine de Merrifield modifiée par greffage de groupements chlorure de 2-chlorotriyle à sa surface, lui conférant la capacité de cliver facilement le greffon en milieu acide.

3.3 Autres utilisations de la résine de Merrifield

En dehors de la synthèse peptidique, la résine de Merrifield a connu certaines applications en tant que support de catalyseurs comme par exemple dans les travaux de Yang *et al.*⁴⁸ qui décrivent le greffage de phénantrolines permettant la rétention de Cu(I), catalyseur de la réaction permettant la formation de 2-aminobenzothiazoles (Fig. 24). Les avantages d'un catalyseur supporté sont, à la fois sa recyclabilité (supérieur à 10 fois), sa facilité de récupération (par filtration du milieu réactionnel) et la conservation de l'activité catalytique du métal après plusieurs cycles (bon turnover).

Fig. 24 : Synthèse et utilisation du catalyseur d'iodure de cuivre (I) supporté sur résine de Merrifield par Yang et al.⁴⁸ pour la synthèse de benzothiazoles.

Un autre exemple d'utilisation de la résine de Merrifield est décrit par Pina-Luis *et al.*⁴⁹ qui ont conçu le greffage d'une sonde fluorescente à la surface d'une résine de Merrifield (Fig. 25). Cette résine acquiert également la capacité de capter différents ions métalliques. Le phénomène de capture entraîne une augmentation de fluorescence (pour les ions Li⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺) ou une extinction de la fluorescence (pour les ions Cu²⁺, Fe³⁺ et Zn²⁺). Ce nouveau polymère permet d'obtenir un outil de quantification rapide de la capture de ces métaux.

Fig. 25 : Résine de Merrifield greffée avec une sonde fluorescente sensible aux ions métalliques par Pina-Luis et al.⁴⁹

4 Résine de Wang et résine de Wang benzaldéhyde

Les structures des polymères de Wang et de Wang benzaldéhyde sont les suivantes (Fig. 26) avec x , y et z correspondant aux nombres de motifs copolymérisés du polymère.



Fig. 26 : Structures des résines de Wang (à gauche) et de Wang benzaldéhyde (à droite).

La résine de Wang est une résine qui a été développée afin de pouvoir greffer directement par estérification, des acides aminés lors de la synthèse peptidique. Elle est issue de la réaction de la résine de Merrifield avec l'alcool 4-hydroxybenzylique en présence d'une base permettant d'obtenir un point d'ancrage hydroxyméthyle à la surface du polymère (Fig. 27). La première synthèse de cette résine est décrite par Su-Sun Wang *et al.*⁵⁰ en 1973.

*Fig. 27 : Préparation de la résine de Wang à partir de la résine de Merrifield par Su-Sun Wang *et al.*⁵⁰.*

Sa synthèse a depuis été améliorée par Hao Yang *et al.*⁵¹ en 2001 par l'utilisation des micro-ondes afin d'obtenir un greffage efficace en seulement 7 min (Fig. 28).

Fig. 28 : Préparation de la résine de Wang par Hao Yang et al.⁵¹

L'utilisation des micro-ondes a également permis d'accélérer considérablement la synthèse de la résine de Wang benzaldéhyde. La méthode thermique classique par substitution nucléophile du 4-hydroxybenzaldehyde sur la résine de Merrifield, nécessite 6 jours de synthèse (méthode **a** de la Fig. 29), alors que les micro-ondes permettent d'obtenir le même polymère en 5 min comme le décrit Guinó *et al.*⁵² en 2005 (méthode **b** de la Fig. 29).

*Fig. 29 : Comparaison des synthèses de la résine de Wang benzaldéhyde par une méthode thermique (méthode **a**) et aux micro-ondes (méthode **b**) par Guinó et al.⁵².*

C'est cette résine commerciale (PL-CHO (Benzaldehyde) resin) qui a été utilisée dans la suite de ce manuscrit.

Il est également intéressant de souligner la possibilité de créer un analogue à la résine de Wang benzaldéhyde par oxydation direct au DMSO de la résine de Merrifield réalisée par Ayres *et al.*^{53,54}. Ce type d'oxydation est une oxydation de Kornblum⁵⁵ mais le produit obtenu n'est pas identique puisqu'il n'y a pas introduction de 4-hydroxybenzaldehyde à la surface de la résine (Fig. 30).

Fig. 30 : Oxydation direct de la résine de Merrifield par Ayres et al.^{53,54}

5 Polymères incorporant des pyridines

Les travaux réalisés dans ce manuscrit s'intéressent en partie aux propriétés de la résine de Merrifield greffée par ajout de pyridine entraînant la formation à la surface du polymère de chlorures de pyridinium (Fig. 31).

Fig. 31 : Synthèse de la résine pyridinium 67.

Ce polymère a déjà été synthétisé, en utilisant également la résine de Merrifield, par Lemaire *et al.*⁵⁶ en 2009 ainsi que deux autres résines de type triméthylammonium et imidazolium (Fig. 32).

*Fig. 32 : Synthèse de trois résines cationiques par Lemaire et al.*⁵⁶

Lemaire a précédemment travaillé sur l'utilisation de liquides ioniques afin d'extraire des composés polyaromatiques (naphtalène, anthracène, phénanthrène, ...) ou azotés neutres (pyrroles, indoles, carbazoles) d'un mélange d'hydrocarbures⁵⁷. Il utilise la résine de Merrifield, greffée avec ces composés, comme support pour effectuer l'extraction de composés azotés et soufrés. Cette méthode évite le passage de liquides ioniques dans les extraits pétroliers et la résine peut également être facilement régénérée par un lavage au méthanol.

Cette idée d'incorporation de motifs pyridine ou pyridinium à l'intérieur d'un polymère n'est pas nouvelle. Déjà en 1983, Kawabata⁵⁸ décrit la synthèse d'un polymère solide de type poly(halogénure de vinylpyridinium) dans lequel la pyridine est élément constitutif de la matrice. La capture des bactéries (*E. coli*, *S. typhimurium* et *S. faecalis*) est décrite avec pour objectif direct, la purification d'eau. Les propriétés intéressantes soulignées dans la publication sont la capture non sélective à la fois des bactéries vivantes et mortes et la quantification d'une capacité de capture d'environ 10^{10} cellules par gramme de résine. Les problèmes rencontrés sont la lenteur de la capture des bactéries, la nécessité d'ajuster un débit de la suspension bactérienne très lent et en même temps, la non recyclabilité de la résine (pas de relargage des bactéries après capture).

5 ans plus tard, Kawabata *et al.*⁵⁹ décrivent cette fois-ci la synthèse, la caractérisation et les capacités antibactériennes sur plusieurs souches bactériennes (Gram + et Gram -) de polymères pyridinium **solubles** de type poly(N-benzyl-4-vinylpyridinium) (BVP). Il rencontre cependant assez rapidement des limitations dues aux interactions entre les BVP solubles et les substrats négativement chargés qui sont présents dans les milieux de cultures et qui entraînent la formation de complexes.

Si l'on compare la structure des polymères synthétisés par l'équipe de Kawabata et la structure de la résine pyridinium **67**, on peut remarquer la présence du même groupement benzyle pyridinium (Fig. **33**).

Fig. 33 : Comparaison de la résine pyridinium 67 (à gauche) et de la résine de poly(vinylpyridinium) de Kawabata et al.⁵⁹ (à droite).

Les travaux de 2010 de Burguete *et al.*⁶⁰ présentent, quant à eux, la synthèse d'un photocatalyseur supporté sur la résine de Merrifield, mais ne montrant une bonne efficacité qu'après greffage d'unités pyridinium supplémentaires (Fig. **34**). Les travaux ont prouvé que cette résine est réutilisable au moins 10 fois sans perte d'activité et cette équipe tente désormais d'étendre l'utilisation de cette résine à un plus grand nombre de substrats.

Fig. 34 : Photooxydation de l'acide 2-furoïque en 5-hydroxy-5H-furan-2-one par l'utilisation d'un catalyseur supporté par Burguete et al.⁶⁰

Les coréens Son et Sun⁶¹ ont travaillé sur l'échange d'anion du polymère de Nylon 6-6. Ils sont parvenus, en milieu basique à obtenir la forme carboxylate du polymère et à réaliser l'échange de motifs ammoniums quaternaires. Les motifs utilisés sont entre autre, le chlorure de cétylpyridinium (CPC) et le chlorure de benzyldiméthylhexadécyle ammonium (BDHAC) (Fig. 35).

Fig. 35 : Synthèse de deux polymères ammonium de Nylon 6-6 par Son et Sun⁶¹.

Ces polymères sont ensuite mis en contact avec des cultures d'*E. coli* et les résultats prouvent que les polymères synthétisés, même après dix lavages, permettent encore d'obtenir une réduction de la concentration bactérienne de 95.7% (CPC) et de 65.0% (BDHAC).

Schmidt *et al.*⁶² et Albrecht *et al.*⁶³ nous montrent également des exemples de photocatalyse ou de transfert électronique utilisant cette fois ci des résines greffées avec des 4,4'-bipyridines.

Une autre application de la résine pyridinium se situe dans la dépollution en utilisant les propriétés développées par cette résine lorsqu'elle porte également la L-méthionine (Fig. 36). Sahana *et al.*⁶⁴ prouvent par une étude cinétique les capacités de capture du Cr(VI) et du Cr(III) de sa résine. Il mesure également l'influence de la température et du pH ; la résine est capable de capter 1.3 mmol/g de Cr(III) à pH = 2 et au contraire, elle capte 2.8 mmol/g de Cr(VI), plus polluant, à pH =8.

*Fig. 36 : Résine L-N-(2-pyridyl méthyl)méthionine méthyl ester (PMME) par Sahana et al.*⁶⁴

6 Supports solides incorporant des calixarènes

Le premier exemple d'une synthèse de calixarènes formant un support solide est en réalité un exemple de polymérisation d'unités calixaréniques monosubstitués par des motifs méthacrylates décrit par Harris *et al.*⁶⁵ en 1991 (Fig. 37).

Fig. 37 : Polymérisation d'unités calixaréniques monosubstituées par des motifs méthacrylates par Harris et al.⁶⁵

Ce polymère a permis de mettre en évidence la capacité d'un polymère calixarénique à réaliser la capture d'ions sodiums. Cette stratégie présente le défaut d'engager de grosses quantités de calixarène (composé onéreux) qui sert uniquement de matrice polymérique. En effet, dans ce cas de figure, les calixarènes piégés à l'intérieur de cette matrice ne sont pas susceptibles de réaliser de la capture d'ions dans le milieu.

Ces travaux ont ainsi permis d'ouvrir la voie à la synthèse de calixarènes supportés sur différents types de supports solides. Par exemple, en 2001, Spiro *et al.*⁶⁶ réalisent la synthèse d'un calix[4]arène supporté sur une résine de Merrifield afin de réaliser la complexation d'ions métalliques tels que le Cs(I), le Fe(III), le Pb(II), Cu(II) ou Ni(II).

En 2002, Trivedi *et al.*⁶⁷ greffent un calix[6]arène sur une matrice polymérique de type poly(styrène β -hydroxylamine) (Fig. 38) et réalisent la capture d'ions métalliques tels que le Th (IV), l'U(VI) ou le Ce(IV).

Fig. 38 : Greffage d'un calix[6]arène sur un polymère de type poly(styrène β -hydroxylamine) par Trivedi et al.⁶⁷

La même année, le travail de Engrand, doctorant du laboratoire et Regnouf-de-Vains.⁶⁸, porte sur la fonctionnalisation d'un polymère naturel, le Dextran, qui est substitué par un calix[4]arène bifonctionnel. En effet, ce calixarène porte sur sa partie basse trois groupements bipyridinés (permettant la complexation d'ions métalliques) et un motif cyanuryle (permettant le greffage sur le support) (Fig. 39).

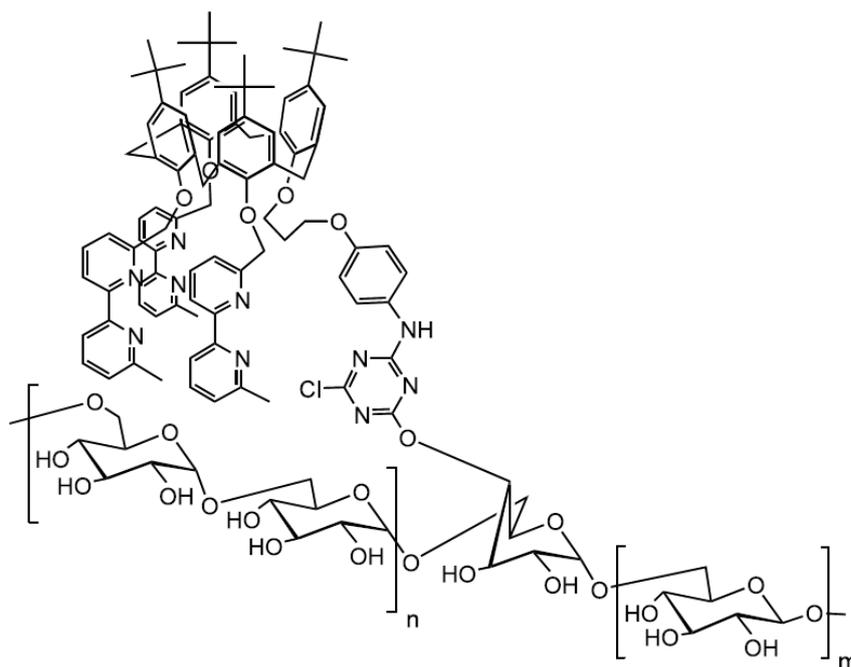


Fig. 39 : Ancre d'un calixarène bifonctionnel sur Dextran par Engrand et al.⁶⁸

Egalement plus récemment, les travaux d'un autre doctorant du laboratoire, De Gaetano et al.⁶⁹ montrent le greffage d'un calixarène bipyridiné sur résine de Wang benzaldéhyde

(Fig. 40), capable d'extraire sélectivement les ions Ag^+ et Zn^{2+} en présence d'ions Pb^{2+} en excès.

Fig. 40 : Résine de Wang benzaldéhyde greffée avec un calixarène bipyridiné par De Gaetano et al.⁶⁹

7 Polymères aux propriétés antibactériennes

Les polymères antibactériens, aussi connus sous le nom de biocides polymériques, sont une classe de polymères avec une activité antibactérienne, ou la capacité d'inhiber la croissance des bactéries (bactériostatique).

Afin d'éviter le risque d'infection bactérienne, par contaminations localisées, par exemple du matériel médical, sur des surfaces ou des meubles dans les hôpitaux, dans les systèmes de purification d'eau, dans les textiles ou même dans les emballages alimentaires, il est nécessaire de mettre au point des matériaux limitant, voir empêchant la prolifération bactérienne.

Dans ce but, des approches différentes ont été envisagées, soit par la création directe d'un polymère possédant des propriétés antibactériennes intrinsèques, soit par le greffage d'un antibactérien à la surface d'un polymère, ou encore par l'incorporation de composés inorganiques métalliques à l'intérieur d'un polymère, lui conférant ainsi des propriétés antibactériennes. Cette chimie connaît un intérêt grandissant comme nous le montre la revue de A. Munoz-Bonilla *et al.*⁷⁰ de 2012 présentant une bibliographie de 439 publications regroupant uniquement les articles des 10 dernières années (Fig. 41).

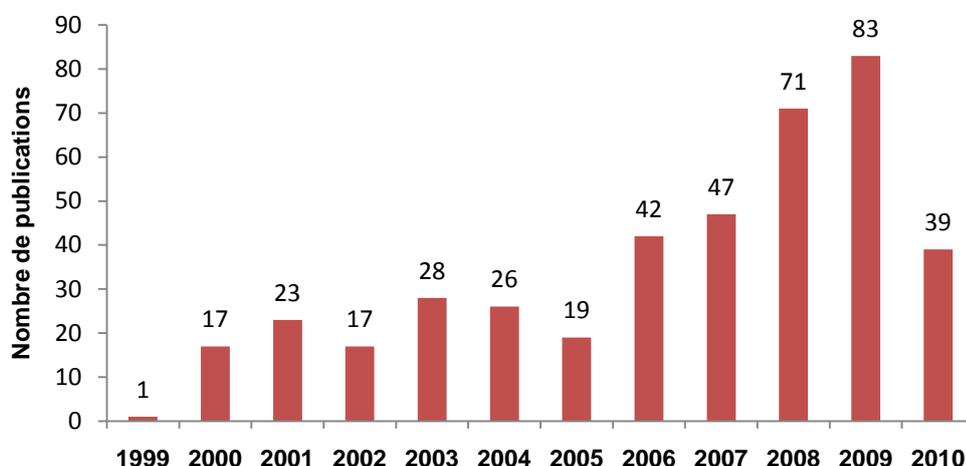


Fig. 41 : Nombre de publications sur les supports antibactériens entre 1999 et 2010 référencés dans la revue de A. Munoz-Bonilla *et al.*⁷⁰

Une sélection non exhaustive des différentes approches et centrée sur la description de polymères chargés est présentée ci-dessous.

7.1 Les polymères possédant des propriétés antibactériennes

En partant du principe que la paroi bactérienne est globalement chargée négativement puisqu'elle contient 70% de phosphatidylsérine (ou céphaline), de nombreux polymères chargés positivement ont été élaborés afin d'utiliser des propriétés électrostatiques qui engendrent la détérioration de la paroi bactérienne. Il est généralement accepté que le mécanisme de l'action bactéricide de ces polymères cationiques passe par :

1. La liaison de la bactérie au polymère
2. La diffusion à travers la paroi bactérienne
3. La perturbation de la membrane cytoplasmique
4. La mort cellulaire

Ces polymères peuvent se classer chimiquement en plusieurs grandes familles :

7.1.1 Les dérivés ammoniums quaternaires

La plupart des exemples connus de polymères cationiques portant des ammoniums quaternaires contiennent des structures aromatiques, hétérocycliques et sont le plus souvent issus de modifications du polystyrène (PS) ou de poly(vinylpyridine).

Par exemple, Li et Shen⁷¹ ont synthétisé un copolymère soluble de 4-vinylpyridine (4-VP), styrène et de divinylbenzène (DVB) qui est ensuite transformé en ammonium quaternaires par l'ajout de dérivés halogénés (bromure de benzyle, C_4H_9Cl , C_4H_9Br et C_4H_9I). Ces nouveaux polymères sont mis en contact avec des suspensions bactériennes d' *E. coli* mortes (chauffées à 70°C pendant 50 min) et les concentrations bactériennes résiduelles sont quantifiées par la mesure de la densité optique à 660 nm. Les résultats montrent clairement une diminution de deux à trois logs de la concentration bactérienne initiale (qui reste identique dans le témoin). Li *et al.* supposent la capture des bactéries à la surface du polymère et confirment ce résultat par microscopie électronique à balayage (SEM) en montrant visuellement les bactéries présentes sur la surface du polymère (Fig. 42).

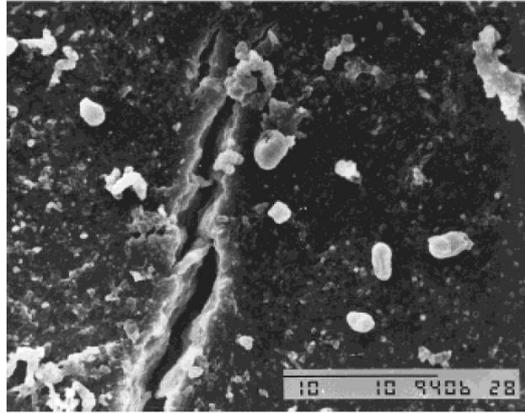


Figure 2 SEM photographs of the surface of Q-A3 which was brought into contact with the *E. coli* cell suspension.

Fig. 42 : Microscopie électronique à balayage par Li et al.⁷² montrant la capture de bactéries par le polymère.

Au-delà de l'activité antibactérienne, il est indispensable de tester également d'autres facteurs tels que l'activité hémolytique (destruction des globules rouges), la biocompatibilité, la biodégradabilité ou la balance hydrophile/lipophile.

L'équipe de Sambhy *et al.*⁷³ a conçu par exemple une série de polymères de type poly(4-vinylpyridine) (P4VP) copolymérisés pour moitié avec du méthacrylate de méthyle (MMA) (Fig. 43). Cette publication décrit l'influence de la position d'une chaîne alkyle (apportant un caractère lipophile) par rapport aux charges positives de l'ammonium. Les résultats montrent que la séparation de la queue lipophile et de la charge positive entraîne à la fois une forte hausse de l'activité antibactérienne, hémolytique et de la toxicité cellulaire.

Fig. 43 : Copolymères de méthacrylate et d'iodure de 4-vinylpyridinium par Sambhy et al.⁷³

D'autres paramètres permettent de faire varier ces facteurs, comme par exemple : les contre-anions⁷⁴, le type d'hétérocycle (imidazolidinium⁷⁵, pyrrolidinium⁷⁶), la balance hydrophile/lipophile⁷⁷ (par l'ajout de chaînes alkyles), ou la charge. Gottenbos *et al.*⁷⁸ décrivent notamment un copolymère de polyméthyle méthacrylate et d'acide méthacrylique (PMMA/MAA) chargé négativement (Fig. 44). Ce copolymère est déposé sur des lames et lamelles de verre précédemment silanisées. Le potentiel zeta (ζ) du film obtenu est mesuré donnant une valeur de -18 mV qui permet de conclure quant à la charge négative globale du polymère. Contrairement aux polymères cationiques, ce polymère chargé négativement empêche beaucoup plus longtemps la fixation initiale des bactéries (grâce aux interactions électrostatiques répulsives) et par conséquent la formation de biofilms. Cependant, la croissance bactérienne sur ces matériaux devient exponentielle une fois les bactéries fixées.

Fig. 44 : Copolymères chargés négativement (H et CH₃) ou positivement (C₃H₆N⁺(CH₃)₃Cl) par Gottenbos et al.⁷⁸

Un autre paramètre important est la réutilisation du matériau antibactérien sur plusieurs cycles. McCubbin *et al.*⁷⁹ décrivent des surfaces de polymères greffés avec des ammoniums quaternaires fixés sur du polyéthylène (PE) perdant toute leur activité antibactérienne après leur première utilisation. Ils émettent l'hypothèse que le polymère adsorbe à sa surface les cellules mortes ou les protéines cellulaires et n'est plus disponible pour en capter de nouvelles.

Au contraire, Dong *et al.*⁸⁰ décrivent la fonctionnalisation d'un polymère de type poly[2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate] (PDMAEMA) sous forme de bromure d'éthyle ammonium et incorporant des nanoparticules de magnetite (Fe₃O₄). Ces dernières permettent de capturer les billes avec un aimant et de les réutiliser/recycler après la capture. Une fois récupérées, les billes peuvent être réutilisées 8 fois de suite sans perdre leurs propriétés antibactériennes.

De nombreux autres exemples de résines ammonium sont décrits dans la littérature utilisant par exemple, des polyélectrolytes à cations conjugués par Xing *et al.*⁸¹ (Fig. 45), des polysiloxanes⁸², des polyéthylèneimines⁸³ ou des oxazolines⁸⁴.

Fig. 45 : Synthèse de polyélectrolytes à cations conjugués par Xing et al.⁸¹

7.1.2 Les dérivés contenant des guanidines

L'activité antibactérienne des guanidines a suscité l'intérêt des chercheurs ces dernières années, notamment en solution par l'utilisation, par exemple, de pyridylguanidines par Said M. *et al.*⁸⁵, mais également au sein de notre laboratoire où Mourer *et al.*¹² ont développés des calixarènes guanidilés sur la partie haute aux propriétés antibactériennes démontrées.

Cette activité antibactérienne a pu être transférée à l'état solide, en copolymérisant des monomères de guanidines comme décrit par Zhang Y. *et al.*⁸⁶ (Fig. 46). Plus récemment, Wei *et al.*⁸⁷ ont décrit la synthèse d'un copolymère de polyhexaméthylèneguanidine (PHEG) hydrochlorure et d'acrylonitrile (AN) possédant à la fois des propriétés mécaniques intéressantes et une bonne activité antibactérienne.

Fig. 46 : Copolymérisation de guanidines par Zhang Y. et al.⁸⁶

Les avantages principaux des guanidines sont leur grande solubilité dans l'eau, leur action en tant que biocides et en même temps leur faible toxicité. On retrouve également dans certaines synthèses de polymères mimant l'action de peptides naturels, l'utilisation de chaînes de type trifluoroacétate d'éthyle-ammonium ou -guanidinium. Les dérivés de

polynorbornènes décrits par Ilker *et al.*⁸⁸ et Gabriel *et al.*⁸⁹ montrent une grande sélectivité entre les propriétés antibactériennes et héméolytiques. Une fois de plus, l'introduction du dérivé guanidinium permet à la fois d'induire une activité antibactérienne et une non toxicité du polymère (Fig. 47).

Fig. 47 : Polynorbornènes par Ilker et al.⁸⁸ (A et B) et polynorbornène décrit par Gabriel et al.⁸⁹ (C).

7.1.3 Les dérivés mimant l'action de peptides naturels

La littérature est très riche en exemples de synthèses d'oligomères ou de polymères mimant l'action de peptides naturels. Par exemple, Gellman *et al.*⁹⁰⁻⁹² ont comparé l'activité de la mangainine⁹³ (Fig. 48), peptide naturel naturellement présent sur la peau de grenouilles africaines *Xenopus laevis*, à l'activité d'un peptide synthétique (Fig. 49).

Fig. 48 : Peptide naturel antibactérien, la magainine

Fig. 49 : β -peptide synthétique par Gellman et al.

Les différentes structures obtenues permettent d'avoir une excellente sélectivité (MHC/MIC) ce qui rend le matériau antibactérien (MIC basse) mais non-hémolytique (MHC élevé).

7.1.4 Les dérivés halogénés

Les polymères fluorés

Parmi les polymères halogénés, les polymères fluorés sont les plus étudiés à cause de leurs propriétés uniques : stabilité chimique, thermique ainsi qu'une surface très hydrophobe entraînant une activité antibactérienne importante. Si l'on ajoute à ça l'incorporation d'antibiotiques tel que la ciprofloxacine (*Ciflox®*) ou la norfloxacine (*Noroxine®*) qui sont des

dérivés de fluoroquinolones, on obtient les polymères synthétisés par Woo et al.⁹⁴⁻⁹⁶ (Fig. 50). Ces polymères présentent également une faible cytotoxicité, mesurée par la dégradation du 3,4,5-diméthylthiazol-2-yl-2,5-diphényltétrazolium (MTT) par les cellules vivantes. Un dérivé du même polymère incorporant du ¹⁴C radioactif ($t_{1/2} = 5730$ ans) a été conçu afin de tester la biodégradabilité du polymère en présence d'une enzyme macrophage. Le résultat par la mesure de l'activité montre une dégradation de 30% du polymère en seulement 30 jours.

Fig. 50 : Polymère incorporant la ciprofloxacine (en rouge) par Woo et al.⁹⁴⁻⁹⁶

Les polymères chlorés

Les polymères chlorés sont une famille de polymères largement publiés par Patel et al.^{97,98} Dans ces travaux, ils décrivent entre autres, la synthèse et la caractérisation d'un homopolymère de 2,4-dichlorophényl méthacrylate (2,4-DMA) synthétisé à partir de l'estérification de chlorure de méthacryloyle et de 2,4-dichlorophénol (Fig. 51).

Fig. 51 : Synthèse d'un homopolymère chloré de 2,4-dichlorophényl méthacrylate par Patel et al.^{97,98}

Ils fabriquent par la suite des séries de copolymères en mélangeant en différentes proportions le 2,4-DMA avec soit la 8-quinolinyll méthacrylate (8-QMA)⁹⁷, soit le méthyle acrylate (MA)⁹⁸ (Fig. 52). Les résultats prouvent que l'incorporation d'un monomère chloré confère aux co-polymères des propriétés inhibitrices de la croissance de bactéries, de champignons ou de levures.

Fig. 52 : Copolymères de 2,4-DMA avec du MA ou 2,4 DMA avec 8-QMA par Patel et al.

97,98

Parmi les polymères chlorés, il existe la famille des polymères incorporant des *N*-halamines, c'est à dire des molécules comportant des azotes substitués par un halogène. Ces *N*-halamines sont très connus pour leurs impressionnantes activités biocides. Ils ont été synthétisés sur des supports de type poly-2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine (PVDAT)⁹⁹ (Fig. **53A**), ou de type poly-siloxanes¹⁰⁰ (Fig. **53B**) ou encore de type polyacrylamide¹⁰¹ (Fig. **53C**).

Fig. 53 : Polymères incorporant des N-halamines. A : PVDAT par Chen et al.⁹⁹ B : Poly-siloxanes par Liang et al.¹⁰⁰ C : Polyacrylamides par Kocer et al.¹⁰¹

Ces polymères sont capables de diminuer de 7 à 8 logs la concentration bactérienne initiale d' *E. coli* ou de *S. aureus*. Une revue a été publiée en 2013 par Hui et al.¹⁰² regroupant les synthèses, les caractérisations et les applications de cette famille de polymères.

Résultats & Discussion

Partie I

Synthèses et caractérisations

8 Stratégies de synthèse

8.1 Introduction

Le but global recherché dans ce travail est la synthèse de matériaux fonctionnalisés sur leur surface par des molécules à propriétés antibactériennes démontrées, leur conférant un effet bactériostatique et/ou bactéricide. Il prend appui sur la chimiothèque de molécules antibactériennes développées au laboratoire, plus particulièrement dans la famille des calixarènes antibactériens dont le représentant majeur est le **Cx1**, représenté en Fig. 54.

*Fig. 54 : Tétra-guanidinoéthylcalix[4]arène ou **Cx1**³⁷.*

La synthèse de dérivés du **Cx1** greffés sur un support solide a été mise au point par une stratégie en plusieurs étapes. L'idée est d'obtenir l'enchaînement du **Cx1** au support solide via un espaceur (Fig. 55). Cet enchaînement nécessite la mise en place de deux points d'ancrages (**X** et **Y**) qui lui permettront la liaison contrôlée de ces trois entités.

*Fig. 55 : Stratégie de synthèse d'un support solide greffé avec le **Cx1**.*

Pour le premier point d'ancrage **X**, la substitution sur la partie basse du calixarène par l'alkylation d'un des quatre phénol a été privilégiée, permettant de conserver la conformation de la partie haute du calixarène intacte et libre de réagir. La monosubstitution du calixarène a également été décidée afin d'obtenir un ancrage univoque de la molécule sur la résine. Cette approche permet d'obtenir un meilleur contrôle du greffage en n'offrant à chaque molécule qu'une seule substitution possible sur le support solide.

Pour le second point d'ancrage **Y**, il sera variable en fonction du support solide choisi. Les deux supports solides choisis sont : la résine de Merrifield, copolymère de styrène, de divinylbenzène et de chlorométhylstyrène, ce dernier autorisant diverses réactions de substitution et la résine de Wang benzaldéhyde, issue de la réaction de la résine de Merrifield avec le 4-hydroxybenzaldéhyde, ce dernier autorisant des réactions de condensation avec les amines.

Il a été choisi de toujours substituer en premier l'espaceur sur le calixarène, puis dans un second temps de tenter le greffage du calixarène substitué sur le support solide.

Si le support est une résine de Merrifield, une substitution du chlore par un groupement nucléophile sera nécessaire. Si la résine de Wang-benzaldéhyde est utilisée, c'est une amine qui pourra servir de point d'ancrage afin de former une liaison imine par condensation de l'amine sur l'aldéhyde (Fig. 56).

Fig. 56 : Substitution nucléophile sur la résine de Merrifield et condensation d'une amine sur la résine de Wang benzaldéhyde.

Des essais menés par Mourer *et al.* au laboratoire ont prouvé qu'expérimentalement, la substitution sur la partie basse du **Cx1 octaboc** ne permet pas d'obtenir le calixarène substitué attendu. C'est un intermédiaire de synthèse, le *tétra-para*-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène **28** qui sera la molécule fonctionnalisée par l'espaceur. Cette molécule est synthétisée en quatre étapes à partir du calix[4]arène commercial (Fig. 57).

Fig. 57 : Synthèse du tétra-para-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène **28** à partir du calix[4]arène et suite de la synthèse jusqu'à obtention du **Cx1** par Mourer et al.³⁹.

Cet intermédiaire **28** a été choisi car il est protégé sur sa partie haute par quatre groupements protecteurs *tert*-butyloxycarbonyl (Boc), ce qui lui permet d'être substitué uniquement sur sa partie basse de façon contrôlée. C'est également un intermédiaire lors de la synthèse du **Cx1** car le composé tétra-para-aminoéthyle-calix[4]arène **27** n'est pas obtenu avec une pureté suffisante. La purification de cet intermédiaire chlorhydrate est difficile, la stratégie développée consiste à protéger les amines sous forme de Boc-, donnant le dérivé **28**. Ce dérivé est alors purifié par chromatographie puis déboqué en milieu acide pour obtenir le composé tétratrifluoroacétate d'ammonium pur. Afin d'obtenir le **Cx1**, deux étapes supplémentaires sont nécessaires : la première consiste en la guanidylation des fonctions amines par la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N''*-triflylguanidine sur la partie haute du calixarène. La synthèse de la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N''*-triflylguanidine sera présentée par la suite. Cette guanidylation permet d'obtenir le calixarène avec des fonctions *octa*-Boc guanidines sur la partie haute. Ces fonctions sont dans un second temps déboquées par traitement en milieu acide pour parvenir au **Cx1**.

Afin d'obtenir un dérivé de **Cx1** monosubstitué sur la partie basse, le calixarène **28** est monosubstitué par un espaceur bifonctionnel sur un des phénols, puis les trois mêmes étapes de débocage, de guanidylation et de nouveau de débocage permettent d'obtenir l'enchaînement souhaité.

Ces 3 étapes peuvent être réalisées soit **après** le greffage du dérivé calixarénique sur le support solide (cette voie de synthèse sera nommée **Bottom-Up**), soit **avant** le greffage du

dérivé calixarénique sur le support solide (cette voie de synthèse sera nommée **Top-Down**) (Fig. 58).



*Fig. 58 : Voies de synthèses possibles : **Bottom-Up** (greffage puis synthèse sur support) et **Top-Down** (synthèse en solution puis greffage).*

Pour pouvoir comparer les rendements de greffage, la plupart des synthèses sur support solide ont été réalisées à la fois en Bottom-Up et en Top-Down. L'étape suivante pour la mise en place d'une telle stratégie est de trouver l'espaceur bifonctionnel adéquat.

8.2 Synthèse de l'espaceur

La recherche du bon espaceur a dû prendre en compte les paramètres nécessaires pour l'ancrage sur le support solide. En effet, l'ancrage a été réalisé sur deux résines différentes : la résine de Wang benzaldéhyde et la résine de Merrifield.

8.2.1 Résine de Wang benzaldéhyde

8.2.1.1 Espaceur 4-alkylaniline

Pour la résine de Wang benzaldéhyde, le greffage sur le support polymérique s'opère par la formation d'une imine, nous menant de façon évidente à synthétiser un espaceur de type amine afin de réaliser le greffage (Fig. 59).

Fig. 59 : Utilisation d'un espaceur de type 4-alkylaniline.

Afin de rendre cette imine plus stable, nous avons d'abord choisi d'incorporer une aniline, permettant ainsi d'obtenir une base de Schiff. En effet, l'imine est conjuguée à la fois sur la partie greffée et sur le support polymérique conférant une formation thermodynamiquement très stable. Il a cependant été vérifié que cette imine n'est pas totalement stable, particulièrement en milieu acide fort, notamment celui utilisé pour le débocage des amines. Il

est donc indispensable de réduire cette double liaison afin de conserver le greffage dans la suite de la synthèse.

Pour accéder aux anilines, les dérivés 4-alkylnitrobenzène **7**, **8** et **9** ont été synthétisés à partir des dérivés halogénoalkylbenzène commerciaux correspondants, ciblant une longueur croissante de type méthyle, éthyle et propyle (Fig. **60**), selon les voies de synthèse décrites respectivement par Gant *et al.*¹⁰³, Baraldi *et al.*¹⁰⁴ et Kim *et al.*¹⁰⁵. Les réactions de nitration donnent toujours un mélange de dérivés ortho-, para- et dinitro- (ortho et para) alkylbenzène qui sont séparés soit par cristallisation, soit par chromatographie. Le calixarène **28** a été mis en présence de ces trois dérivés afin de préparer les analogues mono-substitués en partie basse.

Fig. 60 : Voie de synthèse des calixarènes alkylnitrobenzène monosubstitués.

Pour le 4-chlorométhyle-nitrobenzène **7**, le dérivé calixarène O-*para*-nitrobenzyle a pu être obtenu avec un rendement de 60%, par réaction avec le calixarène **28** en utilisant NaHCO₃ comme base et l'acétonitrile comme solvant. Cependant, les tentatives de réduction en aniline n'ont toujours conduit qu'à la reformation du calixarène **28** de départ (Pd/C + H₂ ou NH₄Cl/In¹⁰⁶ ou SnCl₂, 2H₂O¹⁰⁷) laissant supposer un rôle de groupe protecteur du phénol pour ce radical para-nitrobenzyle, ou sa non réaction (CuSO₄ 2N + NaBH₄¹⁰⁸) (Fig. **61**). De ce fait, la synthèse du dérivé calixarène O-*para*-nitrobenzyle a été abandonnée.

Fig. 61 : Tentatives de formation du dérivé calixarène mono-O-méthyl-(para-nitrobenzyle).

Pour le 4-bromoéthyl-nitrobenzène **8**, la tentative de substitution sur le calixarène **28** dans les mêmes conditions conduit toujours à la formation de beaucoup de *para*-nitrostyrène, explicable par une réaction d'élimination du brome en milieu basique (NaHCO₃), favorisée par le groupement *nitro* électro-attracteur (Fig. **62**). Le produit attendu est tout de même obtenu en très faible quantité et en mélange avec le calixarène **28** de départ. Des chromatographies successives n'ont permis au mieux d'obtenir qu'un mélange des deux composés (calixarène mono-O-*para*-nitrobenzyle / **28** : 4/1 en RMN). La réaction est également tentée en utilisant une autre base, le CsF dans la DMF anhydre, sans succès (méthode de Coleman *et al.*¹⁰⁹ par analogie). Face aux nombreuses difficultés rencontrées, cette synthèse est également abandonnée.

Fig. 62 : Tentatives de formation du dérivé calixarène mono-O-éthyl-(para-nitrobenzyle).

Finalement, le calixarène monosubstitué mono-O-propyl-3-(*para*-nitrobenzène) **33** a été obtenu par la substitution du calixarène **28** par le 4-bromopropyl-nitrobenzène **9** (Fig. **63**).

Fig. 63 : Synthèse du dérivé calixarène mono-O-propyl-3-(para-nitrobenzène)33.

Cette synthèse utilisant NaHCO₃ dans l'acétonitrile en présence de KI, inspirée des conditions de monosubstitution de calixarènes décrite par Regnouf de Vains *et al.*¹¹⁰, ne permet pas d'obtenir un très haut rendement (37%), cependant le seul produit obtenu lors de la réaction est le calixarène monosubstitué attendu **33**, contrairement aux autres synthèses utilisant des bases plus fortes (K₂CO₃, CsF, NaH, ...) qui décrivent la formation de mélanges de calixarènes mono- et di-substitués souvent difficilement séparables. Les produits de départ qui n'ont pas réagi sont systématiquement récupérés lors de l'étape de chromatographie et cette réaction peut-être une nouvelle fois relancée en réutilisant ces mêmes réactifs.

8.2.1.2 Espaceurs 1-bromo- ω -(O-tyramino)-alcane

Afin de comparer l'efficacité du greffage entre une aniline et une amine primaire, deux espaceurs, le Bromo-3-((N-carboxybenzyl-tyramine)-yl)-propane **3** et le Bromo-4-(N-carboxybenzyl-tyramine)-butane **4** ont été synthétisés et incorporés sur le calixarène **28**. Cette fois-ci, le précurseur est protégé par un groupement de type carboxybenzyle (Cbz) qui est orthogonal au groupement Boc du calixarène. Cela permet d'obtenir la déprotection sélective du Cbz par hydrogénation catalytique, sans toucher aux groupements Boc (Fig. **64**).

*Fig. 64 : Synthèse des deux dérivés calixaréniques **30** et **32** monosubstitués par une tyramine.*

Cette synthèse s'opère en protégeant la tyramine pour obtenir la *N*-carboxybenzyl-tyramine **2**. Ce phénol est ensuite substitué sur sa partie basse par le 1,3-dibromopropane pour obtenir le composé **3** ou par le 1,4-dibromobutane pour obtenir le dérivé **4**. La monosubstitution est ensuite réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (NaHCO₃, KI, CH₃CN) pour obtenir les calixarènes monosubstitués **29** et **31**. Ces deux dérivés sont ensuite déprotégés par hydrogénation catalytique des groupements Cbz et les molécules **30** et **32** sont ainsi obtenues.

8.2.2 Résine de Merrifield

Pour le cas de la résine de Merrifield, des essais de greffage très efficaces utilisant un groupement pyridinium comme point d'ancrage ont guidé la synthèse vers le greffage de dérivés de calixarènes pyridinés. La pyridine servant de point d'ancrage a pu être efficacement introduite sur le calixarène par amination réductrice des calixarènes aminés **34** et **42** avec la 4-pyridinecarboxaldéhyde permettant d'obtenir les dérivés pyridinés **36** et **43** correspondants (Fig. 65).

Ces dérivés seront ensuite greffés sur la résine de Merrifield par la substitution du chlore et formation d'un ancrage pyridinium chlorure.

Fig. 65 : Synthèse des dérivés calixarèniques pyridinés par amination réductrice de la 4-pyridinecarboxaldéhyde.

Afin de maîtriser et optimiser les conditions de greffage des calixarènes monosubstitués sur la résine de Merrifield, le point d'ancrage pyridinium a dû être testé. Pour cela, des résines de Merrifield substituées avec différents groupements pyridinés ont été synthétisées.

9 Développement d'un point d'ancrage pyridinium sur la résine de Merrifield

9.1 Introduction

Comme décrit dans la littérature par Lemaire *et coll.*¹¹¹, il est possible de réaliser le greffage de pyridines sur la surface de la résine de Merrifield. Dans notre stratégie de synthèse, cette réaction a été tentée afin d'utiliser le pyridinium formé comme point d'ancrage efficace de composés à la surface de la résine (Fig. 66).

Fig. 66 : Dérivés pyridinés utilisés comme point d'ancrage sur la résine de Merrifield.

Cette réaction a été testée sur deux résines de Merrifield (**50** et **51**) avec des taux de greffages respectifs de 2.95 et 5 mmol de Cl/g. Les polymères greffés correspondants obtenus sont les résines pyridinium **67a** et **67b** (Fig. 67).

Fig. 67 : Synthèse des résines pyridinium 67a et 67b.

Il est intéressant de souligner que lors d'une synthèse sur support solide, les billes de résine sont mises dans un premier temps en réaction avec les différents réactifs, puis dans un second temps, transférées sur un fritté pour être rincées et lavées plusieurs fois (au minimum trois fois dans chaque solvant de rinçage). Ces étapes de rinçages sont essentielles afin de désorber complètement les réactifs qui pourraient rester piégés à l'intérieur de la matrice polymérique. Le dernier solvant utilisé est volontairement un solvant volatil (acétone ou dichlorométhane par exemple) afin d'obtenir un séchage de la résine rapide et efficace. La résine synthétisée est donc séchée et pesée plusieurs fois jusqu'à poids constant pour obtenir la variation de masse effective de la résine lors de la synthèse et accéder à une première évaluation du taux de greffage.

La caractérisation d'un polymère, contrairement à une molécule discrète et soluble, n'est pas accessible par de nombreuses méthodes d'analyse. L'information la plus importante à trouver est la quantité de motifs qui ont réagi lors de la synthèse. Pour cela, seules les analyses suivantes sont facilement accessibles :

➤ **Quantitativement**

- La variation de masse de la résine au cours de la synthèse (Δm)
- L'analyse élémentaire

➤ **Qualitativement**

- La spectroscopie infrarouge

Les résultats obtenus par la variation de masse et par l'analyse élémentaire permettent d'estimer un taux de greffage du polymère. Les résultats de ces deux techniques lors de la synthèse des résines pyridiniums **67a** et **67b** sont les suivants (Tableau 3). La spectroscopie infrarouge, quant à elle, permettra de voir apparaître ou disparaître des bandes caractéristiques du greffage.

Résine pyridinium	Résine de départ	Masse de résine initiale	Masse de résine finale	Δm	%C	%H	%N
67a	Merrifield 2.95 mmol Cl/g 50	1.0000 g	1.2822 g	+ 28.2 %	86.07	6.89	3.52
67b	Merrifield 5 mmol Cl/g 51	1.0009 g	1.5155 g	+ 51.4 %	71.52	6.61	4.68

*Tableau 3 : Variation de masse et analyse élémentaire des résines pyridinium **67a** et **67b**.*

Des méthodes de calculs des taux de greffage par la variation de masse et par l'analyse élémentaire sont proposées ci-dessous.

9.2 Calcul du taux de greffage par la variation de masse

9.2.1 Prérequis

La détermination du taux de greffage par la variation de masse est une technique qui ne peut être utilisée que sous certaines conditions. Il faut tout d'abord que la variation de masse soit mesurable avec suffisamment de précision (lorsque la variation de masse devient trop

petite, il est difficile d'obtenir un résultat précis). Il faut également prendre en compte le transfert des billes de résine du ballon vers le fritté qui entraîne souvent une petite perte de masse sur les parois du ballon, non récupérable malgré les rinçages. Enfin, la substitution sur la résine entraîne parfois le relargage d'espèces dont il faut également tenir compte.

9.2.2 Méthode de calcul

La méthode de calcul suivante est proposée à titre d'exemple pour la discussion, mais ne sera pas utilisée dans la suite de ce manuscrit.

Au cours de la réaction de greffage de la pyridine sur la résine, l'augmentation de la masse du polymère ne peut correspondre qu'au greffage des pyridines. Dans la réaction sur la résine à 2.95 mmol de Cl/g, il y a une augmentation de 28.2% du poids de la résine, correspondant à 282 mg pour 1 gramme de résine de départ. Le motif greffé étant une pyridine (masse molaire de 79.1 g/mol), le nombre de moles correspondant est de 3.57 mmol dans 1.282 g de résine greffée. Si ce nombre de moles est ramené par gramme de résine, un nombre de **2.78 mmol de pyridinium/g** de résine est obtenu.

Pour obtenir le taux de greffage de la résine, il faut calculer le nombre total de motifs (substitués ou non) par gramme de résine. La résine de Merrifield initiale, avec 2.95 mmol de Cl/g, a subi une augmentation de masse tout en conservant le même nombre de moles de motifs. Cela entraîne un nombre de moles de motifs/g qui diminue (Fig. 68).

Fig. 68 : Représentation de la conservation du nombre de motifs et de l'augmentation de masse de la résine pendant la synthèse.

Le nombre de motifs par gramme de la résine greffée est donc le rapport du nombre de motifs initial de la résine sur l'augmentation de masse du polymère, soit $2.95 / 1.282 = \mathbf{2.30}$ mmol de motifs/g.

Le taux de greffage correspondant au nombre de motifs chlorométhyles substitués par des pyridines se calcule par le rapport du nombre de moles de pyridinium greffés sur le nombre de moles de motifs soit $2.78 / 2.30 = \mathbf{121\%}$.

Si le même calcul est appliqué à la synthèse sur la résine de Merrifield à 5 mmol Cl/g, les résultats obtenus sont un nombre de mmoles/g de pyridinium de **4.29**, un nombre de mmoles de motifs/g de **3.30** et un taux de greffage de **130 %**.

Plusieurs hypothèses permettent d'envisager une explication de ces taux de greffages supérieurs à 100% et théoriquement impossibles. La précision de la mesure lors des pesées peut être mise en cause (une faible variation de la masse entraîne une erreur importante). Une adsorption de motifs pyridinium dans la matrice polymérique (sans greffage de ces derniers) peut également être envisagée. Cette hypothèse conduit à mener une étude du relargage potentiel de la résine pyridinium dans l'eau.

9.2.3 Evaluation du relargage de la résine pyridinium dans l'eau

30 mg des résines pyridinium **67a** et **67b** sont mises en suspension dans 10 mL d'eau distillée. Les essais sont laissés agiter à température ambiante pendant 7 jours. Les essais sont prélevés (à $t = 14\text{h}$, 2, 3, 4 et 7 jours), l'absorbance est mesurée et les prélèvements sont remis à agiter.

Les résultats montrent une absorbance à $\lambda = 256\text{ nm}$ stable pendant 7 jours, inférieure à $A = 0.01$ pour les deux résines. Avec un coefficient d'absorption molaire de la pyridine de $2000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (référence ¹¹²) à cette longueur d'onde, ces valeurs correspondent à un relargage inférieur à $5 \cdot 10^{-6}\text{ mol}$ de pyridine. En reprenant des nombres de motifs pyridinium de 2.78 et 4.29 mmol / g dans 30 mg de résine, des valeurs de $8.34 \cdot 10^{-5}$ et $1.3 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$ de pyridinium sont obtenues.

Conclusion : Au maximum, le relargage quantifié est de 6.0 et 3.8 %, ce qui ne peut expliquer qu'en petite partie les taux de greffage de 121 et 130% obtenus par le calcul de la variation de masse des résines **67a** et **67b**.

Afin de pouvoir comparer ces résultats, les analyses élémentaires des résines greffées et les calculs des taux de greffage correspondants ont été réalisés.

9.3 Calcul du taux de greffage par l'analyse élémentaire

La résine de Merrifield vierge, composée d'un copolymère de styrène, de chlorométhyle styrène et de divinyle benzène, ne contient pas d'azote. Le greffage d'une pyridine introduit un pourcentage d'azote qui ne peut être rapporté qu'au nombre de motifs greffés.

Les résultats d'analyse élémentaire des résines de Merrifield vierge **50** et **51**, et des résines pyridinium **67a** et **67b** sont les suivants (Tableau 4).

	50	51	67a	67b
%C	80.90	74.57	86.08	71.52
%H	6.79	6.33	6.89	6.61
%N	< 0.05	< 0.05	3.52	4.68

Tableau 4 : Résultats d'analyse élémentaire des résines 50, 51, 67a et 67b.

En prenant toujours comme exemple la résine pyridinium **67a**, son pourcentage d'azote est de 3.52%, ce qui signifie que dans 100 g de résine greffée **67a**, il y a 3.52 g d'azote. Si cette masse est convertie en nombre de moles, en divisant par la masse molaire de l'azote, 0.251 mol d'azote dans 100 g de résine sont obtenues, soit 2.51 mmol d'azote/g. Le motif greffé pyridinium ne contient qu'un seul azote, ce qui signifie que le nombre de moles d'azote introduit est égal au nombre de moles de motifs greffés. Le résultat de l'analyse élémentaire de la résine **67a** permet d'obtenir une valeur de **2.51 mmol de pyridinium/g**.

Le même calcul donne pour la résine **67b** une valeur de **3.34 mmol de pyridinium/g**.

Cette fois-ci les taux de greffage respectifs des résines **67a** et **67b** sont, en divisant par le nombre de motifs/g (**2.30** et **3.30** mmol), respectivement **109%** et **101%**.

Ce calcul a été appliqué pour la quasi-totalité des résines synthétisées, les résultats sont reportés dans la partie expérimentale et seront utilisés dans la suite de ce document.

Afin de tenter de corroborer les résultats expérimentaux de l'analyse élémentaire avec la formule théorique d'une résine de Merrifield greffée, une méthode de calcul a été envisagée.

9.4 Calcul théorique de la composition chimique des résines pyridinium

9.4.1 Introduction

La résine de Merrifield possède dans sa structure 3 unités monomériques copolymérisées : le cholométhylstyrène, le styrène et le 1,4-divinylbenzène (DVB) (Fig. **69**).

Fig. 69 : Schéma d'une résine de Merrifield polymérisée vierge

Dans cet exemple, **x**, **y**, et **z** représentent les nombres d'unités monomériques constituant le motif du polymère. Le but est de déterminer ces 3 valeurs de manière théorique, puis de remonter à leurs valeurs en pourcentages de carbone, d'hydrogène et d'azote afin de pouvoir les comparer avec les résultats expérimentaux d'analyse élémentaire.

Pour cela, nous proposons une méthode de calcul par les étapes suivantes :

1. Détermination de la masse de chacune des unités monomère dans la résine de Merrifield vierge
2. Conversion des masses de chaque unité monomère en nombres de moles
3. Simulation de l'évolution de chaque unité monomère lors du greffage
4. Détermination de la formule brute de cette nouvelle résine greffée
5. Conversion de cette formule brute en formule centésimale

9.4.2 Détermination de la masse de chaque unité monomère dans la résine de Merrifield vierge 50

Les informations données par le fournisseur sur la résine de Merrifield vierge **50** sont les suivantes : *Loading* : 2.95 mmol Cl/g et 1% crosslinked with DVB.

Le taux de réticulation de la résine de Merrifield utilisée est donc de 1%, ce qui correspond à une masse de 1 g de DVB dans 100 g de polymère.

Afin de déterminer la masse de chlorométhylstyrène et de styrène dans la résine, il faut considérer que chaque chlore appartient à une unité chlorométhylstyrène. L'information du fournisseur sur le « *loading* », c'est-à-dire le nombre de moles de motifs greffés par gramme de polymère, permet de déterminer le nombre de moles d'unités chlorométhylstyrène dans 100 g.

$n(\text{chlorométhylstyrène}) = \text{Loading} \times \text{masse de résine} = 2.95 \times 100 = 295 \text{ mmol}$ dans 100 g de résine vierge.

La masse molaire de l'unité monomère de chlorométhylstyrène est de 152.6 g/mol, ce qui correspond à 45 g pour 100 g de résine. La masse de styrène en est déduite par différence. Soit $m = 100 - 45 - 1 = 54 \text{ g}$. La répartition massique dans 100 g de résine vierge est donc la suivante (Fig. 70).

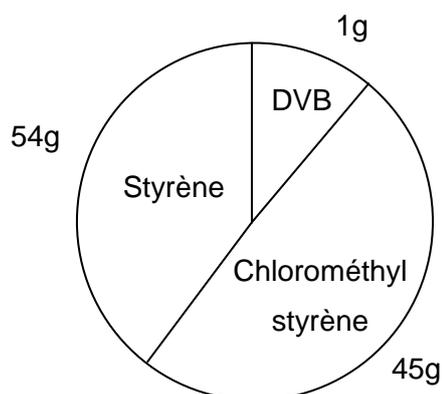


Fig. 70 : Répartition massique théorique des unités monomères dans 100 g de résine de Merrifield 50.

9.4.3 Détermination du nombre de moles de chaque unité monomère dans la résine de Merrifield vierge 50

Les masses molaires des unités monomères de DVB, de chlorométhylstyrène et de styrène sont respectivement 130.2 ; 152.6 et 104.1 g/mol. La répartition en nombre de moles et en pourcentage molaire est obtenue en divisant la masse par la masse molaire ($n = m/M$). Les nombres de moles de chaque entité sont donc les suivants (Fig. 71).

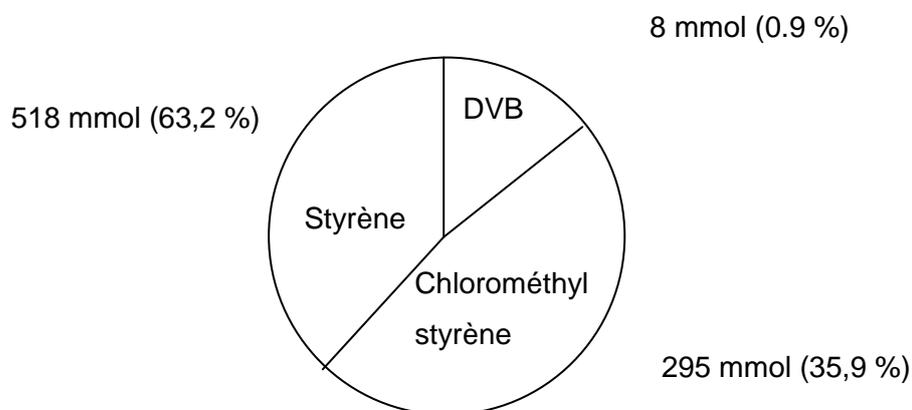


Fig. 71 : Répartition molaire théorique des unités monomères de la résine de Merrifield

Pour cette résine, si l'on revient à la représentation de la Fig. 69 de l'introduction, les valeurs de **x**, **y** et **z** du motif correspondent respectivement aux valeurs suivantes : **0.9**, **35.9** et **63.2**.

9.4.4 Greffage sur la résine de Merrifield vierge 50

Lorsque l'on fonctionnalise la résine de Merrifield 50, un quatrième type de motif monomérique est introduit dans la structure polymérique : le Greffon (Fig. 72).

Fig. 72 : Schéma d'une résine de Merrifield greffée.

Dans ce nouvel exemple, **a**, **b**, **c** et **d** représentent les nombres d'unités monomères constituant le motif du polymère de la résine greffée. Le but est à présent de déterminer ces 4 valeurs. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser la donnée expérimentale et la relation suivante.

Donnée expérimentale : le taux de greffage du polymère obtenu, soit par mesure de l'augmentation de masse, soit par l'analyse élémentaire de la résine comme vu précédemment.

Cette donnée expérimentale du pourcentage de greffage est égale au nombre de moles de greffons sur le nombre de moles de motifs total.

$$(1) \%Greffage = \frac{n(Greffons)}{n(Motifs\ total)}$$

→Ce pourcentage permet d'obtenir le nombre de moles de Greffons du polymère : **n(Greffons)**.

Relation : lorsque la réaction de greffage a lieu, les chlorométhylstyrènes vont être de partiellement à totalement substitués. Il y aura donc d'un côté, les chlorométhylstyrènes non

greffés et de l'autre, les Greffons. La conservation de la matière permet d'écrire la relation suivante :

$$(2) n(\text{chlorométhylstyrène}) = n(\text{chlorométhylstyrène non greffés}) + n(\text{Greffons})$$

→ Le nombre de chlorométhylstyrènes est connu puisqu'il reste le même avant et après greffage. Le nombre de moles de greffons a été déterminé par le pourcentage de greffage. Cette relation permet donc d'obtenir le **nombre de moles de chlorométhylstyrènes non greffés**.

A l'aide des équations (1) et (2), les nombres de moles de chaque unité monomère après greffage sont obtenus. La figure suivante illustre le greffage **théorique** d'une résine de Merrifield avec un pourcentage de greffage de 40% (Fig. 73).

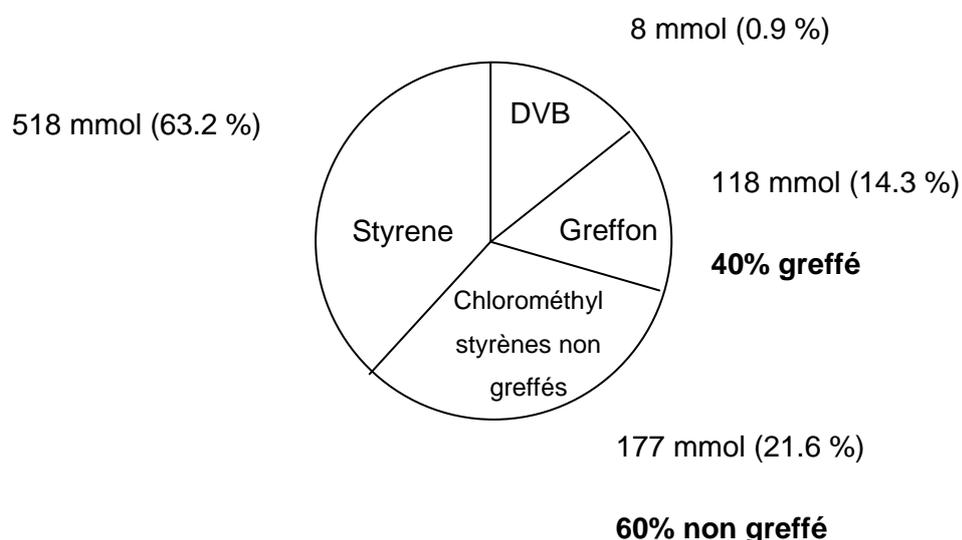


Fig. 73 : Répartition molaire des différentes unités monomères de la résine de Merrifield 50 avec un taux de greffage théorique de 40%

Dans cet exemple, si l'on revient à la représentation de la Fig. x, les valeurs de **a**, **b**, **c** et **d** du motif sont respectivement **0.9**, **21.6**, **63.2** et **14.3**.

9.4.5 Détermination de la formule brute de la résine pyridinium 67a

Le but est la détermination de la formule brute du motif de la résine pyridinium **67a** sous la forme $C_i H_j O_k N_l Cl_m$. Le pourcentage de greffage ayant été calculé supérieur à 100%, tous les motifs chlorométhylstyrènes sont considérés comme ayant été substitués. Les

nombre de motifs de DVB, de styrène, de chlorométhylstyrènes non greffés et de pyridinium sont respectivement **a**, **b**, **c** et **d** (Fig. 74).

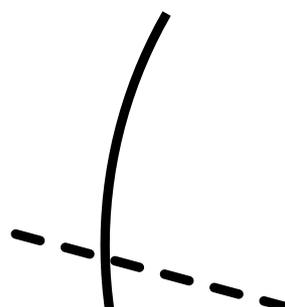


Fig. 74 : Schéma de la composition de la résine pyridinium.

La masse molaire et le nombre d'atomes de chaque motif constitutif de la résine sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 5).

Motifs	DVB (a)	Styrène (b)	Chlorométhylstyrènes non greffés (c)	Pyridinium (d)
Masse molaire (g/mol)	130.2	104.1	152.6	231.7
Nombre de carbones (i)	10	8	9	14
Nombre d'hydrogènes (j)	10	8	9	14
Nombre d'oxygènes (k)	0	0	0	0
Nombre d'azotes (l)	0	0	0	1
Nombre de chlores (m)	0	0	1	1
Répartition molaire des motifs (%)	0.9	63.2	0	35.9

Tableau 5 : Masses molaires et nombres d'atomes de chaque motif constitutif de la résine pyridinium **67a**.

Les masses molaires des motifs sont égales aux masses molaires des molécules correspondantes car la polymérisation radicalaire n'entraîne pas de gain ou de perte de masse.

Le but est désormais de déterminer le nombre d'atomes i , j , k , l et m du motif de la résine $C_i H_j O_k N_l Cl_m$. Ce nombre d'atome est appelé **N**. **N** est égal à la somme du nombre

d'atomes en question de chacun des motifs de la résine, pondérée par la répartition de chaque motif.

Formule générale : $N = \sum_{motif} \text{Nombre d'atomes du motif} * \text{Répartition du motif}$

Exemple pour la résine **67a** : $C_i H_j O_k N_l Cl_m$

$$i = 9 \times 0 + 8 \times 63.2 + 10 \times 0.9 + 14 \times 35.9 = 1017.2$$

$$j = 9 \times 0 + 8 \times 63.2 + 10 \times 0.9 + 14 \times 35.9 = 1017.2$$

$$k = 0 \times 0 + 0 \times 63.2 + 0 \times 0.9 + 0 \times 35.9 = 0$$

$$l = 0 \times 0 + 0 \times 63.2 + 0 \times 0.9 + 1 \times 35.9 = 35.9$$

$$m = 1 \times 0 + 0 \times 63.2 + 0 \times 0.9 + 1 \times 35.9 = 35.9$$

La formule brute théorique du motif de la résine greffée **67a** est la suivante : $C_{1017.2} H_{1017.2} N_{35.9} Cl_{35.9}$.

9.4.6 Détermination de la composition centésimale du motif « monomère » de la résine pyridinium **67a**

La formule brute trouvée permet de calculer la masse molaire d'un motif théorique. Dans l'exemple de la résine **67a**, la masse molaire du motif est de 15000.57 g/mol.

Les masses atomiques $M(A)$ des atomes de carbone, d'hydrogène, d'azote et de chlore sont respectivement de 12, 1, 14 et 35.5 g/mol. La masse molaire du motif est utilisée pour déterminer les pourcentages théoriques de chacun des atomes (**%A**) constituant la résine dans la formule suivante :

$$\%A = \frac{N * M(A)}{M(motif)}$$

Application pour cette résine :

$$\%C = \frac{1017.2 * 12}{15000.57} = 81.37 \%$$

$$\%H = \frac{1017.2 * 1}{15000.57} = 6.78 \%$$

$$\%N = \frac{35.9 * 14}{15000.57} = 3.38 \%$$

$$\%Cl = \frac{35.9 * 35.5}{15000.57} = 8.50 \%$$

Les mêmes calculs théoriques sont refaits en considérant la résine pyridinium **67b**, toujours en supposant un greffage quantitatif. Tous les résultats obtenus par le calcul sont ensuite comparés aux résultats expérimentaux d'analyse élémentaire dans le Tableau 6.

	67a théorique	67a analyse élémentaire	67b théorique	67b analyse élémentaire
%C	81.37	86.08	75.91	71.52
%H	6.78	6.89	6.37	6.61
%N	3.38	3.52	5.02	4.68

*Tableau 6 : Comparaison des calculs théoriques et des résultats expérimentaux d'analyse élémentaire des résines pyridinium **67a** et **67b**.*

Les résultats expérimentaux (d'analyse élémentaire) et théoriques (calculés) des résines pyridinium **67a** et **67b** sont très cohérents quant aux pourcentages d'hydrogène et d'azote. Cependant, cette théorie ne permet pas d'obtenir une approximation satisfaisante sur le pourcentage de carbone de la résine (-4.71 % pour **67a** et +4.39 % pour **67b**).

9.4.7 Hypothèse de calcul concernant la résine **67b**

La formule brute de la résine **67b** peut être écrite sous la forme : $C_{17.64} H_{17.64} Cl N$. Si l'on considère une hydratation de la résine, possible lors de son rinçage à l'eau et que l'on recalcule les pourcentages d'analyse élémentaire théorique à l'aide de cette nouvelle formule brute : $C_{17.64} H_{17.64} Cl N, H_2O$, le résultat suivant est obtenu (Tableau 7).

	67b théorique $C_{17.64} H_{17.64} Cl N$	67b théorique $C_{17.64} H_{17.64} Cl N, H_2O$	67b analyse élémentaire
%C	75.91	71.31	71.52
%H	6.37	6.66	6.61
%N	5.02	4.71	4.68

*Tableau 7 : Hypothèse de calcul par ajout d'une molécule d'eau par motif de la résine **67b**.*

Le résultat obtenu par l'analyse élémentaire de la résine est en adéquation avec le calcul théorique incluant une molécule d'eau. Cependant, cette correction n'est pas applicable sur la résine **67a** car son pourcentage de carbone est trop bas et non trop haut. Les calculs tentés dans ce cas, par ajout de dichlorométhane ou de pyridine par exemple n'ont pas non plus permis d'aboutir à un résultat satisfaisant.

Cette méthode de calcul a été testée pour d'autres résines greffées notamment avec des calixarènes, cependant les résultats de ces calculs ne permettent pas non plus d'obtenir une estimation correcte des pourcentages de carbone, d'hydrogène et d'azote.

9.5 Conclusion sur le taux de greffage des résines pyridinium

Les taux de greffage calculés à la fois par l'augmentation de masse et par les résultats d'analyse élémentaire permettent de conclure quant à un excellent taux de greffage (probablement quantitatif). Une tentative de désorption de la résine pyridinium **67b** dans l'eau n'a d'ailleurs pas permis de mettre en évidence un relargage important de pyridine libre par la matrice polymérique.

Cependant, l'augmentation de masse donne des résultats bien trop importants en terme de taux de greffage (121% pour **67a** et 130% pour **67b**). Cette méthode de calcul n'est pas suffisamment précise et robuste pour être appliquée à l'ensemble des polymères synthétisés.

Le calcul du taux de greffage par l'analyse élémentaire est, par contre, plus proche de la réalité et a été généralisé pour l'ensemble des polymères greffés.

La tentative de mise en place d'un calcul théorique permettant de simuler le greffage d'une résine n'a pas été concluant. Les résultats du calcul sont trop éloignés des valeurs expérimentales de l'analyse élémentaire.

Le greffage des résines peut être également évalué de manière qualitative par l'utilisation de la spectroscopie infrarouge en recherchant les bandes caractéristiques dues au greffage (ou à la modification) des motifs à la surface de la résine.

9.6 Caractérisation de la résine pyridinium par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge a permis de confirmer le greffage par la détermination des bandes de vibration caractéristiques du greffon pyridinium. Afin d'avoir une référence de ces bandes caractéristiques, les synthèses de deux dérivés : le chlorure de benzylpyridinium **10** et le dibromure de 1,1'-xylène-bis(pyridinium) **11** ont été réalisées par l'application des protocoles de synthèse décrits respectivement par Li *et al.*¹¹³ et Musilek *et al.*¹¹⁴ (Fig. **75**).

Fig. 75 : Synthèse du chlorure de benzylpyridinium **10** et de dibromure de 1,1'-xylène-bis(pyridinium) **11**.

La Fig. 76 présente, de haut en bas, les spectres infrarouge ATR entre 600 et 2000 cm^{-1} , de la résine de Merrifield vierge **50**, du chlorure de benzylpyridinium **10**, du dibromure de 1,1'-xylène-bis(pyridinium) **11** et de la résine pyridinium **67b**. Les spectres sont enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} , mais aucune information particulière interprétable n'est accessible entre 2000 et 4000 cm^{-1} .

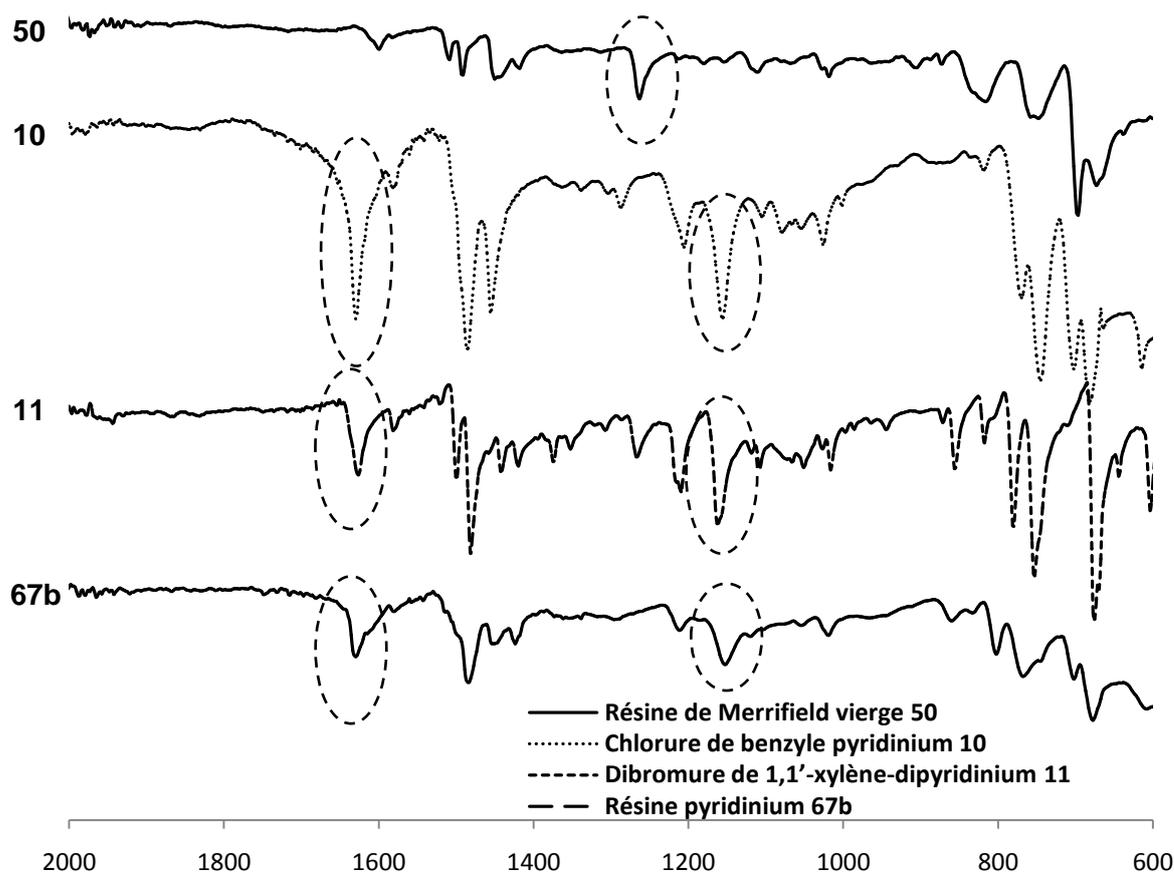


Fig. 76 : Comparaison des spectres infrarouge des résines **50** et **67b** avec le chlorure de benzylpyridinium **10** et le dibromure de 1,1'-xylène-bis(pyridinium) **11** .

La comparaison des spectres de la résine vierge **50** et de la résine pyridinium **67b** montre la disparition totale d'une bande de vibration à 1263 cm^{-1} . Cette bande est attribuée aux vibrations de la liaison $\text{CH}_2\text{-Cl}$ comme présenté par Avram *et al.*¹¹⁵. Cette bande est remplacée par l'apparition d'une bande à 1153 cm^{-1} en même temps que l'apparition d'une bande à 1630 cm^{-1} qui est attribuable à la formation de la liaison $\text{CH}_2\text{-N}^+$ et confirmée par sa présence dans les deux molécules **10** et **11**.

Les deux bandes à 1483 et 1630 cm^{-1} , sont quant à elles attribuées aux vibrations des liaisons C=C et C=N^+ du pyridinium.

La résine pyridinium **67a** présente un spectre infrarouge quasiment identique à celui de la résine pyridinium **67b**. L'analyse infrarouge permet de conclure qualitativement quant à l'efficacité du greffage des résines pyridinium (**67a** et **67b**).

9.7 Microscopie électronique à balayage

9.7.1 Principe de fonctionnement

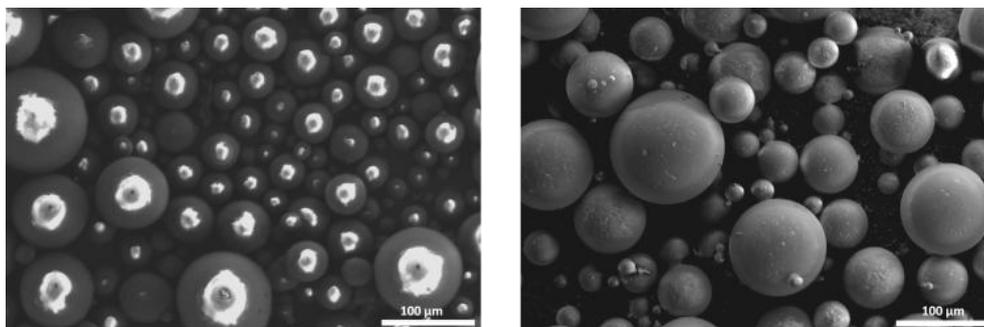
La microscopie électronique à balayage (ou MEB) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

Le MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. En microscopie optique classique, la lumière visible réagit avec l'échantillon et les photons réfléchis sont analysés par des détecteurs ou par l'œil humain. En microscopie électronique, le faisceau lumineux est remplacé par un faisceau d'électrons primaires qui vient frapper la surface de l'échantillon et les photons réémis sont remplacés par tout un spectre de particules ou rayonnements : électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger ou rayons X. Ces différentes particules ou rayonnements apportent des types d'informations complémentaires sur la matière dont est constitué l'échantillon.

Le mode par électrons secondaires utilisé par la suite est le mode classique d'observation de la surface de l'échantillon.

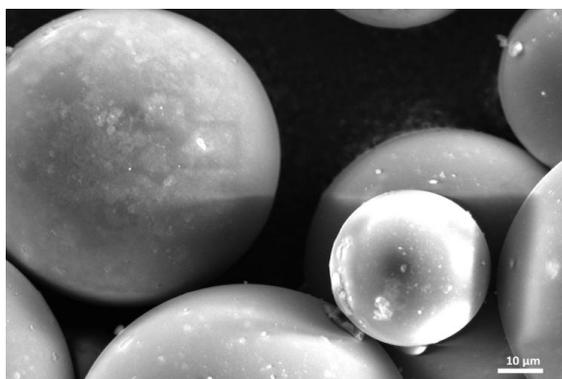
9.7.2 Application à la résine pyridinium

La forme des billes de la résine de Merrifield vierge **50** et celle des billes de résine pyridinium **67b** ont pu être observées par cette méthode. Les résultats obtenus permettent d'observer une différence significative entre la résine de Merrifield vierge **50** (Fig. 77 à gauche) et la résine de Merrifield pyridinium **67b** (Fig. 77 à droite).



*Fig. 77 : Microscopie électronique à balayage par électron secondaire à 3 kV : gauche) Résine de Merrifield vierge **50** droite) Résine pyridinium **67b**.*

Tout d'abord, les billes de la résine vierge **50** supportent mal une tension de 3 kV. Elles se décomposent (points blancs à la surface des billes) alors que la résine pyridinium **67b** ne montre aucune détérioration, même à 10 kV (Fig. 78).



*Fig. 78 : Microscopie électronique à balayage par électron secondaire à 10 kV de la résine pyridinium **67b**.*

Cette différence de comportement pourrait s'expliquer par la présence de motifs pyridiniums qui subiraient moins de détérioration que les motifs chlorométhylés lorsqu'ils sont soumis à un bombardement d'électrons.

De plus, le diamètre moyen des billes a pu être mesuré et celui-ci est compris entre 7 et 105 µm pour la résine vierge **50** (le fournisseur indique une dispersion entre 37 et 74 µm) et

entre 7 et 150 μm pour la résine greffée **67b**. Cette augmentation du diamètre moyen conforte l'hypothèse du greffage des billes et de leurs augmentations de masse. Il est également à remarquer que ces billes conservent leur forme initiale après le greffage.

9.8 Synthèse d'analogues de la résine pyridinium

9.8.1 Stratégie de synthèse

La pyridine est un petit motif qui peut pénétrer et se greffer facilement à la surface du polymère comme il a été vu précédemment. Afin de tester la réaction de greffage de molécules plus grosses et plus volumineuses, l'introduction de motifs de type alcool benzylique a été tentée tout en conservant un potentiel d'ancrage sur la résine de Merrifield *via* une pyridine. Cette stratégie permet également de créer des résines avec des bras d'ancrage plus longs, permettant ainsi d'imaginer un polymère plus accessible aux greffons et donc plus réactif (Fig. 79).

Fig. 79 : Stratégie de synthèse d'une résine de Merrifield possédant des bras d'ancrage plus longs.

Cette résine permet également d'ouvrir l'opportunité de greffer plus d'un pyridinium par motif et ainsi d'augmenter le nombre de pyridinium par gramme de résine. Ainsi, la synthèse d'une résine comportant deux pyridiniums par greffon peut être imaginée. Cette approche permettra dans la suite de ce travail de tester les capacités de rétention de bactéries d'un polymère cationique possédant deux groupements pyridinium proches dans l'espace.

9.8.2 Synthèses

La molécule de 4-(4-pyridinylméthoxy)-benzène-méthanol **15** a été synthétisée par une substitution nucléophile du 4-(hydroxyméthyl)phénol sur la 4-(chlorométhyl)pyridine.

L'utilisation d'une base faible (K_2CO_3) permet la déprotonation uniquement du phénol ($pK_a = 10$) et non de l'alcool benzylique ($pK_a = 15.4$) conduisant à la formation du produit attendu (Fig. **80**).

*Fig. 80 : Synthèse des résines de Merrifield greffées **62a** et **62b**.*

La molécule **15** est ensuite incorporé à la résine de Merrifield vierge **50**. Cette synthèse a été essayée dans deux solvants différents : le toluène qui permet d'obtenir la résine **62a** et l'acétonitrile qui permet d'obtenir la résine **62b**. A l'exception du solvant, le protocole de synthèse est rigoureusement identique. Les résultats d'analyse élémentaire des résines greffés sont également les mêmes (2.38 et 2.39% d'azote) et les taux de greffages calculés sont de 89.9% pour la résine **62a** et de 89.1% pour la résine **62b** aussi.

Ces nouvelles résines **62** sont particulièrement intéressantes du fait de la similitude structurelle avec la résine de Wang. Comme le décrit Wang⁵⁰ dans la synthèse de sa résine, une présence de groupements méthoxy- est quantifiable après traitement (2.7% et 0.3% restant). L'utilisation d'une substitution directe du pyridinium ne nécessitant pas l'utilisation d'une base, la synthèse d'une résine ainsi fabriquée n'est pas sujette à cette pollution (Fig. **81**).

*Fig. 81 : Comparaison de la synthèse de la résine **62** avec la synthèse de la résine de Wang⁵⁰.*

Pour la suite de la synthèse, la résine **62a** est utilisée pour tester la réaction de chloration des groupes hydroxyméthyles incorporés, conduisant cette fois-ci à un nouvel analogue de la résine de Merrifield, la résine **63** (Fig. **82**).

Fig. 82 : Synthèse de la résine chlorométhylée 63.

Pour cela, la résine est mise en suspension dans le chloroforme à 0°C et additionnée lentement de chlorure de thionyle pur. Il est à souligner que l'analyse élémentaire de la résine après réaction, filtration et de nombreux rinçages donne un pourcentage de soufre de 1.09%. Ce pourcentage ne peut être expliqué que de deux manières possibles : soit par la présence de chlorosulfites (-SO₂Cl) n'ayant pas subi l'attaque nucléophile de l'ion chlorure, soit par le chlorure de thionyle introduit, qui se transforme en dioxyde de soufre (SO₂) après hydrolyse et qui resterait piégé dans la résine (Fig. **83**).

Fig. 83 : Mécanisme réactionnel de la chloration par SOCl₂.

La synthèse est poursuivie malgré cette présence de composés soufrés. Ainsi, la résine **62a**, par le calcul du taux de greffage proposé précédemment (§9.3), est substituée à 89.9%, cela signifie que les 10.1% restant sont des groupements chlorométhyles n'ayant pas réagi. Afin d'obtenir une résine comportant un maximum de motifs pyridinium, une réaction de « capping » de la résine **62a** est tentée. Le but est de substituer le maximum des 10.1% de chlorométhyles restants par des pyridines. Pour cela, le protocole de synthèse des résines pyridinium **67** est repris pour obtenir la résine **64**. (Fig. **84**).

Fig. 84 : Voie de synthèse de la résine pyridinium 66.

La résine **64** contient 2.74% d'azote, équivalent à 1.96 mmol de pyridinium/g de résine. Si l'on néglige la variation de masse et que l'on compare cette valeur à la valeur de la résine **62** de 1.70 mmol de pyridinium/g, une différence de 0.26 mmol/g est obtenue. Cette différence correspond aux pyridiniums ajoutés et correspond également à 13% (0.26/1.96) des motifs substitués. Ce nombre est tout à fait cohérent avec les 10.1% de chlorométhyles restant de la résine **62**. En conclusion, la résine **64** ne contient plus ou presque plus de motifs chlorométhyles substituables et un nombre de motifs pyridiniums greffés supérieur a pu être atteint.

Une fois cette résine obtenue, la réaction de chloration est de nouveau tentée et cette fois ci la résine chlorée **65** est obtenue **sans présence de soufre** dans l'analyse élémentaire. Le pourcentage d'azote reste quasiment le même (2.74% avant réaction, 2.78% après réaction), ce qui confirme la solidité du greffage.

La résine **65** est mise en réaction avec la pyridine et la résine **66** obtenue contient cette fois ci 3.33% d'azote. Le calcul théorique du nombre de motifs/g de cette résine devient très hypothétique car la résine est désormais substituée par au moins deux motifs différents : un motif pyridinium (avec 1 azote/motif) et un motif 4-[4'-methylpyridiniumchlorure-phenoxy-méthyl]-pyridinium (avec 2 azotes/motif). L'augmentation de la valeur de l'azote (de 2.78% à 3.33%) permet cependant de confirmer le greffage d'unités pyridinium supplémentaires, sans pouvoir en donner une valeur précise. Un nombre de mmoles d'azote total est également obtenu, égal à 2.38.

9.9 Synthèse et caractérisations d'un analogue fluorescent de la résine pyridinium

9.9.1 Synthèse

Afin d'obtenir plus d'informations sur la capacité du motif pyridinium à servir de point d'ancrage sur la résine de Merrifield, la synthèse d'autres résines a été réalisée en incorporant différents motifs. En ce sens, nous avons pensé que l'incorporation d'un motif pyrène permettrait de confirmer l'efficacité du greffage par l'apport de propriétés de fluorescence au support. Pour cela, le dérivé pyridiné 4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-pyridine **23** est greffé sur la résine de Merrifield vierge **50** (Fig. **85**).

La synthèse de l'analogue benzylé **24** a également été réalisée en solution, servant ainsi de modèle pour comparaison avec la résine **68**.

*Fig. 85 : Synthèse d'une résine polystyrène pyrénique **68** et de son analogue monomère **24**.*

La molécule 4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-pyridine **23** est obtenue par amination réductrice du 1-pyrèncarboxaldéhyde avec la 4-aminopyridine. La synthèse a d'abord été tentée en solution dans différents solvants anhydres (MeOH, CH₃CN, EtOH et CHCl₃) en utilisant des conditions (classiques) proches de celles décrites par Song *et al.*¹¹⁶ pour l'amination réductrice du 1-pyrèncarboxaldéhyde sur la molécule de Tris (Fig. **86** à gauche)

sans pouvoir cependant obtenir l'imine intermédiaire. Sa formation a ensuite été tentée dans l'eau en utilisant les conditions de Tanaka *et al.*¹¹⁷ sans succès (Fig. **86** à droite).

Fig. 86 : Amination réductrice de la molécule de Tris sur le 1-pyrèncarboxaldéhyde par Song et al.¹¹⁶ (à gauche) et conditions de Tanaka et al.¹¹⁷ de formation d'une imine dans l'eau (à droite).

L'imine a finalement pu être formée avec un bon rendement en mixant directement les réactifs sans solvant, à l'état solide, dans un four à boules à 175°C. Ces conditions particulières sont inspirées du savoir-faire du laboratoire ainsi que de la synthèse d'azométhines par Schmeyers *et al.*¹¹⁸ de 1998. La différence majeure porte sur le fait qu'il est nécessaire de chauffer les deux solides afin d'obtenir la réaction. Cette différence peut peut-être s'expliquer par la différence de température de point de fusion des produits utilisés. Les points de fusion du 1-pyrèncarboxaldéhyde et de la 4-aminopyridine sont respectivement compris entre 123-126°C et 155-158°C alors que Schmeyers *et al.* utilisent en mélange, soit une amine, soit un aldéhyde à bas point de fusion (~40-60°C).

Lors de la réaction, les solides fusionnent et une condensation de vapeur d'eau est visible au sommet du tube en verre du four à boules. Une fois obtenue, l'imine est solubilisée dans l'éthanol anhydre et directement réduite par NaBH₄. Le rendement de 69% obtenu est probablement dû à la faible stabilité de l'imine formée qui, même si c'est une base de Schiff, peut s'hydrolyser à la moindre trace d'eau.

L'analogue **24** est obtenu propre par précipitation lorsqu'il est mis en réaction avec du chlorure de benzyle sur le dérivé pyridiné **23** dans le toluène. La RMN confirme la formation du dérivé pyridinium et non de l'amine tertiaire.

La résine pyrène-pyridinium **68** est obtenue par substitution de la résine de Merrifield vierge **50** par le dérivé pyridiné **23**. Lors de la formation de cette résine, la variation de

masse mesurée est de + 33.7%, le pourcentage d'azote de l'analyse élémentaire est de 3.35%, ce qui correspond en utilisant les calculs vus précédemment, à **1.20** mmol de motifs pyridinés/g de résine. Le nombre total de motifs greffés dans la résine est de $2.95 / 1.337 =$ **2.21** mmol de motifs/g (en tenant compte de l'augmentation de masse). Cela permet de calculer un taux de greffage de **54%** de la résine.

Malgré la taille relativement importante du greffon (masse molaire de 308.38 g/mol) comparé à une simple pyridine (masse molaire de 79.10 g/mol), le greffage concerne plus de la moitié des groupes chlorométhyles de départ. Ce résultat est très encourageant pour l'utilisation d'une pyridine comme élément d'ancrage sur la résine de Merrifield.

L'incorporation d'un motif pyrénique entraîne l'acquisition de propriétés de fluorescence de la résine qui vont être évaluées de manière qualitative (microscopie optique) et quantitative (mesure de la fluorescence à l'état solide).

9.9.2 Microscopie optique de la résine 68

Après avoir obtenu la résine pyrène-pyridinium **68**, celle-ci a été placée sous une lampe UV à 365 nm dans la pénombre. Les billes de résine ont tout de suite pris une coloration bleue démontrant l'incorporation d'un fluorophore à cette longueur d'onde (le pyrène). Des photos ont pu être prises de la résine de Merrifield vierge **50**, à la lumière du jour et de la résine pyrène-pyridinium **68** sous irradiation à 365 nm avec un microscope optique en grossissement 25 fois (Fig. 87).

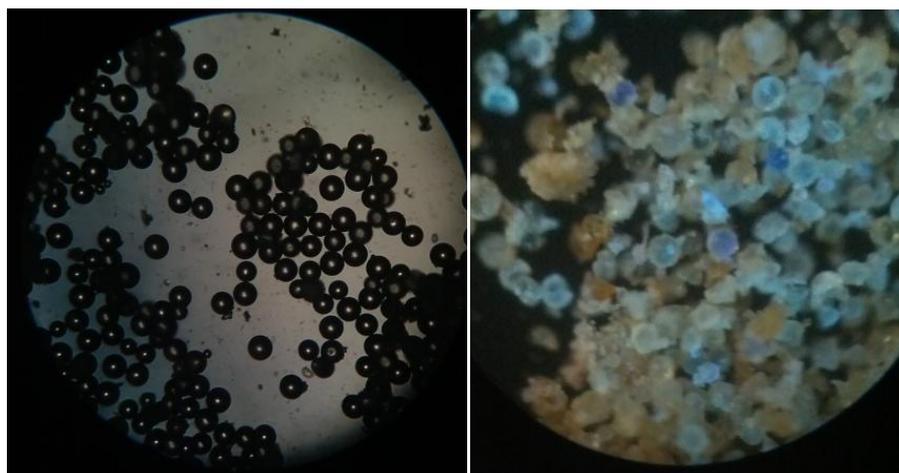


Fig. 87 : Billes de résine de Merrifield vierge 50 à la lumière blanche (à gauche) et billes de résine pyrène-pyridinium 68 sous une lampe UV à 365 nm (à droite).

La détérioration des billes lors de la synthèse est constatée. Ces billes ne conservent plus tout à fait leur forme originelle. La fluorescence observée peut être quantifiée en utilisant un spectrofluorimètre comme présenté ci-dessous.

9.9.3 Mesure de fluorescence à l'état solide

9.9.3.1 Principe de fonctionnement

Le phénomène de fluorescence met en jeu deux mécanismes successifs, l'absorption d'un photon par la molécule fluorescente (fluorophore) qui est suivie de l'émission d'un photon de plus basse énergie par ce même fluorophore. Un spectrofluorimètre est un appareil qui sera capable de réaliser les spectres d'absorption et d'émission d'un composant, c'est à dire de mesurer la capacité d'un composant à absorber ou à émettre des photons à différentes longueurs d'ondes.

9.9.3.2 Spectres d'excitation

Afin de connaître la longueur d'onde d'excitation optimale pour mesurer l'émission, des spectres d'excitation de 250 à 370 nm ont été réalisés à l'état solide sur les composés fluorescents suivant : le 1-pyrèncarboxaldéhyde, la 4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-pyridine **23** et la résine pyrène-pyridinium **68** (Fig. 88).

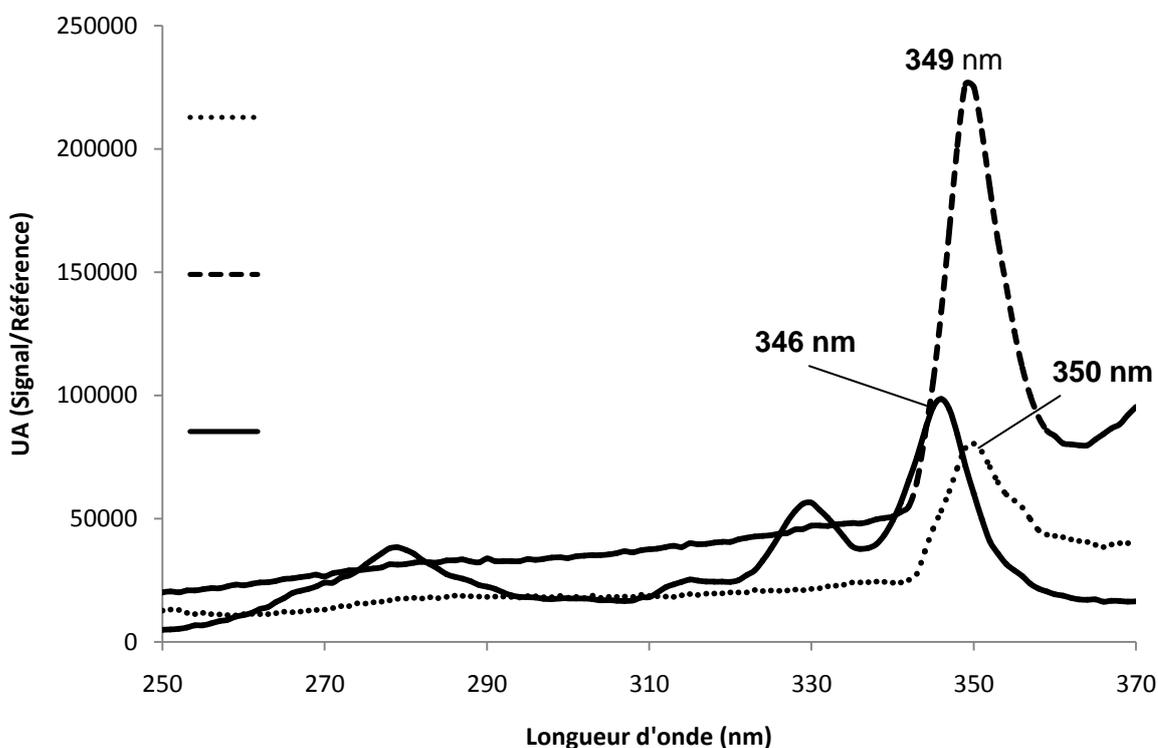


Fig. 88 : Spectres d'excitation du 1-pyrèncarboxaldéhyde, de la 4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-pyridine **23** et de la résine pyrène-pyridinium **68**

Les spectres d'excitation fournissent une excitation optimale du motif pyrène autour de $\lambda = 350$ nm. Les spectres d'émission de ces composés ont tous été enregistrés à cette longueur d'onde.

9.9.3.3 Spectres d'émission

Les spectres d'émission ont été enregistrés après une excitation des molécules à 350 nm (Fig. 89).

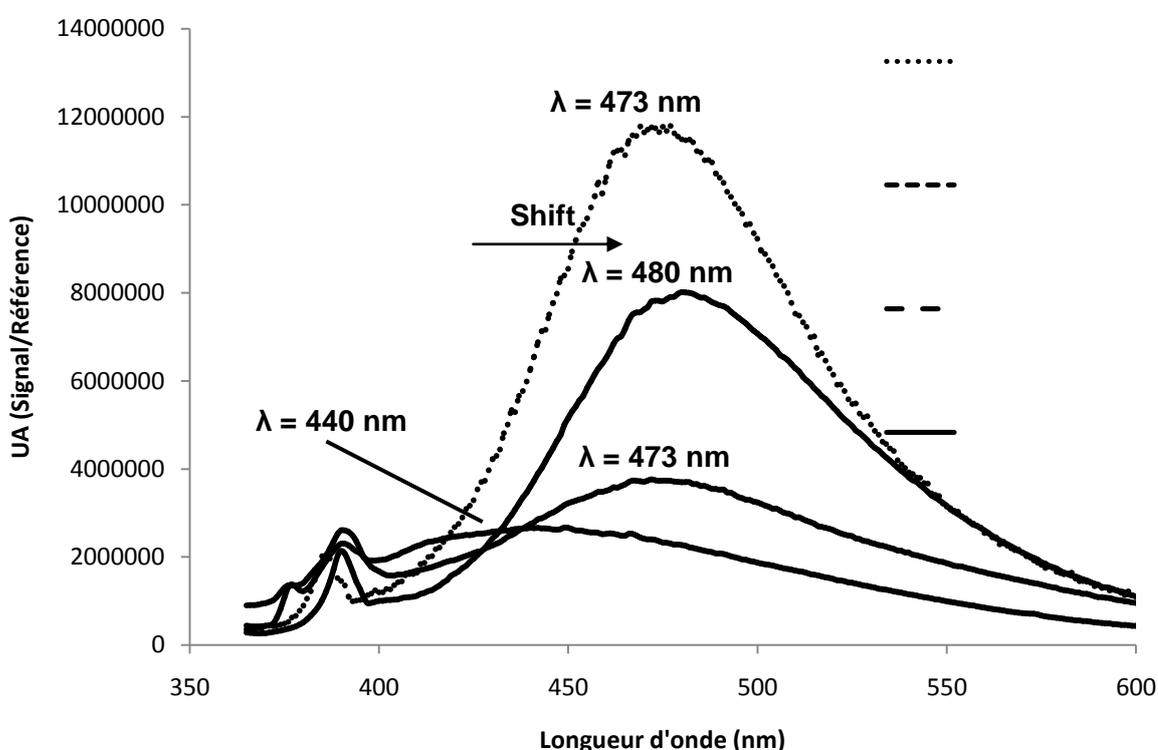


Fig. 89 : Spectres d'émission des composés **23**, **67b**, **68** et du 1-pyrèncarboxaldéhyde.

La résine pyridinium **67b** montre une faible fluorescence à 440 nm. La résine pyrène-pyridinium **68**, quant à elle, présente une forte émission à 473 nm. Cette forte émission ne peut être attribuée qu'au greffage de motifs pyréniques ainsi qu'en attestent les spectres du 1-pyrèncarboxaldéhyde et de l'analogue pyrénique **23** respectivement à 473 et 480 nm.

Cette étude a permis de confirmer par une autre analyse, l'efficacité du greffage de la résine pyrène-pyridinium **68**. Afin de conserver cette méthode d'analyse des polymères

greffés, il a été tenté de substituer un fluorophore sur les calixarènes monosubstitués destinés à être greffés sur résine.

9.10 Synthèse d'un calixarène fluorescent

L'ajout d'une sonde fluorescente sur le calixarène **27** a donc été tenté afin d'obtenir un greffon qui pourrait être incorporé sur un polymère et conférer à ce dernier, tout en jouant le rôle de traceur de greffage, des propriétés de fluorescence. La synthèse n'a pas pu aboutir car la substitution d'un second phénol du calixarène n'a jamais réussi dans les conditions testées. L'introduction a été tentée en substituant en premier la chaîne propyl-nitrobenzène puis la chaîne pyrènebutyrique. Elle a également été tentée dans l'autre sens mais le composé bi-substitué n'a pu être obtenu (Fig. **90**).

Fig. 90 : Tentative de formation d'un calixarène fluorescent greffable sur support solide.

Le calixarène mono-pyrényle **38** s'obtient par réaction du calixarène **28** avec le 1-(4-Bromobutyl)-pyrène **6** à reflux de l'acétonitrile en présence de NaHCO_3 comme base et de KI comme activateur. La poudre jaune pâle obtenue avec un rendement modeste de 25% donne une couleur bleutée en solution sous irradiation de la lampe UV à 365 nm.

Le 1-(4-Bromobutyl)-pyrène **6** est rapidement fabriqué selon Lampkins *et al.*¹¹⁹ par réduction à l'hydrure d'aluminium lithium de l'acide 1-pyrène butyrique en alcool (composé **5**) puis par sa bromation par un mélange *tétra*-bromure de carbone et triphénylphosphine.

L'incorporation du deuxième substituant, le 1-(3-bromopropyl)-4-nitrobenzène **9**, en position alternée sur **38** a été tentée en utilisant les conditions de Regnouf de Vains *and coll.*¹²⁰, i.e. dans l'acétonitrile à reflux, en présence de 0.6 éq. de K₂CO₃ et de 1.0 éq. de dérivé bromé durant 48 h. Cependant, malgré l'ajout de KI, la plaque CCM et la RMN n'ont pas permis d'observer la formation d'un nouveau produit.

La formation du di-substitué voulu a également été tentée par la substitution du dérivé nitrophényl **33** par le 1-(4-Bromobutyl)-pyrène **6** dans les mêmes conditions. Une nouvelle fois, aucun produit attendu n'a pu être observé. Par manque de résultats, ces essais n'ont pas été poursuivis.

9.11 Conclusion

La clé de voute de la synthèse sur support solide est d'arriver à substituer le plus grand nombre de motifs sur le polymère. Pour cela, le motif pyridinium a été testé sous différentes formes comme substituant de la résine de Merrifield.

Tout d'abord, la pyridine seule permet d'obtenir un greffage quantitatif à la surface du polymère de Merrifield. Ce résultat a pu être vérifié par le calcul du nombre de motifs par gramme utilisant le pourcentage d'azote (%N) issu de l'analyse élémentaire. Un calcul similaire a été tenté en utilisant la variation de masse (Δm) du polymère au cours de la synthèse comme base de calcul, cependant le résultat n'est pas très réaliste. Il a donc été décidé d'utiliser dans la suite des travaux les résultats d'analyse élémentaire (en particulier le pourcentage d'azote) comme base de calcul pour déterminer le nombre de motifs par unité de masse dans les polymères greffés.

Une comparaison entre les résultats d'analyse élémentaire et les résultats d'un calcul théorique du greffage de la résine de Merrifield a également été effectuée. Malheureusement, le calcul théorique ne permet pas d'obtenir un résultat concordant à l'expérience. Ce calcul ne sera donc pas utilisé par la suite.

Le greffage quantitatif de pyridines nous a encouragés à poursuivre les essais de greffages de molécules sur la résine en utilisant la pyridine comme point d'ancrage. Pour cela, les molécules de 4-(4-pyridinylmethoxy)-benzenemethanol **15** et de 4-[(pyrène-1-yl)-

méthylamino]-pyridine **23** ont été substituées sur ce polymère. Des taux de greffages tout à fait intéressants sont obtenus et sont rappelés dans le tableau ci-dessous. (Tableau **8**).

Résines	67a et 67b	62a et 62b	68
Supports greffés			
Taux de greffage	Quantitatif	90% et 89%	54%

Tableau 8 : Comparaison des taux de greffage obtenus par l'utilisation du greffon pyridinium.

La résine **62a** a également subi avec succès des modifications de son greffon (chloration des alcools primaires, substitution par une pyridine supplémentaire). De plus la résine **68** possède des propriétés de fluorescence grâce à l'introduction du motif pyrène. Ces propriétés ont pu être observées (microscope) et quantifiées (spectrofluorimètre) confirmant une fois de plus l'efficacité du greffage. Malheureusement, les tentatives de substitution d'un fluorophore sur la partie basse d'un calixarène monosubstitué n'ont pas permis d'aboutir à la molécule attendue.

Le greffage de calixarènes a ensuite été tenté directement sur la résine de Merrifield. La spectroscopie infrarouge et l'analyse élémentaire ont permis d'obtenir une information à la fois qualitative et quantitative des taux de greffage des résines présentées par la suite.

10 Tentatives de greffage de calixarènes sur la résine de Merrifield

10.1 Introduction

L'ancrage pyridinium étant apparu très prometteur, avec des taux de greffage conséquents, son application pour le développement de calixarènes greffés sur support a été engagée. Pour cela, les deux stratégies **Bottom-Up** et **Top-Down** vues en introduction (§8.1), ont été employées et comparées pour fonctionnaliser la résine de Merrifield.

10.2 Synthèse Bottom-Up

Cette stratégie de synthèse consiste à réaliser la plus grande partie de la synthèse supportée sur le polymère. Dans cette optique, la voie de synthèse suivante a été choisie (Fig. 91).

*Fig. 91 : Voie de synthèse d'un dérivé de **Cx1** supporté sur la résine de Merrifield, greffé par un point d'ancrage pyridinium et obtenu par une stratégie Bottom-Up.*

Le précurseur **36** est obtenu en trois étapes de synthèse à partir du tétra-para-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène **28** (Fig. **92**).

Fig. 92 : Voie de synthèse du dérivé pyridiné 36.

La substitution de l'espaceur conduisant à la molécule **33** a déjà été discutée lors de la recherche du bras espaceur. La suite de la synthèse est discutée ci-dessous.

10.2.1 Réduction du groupement nitrophényl du dérivé 33 en aniline

La réduction du groupement nitro de la molécule **33** a dû être mise au point. Elle a tout d'abord été essayée plusieurs fois en utilisant une l'hydrogène gazeux dans l'éthanol en présence d'un catalyseur au palladium déposé sur charbon (Pd/C 10%). Cette méthode correspond à la méthode n°1 décrite dans la partie expérimentale mais elle a posé beaucoup de problèmes de répétabilité (Tableau **9**).

Essais	Quantités engagées (g)	Volumes d'éthanol	Temps de réaction	Rendements des produits purifiés
1	0.1	8 mL	1h30	52%
2	0.127	10 mL	2h	28%
3	0.223	20 mL	24h	60%
4	0.363	30 mL	1h	50%
5	0.4	30 mL	1h	43%
6	0.592	50 mL	2h	33%
7	0.726	60 mL	1h	50%
8	0.85	70 mL	1h30	41%
9	1.2	90 mL	2h30	51%
10	1.39	70 mL	24h	28%

*Tableau 9 : Comparaison des rendements des différentes synthèses du dérivé anilino **34** par la méthode n°1 à température ambiante.*

Les résultats obtenus par cette méthode permettent d'avoir des rendements très modeste compris entre 28% et 52%. De plus, un nouveau produit inattendu se forme sur plaque CCM.

Afin de mieux comprendre pourquoi la réaction ne fonctionnait pas correctement avec l'hydrogène gazeux, un essai en « poussant » les conditions, c'est-à-dire en utilisant un très large excès de catalyseur sur une durée de plus de 24 heures a été tenté. Le produit majoritairement obtenu a été purifié et caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). Le spectre de masse obtenu est présenté ci-dessous (Fig. **93**).

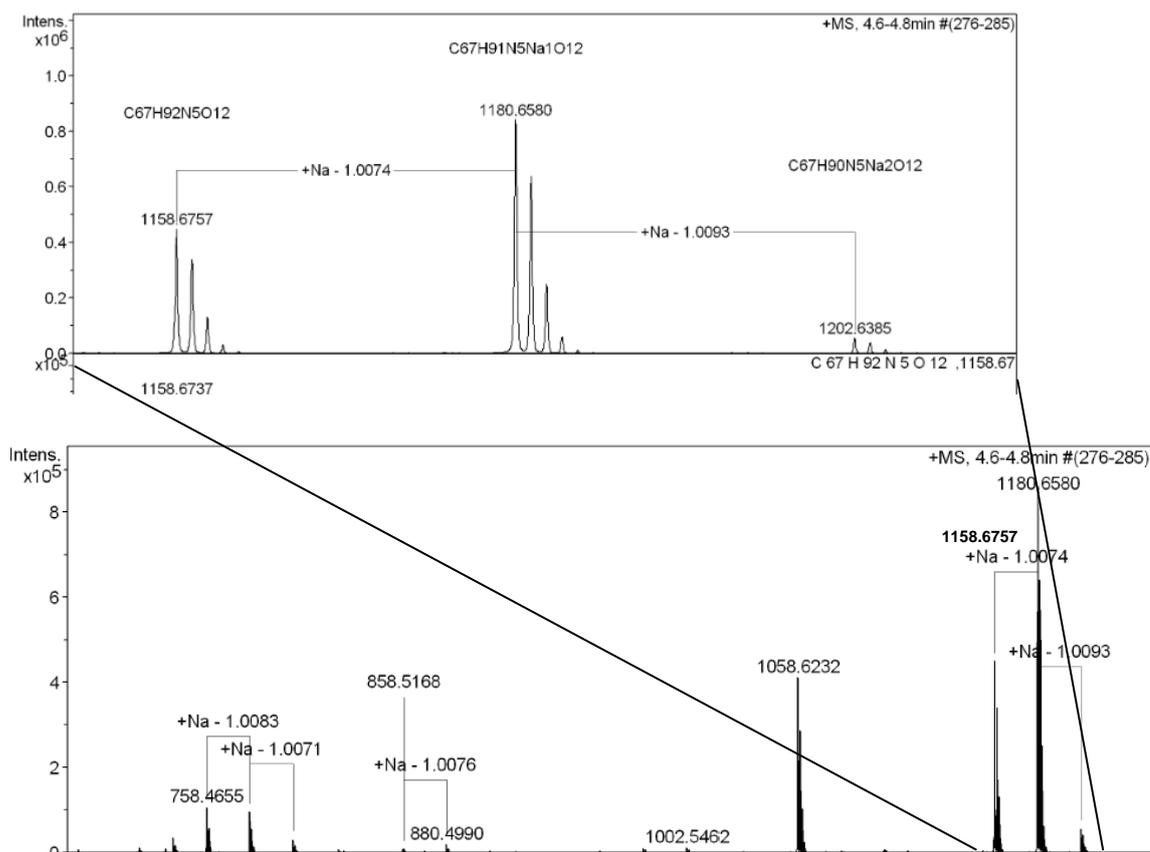


Fig. 93 : Spectrométrie de masse haute résolution (ES⁺) du produit isolé.

La seule structure possible correspondant à une masse de 1158.6757 [M + H⁺]⁺ est obtenue par introduction d'une chaîne éthyle sur l'aniline formée. Le produit secondaire obtenu au cours de cette réaction est donc le dérivé anilinoéthyle **35** (Fig. 94).

Fig. 94 : Formation du sous-produit de réaction 35.

Cette hypothèse est confirmée par le spectre RMN ¹H (Fig. 95) qui présente un triplet correspondant au CH₃ de la chaîne éthyle à 1.26 ppm ainsi qu'un quadruplet à 3.16 ppm qui correspond au CH₂ de la chaîne éthyle.

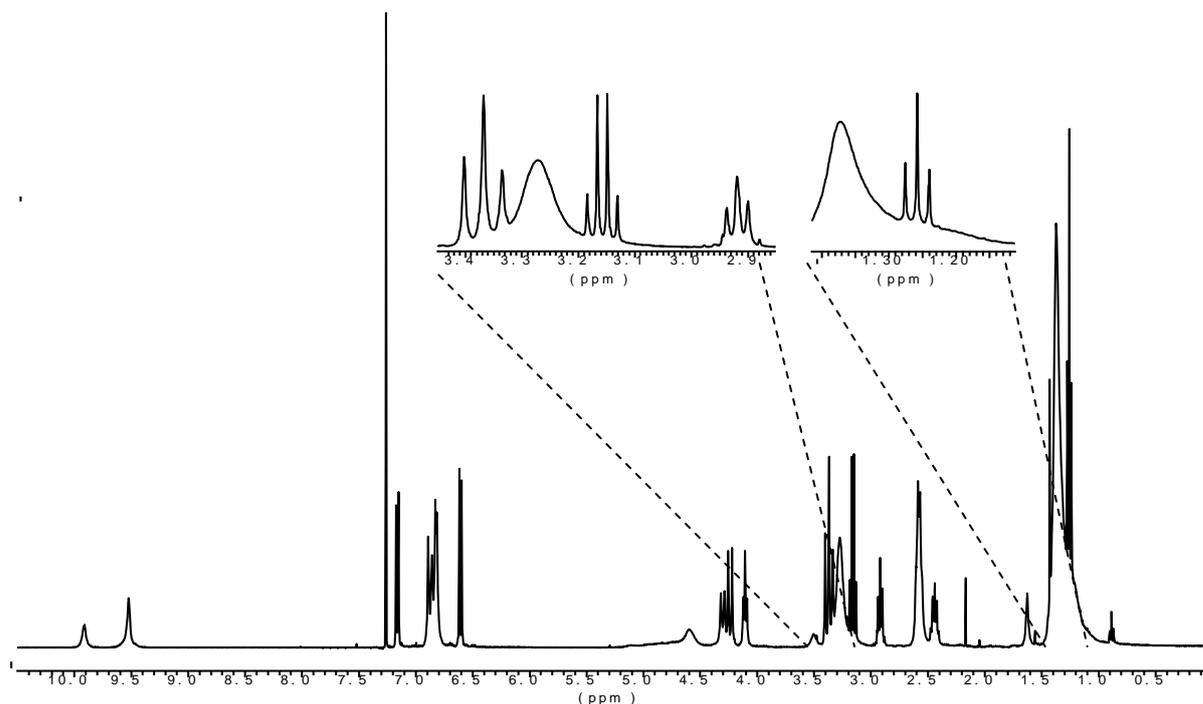


Fig. 95 : Spectre RMN de la molécule 35.

Il y a très peu d'exemples de cette réaction dans la littérature, cependant un brevet de Poirier *et al.*¹²¹ décrit la synthèse d'un dérivé anilino méthylé et éthylé d'un stéroïde par utilisation de Pd/C 10% dans l'alcool correspondant (Fig. 96). Les conditions décrites dans le brevet correspondent parfaitement aux conditions expérimentales utilisées lors de la synthèse du dérivé anilino **34**.

Fig. 96 : Synthèse d'un dérivé anilinoalkyle par utilisation de Pd/C par Poirier et al.¹²¹.

Nous avons décidé de remplacer l'hydrogène gazeux par un autre réducteur, l'hydrazine monohydrate, toujours en présence de Pd/C 10% (méthode n°2). Ces conditions sont inspirées des travaux de Danila *et al.*¹²² qui utilisent cette méthode pour réduire des groupements nitro aromatiques portés par des calix[4]arènes en position 1,3 alternés.

Cette modification s'est traduite par une nette augmentation du rendement à 89%, une bonne répétabilité de la synthèse, une vitesse bien supérieure (15 minutes seulement) et une absence de purification par chromatographie.

10.2.2 Obtention du dérivé calixarénique pyridiné **36**

Afin d'obtenir un dérivé *tétra-para*-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène pyridiné sur la partie basse, la réaction d'amination réductrice de la 4-pyridinecarboxaldéhyde sur le dérivé anilino **34** a été tentée (Fig. **97**).

*Fig. 97 : Amination réductrice du dérivé anilino **34** sur la 4-pyridinecarboxaldéhyde.*

Cette amination réductrice a été effectuée à l'état solide dans un mortier en réutilisant les conditions de Schmeyers¹¹⁸, en mettant en présence l'aniline **34** avec le dérivé 4-pyridinecarboxaldéhyde, déjà utilisé pour la synthèse du dérivé pyrénique **23** (§9.9.1). Le broyage de ces deux composés permet d'obtenir une huile marron, qui est ensuite transférée dans un ballon par solubilisation dans l'éthanol et l'imine formée (non vérifiée cependant) est immédiatement réduite par ajout de NaBH₄. Cette amination réductrice est toujours réalisée sans isoler l'imine intermédiaire qui, malgré sa nature de base de Schiff, apparaît instable et très sensible à l'humidité. Après traitement, la molécule attendue **36** est obtenue avec un rendement satisfaisant de 94% à condition de réduire l'imine le plus rapidement possible.

10.2.3 Tentatives de greffage sur la résine de Merrifield

Comme proposé dans la stratégie de synthèse mise en place (bottom-up), le greffage du dérivé calixarénique **36** sur la résine de Merrifield est suivi de 3 étapes supplémentaires de débocage et de guanidylation afin d'obtenir l'équivalent **Cx1** greffé (Fig. **98**).

Fig. 98 : Voie de synthèse de la résine 55.

La première étape de greffage est très importante car elle imposera la quantité maximum de motifs calixarènes greffés sur la résine. La synthèse de la résine **52** est réalisée par analogie aux protocoles des résines pyridinium vues précédemment, c'est à dire en mettant en suspension la résine vierge **50** dans l'acétonitrile et en ajoutant le dérivé pyridiné solubilisé dans le solvant. Le mélange est ensuite chauffé à 80°C sous agitation douce, sous argon pendant 5 jours.

Après traitement, la synthèse est poursuivie sur la résine greffée par des conditions classiques de débocage dans le dichlorométhane en présence d'acide trifluoroacétique (CH₂Cl₂/TFA : 3/1 v/v) à température ambiante pendant une nuit pour obtenir la résine **53**.

La guanidylation est réalisée sur cette résine **53** qui est mise en présence de *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*-triflylguanidine et de triéthylamine dans le dichlorométhane. Pour cela, la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*-triflylguanidine est fabriquée par la voie de synthèse suivante décrite par Baker¹²³ (Fig. **99**).

Fig. 99 : Synthèse de la N,N'-Bis(tert-butoxycarbonyl),N''triflylguanidine par Baker¹²³ et guanidylation d'une amine primaire.

Dans cette synthèse, l'anhydride trifluorométhane sulfonique est obtenu soit commercialement, soit par triple distillation de l'acide trifluorométhanesulfonique sur P₂O₅. Cette distillation est possible car l'anhydride a un point d'ébullition de 82°C alors que l'acide a un point d'ébullition de 162°C. La triple distillation est indispensable afin d'obtenir l'anhydride sans aucune trace d'acidité résiduelle, cependant le rendement de distillation est toujours compris entre 10 et 20%. Ce mauvais rendement s'explique par l'imprégnation d'une partie non négligeable du réactif dans le P₂O₅.

La guanidylation de la résine **53** permet d'obtenir des billes rouge foncé qui sont ensuite traitées une nouvelle fois dans des conditions acides (CH₂Cl₂/TFA) pour ôter les groupements protecteurs Boc, afin d'obtenir la résine finale guanidinium **54**.

10.2.4 Comparaison des résultats d'analyse élémentaire des résines greffées

Le tableau suivant (Tableau **10**) résume les résultats d'analyse élémentaire ainsi que les résultats des calculs qui en découlent, des polymères greffés obtenus par cette voie de synthèse. Il est nécessaire de préciser ici que les calculs intègrent les anions trifluoroacétates associés aux ammoniums et guanidiniums des dérivés déboqués.

	%N analyse élémentaire	Nombre d'azotes par motif greffé	Nombre de mmoles de motifs greffés par gramme	Taux de greffage (%)
Résine 50	<0.05	0	0	
Résine 52	0.64	6	$7.62 \cdot 10^{-2}$	2.58
Résine 53	0.64	6	$7.62 \cdot 10^{-2}$	2.58
Résine 54	0.96	14	$4.90 \cdot 10^{-2}$	1.66
Résine 55	1.16	14	$5.92 \cdot 10^{-2}$	2.01

*Tableau 10 : Interprétation des résultats d'analyse élémentaire sur l'azote des résines **50**, **52**, **53**, **54** et **55**. Evaluation des taux de greffage.*

La résine greffée **52** a été obtenue avec un pourcentage d'azote de 0.64%. Ce pourcentage d'azote correspond à un nombre de mmoles de motifs greffés par gramme de $7.62 \cdot 10^{-2}$. Si l'on rapporte cette valeur au nombre de motifs total de la résine, on obtient un taux de greffage de 2.58%.

Ce résultat peut sembler faible, surtout s'il est comparé aux taux de greffage obtenus lors de la synthèse des résines à pyridiniums "simples" c'est-à-dire de petite taille. Cependant, il peut être relativisé par la taille importante du greffon et son accessibilité probablement diminuée aux groupements chlorométhyles de la résine.

Le premier débocage conduisant à la résine ammonium **53** ne modifie pas le taux de greffage. Par contre, la réaction de guanidylation ne semble pas totalement efficace. En effet, si la réaction avait été totale, le nombre de motifs par gramme n'aurait pas changé ($7.62 \cdot 10^{-2}$) et le taux de greffage serait resté identique (2.58%).

La réaction de débocage finale conduisant à la résine **55**, présente elle aussi une petite incohérence, puisque le taux de greffage n'est pas censé pouvoir augmenter après la réaction de greffage sur la résine.

Les résultats obtenus lors de cette première synthèse d'un calixarène sur résine montrent clairement une incorporation d'azote, mais, en plus d'une certaine inconstance des taux de greffage calculés, une assez faible valeur pour ces derniers (~2%). Cependant, le support semble permettre des réactions successives sans perdre les motifs greffés en surface. Cette observation est confirmée par les analyses de spectroscopie infrarouge suivantes.

10.2.5 Comparaison des spectres infrarouge des résines greffées

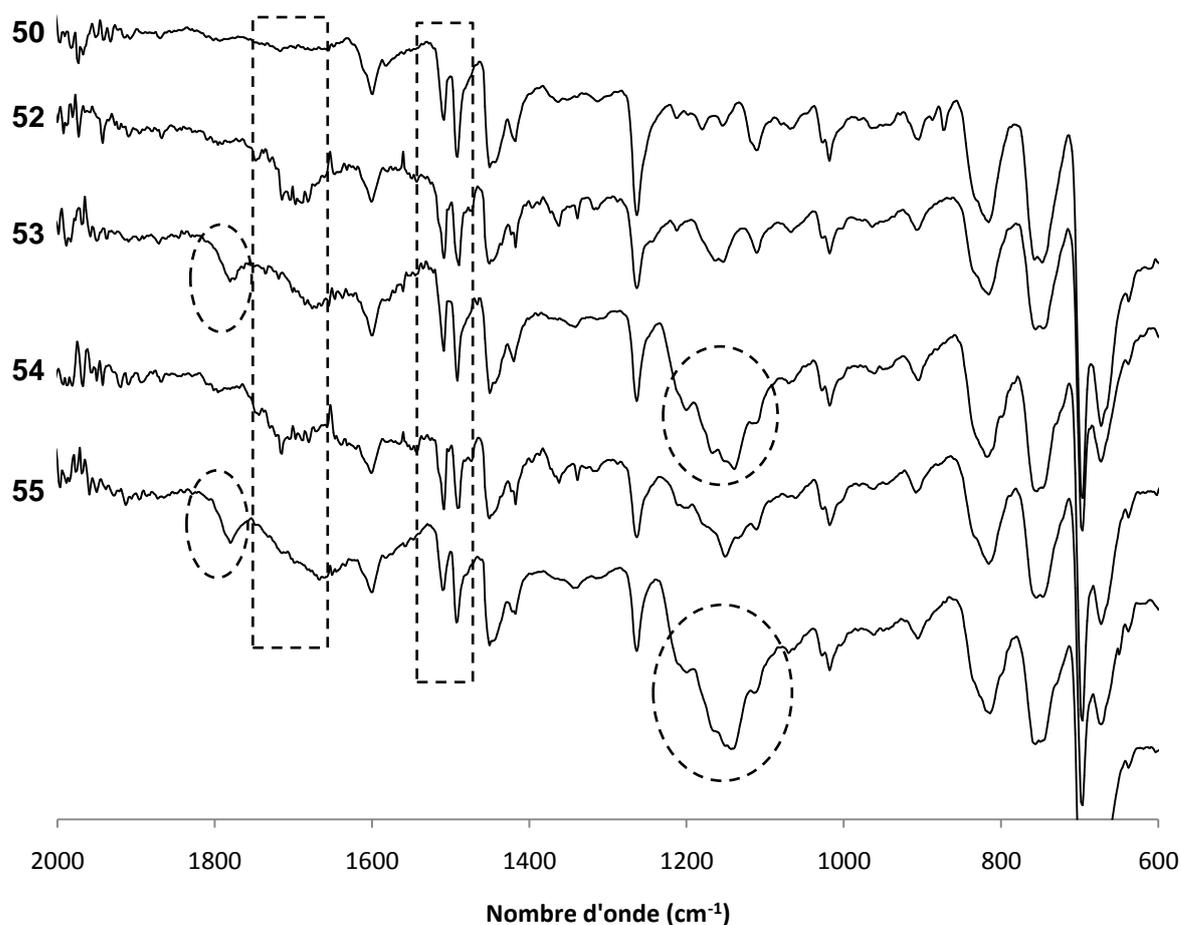


Fig. 100 : Comparaison des spectres infrarouges des résines **50**, **52**, **53**, **54** et **55**.

La comparaison des spectres infrarouges (Fig. 100) a permis d'obtenir certains indices quant à l'efficacité du greffage. Cependant, ces spectres ne présentent des différences caractéristiques que sur l'intervalle allant de 600 à 2000 cm^{-1} ; l'intervalle supérieur (de 2000 à 4000 cm^{-1}) n'est pas montré ici pour améliorer la lisibilité.

Tout d'abord, l'apparition d'une bande assez large vers 1700 cm^{-1} , présente dans toutes les résines greffées, pourrait correspondre à la bande caractéristique de la liaison $\text{C}=\text{N}^+$ du pyridinium. De plus, la comparaison de la taille des deux bandes à 1510 et 1490 cm^{-1} montre une augmentation de la taille de celle à 1510 cm^{-1} pour les résines *tétra*-(Boc-aminoéthyl) **52** et *tétra*-(Boc-guanidinoéthyl) **54**. Cette augmentation de signal est attribuable à une liaison de type amide (N-HCO) provenant des groupements Boc de ces résines.

Les résines **53** et **55** ayant subi un débocage en milieu acide (TFA), montrent quant à elles la présence de bandes larges de 1100-1200 cm^{-1} et à 1770 cm^{-1} correspondants aux

trifluoroacétates des sels d'ammonium calixaréniques formés. Ces bandes ne sont présentes que dans ces deux résines et leur absence dans la résine **54** prouve qu'ils n'y a pas de piégeage de l'acide dans la résine.

La suite du travail consiste à tenter d'obtenir la même résine **55**, mais cette fois-ci par un greffage direct sur la résine de Merrifield d'un calixarène pyridiné portant des guanidines protégées sur sa partie haute (stratégie Top-Down).

10.3 Synthèse Top-Down

10.3.1 Stratégie de synthèse

La stratégie Top-Down est une approche qui minimise le nombre de réactions sur le polymère et privilégie la synthèse en solution. Pour cela, le calixarène pyridiné **43** a été construit en quatre étapes de synthèse à partir du dérivé nitrobenzène **33** (Fig. **101**).

*Fig. 101 : Voie de synthèse du dérivé calixarénique **43**.*

Le dérivé **33** est tout d'abord déprotégé par un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$: 75/25 (v/v), puis le trifluoroacétate **39** obtenu est guanidylée par l'ajout de *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N''*-triflylguanidine dans le dichlorométhane/méthanol (1/1) en présence de triéthylamine. Le dérivé nitrobenzène **40** que l'on isole est ensuite réduit en aniline par hydrogénation catalytique (H_2 , Pd/C 10%) dans le THF. La réduction à l'hydrazine n'a pas été tentée sur ce dérivé car l'hydrogénation, cette fois-ci, a permis d'obtenir un rendement de 93% sans produits secondaires.

De façon très surprenante et à ce jour encore incomprise, cette aniline **42** présente une très forte instabilité et sa conservation au congélateur est obligatoire. Si cette molécule est chauffée dans un solvant à 40°C, elle se dégrade très rapidement (moins de 30 minutes), pour former un précipité blanc insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques classiques (CH_2Cl_2 , MeOH, EtOH, DMF, THF, Et_2O , Hexane). Cette situation est problématique pour le développement du programme.

Pour cette raison, nous avons recherché une alternative à sa transformation en solution : l'aniline **42** est en fait remise en réaction à l'état solide dans un mortier, en présence de 4-pyridinecarboxaldéhyde afin de former l'imine par broyage. Cette imine est ensuite réduite par NaBH_4 dans l'éthanol pour obtenir l'amine secondaire **43** attendue avec un rendement global de 61%. Cette dernière molécule ne possède pas l'instabilité de son précurseur et supporte une température de 100°C sans dégradation visible sur plaque CCM.

L'étape suivante de la synthèse consiste à greffer la molécule **43** sur la résine de Merrifield (Fig. **102**).

*Fig. 102 : Greffage du dérivé **43** sur la résine de Merrifield et déprotection de l'octa-Bocguanidine greffée.*

Pour ce faire, la résine de Merrifield vierge **50** est mise en suspension dans l'acétonitrile. Le dérivé **43** est ajouté solubilisé et la réaction à chaud est suivie par l'évolution de la disparition du dérivé **43** dans le milieu réactionnel sur plaque CCM. Il faut souligner que c'est l'augmentation de la température qui a permis de voir la consommation du dérivé **43**. A température ambiante et à 70°C, aucune consommation n'est visible sur plaque CCM alors qu'à 90°C, une consommation rapide est observée.

Le milieu réactionnel est traité de manière classique (filtration, rinçages et séchages) et la résine obtenue **56** est déprotégée par attaque des groupements Boc dans un mélange CH₂Cl₂/TFA afin d'obtenir le polymère **57** attendu.

10.3.2 Comparaison des résultats d'analyse élémentaire des résines greffées **50**, **56** et **57**

Le tableau suivant (Tableau **11**) résume les résultats d'analyse élémentaires obtenus lors de cette voie de synthèse.

	%N d'analyse élémentaire	Nombre d'azotes par motif	Nombre de mmoles de motifs greffés par gramme	Taux de greffage (%)
Résine 50	<0.05	0	0	
Résine 56	0.70	14	3.57 10 ⁻²	1.21
Résine 57	0.72	14	3.67 10 ⁻²	1.24

*Tableau 11 : Résultats d'analyse élémentaire et comparaison des nombres de motifs greffés par gramme des résines **56** et **57** à partir de la résine **50** à 2.95 mmoles Cl/g.*

Le greffage de la résine vierge permet d'obtenir un taux de greffage de 1.21% dans la résine **56**, qui est conservé après débocage des guanidiniums dans la résine **57**.

Cependant, ce calcul du taux de greffage montre que la stratégie Top-Down est moins efficace que la stratégie Bottom-Up (1.24% en Top-Down contre 2.01% en Bottom-Up). Plusieurs raisons peuvent être invoquées, essentiellement liées à la taille des calixarènes, leur lipophilie ou la disponibilité du bras pyridiné en fonction du solvant. Plusieurs essais complémentaires doivent être engagés à la suite de ces travaux afin d'améliorer le taux de greffage.

10.3.3 Comparaison des spectroscopies infrarouge des résines greffées

La spectroscopie infrarouge (Fig. 103) confirme l'observation de l'analyse élémentaire. Si l'on compare les résines **55** (Bottom-Up) et **57** (Top-Down), les bandes caractéristiques des $C=N^+$ (1670 cm^{-1}) et des CF_3COOH ($1100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ et 1770 cm^{-1}) sont d'autant moins visibles dans la résine **57**. L'apparition de la bande large vers 1700 cm^{-1} attribuée à la bande caractéristique de la liaison $C=N^+$ du pyridinium est également moins visible.

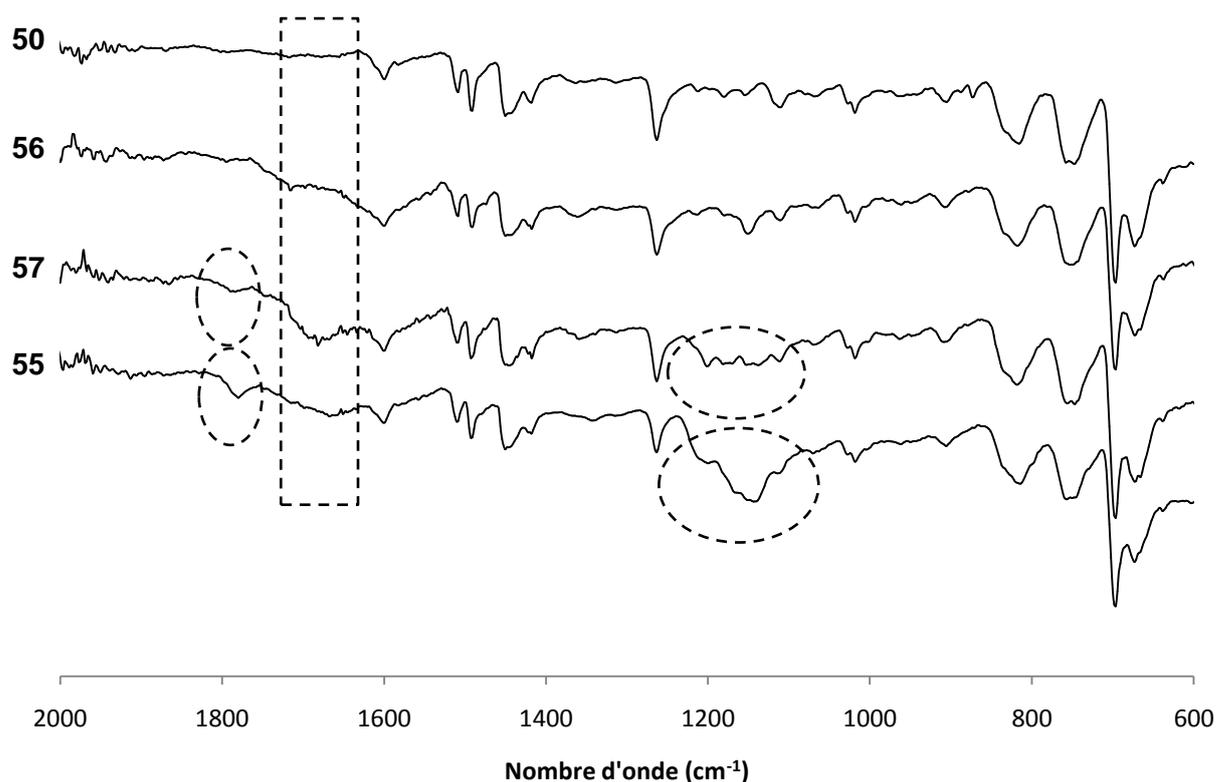


Fig. 103 : Comparaison des spectres infrarouges des résines **50**, **55**, **56** et **57**.

10.4 Synthèse Top-Down sur la résine de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde

10.4.1 Introduction

Une dernière approche de greffage Top-down de calixarènes sur la résine de Merrifield a été tentée en modifiant cette dernière par incorporation de motifs 4-pyridiniumcarboxaldéhyde sur la surface du polymère. L'idée présidant à ce travail est de tenter l'amination réductrice en utilisant le calixarène anilino **42**, pour libérer enfin les

guanidines par débocage en milieu acide. Le schéma de synthèse envisagé est présenté en Fig. 104.

Fig. 104 : Voie de synthèse Top-Down sur la résine de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde

Afin de disposer des spectres infrarouges de référence, caractéristiques de l'incorporation de la 4-pyridine carboxaldéhyde, les deux composés de référence **13** et **14** ont été préparés en solution à partir de bromure de benzyle (**13**) et de *p*-dibromoxylène (**14**) (Fig. 105) respectivement selon Ponnaiah *et al.*¹²⁴ et Howard *et al.*¹²⁵.

Fig. 105 : Synthèse du Bromure de 1-benzyl-4-formylpyridinium 13 et du dibromure de 1, 1'-(para-phénylènediméthylène)bisformylpyridinium 14.

Les spectres infrarouges de ces deux composés purs permettent de détecter, par comparaison avec la 4-pyridine carboxaldéhyde, certaines bandes caractéristiques qui pourront peut-être être retrouvées lors des greffages sur polymères (Fig. 106).

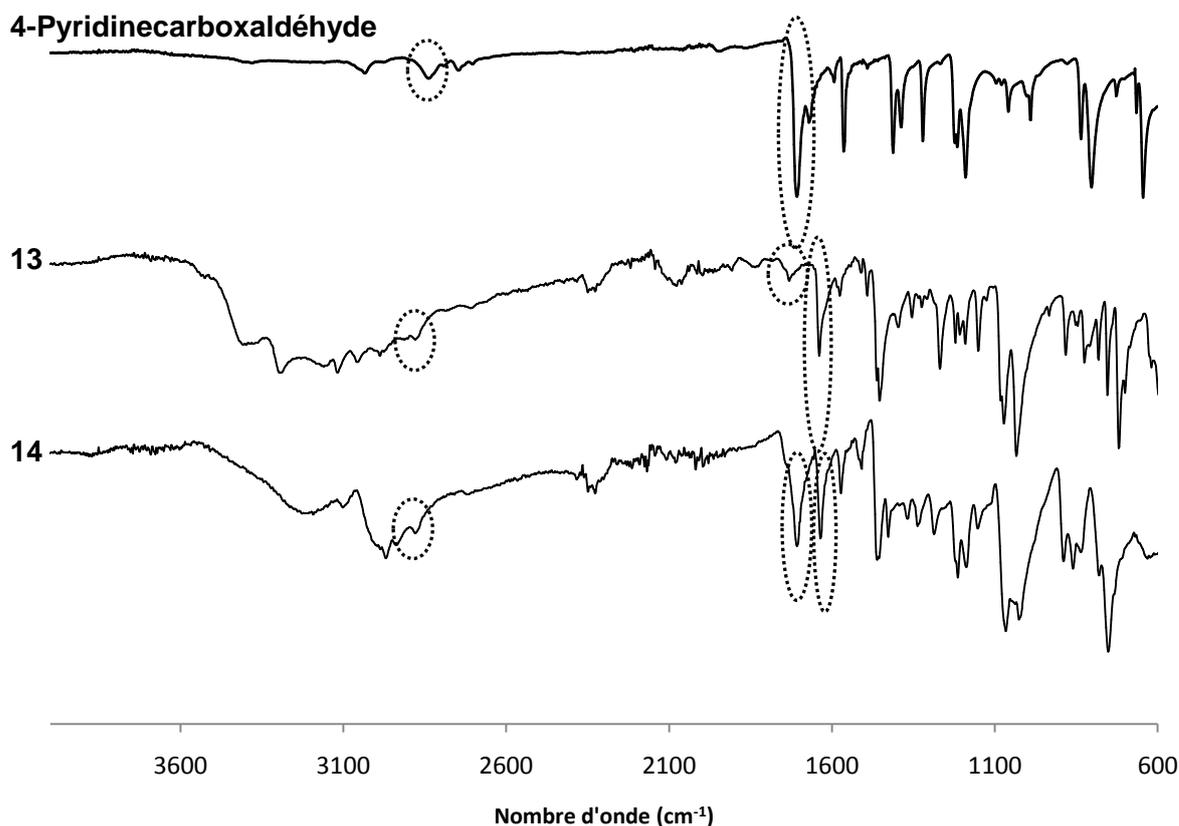


Fig. 106 : Comparaison des spectres infrarouges de la 4-pyridinecarboxaldéhyde et des pyridiniums 13 et 14.

Vers 2840 cm^{-1} , la bande correspondant à la liaison C-H aldéhydique de la 4-pyridinecarboxaldéhyde est visible. Cette bande est probablement légèrement déplacée vers

2860 cm^{-1} dans les molécules **13** et **14**. De plus, la bande C=O de l'aldéhyde de la 4-pyridinecarboxaldéhyde est très intense à 1700 cm^{-1} et cette bande est conservée dans les deux autres molécules, bien qu'atténuée grandement dans la molécule **13**. La bande caractéristique de la liaison C=N⁺ est très facilement reconnaissable dans les molécules **13** et **14** à 1630 cm^{-1} .

A l'aide de ces informations, les résultats de spectroscopie infrarouge des résines greffées issues de la résine de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde **58a** pourront être plus facilement interprétés.

10.4.2 Synthèse sur la résine de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde

La synthèse de la résine de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde (Fig. **107**) a été tentée en utilisant des conditions opératoires très proches de celles de Lemaire¹¹¹ et de la synthèse de la résine pyridinium **67**. 2 équivalents de 4-pyridinecarboxaldéhyde sont mis en présence de la résine de Merrifield vierge **50** (2.95 mmol Cl/g) dans 10 mL de toluène (**58a**). Après réaction et traitement, le pourcentage d'azote issu de l'analyse élémentaire de la résine obtenue est 0.64%. Afin d'améliorer ce résultat, le greffage a de nouveau été tenté en changeant de solvant par remplacement du toluène par l'acétonitrile (**58b**). L'analyse élémentaire donne un résultat similaire avec 0.68% d'azote.

*Fig. 107 : Synthèse des résines de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde **58a** et **58b**.*

La synthèse est poursuivie sur la résine **58a** qui a été synthétisée en plus grande quantité. Cette résine est mise en présence du dérivé calixarénique anilino **42** (instable dès 40°C) dans un mélange CH₂Cl₂/EtOH : 1/4 (v/v) à température ambiante pendant 4 jours (Fig. **108**).

Fig. 108 : Synthèse Top-Down sur la résine de Merrifield-pyridinium carboxaldéhyde.

Une faible consommation du dérivé anilino **42** est visible sur plaque CCM sans pour autant observer de dégradation. Une tentative de chauffage à 30°C de la réaction entraîne après 30 minutes une dégradation partielle du dérivé anilino **42**. Le chauffage est arrêté et la résine obtenue **59** est filtrée, rincée et séchée par un traitement classique. Cette résine est ensuite réduite par le borohydrure de sodium dans le méthanol pour obtenir la résine **60**.

Il est important de souligner que le borohydrure de sodium entraîne la réduction de l'imine, mais peut toucher également le pyridinium en le réduisant en 1,2,3,6-

tétrahydropyridine comme décrit par exemple par Wichitnithad *et al.*¹²⁶. Cette réaction a été étudiée pour la première fois par Panouse *et al.*¹²⁷ en 1951, mais ce n'est pas avant 1962 que Lyle *et al.*¹²⁸ ont pu déterminer le mécanisme réactionnel de cette réaction (Fig. **109**). Cette réaction permet d'envisager la transformation du point d'ancrage pyridinium en un point d'ancrage de type amine tertiaire.

Fig. 109 : Mécanisme réactionnel de la réduction d'un pyridinium 1,4-disubstitué.

Les guanidines de la résine **60** sont ensuite déboquées par traitement au TFA pour obtenir la résine **61**.

10.4.3 Comparaison des résultats d'analyse élémentaire des résines greffées

Le tableau suivant (Tableau **12**) résume les résultats d'analyse élémentaires des résines obtenues lors de cette voie de synthèse.

	%N d'analyse élémentaire	Nombre d'azotes par motif	Nombre de mmol de motifs greffés par gramme	Taux de greffage (%)
Résine 50	<0.05	0	0	
Résine 58a	0.64	1	$4.57 \cdot 10^{-1}$	15.49
Résine 58b	0.68	1	$4.86 \cdot 10^{-1}$	16.47
Résine 59	1.35	14	$6.89 \cdot 10^{-2}$	2.34
Résine 60	1.22	14	$6.22 \cdot 10^{-2}$	2.11
Résine 61	1.06	14	$5.41 \cdot 10^{-2}$	1.83

*Tableau 12 : Résultats d'analyse élémentaire et comparaison des nombres de motifs greffés par gramme et des taux de greffage des résines **50**, **58**, **59**, **60** et **61**.*

Les résines greffées **58a** et **58b** ont été obtenues avec des pourcentages d'azote faibles de 0.64 et 0.68%. Le nombre de mmoles de motifs greffés par gramme est très loin de la capacité de la résine de Merrifield, ce qui signifie qu'il reste beaucoup de groupements chlorométhyles non substitués dans la résine. A ce jour, cette différence par rapport à la résine **67** n'est pas expliquée.

La réaction avec le calixarène anilino **42** conduit à un pourcentage d'azote de 1.35%, ce qui confirme l'incorporation de nouvelles structures azotées à la surface de la résine **59**. Cependant, le nombre de mmoles de motifs greffés par gramme chute presque d'un facteur dix, indiquant que peu d'imines se sont formées. Il est très difficile de calculer précisément le nombre de motifs calixaréniques greffés car le pourcentage d'azote ne permet pas de faire la discrimination entre les différents motifs azotés de la résine : d'un côté les sous-unités pyridine-carboxaldéhyde qui n'ont pas réagi et d'un autre côté les imines calixaréniques formées (Fig. **110**).

*Fig. 110 : Représentation de la résine **59** greffée avec différents motifs azotés.*

Les résines **60** et **61** conservent des pourcentages d'azote correspondant à des taux de greffage de l'ordre de 2%, quasiment équivalents à ceux de la synthèse en bottom-up. Ceci étant, il faut relativiser ce taux de greffage car les unités pyridinium-carboxaldéhyde participent pour une grande partie au pourcentage d'azote, ce qui signifie que le taux de greffage des motifs calixaréniques est en réalité assez bas.

10.4.4 Comparaison des spectres infrarouge des résines greffées

Les spectres infrarouge des résines synthétisées sont présentés ci-dessous (Fig. 111).

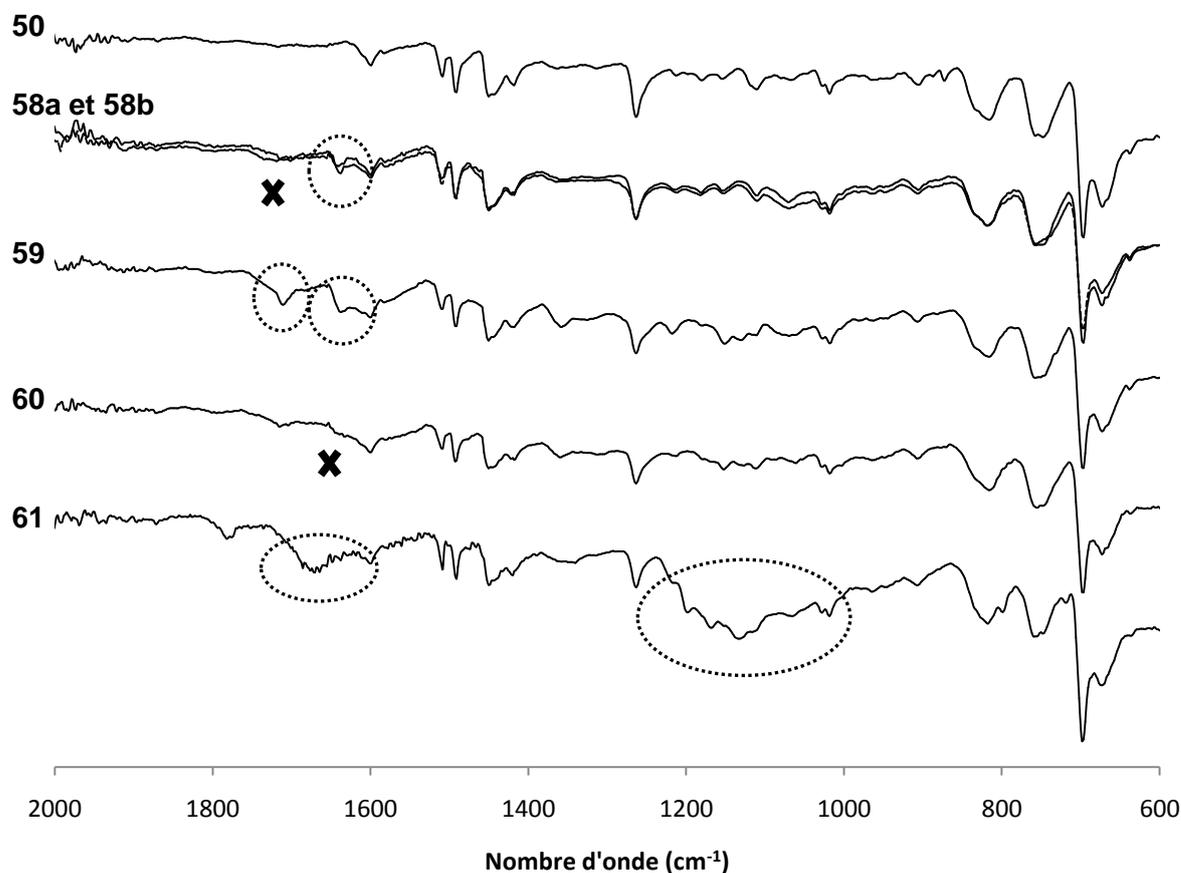


Fig. 111 : Comparaison des spectres infrarouges des résines **50**, **58a**, **58b**, **59**, **60** et **61**.

Ces spectres infrarouge permettent d'obtenir une information importante sur la réduction du groupe pyridinium par NaBH_4 . En effet, l'apparition de la bande caractéristique de la liaison $\text{C}=\text{N}^+$ est visible à 1630 cm^{-1} lors de la synthèse des résines **58a**, **58b** et elle est conservée dans la résine **59**. Cependant, après réduction (résine **60**) cette bande disparaît totalement confirmant ainsi la disparition des pyridiniums à la surface du polymère.

Cette région du spectre est malheureusement masquée par les bandes larges des trifluoroacétates dans la résine **61** à 1670 cm^{-1} . La bande très large des trifluoroacétates est d'ailleurs également visible entre $1100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$.

Etrangement, les bandes caractéristiques de l'aldéhyde (C-H à 2860 cm⁻¹ et C=O à 1700 cm⁻¹) qui étaient présentes lors de la synthèse des résines **13** et **14**, ne sont pas visibles du tout dans la résine **58**. Une faible bande à 1700 cm⁻¹ est visible dans la résine **59**.

10.5 Conclusion sur les tentatives de greffage de calixarènes sur la résine de Merrifield

Lorsqu'une molécule est mise en réaction en solution, les produits discrets obtenus peuvent être caractérisés par de nombreuses méthodes analytiques permettant d'obtenir un faisceau d'informations concordants sur le rendement de la synthèse et la pureté des différents produits obtenus.

Lorsque l'on travaille sur le greffage d'un matériau solide, le nombre d'analyses disponible pour sa caractérisation diminue fortement. Dans ce cadre, l'analyse élémentaire est une analyse qui permet d'obtenir une information pertinente quant au nombre de motifs qui ont pu être greffés à la surface de la résine. Cette information peut être alors corrélée au nombre de motifs total du polymère, ce qui permet d'obtenir les taux de greffage de ces derniers.

La comparaison des taux de greffage des résines de Merrifield substituées par des calixarènes *tétra*-guanidinium, les résines **55**, **57** et **61**, est présentée ci-dessous (Tableau 13).

Résines	Résine utilisée	Stratégie	Taux de greffage (%)
55	Merrifield vierge 50	Bottom-Up	2.01
57	Merrifield vierge 50	Top-Down	1.24
61	Merrifield pyridinium carboxaldéhyde 58	Top-Down	1.83

*Tableau 13 : Comparaison des résines de Merrifield greffées avec des calixarènes tétra-guanidinium **55**, **57** et **61**.*

Ces trois résines, issues de synthèses privilégiant soit la synthèse sur support (stratégie Bottom-Up), soit la synthèse en solution (stratégie Top-Down), montrent que sur la résine de Merrifield, c'est la synthèse en Bottom-Up de la résine **55** (avec 2.01% de greffage) qui permet d'obtenir le meilleur taux de greffage du polymère.

La spectroscopie infrarouge permet d'apporter des indices concordants avec le greffage du polymère. En effet, des bandes caractéristiques apparaissent et/ou disparaissent

permettant de prouver la modification de surface du matériau due à sa modification moléculaire.

En vue d'améliorer les taux de greffage de calixarènes *tétra*-guanidinium, des tentatives de greffage similaires ont été menées cette fois-ci sur un autre polymère : la résine de Wang benzaldéhyde. Cette approche est développée ci-après.

11 Tentatives de greffage de calixarènes sur la résine de Wang benzaldéhyde

11.1 Introduction

En parallèle des synthèses réalisées sur les résines de Merrifield **50** et **51**, le greffage d'une partie des molécules précédemment fabriquées a été tenté sur la résine de Wang benzaldéhyde **72** en changeant de type de point d'ancrage. Au lieu d'utiliser une réaction de substitution nucléophile, la formation d'une liaison covalente est faite par une réaction de condensation d'une amine sur l'aldéhyde de la résine, suivie de la réduction en amine de l'imine formée par le borohydrure de sodium. Pour simplifier l'écriture, le greffon de la résine de Wang benzaldéhyde, le 4-(benzyloxy)benzaldéhyde, sera omis et remplacé par un groupement aldéhyde (Fig. **112**).

Fig. 112 : Greffage d'une amine primaire sur la résine de Wang benzaldéhyde.

Les stratégies de synthèse top-down et bottom-up ont toutes les deux été tentées à partir des calixarènes anilino monosubstitués **33** et **41**. Le greffage d'un dérivé calixarénique **29** de type amino-éthyle a également été testé (en bottom-up uniquement) et pour finir, un analogue monomérique des calixarènes anilino, le 1-(4-[(*N,N*-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénoxy)-3-(4-anilino)propane **20** a été greffé pour servir de modèle monomérique des calixarènes *tétra*-guanidinium greffés.

11.2 Stratégie de synthèse Bottom-Up

11.2.1 Construction d'une résine-calixarène *tétra*-guanidinium avec un espaceur propyl-anilino

La stratégie de synthèse bottom-up suivante a été mise en place pour obtenir la résine **77** à partir de la résine de Wang benzaldéhyde et d'un anilino-calixarène (*Fig. 113*).

Fig. 113 : Voie de synthèse du calixarène tétra-guanidinium 77.

Pour cela, la résine de Wang benzaldéhyde **72** est mise en suspension dans le toluène puis le calixarène **34**, monosubstitué sur sa partie basse par une chaîne *para*-amino-phénylpropane est ajouté, et la réaction est mise à chauffer à 70°C pendant 48 heures. Après les rinçages et séchages habituels, la résine **73** est ainsi obtenue. Cette résine greffée est une base de Schiff conjuguée avec l'aniline d'un côté et le groupement benzyloxy de l'autre (*Fig. 114*) ce qui devrait conférer à cette imine une certaine stabilité.

Fig. 114 : La base de Schiff et la conjugaison de la résine 73.

Afin de s'affranchir de la sensibilité de la fonction imine, cette dernière est réduite par le borohydrure de sodium en solution dans du THF anhydre pour donner la résine **74**.

A cette étape, un test de débocage de la résine **73** (imine) a été conduit dans les mêmes conditions et en parallèle au débocage de la résine **74** (amine) précédente afin de comparer la solidité du greffage en milieu acide fort et surtout de vérifier que la réduction au NaBH_4 est efficace (Fig. **115**).

*Fig. 115 : Test de la solidité de la liaison imine de la résine **73** en comparaison à celle de la liaison amine de la résine **74** en milieu acide fort.*

Après réaction dans un mélange CH₂Cl₂/TFA pendant 7 heures, les deux résines sont filtrées et séchées, puis les analyses élémentaires des deux nouvelles résines (**73** déboquée et **75**) sont réalisées et les pourcentages d'azote sont comparés ainsi que les quantités correspondantes de motifs greffés par gramme (Tableau 14).

	73	74	73 déboquée	75
%N	1.01	1.15	0.35	0.94
Nombre mmoles de motifs par gramme	1.44 10 ⁻¹	1.64 10 ⁻¹	5.00 10 ⁻²	1.34 10 ⁻¹

*Tableau 14 : Comparaison des pourcentages d'azote et des quantités de motifs greffés par gramme des résines **73**, **74**, **73** déboquée et **75**.*

Les résultats montrent que le pourcentage d'azote (et le nombre correspondant de moles de motifs) chute si l'imine n'est pas préalablement réduite en amine (0.35% contre 0.94%).

Cela implique de devoir réduire cette imine systématiquement avant de pouvoir avancer dans la suite de la synthèse. Une étape de réduction suivra donc systématiquement chaque étape de greffage des dérivés aminés sur les résines de Wang benzaldéhyde.

La synthèse est poursuivie de la même façon que pour les résines de Merrifield, c'est à dire en réalisant la guanidylation des amines primaires de la résine **75** par utilisation de la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N''*triflylguanidine, en faisant l'hypothèse que la fonction aniline n'est pas concernée. La résine **76** obtenue est finalement déboquée pour donner la résine *tétra*-guanidinium **77** attendue.

11.2.2 Construction d'une résine-calixarène *tétra*-guanidinium avec un espaceur propyl-tyramino-

Une voie de synthèse parfaitement similaire est mise en place en tentant le greffage d'un dérivé de type amino-éthyle **29** sur la résine de Wang-benzaldéhyde (Fig. **116**).

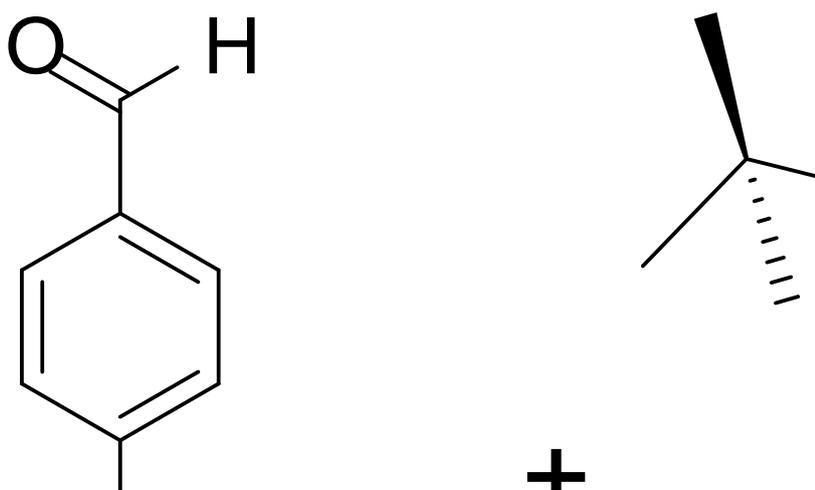


Fig. **116** : Voie de synthèse du calixarène *tétra*-guanidinium **82**. La structure de la résine de Wang benzaldéhyde (**72**) est omise pour plus de clarté.

L'utilisation du dérivé calixarénique monosubstitué **30** permet de tester le greffage d'un espaceur à la fois plus long, dont la fonction amine est stériquement moins encombrée et qui possède un caractère d'amine aliphatique. Ce greffage est réalisé dans le toluène à 70°C pendant 24 heures. Après traitements et séchage, l'imine théoriquement formée sur la résine **78** est réduite par NaBH₄ dans le méthanol. La résine **79** ainsi obtenue est déboquée (résine **80**), puis guanidylée (résine **81**) ; les fonctions guanidines protégées sont enfin déboquées (résine **82**).

11.2.3 Comparaison des deux voies de synthèse bottom-up

11.2.3.1 Comparaison par spectroscopie infrarouge

La comparaison des spectres infrarouge des résines allant jusqu'au calixarène *tétra*-guanidinium dans la stratégie bottom-up **espaceur propyl-anilino-** sont présentées ci-dessous (Fig. 117).

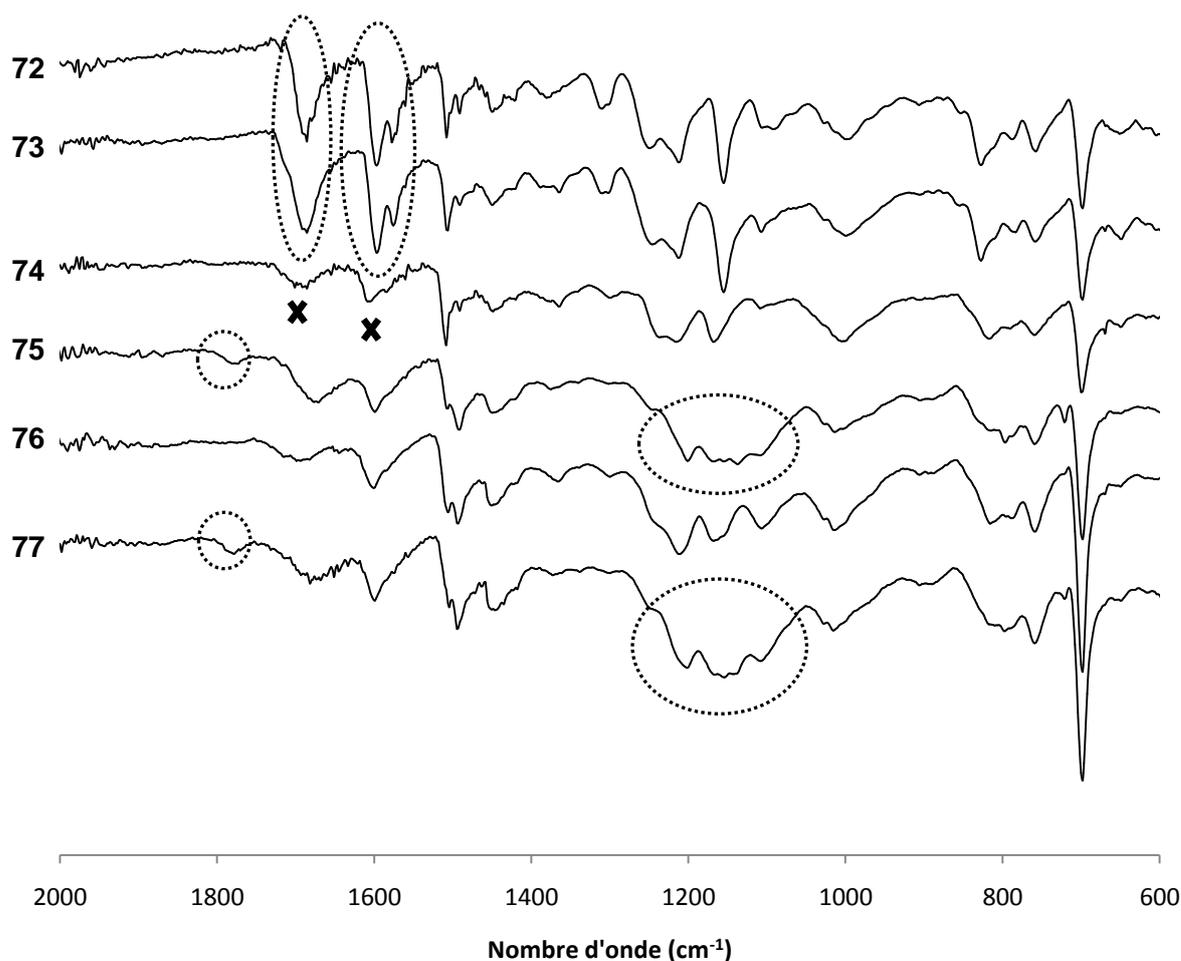


Fig. 117 : Spectroscopie infrarouge des résines anilino **72**, **73**, **74**, **75**, **76** et **77**.

La figure ci-dessus est présentée de 600 à 2000 cm^{-1} car aucune différence caractéristique n'est visible en dessous de 600 cm^{-1} ni au-delà de 2000 cm^{-1} . Tout d'abord, les résines **72** et **73** présentent deux larges bandes à 1600 et 1680 cm^{-1} . Ces deux bandes correspondent aux vibrations de la liaison carbonyle (C=O) de l'aldéhyde de la résine de Wang-benzaldéhyde. Ces deux bandes disparaissent logiquement lors de l'étape de réduction de l'imine au NaBH_4 , qui entraîne également dans la résine **74** la réduction des aldéhydes non substitués en alcool. De la même façon que pour les résines de Merrifield, l'utilisation de d'acide trifluoroacétique lors de l'étape de débocage conduit à retrouver sa présence vers 1780 cm^{-1} et sous forme de bande large entre 1000 et 1200 cm^{-1} dans les résines débocquées **75** et **77**.

La comparaison des spectres infrarouge des résines allant jusqu'au calixarène *tétra*-guanidinium dans la stratégie bottom-up espaceur **propyl-tyramino-** est présentée ci-dessous (Fig. 118).

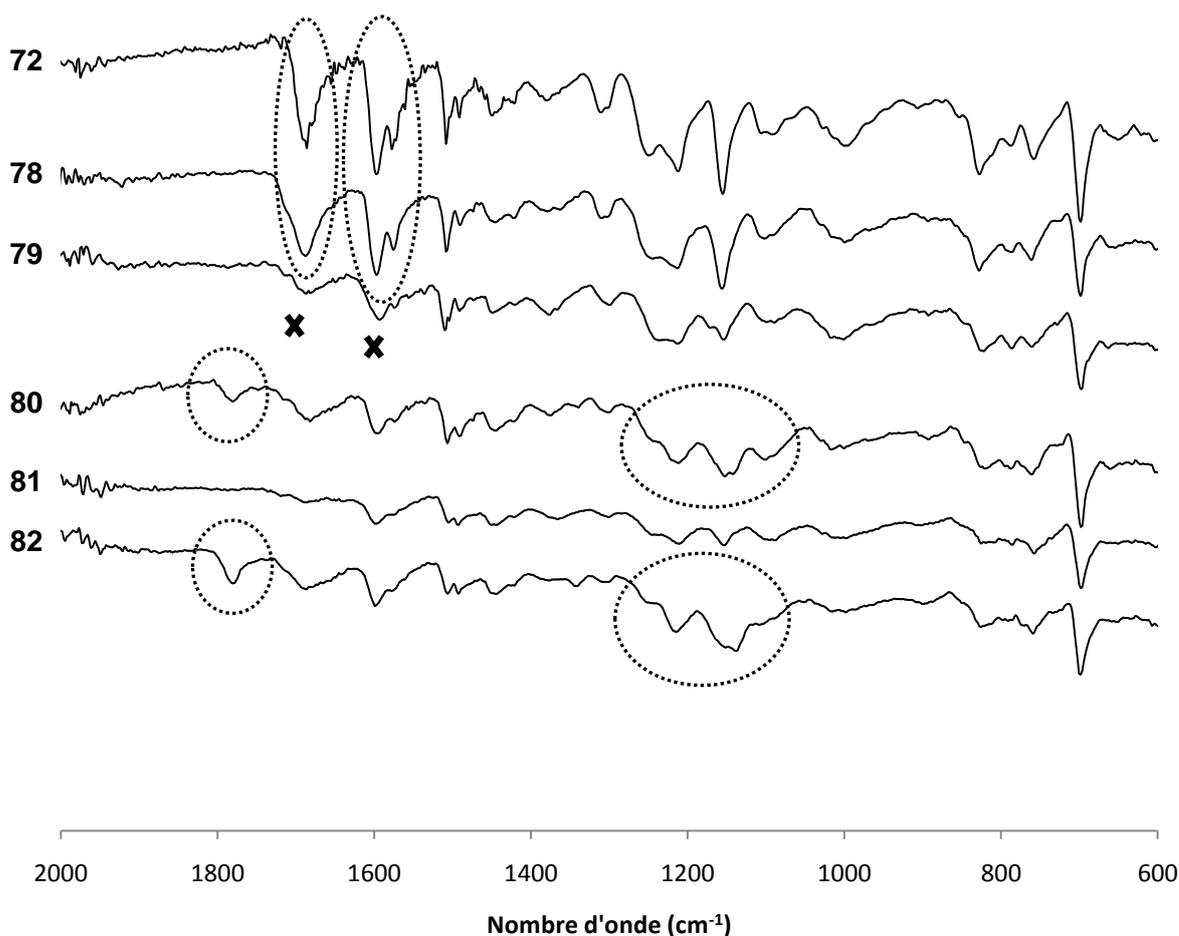


Fig. 118 : Spectroscopie infrarouge des résines **72**, **78**, **79**, **80**, **81** et **82**.

Les spectres infrarouges obtenus sont parfaitement similaires à la voie de synthèse avec l'espaceur propyl-anilino-. La réduction de l'aldéhyde est retrouvée de la même manière dans la résine **79** (disparition des deux pics) et les massifs caractéristiques de l'acide trifluoroacétique sont également présents dans les résines **80** et **82**.

La spectroscopie infrarouge permet de donner des indices quant à l'efficacité du greffage mais n'apporte pas de certitudes. Cette analyse doit être complétée par l'analyse élémentaire qui permet une quantification du nombre de motifs greffés.

11.2.3.2 Comparaison des analyses élémentaires

Le tableau ci-dessous présente la comparaison des résultats d'analyses élémentaires ainsi que les nombres de motifs greffés par gramme de résine (Tableau **15**).

Résine	%N	Nombre de mmoles de motifs greffés / g	Taux de greffage (%)
72	0.16	0	
73	1.01	$1.44 \cdot 10^{-1}$	4.70
74	1.15	$1.64 \cdot 10^{-1}$	5.47
75	0.94	$1.34 \cdot 10^{-1}$	5.47
76	1.00	$5.49 \cdot 10^{-2}$	1.83
77	0.91	$5.00 \cdot 10^{-2}$	1.67
78	0.58	$8.29 \cdot 10^{-2}$	2.76
79	0.61	$8.71 \cdot 10^{-2}$	2.90
80	0.51	$7.29 \cdot 10^{-2}$	2.43
81	0.83	$4.56 \cdot 10^{-2}$	1.52
82	0.45	$2.47 \cdot 10^{-2}$	0.82

Tableau 15 : Comparaison des pourcentages d'azote, du nombre de motifs par gramme et des taux de greffage des résines de Wang-benzaldéhyde fonctionnalisées en bottom-up.

Les résultats de ce tableau montrent tout d'abord que la résine de Wang benzaldéhyde vierge **72** présente un pourcentage d'azote de 0.16% bien que cette résine vierge ne devrait pas en contenir du tout (aucun motif azoté dans sa structure), hormis la présence éventuelle d'amines stabilisatrices (HHALS : Highly Hindered Amines Light Stabilizers, telle la 2,2,6,6-tétra-méthyl piperidine). Nous n'avons pas pu avoir les certificats d'analyse des lots commerciaux concernés. Dans la suite des calculs, ce pourcentage n'a pas été pris en compte.

Si l'on compare ensuite le greffage de la résine par les dérivés propyl-anilino- (résine **73**) et propyl-tyramino- (résine **78**), les taux de greffage sont bien meilleurs pour la résine **73**. La formation d'une imine fortement conjuguée avec deux cycles aromatiques peut sans doute expliquer ce bon résultat.

Dans la suite des deux synthèses, les étapes de réduction et de débocage ne semblent pas influencer grandement sur les taux de greffage (résines **74**, **75** ainsi que **79** et **80**). Cependant, l'étape de guanidylation entraîne une chute des taux de greffage dans les deux cas : de 5.47 à 1.83 % pour le greffage du dérivé propyl-aniline et de 2.43 à 1.52 % pour le greffage du dérivé propyl-tyramino-. Malgré la consommation visible de la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N''*-triflylguanidine dans le milieu réactionnel, celle-ci n'est manifestement pas suffisante pour réaliser la guanidylation totale des groupes amino-éthyle des calixarènes greffés.

L'étape finale de débocage, quant à elle, ne modifie quasiment pas le taux de greffage du dérivé propyl-anilino- (1.83% à 1.67%) mais réduit visiblement celui du dérivé propyl-tyramino- (1.52% à 0.82%). Au final, la voie de synthèse du dérivé propyl-anilino- permet de greffer deux fois plus de motifs que la voie de synthèse du dérivé propyl-tyramino-.

La suite du travail consiste à tenter d'obtenir la même résine fonctionnalisée **77**, mais cette fois-ci par un greffage direct d'un calixarène guanidylé sur la résine de Wang benzaldéhyde (stratégie **Top-Down**). Cette stratégie ne sera tentée qu'avec le dérivé propyl-anilino- puisqu'elle a permis d'atteindre de meilleurs taux de greffages.

11.3 Stratégie de synthèse Top-down

11.3.1 Greffage d'un calixarène tétra-guanidinium par utilisation d'un espaceur propyl-aniline

La stratégie de synthèse top-down consiste, pour rappel, à minimiser le nombre d'étapes de synthèse sur la résine en privilégiant les étapes de synthèse en solution. Pour cela, la molécule *octa*-Boc-guanidino-éthyl-calix[4]arène **42** est utilisée comme greffon. Seulement une étape de greffage, une étape de réduction et une étape de débocage suffisent à obtenir la résine guanidinium **85** (Fig. **119**).

Fig. 119 :Voie de synthèse de la résine tetra-guanidinium **85**.

L'étape de greffage de l'anilino- **42** a été tentée dans deux solvants différents, l'acétonitrile (**83a**) et le toluène (**83b**). Il faut se rappeler que la molécule **42** est une molécule très fragile puisqu'elle se dégrade rapidement dès qu'elle est chauffée même à basse température (voir §10.3.1). La réaction est donc menée à température ambiante. La consommation de la molécule **42**, qui est additionnée en défaut par rapport au nombre de fonctions aldéhydes théoriques, est suivie par CCM. Dès sa consommation totale observée, un aliquote supplémentaire est ajouté. Une tentative de chauffage à 35°C pendant la nuit a été tentée dans l'essai **83b** mais la dégradation partielle de la molécule **42** a été visible sur plaque CCM le lendemain matin.

Les étapes suivantes, réduction de l'imine et débocage des groupes aminoéthyle sont réalisées séparément et de manière identique sur chacune des deux résines. Les spectres infrarouge et les analyses élémentaires sont réalisés sur ces six résines.

11.3.2 Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge des résines greffées précédemment synthétisées est présentée ci-dessous (Fig. 120).

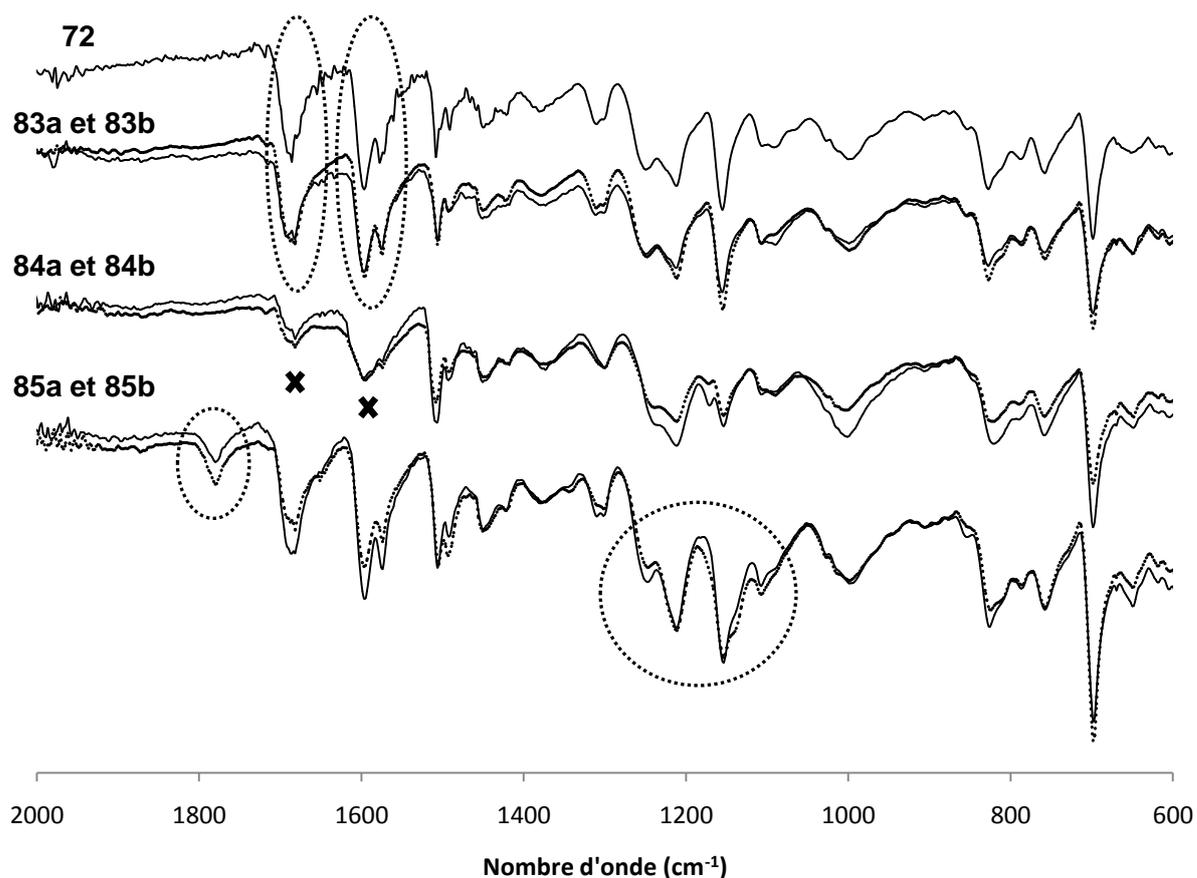


Fig. 120 : Spectroscopie infrarouge des résines **72** et des résines **83a** et **83b**, **84a** et **84b**, **85a** et **85b** superposées deux à deux.

Tout d'abord, il faut souligner que les différences observées entre les spectres infrarouge des composés synthétisés dans l'acétonitrile (**83a**, **84a** et **85a**) ou dans le toluène (**83b**, **84b** et **85b**) sont très faibles. Les spectres ont été volontairement superposés pour montrer cette similitude.

Les bandes caractéristiques facilement identifiables sont celles des groupements carbonyles présents à 1600 et 1680 cm⁻¹ à la fois dans la résine de Wang benzaldéhyde vierge et dans les résines greffées **83a** et **83b**. Ces deux bandes disparaissent logiquement

lors de la réduction au borohydrure de sodium (**84a** et **84b**). A la suite de la dernière étape de débocage, les trifluoroacétates apparaissent à 1770 cm^{-1} et entre 1100 et 1300 cm^{-1} .

Les spectres infrarouge permettent une nouvelle fois de donner des indices révélateurs de l'efficacité des réactions.

11.3.3 Résultats des analyses élémentaires

Le tableau ci-dessous présente la comparaison des résultats d'analyses élémentaires ainsi que les nombres de motifs greffés par gramme de résine (Tableau 16).

Résine	%N	Nombre de mmoles de motifs greffés / g	Taux de greffage (%)
72	0.16	0	
83a	0.56	$3.08 \cdot 10^{-2}$	1.03
83b	0.55	$3.02 \cdot 10^{-2}$	1.01
84a	0.28	$1.54 \cdot 10^{-2}$	0.51
84b	0.29	$1.59 \cdot 10^{-2}$	0.53
85a	0.26	$1.43 \cdot 10^{-2}$	0.48
85b	0.27	$1.48 \cdot 10^{-2}$	0.49

Tableau 16 : Comparaison des pourcentages d'azote, du nombre de motifs par gramme et des taux de greffage des résines de Wang-CHO greffées en top-down.

Les résultats des analyses élémentaires des résines fabriquées dans l'acétonitrile et dans le toluène montrent des résultats quasiment identiques. Cette information corrobore les résultats de spectroscopie infrarouge.

Par contre, les taux de greffage obtenus sur l'ensemble de ces résines sont globalement bien plus bas que ceux obtenus lors de la stratégie bottom-up précédente. De plus, l'étape de réduction au NaBH_4 divise par deux le taux de greffage. De 1.03% et 1.01%, il passe à 0.51% et 0.53%.

Dans le cas des résines de Wang-benzaldéhyde, cette stratégie n'est clairement pas la meilleure pour greffer des calixarènes tétra-guanidinium à la surface de la résine. Ce résultat peut être partiellement expliqué par l'utilisation du greffon **42**, qui ne peut pas être chauffé sans être dégradé, or le chauffage est une condition probablement essentielle pour augmenter le rendement de formation de l'imine sur le support solide.

11.3.4 Greffage d'un analogue monomérique du calixarène

Le greffage d'une résine avec un équivalent monomérique des calixarènes guanidiniums a été tenté en utilisant la molécule de 1-(4-[(*N,N*-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénoxy)-3-(4-anilino)propane **20** comme greffon (Fig. **121**). Cette synthèse permet de fabriquer une résine avec un motif similaire aux calixarènes guanidiniums, qui sera utilisée afin de donner un point de comparaison par rapport aux propriétés des calixarènes *tétra*-guanidinium greffés sur polymère. Cette stratégie de comparaison a été initiée au laboratoire dans les études des propriétés antibactériennes des calixarènes par Regnouf de Vains *et coll.*^{12,35,129}.

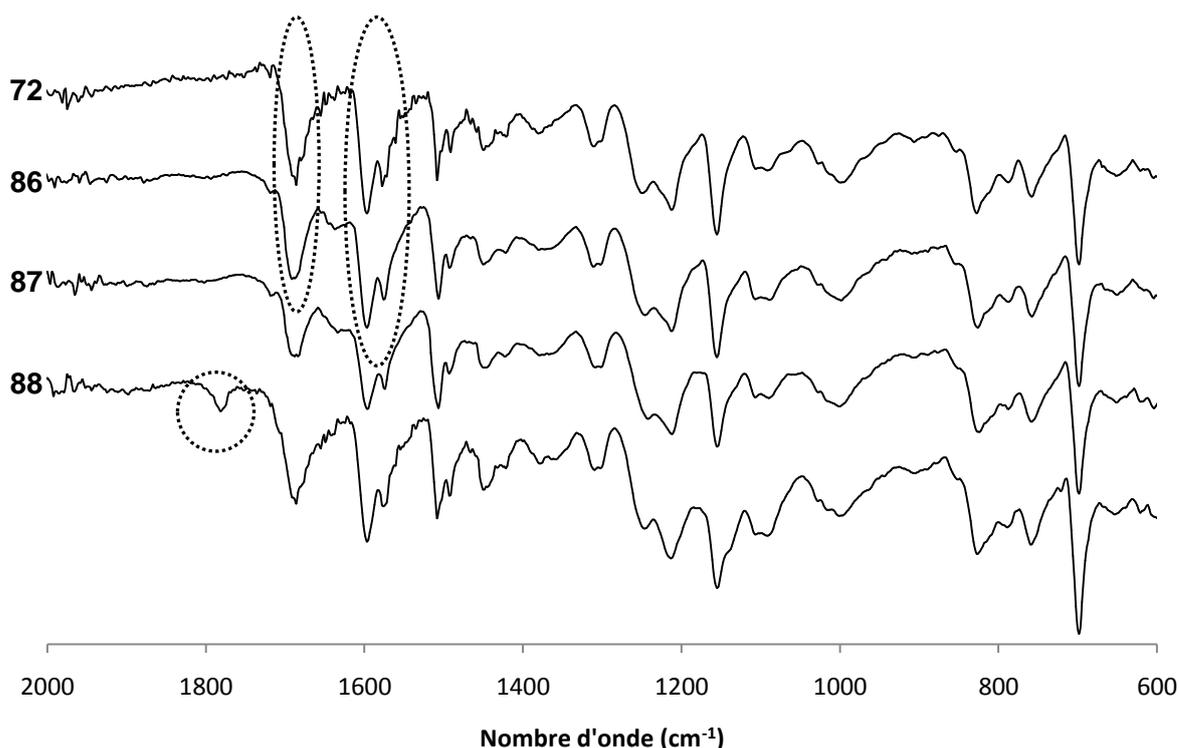
*Fig. 121 : Synthèse de la résine **88**, intégrant un modèle monomérique de calixarène tétra-guanidinium. Greffage sur la résine de Wang-benzaldéhyde.*

Le greffon **20** (dont la synthèse est décrite au §12.1.2) est ajouté solubilisé dans le toluène sur la résine de Wang benzaldéhyde vierge **72**. Après un chauffage à 70°C pendant la nuit, la résine est récupérée, filtrée sur fritté, lavée et séchée. La résine **86** ainsi obtenue est réduite par le borohydrure de sodium dans le méthanol à température ambiante pendant 2 heures. Après traitement (filtration, rinçages et séchages), le motif di-Boc-guanidine de la résine **87** est déprotégé dans des conditions classiques ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$) afin de donner la résine **88**.

Les spectres infrarouge et l'analyse élémentaire de ces trois nouvelles résines sont présentés ci-dessous.

11.3.5 Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge

La comparaison des spectres infrarouges des résines **72**, **86**, **87** et **88** est présentée dans la Fig. **122** ci-dessous.



*Fig. 122 : Comparaison des spectres infrarouge des résines **72**, **86**, **87** et **88**.*

Les bandes caractéristiques facilement identifiables sont celles des carbonyles à 1600 et 1680 cm^{-1} . Ces signaux sont présents à la fois dans la résine de Wang benzaldéhyde vierge **72** et dans la résine **86**, cependant ils devraient disparaître lors de la réduction au borohydrure de sodium (résine **87**) mais ils ne sont que faiblement diminués. A la suite de la dernière étape de débocage, les trifluoroacétates apparaissent à 1770 cm^{-1} cependant la bande large entre 1100 et 1300 cm^{-1} n'est pas visible.

Ces analyses infrarouge ne montrent pas des spectres correspondant parfaitement à ce qui est attendu lors de l'étape de réduction au NaBH_4 (résine **87**). Il est à supposer que cette réaction a peut-être été incomplète. L'absence de signaux caractéristiques des trifluoroacétates entre 1100 et 1300 cm^{-1} dans la résine **88** est peut-être due à la plus faible capacité des motifs monomériques à retenir ces sels, puisqu'ils ne comportent qu'une seule guanidine contrairement aux calixarènes qui en portent quatre. Une autre explication serait que le débocage de la résine était incomplet ou n'a pas eu lieu.

11.3.6 Résultats des analyses élémentaires

Les résultats d'analyse élémentaire des résines **72**, **86**, **87** et **88** sont présentés dans le Tableau 17 ci-dessous.

Résines	%N	Nombres de mmoles de motifs greffés / g	Taux de greffage (%)
72	0.16	0	
86	1.05	$1.88 \cdot 10^{-1}$	6.27
87	1.18	$2.11 \cdot 10^{-1}$	7.03
88	1.07	$1.91 \cdot 10^{-1}$	6.37

*Tableau 17 : Résultats des analyses élémentaires des résines **72**, **86**, **87** et **88** ainsi que les résultats des calculs du nombre de motifs/g et du taux de greffage correspondants.*

Les résultats obtenus montrent des pourcentages d'azote dans les résines greffés **86**, **87** et **88** à peine supérieurs à 1% mais ne variant que très peu. Cela signifie que les motifs sont restés greffés sur la résine pendant les étapes de réduction et de débocage.

Si l'on compare maintenant ces pourcentages d'azote avec ceux des résines calixaréniques précédemment fabriquées, le résultat est du même ordre de grandeur. Cependant, le motif greffé ne comporte que 4 azotes contrairement aux calixarènes greffés qui en comportent jusqu'à 14. Cette différence entraîne un nombre de mmoles de motifs / g et un taux de greffage bien supérieur aux résines précédemment synthétisées.

Ces informations permettent de conclure quant à un taux de greffage entre 5 et 10 fois plus important pour l'équivalent monomérique. Ce résultat n'est pas surprenant si l'on compare les tailles des motifs greffés. Par exemple, le calixarène **42** précédemment greffé sur la résine de Wang benzaldéhyde au cours de la stratégie Top-Down a une masse molaire de 1699.04 g/mol. En comparaison, le motif monomérique **20** est plus de trois fois moins « gros » avec une masse molaire de 512.64 g/mol, ce qui lui permet probablement une pénétration à l'intérieur de la matrice polymérique bien plus facile et par conséquent un nombre de motifs greffés bien plus important.

11.4 Conclusion sur les taux de greffage sur résines de Wang benzaldéhyde

L'alternative proposée visant à utiliser la résine de Wang-benzaldéhyde a conduit à la synthèse de résines calixaréniques *tétra*-guanidinium par des stratégies bottom-up et top-down. Cependant, les résines ont montré des taux de greffages de calixarènes *tétra*-guanidinium globalement plus faibles que ceux obtenus sur la résine de Merrifield (Tableau **18**).

Résines	Numéros	Résine utilisée	Stratégie	Taux de greffage (%)
Merrifield Calixarènique	55	Merrifield vierge 50	Bottom-Up	2.01
	57	Merrifield vierge 50	Top-Down	1.24
	61	Merrifield pyridinium carboxaldéhyde 58	Top-Down	1.83
Wang-benzaldéhyde Calixarènique	77	Wang-benzaldéhyde 72	Bottom-Up	1.67
	82	Wang-benzaldéhyde 72	Bottom-Up	0.82
	85a	Wang-benzaldéhyde 72	Top-Down	0.48
	85b	Wang-benzaldéhyde 72	Top-Down	0.49
Wang-benzaldéhyde Monomérique	88	Wang-benzaldéhyde 72	Top-Down	6.37

*Tableau 18 : Récapitulatif des taux de greffage de toutes les résines finales **55, 57, 61, 77, 82, 85a, 85b et 88.***

Sur résine de Wang-benzaldéhyde, de la même façon que pour la résine de Merrifield, c'est la stratégie bottom-up avec sa construction du motif à la surface de la résine qui a permis d'atteindre les meilleurs taux de greffage. Plus particulièrement, c'est le greffage du motif calixarène propyl-anilino- qui a conduit à la plus importante substitution de la résine, celle-ci ayant été confirmée par la spectroscopie infrarouge.

La synthèse d'une résine modèle, greffée à sa surface avec des groupements 1-(4-[(*N,N*-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénoxy)-3-(4-anilino)propane **20**, équivalent monomérique d'un calixarène tétra-guanidinium monosubstitué a été tentée. Le résultat permet d'obtenir une résine avec un taux de greffage relativement élevé (6.37 %). Cette résine **88** sera un point de comparaison essentiel dans la suite de ce travail.

12 Synthèse et évaluation biologique de calixarènes bioactifs

12.1 Synthèse

12.1.1 Calixarènes guanidinium monosubstitués

La mise au point de calixarènes tétrasubstitués sur la partie haute par des entités cationiques et monosubstitués sur la partie basse à des fins de greffage a également conduit à la synthèse de nouvelles molécules potentiellement antibactériennes.

Parmi celles-ci, les deux dérivés tétra-guanidiniums nitrophényl- **41** et anilino- **44** ont été testés. Ces deux dérivés sont obtenus par simple débocage des composés diBocguanidylés **40** et **42** correspondants qui ont servi de précurseur pour le greffage sur résine (Fig. **123**).

*Fig. 123 : Synthèse des composés tetra-guanidium **41** et **44** à partir des calixarènes **40** et **42**.*

12.1.2 Equivalents monomériques des calixarènes 41 et 44

Afin de pouvoir vérifier l'influence de la plateforme calixarénique sur l'évolution de l'activité antibactérienne qui en découle, les composés **21** et **22**, sous-unités monomériques des calixarènes **41** et **44** ont été synthétisés à partir de la tyramine afin de donner un point de comparaison (Fig. **124**).

Fig. 124 : Synthèse des équivalents monomériques 21 et 22 des molécules 41 et 44.

Pour cela, la tyramine est guanidylée en 4-[(*N,N'*-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénol **1** puis la substitution nucléophile du 1-(3-Bromopropyl)-4-nitrobenzène **9** par le phénate correspondant conduit au dérivé alkylé **19**. Cette simple substitution nucléophile a été tentée dans l'acétonitrile ou le THF, en présence de carbonate de potassium ou d'hydrure de sodium, sans permettre la formation du produit attendu (Tableau **19**).

Base (équivalents)	Solvant	Température	Temps de réaction	Résultat
K ₂ CO ₃ (0.5)	CH ₃ CN	95°C	72h	Dégradation des produits de départ
NaH (3)	THF	0°C à TA	24h	Pas de réaction, récupération des produits de départ
NaOH (4)	DMSO	TA	17h	100%

Tableau 19 : Tentatives de formation de la molécule 19.

La solution est venue des conditions employées par Ueno¹³⁰ qui réalise la substitution nucléophile d'un dérivé bromométhylpipéridine par la 7-hydroxy-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline portant également une fonction diBoc-guanidine, dans le DMSO en présence de soude (Fig. 125).

Fig. 125 : Substitution nucléophile de la 7-hydroxy-1,2,3,4-tétra-hydroisoquinoline par Ueno¹³⁰.

L'application de ces conditions opératoires permet d'obtenir la molécule attendue 19 de manière quantitative. Il est à noter que l'excès de dérivé bromé (3 éq.) est indispensable à la réaction qui voit son rendement chuter si cette condition n'est pas remplie.

La synthèse se poursuit soit par le débocage direct (CH₂Cl₂/TFA) du dérivé 19 pour obtenir le dérivé nitroguanidylé 21, soit par sa réduction en aniline 20 (H₂, Pd/C 10%) qui est ensuite déboquée de la même façon pour obtenir la molécule 22 attendue.

A l'heure actuelle, les molécules 21 et 22 sont en cours d'évaluation de leurs activités auprès des biologistes.

12.1.3 Bis calixarènes ammoniums et guanidiniums

Le développement des méthodologies de greffage sur support polymérique a nécessité une part de mise au point sur molécules discrètes dont certaines ont déjà été présentées (voie de synthèse de la molécule 34, §10.2.1). Nous avons profité de ces développements

pour accéder à de nouvelles entités oligomères de guanidino-calixarènes pour lesquelles une activité antibactérienne particulière, du fait de la sur-organisation des entités antibactériennes calixaréniques, pourrait émerger.

Pour cela, la synthèse de composés possédant plusieurs têtes poly-guanidiniums a été tentée en utilisant le schéma suivant comme modèle (Fig. **126**).

Fig. 126 : Schéma de synthèse de molécules possédant plusieurs têtes poly-guanidiniums.

Le noyau organisateur utilisé dans ce cas est le téréphthalaldéhyde qui est fonctionnalisé par amination réductrice avec deux unités anilino *tétra*-Bocaminoéthylcalix[4]arènes **34** (Fig. **127**). Cette synthèse se déroule bien à condition de respecter parfaitement la stœchiométrie (1 aldéhyde pour 2 calixarènes anilino). En effet, si la réaction n'est pas totale, le mélange de calixarènes mono et bis est très difficile à séparer.

Le bis-calixarène **45** obtenu est déboqué ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$) pour donner le composé octa ammonium **46**, qui est ensuite guanidylé de manière classique en composé octa-boc **47** puis déboqué ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$) pour donner le Bis-guanidiniumcalixarène **48**.

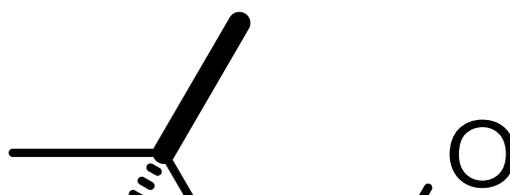


Fig. 127 : Synthèse du bis[tétra-guanidinoéthyl-calix[4]arène] 48.

Les bis-calixarènes **46** et **48** ont été testés en microbiologie. En utilisant le benzène-1,3,5-tricarboxaldéhyde comme noyau organisateur, nous avons ciblé la synthèse des tris-calixarènes ammonium et guanidinium selon le schéma suivant (Fig. **128**).

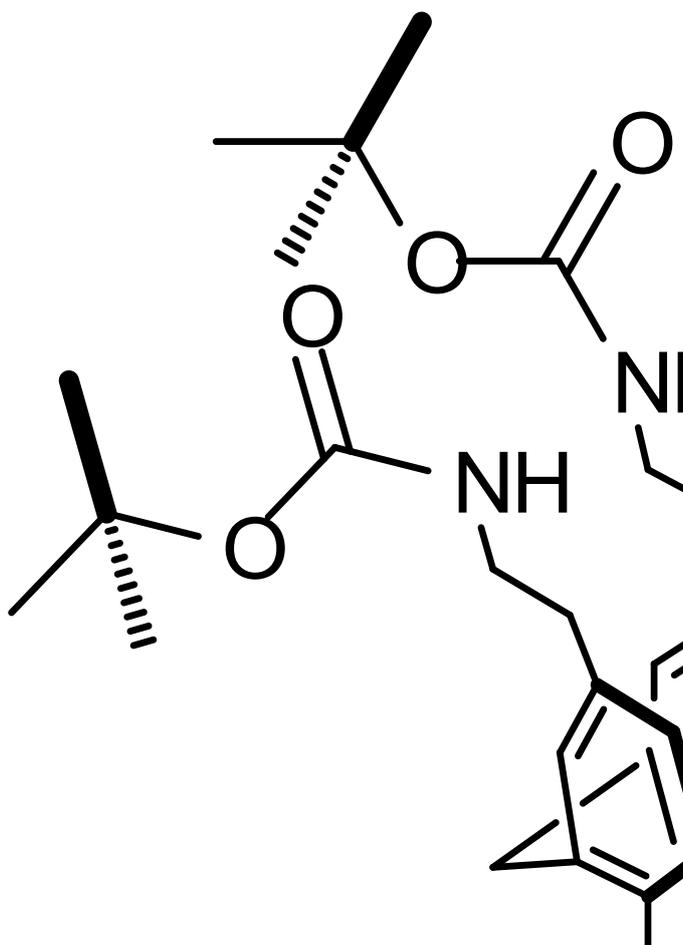


Fig. **128** : Tentative de synthèse du tris-[tétra-guanidinoéthyl-calix[4]arène].

La formation de la tris-imine est visible par CCM dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour la formation du bis-calixarène **45** précédent, mais elle est accompagnée de dérivés que nous avons analysés comme étant les mono- et bis-imine intermédiaires, sur la base de leurs apparitions et de leurs fronts de migration.

La réaction de réduction des imines a été tentée avec NaBH₄ dans le méthanol ou avec BH₃ : THF, mais elle ne permet pas la formation d'un produit unique sur plaque CCM qui montre des trainées inséparables. La spectrométrie de masse ne détecte pas la formation de composés mono-, bis- ou tris- aminés mais uniquement le composé anilino **34** de départ. Après traitement, des produits plus polaires non identifiés se forment, menant à stopper momentanément ce sujet.

12.2 Évaluation biologique

12.2.1 Conditions d'évaluation des CMI

Les CMI (concentrations minimales inhibitrices) ont été déterminées sur la plateforme ABC[®] de l'Université de Lorraine. La détermination de la turbidité, indice de la population bactérienne, a été effectuée à 24 h par lecture de l'absorbance à 540 nm.

12.2.2 Résultats

Les résultats des mesures de CMI des molécules **41**, **44**, **46** et **48** sont présentés en comparaison avec les résultats des CMI des molécules suivantes précédemment conçues dans l'équipe : le **Cx1**, le **Cx1-5,5'-bpy** et l'hexamidine diisethionate (antiseptique de référence) sélectionnés dans la publication de Mourer *et al.*³⁷ en 2009. (Fig. **129**).

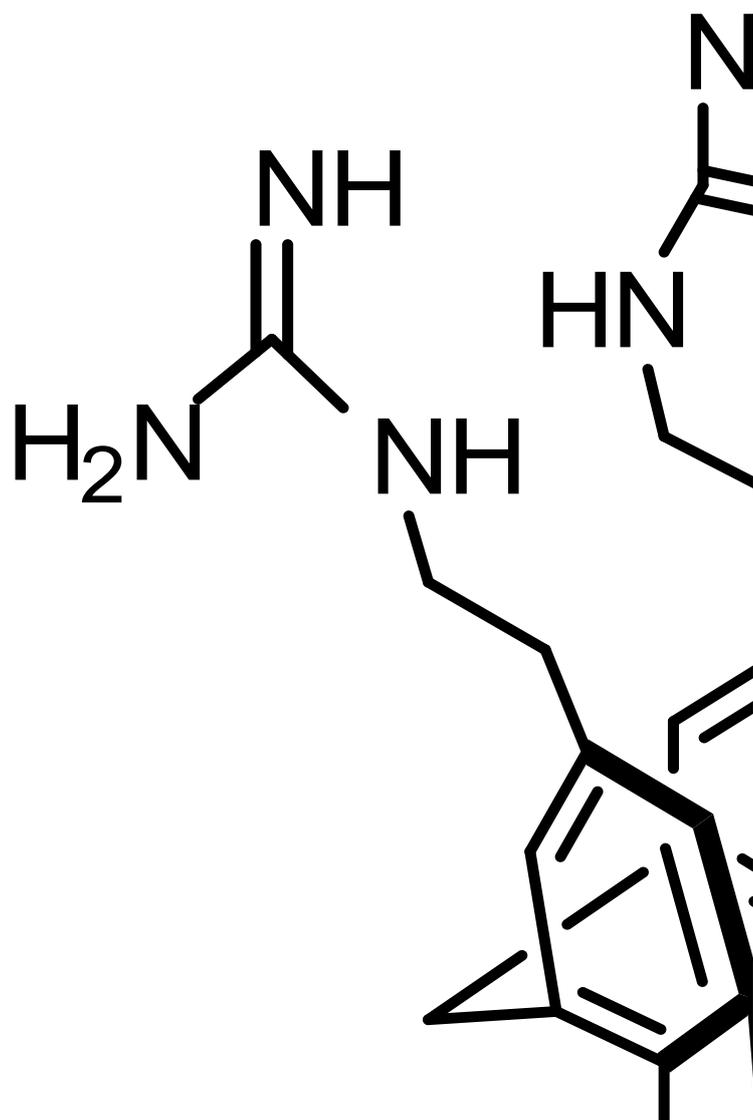


Fig. 129 : Représentations des molécules 41, 44, 46, 48, de Cx1, de Cx1-5,5'-bpy et d'hexamidine diisethionate.

Les CMI de ces molécules sont présentées dans le Tableau 20.

	Molécules (MM en g/mol)						
	41 (1474.28)	44 (1400.19)	46 (2645.30)	48 (2993.02)	Cx1 (1239.00)	Cx1-5,5'-bpy (1885.56)	Hexamidine diisethionate (668.22)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16 (10.9)	32 (22.9)	32 (12.1)	32 (10.7)	4 (3.2)	32 (17.0)	8 (12.0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16 (10.9)	64 (45.7)	64 (24.2)	64 (21.7)	32 (26.0)	32 (17.0)	32 (47.9)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1 (0.7)	8 (5.7)	16 (6.0)	16 (5.3)	8 (6.5)	8 (4.2)	4 (6.0)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1 (0.7)	8 (5.7)	16 (6.0)	32 (10.7)	8 (6.5)	8 (4.2)	<1 (<1.5)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1 (0.7)	8 (5.7)	16 (6.0)	32 (10.7)	32 (26.0)	8 (4.2)	2 (3.0)

Tableau 20 : Valeurs des CMI en $\mu\text{g/mL}$ et ($\mu\text{mol/L}$) des différentes molécules étudiées vis-à-vis des souches bactériennes de référence ($n = 3$).

Les CMI des molécules **41**, **44**, **46** et **48** sont, pour toutes les bactéries, inférieures à 100 $\mu\text{g/mL}$ et approchent le 1 $\mu\text{g/mL}$. Les CMI du tétra-guanidinoéthyle-calixarène nitré **41** sont particulièrement basses (1 $\mu\text{g/mL}$) sur les bactéries à Gram positif et restent basses (16 $\mu\text{g/mL}$) sur les bactéries à Gram négatif testées. Cette activité peut être comparée à son équivalent anilino **44** qui ne présente que des CMI de 2 à 8 fois plus élevées. L'introduction d'une chaîne contenant un motif nitrobenzène sur **Cx1** (molécule **41**) améliore l'activité antibactérienne (sauf sur *E. coli*).

Il faut également souligner que les bis-calixarènes **46** et **48**, avec de hauts poids moléculaires (~ 3000 g/mol) donnent des résultats de CMI en concentrations massiques globalement plus élevées. Cependant si l'on s'intéresse aux concentrations molaires (c'est à dire à nombre égal de molécules), les résultats sont alors dans la même gamme, voir meilleurs sur les bactéries à Gram négatifs qu'avec les molécules de plus faible poids moléculaire (**44**, **Cx1** ou hexamidine diisethionate par exemple).

12.2.3 Conditions d'évaluation des toxicités cellulaires CI_{50}

Les CI_{50} (concentrations inhibitrices 50) ont été déterminées sur la plateforme ABC[®] de l'Université de Lorraine. La détermination de la vitalité cellulaire a été effectuée à 24h et 48h

après ajout de 10 μL de MTT (4h) et 100 μL de SDS (4h) par lecture de l'absorbance à 540 nm et 690 nm.

12.2.4 Résultats

Les CI_{50} des molécules **41**, **44**, **46** et **48** sont présentées dans le Tableau 21.

	Molécules (MM en g/mol)						
	41 (1474.28)	44 (1400.19)	46 (2645.30)	48 (2993.02)	Cx1 (1239.00)	Cx1-5,5'-bpy (1885.56)	Hexamidine diisethionate (668.22)
24h	108 (73.2)	97 (69.3)	48 (18.1)	59 (19.7)	>256 (>206.6)	>128 (>67.9)	32-64 (47.9-95.8)
48h	79 (53.6)	62 (44.3)	43 (16.3)	31 (10.4)	>256 (>206.6)	>128 (>67.9)	16-32 (23.9-47.9)

Tableau 21 : CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$ et ($\mu\text{mol/L}$) des différentes molécules vis-à-vis de la lignée MRC5 par test MTT à 24 et 48h.

Nous observons que l'ensemble des composés présentent une toxicité cellulaire non négligeable, supérieure à celle des deux calixarènes **Cx1** et **Cx1-5,5'-bpy** pris pour comparaison.

12.2.5 Indices de sélectivité

Afin de mieux pouvoir évaluer leurs potentiels, les indices de sélectivité (IS), c'est à dire le rapport entre la CI_{50} et la CMI de chacune de ces molécules ont été calculés et reportés dans le Tableau 22. Plus cet indice de sélectivité est élevé, « meilleure » doit être la molécule étudiée.

Temps	41		44		46		48		Cx1	Cx1-5,5'-bpy	Hexamidine diisethionate
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	24h	24h
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6.8	4.9	3.0	1.9	1.5	1.3	1.8	1.0	>64	>4	4-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6.8	4.9	1.5	1.0	0.8	0.7	0.9	0.5	>8	>4	1-2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	108	79	12.1	7.8	3.0	2.7	3.7	1.9	>32	>16	8-16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	108	79	12.1	7.8	3.0	2.7	1.8	1.0	>32	>16	32-64
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	108	79	12.1	7.8	3.0	2.7	1.8	1.0	>8	>16	16-32

Tableau 22 : Indices de sélectivité calculés des molécules **41**, **44**, **46** et **48** à 24h et 48h comparés aux indices de sélectivité du **Cx1**, du **Cx1-5,5'-bpy** et de l'**hexamidine diisethionate** à 24h.

L'exploitation de ces résultats permet de sortir la molécule **41** du lot. En effet, cette molécule possède une très bonne sélectivité sur les 3 souches bactériennes à Gram positif étudiées avec un indice de sélectivité dépassant 100 après 24h. Si l'on compare cette molécule à celle de **Cx1**, son action est moins bonne sur les bactéries à Gram négatifs mais plus efficace sur les bactéries à Gram positifs.

12.3 Conclusion

Des molécules originales **21** et **22** dérivées du **Cx1** (modèles monomériques), **41** et **44** (monosubstitués) ainsi que **46** et **48** (Bis-calixarènes) ont été synthétisées. Ces molécules ont été testées (ou sont en cours d'évaluation) et parmi les résultats obtenus jusqu'à présent, la molécule **41**, monosubstituée par un linker contenant un motif nitrobenzène, apporte des résultats très encourageants. Les tests de viabilité cellulaire (CI₅₀) sur ces molécules ont montré que ces molécules possèdent cependant une toxicité cellulaire non négligeable.

Les évaluations biologiques des deux composés bis-calixaréniques **46** et **48** n'ont pas donné des résultats à la hauteur de nos espérances avec des indices de sélectivité proches de 1.

Il est également intéressant de noter ici que l'incorporation d'un bras d'ancrage n'obère en rien l'activité antibactérienne des calixarènes à greffer sur résine, laissant augurer un comportement intéressant dans la séquestration de bactéries.

Partie II

Capture / Séquestration

13 Etude d'échange d'anions

13.1 Introduction

La chimie environnementale est un domaine de recherche jeune et interdisciplinaire. Elle fait face de nos jours, à une pollution quasi-omniprésente (dans l'air, dans le sol, dans l'eau, ...) issue de nombreux composés. Parmi ces composés, les substances pharmaceutiques telles que somnifères, antidépresseurs, anti-inflammatoires stéroïdiens et non-stéroïdiens, anti-épileptiques, anticancéreux, anti-hypertenseurs (une grande part de la pharmacopée...), sont retrouvées dans les eaux circulantes. Leur origine humaine peut être naturelle, issue des rejets des patients traités en ambulatoire ou en secteur hospitalier (urines, fécès) mais aussi "accidentelle" ou volontaire, par élimination des stocks périmés hors du circuit de recyclage officiel représenté par les officines. Leur origine peut aussi être animale, concernant plus particulièrement les élevages de masse et leur usage soutenu d'antibiotiques.¹³¹

La recherche de systèmes aptes à éliminer tout ou partie de ces substances avant retour des eaux à la Terre est un sujet de grand intérêt et de fort impact sociétal.

Parmi ces substances d'origine médicamenteuse, un certain nombre présente un caractère anionique (par la présence de fonctions acides ionisables). Il s'agit par exemple et de façon non exhaustive bien entendu, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (fonction R-COOH; avant les coxibs), des antibiotiques de type β -lactames (fonction R-COOH; pénicillines, céphalosporines, monobactames, carbacéphèmes...), ou "quinolonique" (fonction RCOOH; quinolones et fluoroquinolones).

Les résines polyioniques que nous avons développées sont cationiques, et peuvent en ce sens présenter (comme les résines cationiques commerciales d'ailleurs) un comportement de séquestrant pour ces substances, et jouer de ce fait un rôle dans le traitement de ces pollutions.

Notre stratégie est représentée en Fig. **130**, montrant notre souhait de recyclabilité pour les résines étudiées. Elle est en parfait accord avec l'usage courant des résines échangeuses d'ions.

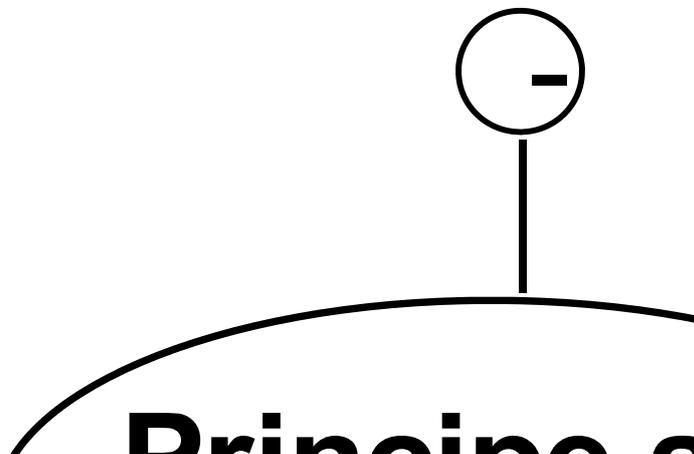


Fig. 130 : Utilisation d'un polymère cationique dans l'optique de réaliser la capture de principes actifs anioniques contenus dans l'eau.

La mise au point d'un polymère greffé avec des composés polycationiques disposés à sa surface permettrait d'obtenir des contre-anions labiles et échangeables en milieu aqueux (X^-). Ces anions, mis en présence de principes actifs anioniques, pourront s'échanger et la capture de ces polluants deviendrait possible.

Par la suite, le relargage des principes actifs échangés sur la résine semble envisageable par l'ajout d'une solution saline (type KCl ou NaCl par exemple) afin d'obtenir un polymère réutilisable ouvrant ainsi la porte du recyclage. Le polymère polycationique que nous avons choisi pour ces études est, du fait de son accessibilité et pour raison chronologique au cours de la thèse, le polymère de Merrifield greffé pyridinium **67b**.

Il a ensuite été nécessaire de choisir des modèles de produit pharmaceutiques. Nous nous sommes attachés à deux composés antibiotiques historiques : la pénicilline V et l'acide nalidixique (Fig. 131).

Fig. 131 : Structures de la pénicilline V (à gauche) et de l'acide nalidixique (à droite).

La pénicilline V est un antibiotique de type β -lactame, c'est-à-dire un amide cyclique à 4 atomes (nommé aussi azétidine-2-one) fusionné avec un hétérocyclique à cinq atomes de type thiazolidine.

Sur ce dernier sont attachés deux groupes méthyles et un groupe carboxyle en α de l'azote et orienté de façon à conférer au carbone cyclique le portant, une configuration absolue (*S*). Le cycle β -lactame est porteur d'une fonction amine extracyclique et amidifiée, et est fusionnée au soufre de la thiazolidine. N et S sont orientés du même côté de cycle (vers l'arrière sur le schéma), conférant aux deux carbones qui les portent un caractère asymétrique de type (*R*). Cet antibiotique est un composé d'origine naturelle principalement utilisé dans le traitement des pneumonies, de la scarlatine et des infections de la peau, de la gorge et des oreilles (otites)¹³². Son mécanisme d'action consiste à inhiber la réticulation du peptidoglycane des bactéries, par blocage des enzymes carboxypeptidases impliquées dans ce mécanisme (ressemblance avec le substrat naturel de ces enzymes : le Acyl-D-Ala-D-Ala).

L'acide nalidixique fait partie de la famille des "quinolones". Cette famille d'antibactériens, inhibiteurs de l'ADN girase, a été découverte en 1962 et regroupe 4 générations. A partir de la seconde figurent les dérivés de type fluoro-quinolone. L'introduction d'un fluor en position C6 confère un élargissement du spectre d'activité de la molécule sur certaines souches de bactéries à Gram négatifs et positifs. L'acide nalidixique (le premier commercialisé) était quant à lui utilisé principalement pour le traitement des infections urinaires (actif sur *E. coli*).

13.2 Etude d'échange d'ions sur la résine pyridinium 67b par spectroscopie UV

13.2.1 Synthèse et caractérisation des sels de nalidixate et de pénicillinate

Les deux antibiotiques, l'acide nalidixique (quinolone de 1^{ère} génération) et le pénicillinate de potassium (β -lactame) ont été choisis comme modèles afin de réaliser les études d'échange d'anion chlorure/ pénicillinate ou nalidixate sur la résine pyridinium **67b** (Fig. **132**).

Fig. 132 : Echange d'anions pénicillinate et nalidixate sur la résine pyridinium 67b.

L'acide nalidixique sera utilisé sous forme de nalidixate de potassium que nous avons préparé. Pour cela, sa synthèse s'opère par la mise en suspension de 0.500 g d'acide nalidixique dans 30 mL d'eau, 0.121 g de KOH (1 éq.) sont ajoutés, le pH est ajusté à pH = 8, par ajout de petites quantités d'acide nalidixique puis le milieu réactionnel est filtré et lyophilisé pour obtenir le nalidixate de potassium (solide blanc, 0.547 g, 88%). La pureté du produit est vérifiée par analyse élémentaire, les résultats obtenus (%C = 49.80, %H = 4.41, %N = 9.64) correspondent à la molécule de nalidixate de potassium attendue liée à une molécule d'eau ($C_{12}H_{11}N_2O_3K \cdot H_2O$: %C = 49.99, %H = 4.54, %N = 9.72). Le pénicillinate de potassium (ou pénicilline V) est obtenu commercialement et utilisé directement sous cette forme.

Les coefficients d'absorption molaire du pénicillinate et du nalidixate de potassium sont obtenus par la réalisation d'une gamme d'étalonnages ($n = 3$) des deux molécules dans l'eau. Les gammes de concentrations sont comprises entre $1.0 \cdot 10^{-3}$ et $2.0 \cdot 10^{-5}$ mol/L pour le pénicillinate de potassium et entre $1.0 \cdot 10^{-4}$ et $1.0 \cdot 10^{-7}$ mol/L pour le nalidixate de potassium. Les concentrations donnant une absorbance supérieure à 1 sont diluées jusqu'à obtenir une absorbance inférieure à 1. L'absorbance est mesurée dans les deux cas à $\lambda = 256$ nm. Les coefficients d'absorption molaire à cette longueur d'onde sont de $\epsilon = 1082 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ pour le pénicillinate (Fig. 133 à gauche) et $\epsilon = 24576 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ pour le nalidixate (Fig. 133 à droite). Les R^2 indiquent une très bonne linéarité sur les domaines de concentration étudiés.

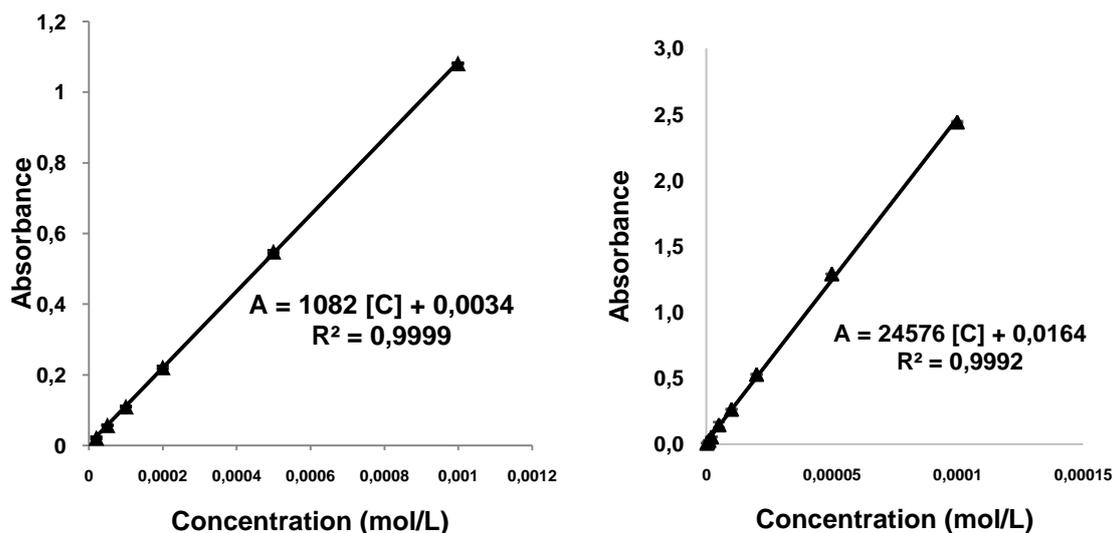


Fig. 133 : Courbes d'étalonnage UV-visible du pénicillinate de potassium (à gauche) et du nalidixate de potassium (à droite).

13.2.2 Capture par échange des sels de nalidixate et de pénicillinate sur la résine pyridinium 67b

Une étude préliminaire réalisée par spectroscopie UV, de l'échange des anions chlorure de la résine pyridinium **67b** par les anions pénicillinate et nalidixate a été menée. Les résultats de cette étude seront également corrélés par la variation de masse de la résine due à l'échange d'un anion de plus haute masse molaire, et également aux résultats d'analyse élémentaire par la variation des pourcentages d'azote et de soufre.

Pour ce faire, 0.100 g de résine pyridinium **67b** (3.34 mmol de Cl/g) est mise en contact avec **1 équivalent** d'anion dans 35 mL d'eau, sous agitation à température ambiante pendant 72 heures. Les surnageants de chaque expérience sont prélevés et quantifiés par dosage UV. La quantification donne des taux de capture de **75.9%** pour le pénicillinate et de **63.7%** pour le nalidixate.

Les résines sont ensuite filtrées sur fritté, rincées à l'eau et séchées jusqu'à poids constant. Les masses obtenues sont respectivement pour les résines échangées pénicillinate et nalidixate de 0.162 g et 0.128 g. Ces augmentations de masse (de +62% et +28%) permettent également de calculer les quantités de motifs échangés (comme présenté au §9.2).

Par exemple, pour la résine **67b** mise en contact avec le pénicillinate, l'échange entraîne le gain d'un pénicillinate et la perte d'un chlorure ce qui se traduit par la variation de masse molaire suivante : $\Delta M = M(PV^-) - M(Cl^-) = 349.38 - 35.5 = 313.88$ g/mole. L'augmentation de

la masse du polymère (+ 62 mg) durant la synthèse ne peut être due qu'à cet échange et le nombre de moles échangées est donc de $1.98 \cdot 10^{-4}$ mole. Si l'on ramène ce nombre par gramme de résine, on obtient 1.22 mmole de pénicillinate par gramme de résine. Il faut toujours tenir compte de l'augmentation de masse de la résine greffée qui entraîne la diminution du nombre de motifs greffés par gramme de résine : $3.34 / 1.62 = 2.06$ mmole de pyridinium / g. Enfin, il faut faire le rapport du nombre de **pénicillinate** sur le nombre de pyridinium de la résine greffée pour obtenir le taux d'échange d'anions : $1.22 / 2.06 = 59.2\%$. Le même calcul est réalisé pour l'échange avec le **nalidixate** et le résultat obtenu est un taux d'échange de **43.1%**.

Les analyses élémentaires des deux résines permettent d'obtenir les résultats suivants (Fig. 134).

	%C	%H	%N	%S
67b + pénicillinate de K	61.83	5.60	6.11	5.02
67b + nalidixate de K	66.82	5.82	7.05	<0.05

*Fig. 134 : Résultats d'analyse élémentaire de la résine **67b** échangée par les anions pénicillinate et nalidixate.*

Le calcul du pourcentage d'échange du nalidixate de potassium est un peu complexe, puisqu'il faut utiliser le pourcentage d'azote qui regroupe à la fois les motifs pyridiniums greffés et les motifs nalidixate échangés. Pour cela, le pourcentage d'azote de 7.05% correspond à 5.04 mmole d'azote total / g dans la résine greffée. La variation de masse de la résine (+ 62%) entraîne un nombre de motifs pyridinium égal à 2.06 mmol/g ($3.34 / 1.62$). Si l'on soustrait ce nombre de motifs pyridinium au nombre d'azote total, on obtient $5.04 - 2.06 = 2.98$ mmol d'azote des nalidixates / g de résine. Il y a 2 azotes par nalidixate, ce qui correspond donc à un nombre de nalidixates / g de résine égal à $2.98 / 2 = 1.49$ mmol/g. Le taux d'échange est obtenu par le rapport du nombre de nalidixates sur le nombre de pyridiniums soit $1.49 / 2.06 = 72.3\%$.

Pour l'échange du pénicillinate de potassium, on peut considérer le pourcentage de soufre, qui après calculs conduit à un taux d'échange de **60.0%** ou bien refaire le même type de calcul que pour le nalidixate de potassium (en considérant le pourcentage d'azote). Dans ce cas, le pourcentage d'échange est de **33.5 %**.

Ci-dessous est présenté un graphique résumant les résultats des pourcentages de capture de chaque antibiotique par les différentes techniques utilisées (Fig. 135).

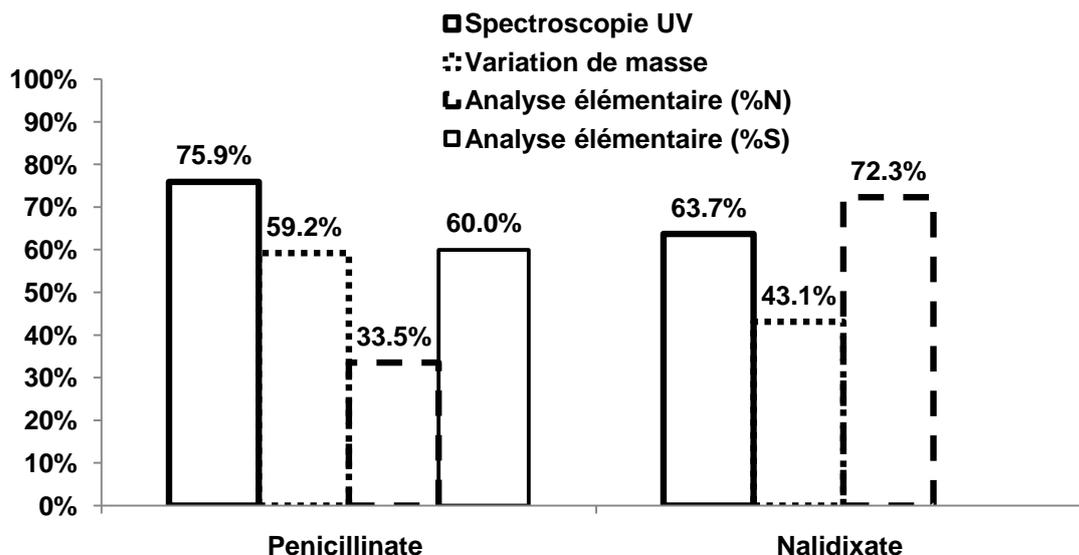


Fig. 135 : Comparaison des résultats des taux d'échanges d'anions issus des mesures de spectroscopie UV, d'analyse élémentaire et de la variation de masse de la résine.

Ces résultats montrent des taux d'échanges des chlorures de la résine très disparates. Ceci étant, si l'on s'intéresse uniquement à la spectroscopie UV, les résultats montrent des taux d'environ 75% pour le pénicillinate et 65% pour le nalidixate, ce qui confirme un échange d'environ deux tiers des anions de la résine.

L'analyse élémentaire présente un taux de 72.3% pour le nalidixate, plutôt cohérent avec le résultat d'UV, mais une incohérence apparaît lorsque l'on compare les résultats issus des analyses élémentaires (%N et %S) de la résine pénicillinate (33.5% et 60.0%). Une hypothèse peut tout de même être posée quant au fait que le résultat obtenu à partir du pourcentage de soufre est plus juste que celui calculé à partir du pourcentage d'azote. La raison vient du fait que le calcul avec le pourcentage de soufre est plus direct (sans soustraction du nombre de motifs pyridiniums) et peut être considéré comme étant plus fiable dans cette comparaison.

La variation de masse donne des résultats globalement inférieurs à ceux de l'UV (59.2% et 43.1%) mais allant dans le même sens (taux d'échange du pénicillinate supérieur à celui du nalidixate).

Afin d'obtenir des mesures précises et répétables ainsi que d'éviter l'utilisation de grosses quantités de résines à chaque essai, une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance (CLHP) a été mise au point.

13.3 Chromatographie Liquide Haute Performances

13.3.1 Matériel et méthode

Afin de poursuivre les expériences d'échange d'anions, les conditions suivantes de CLHP ont été utilisées pour quantifier les anions pénicillinate et nalidixate :

- Colonne type C18 (phase inverse) à température ambiante.
- Phase mobile : mélange tampon acétate pH 2.2 (50 mM dans l'eau) / CH₃CN : 75/25.
- Débit de 1.5 mL/min
- Volume d'injection : 5 µL
- Longueur d'onde de détection fixée à 256 nm.

13.3.2 Linéarité

La linéarité de l'aire sous pic par rapport à la concentration injectée a été vérifiée à la fois pour le pénicillinate et le nalidixate de potassium à des concentrations allant de $2.00 \cdot 10^{-3}$ à $1.25 \cdot 10^{-4}$ mol/L (n = 3). Les résultats sont présentés ci-dessous (Fig. 136 et Fig. 137).

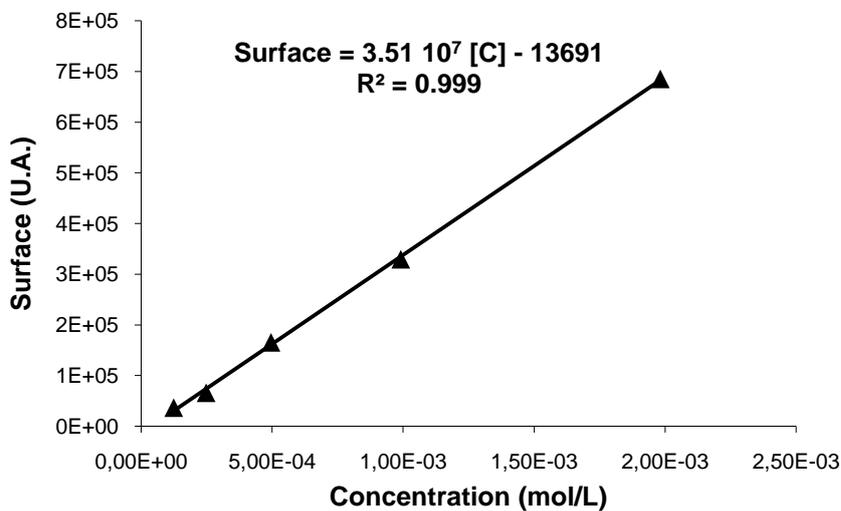


Fig. 136 : Etude de linéarité du pénicillinate de potassium en CLHP.

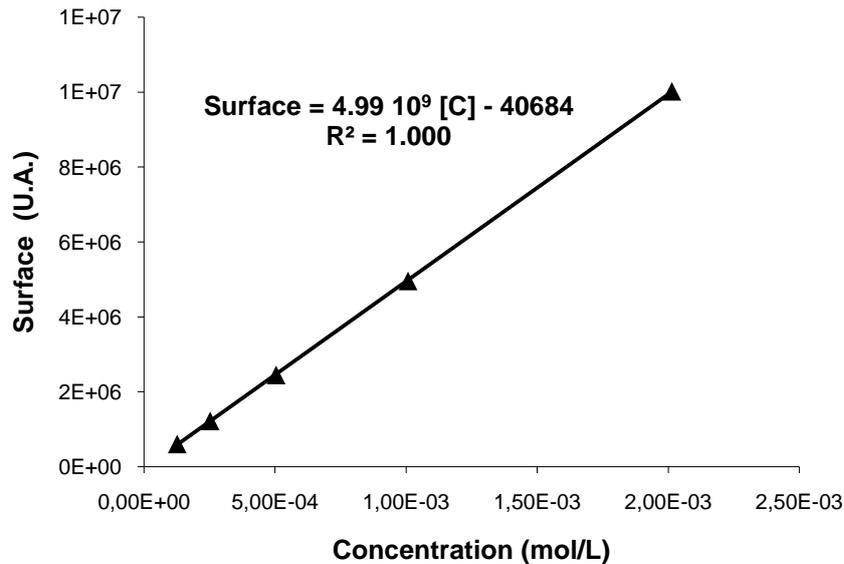


Fig. 137 : Etude de linéarité du nalidixate de potassium en CLHP.

Les résultats obtenus montrent une parfaite linéarité sur ces domaines de concentration.

13.3.3 Cinétique d'échange des ions chlorure de la résine pyridinium 67b

Afin de connaître la vitesse à laquelle l'échange d'anion a lieu, une étude cinétique de cet échange a été menée en suivant l'évolution de la concentration de l'antibiotique à $t = 0, 5, 10, 15, 30$ et 60 min. 11.3 mg de résine **67b** est mise en suspension dans 10.0 mL d'une solution de pénicillinate ou de nalidixate de potassium à $4.0 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Ces conditions permettent de se placer en stœchiométrie : motifs pyridinium / anions (1/1).

Les résultats sont présentés dans le graphique de la Fig. 138.

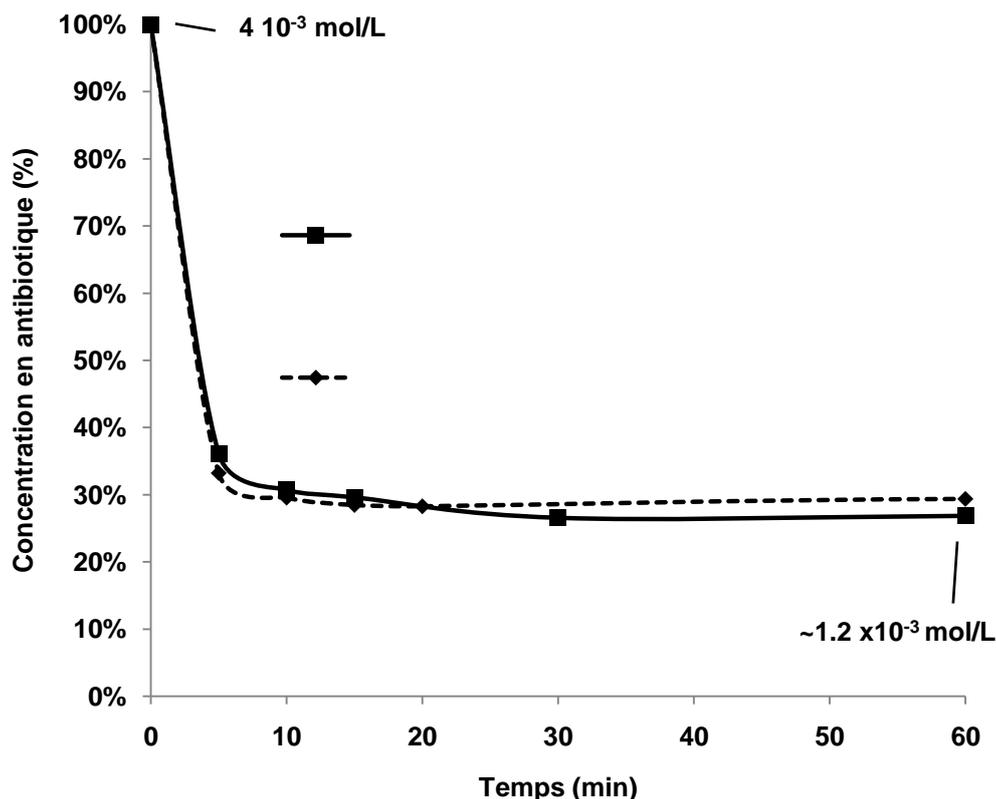


Fig. 138 : Quantification de la concentration en antibiotique restant en solution en fonction du temps de contact avec la résine pyridinium **67b**. Cas du nalidixate et du pénicillinate.

Les résultats sont très intéressants puisqu'ils démontrent un échange très rapide (<5 min) des deux anions suivi d'un plateau. Cet échange, réalisé dans des conditions stœchiométriques, permet d'échanger plus de 70% de la quantité initiale de chacun des antibiotiques mis en présence.

La suite des essais a été orientée vers le lavage de cette résine et surtout le relargage de cette dernière, permettant d'introduire une notion de recyclabilité du polymère.

13.3.4 Capture et relargage d'antibiotiques en quantités stœchiométriques sur la résine pyridinium **67b**

Les mêmes expériences sont réalisées cette fois-ci en utilisant environ exactement 2.0 mg de résine pyridinium **67b**, mise en contact avec 1 équivalent de chacun des deux anions (pénicillinate et nalidixate) dans 1.5 mL d'eau distillée en tube Eppendorf de 2 mL. Les résultats sont présentés dans la Fig. 139 ci-dessous.

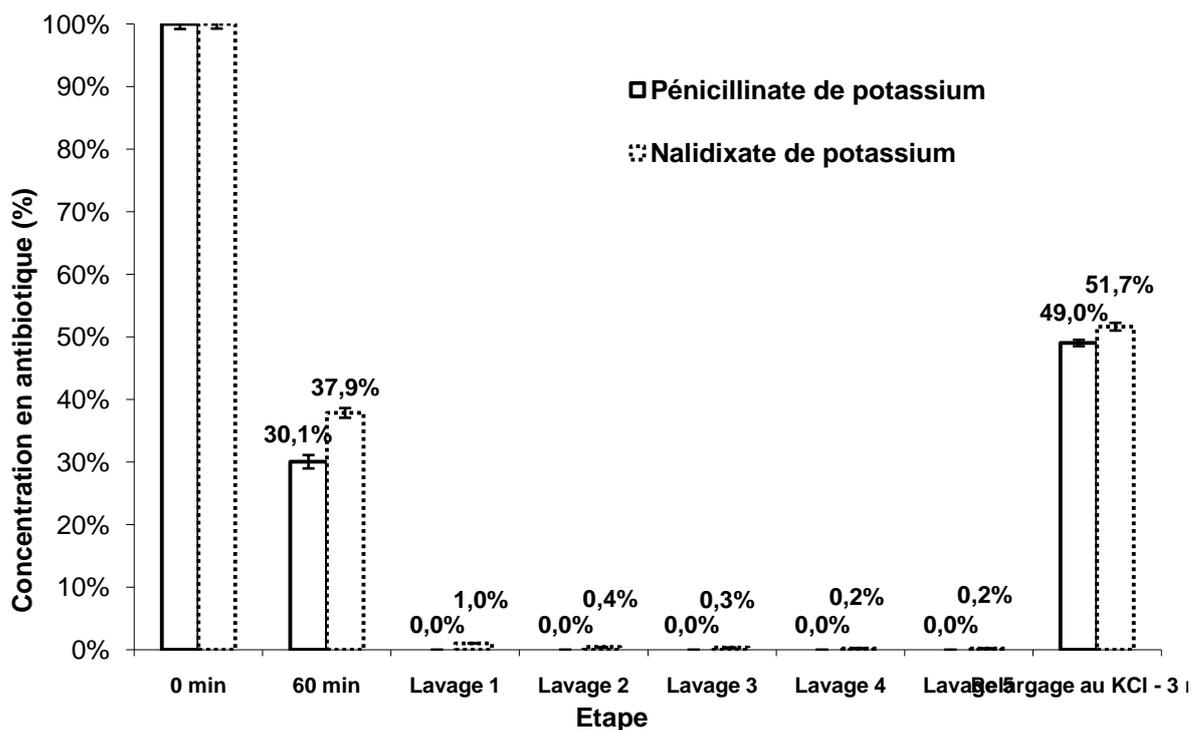


Fig. 139 : Quantification de l'évolution des concentrations d'antibiotiques en contact avec la résine pyridinium **67b** au cours des étapes de capture, lavage et relargage.

Les deux échantillons sont agités pendant 1 heure à température ambiante, puis les surnageants sont quantifiés par rapport à la concentration initiale introduite dans chaque échantillon. Comme dans l'essai précédent, les échanges d'anions sont d'environ 70% pour les deux antibiotiques (concentration résiduelle = ~30% de la concentration initiale). Les échantillons sont ensuite lavés 5 fois de suite, par un protocole de lavage consistant à retirer le surnageant, ajouter 1.5 mL d'eau et à centrifuger le tube Eppendorf à 13500 tr/min pendant 3 minutes. Après chaque lavage, le surnageant est injecté en CLHP et les résultats ne montrent aucun relargage de pénicillinate dans l'eau et un relargage très faible de nalidixate (Lavages 1 à 5 : relargage maximum de 1.02% de nalidixate et décroissant).

Le surnageant de l'échantillon est finalement retiré, puis remplacé par 1.5 mL d'une solution de KCl à 0.5 mol/L. Le tube Eppendorf est agité pendant 3 min et le surnageant est injecté en CLHP. Un relargage de 49.0% et 51.7% de la concentration initialement introduite (0 min de la Fig. 139) des anions pénicillinate et nalidixate est observé.

Ces résultats permettent de prouver que la résine pyridinium **67b** est capable de réaliser l'extraction solide-liquide d'anions pénicillates et nalidixates dans l'eau. Elle permet également de conserver ces anions lors du rinçage de cette résine à l'eau mais elle relargue une grande partie des anions capturés lorsqu'elle est mise en compétition avec une solution

0.5 M de KCl. En effet, environ 50% de la concentration initiale de chaque antibiotique est relarguée, ce qui correspond à environ 70% de la quantité d'antibiotique échangée lors de l'étape de mise en contact de l'antibiotique avec la résine.

L'étape suivante consiste à étudier la mise en compétition des deux antibiotiques sur la résine.

13.3.5 Capture et relargage d'un mélange équimolaire de pénicillinate et de nalidixate de potassium sur la résine 67b

Afin de tester la compétitivité de l'échange des chlorures de la résine pyridinium face aux pénicillinates et aux nalidixates, un mélange équimolaire des deux anions est préparé et mis en contact avec la résine **67b**. Les résultats sont présentés ci-dessous en fonction des proportions de chacun des deux antibiotiques : 0.25 éq. (Fig. 140), 0.5 éq. (Fig. 141) et 1.2 éq par rapport aux chlorures de la résine. (Fig. 142).

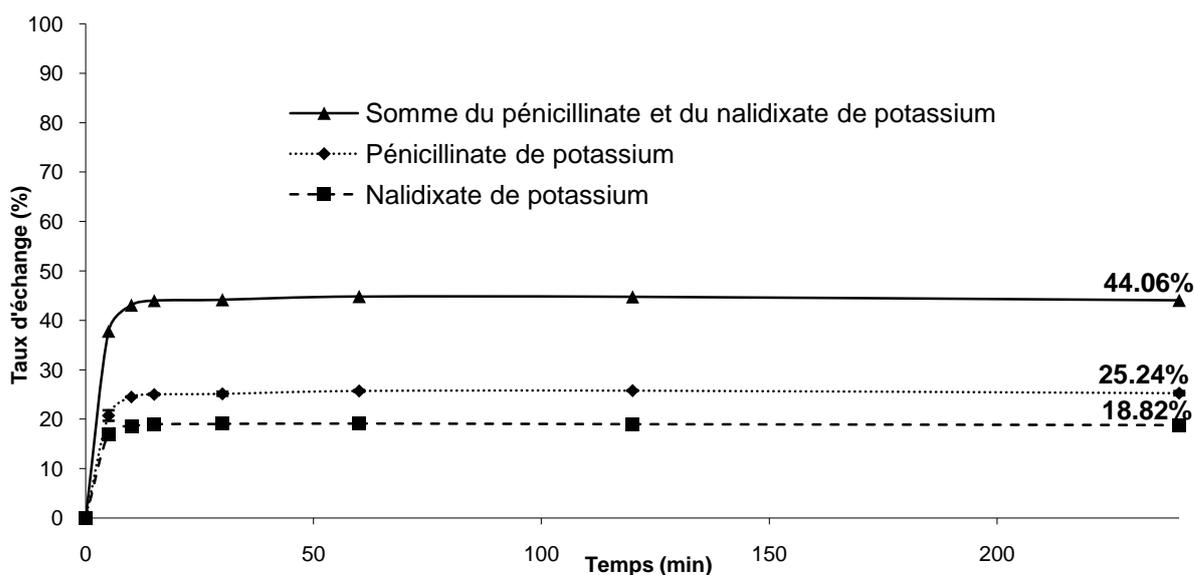


Fig. 140 : Echange des chlorures par un mélange équimolaire pénicillinate et nalidixate de potassium (0.25/0.25) sur la résine pyridinium **67b**.

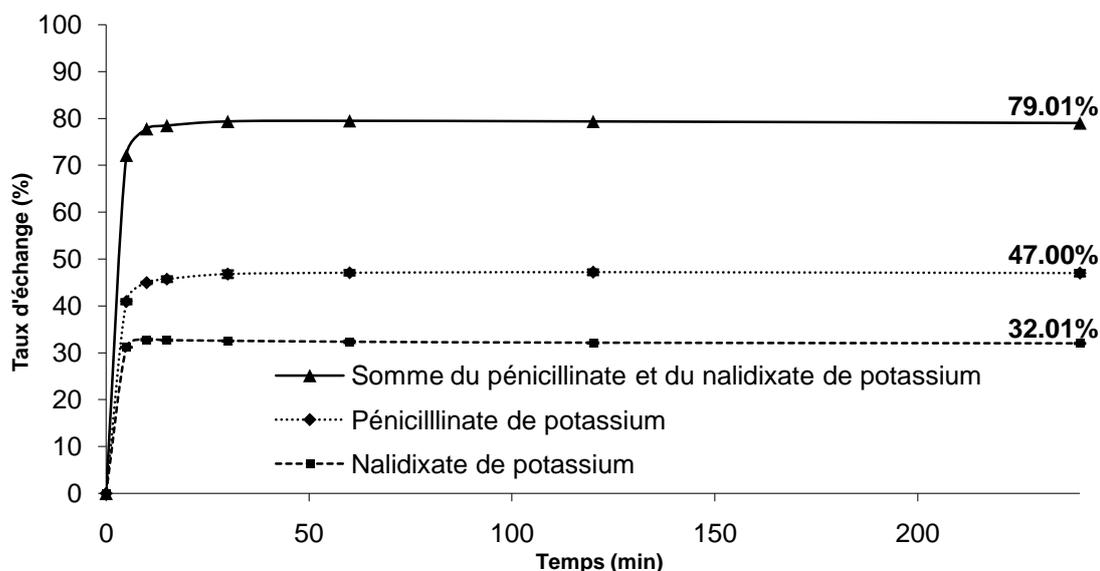


Fig. 141 : Echange des chlorures par un mélange équimolaire pénicillinate et nalidixate de potassium (0.5/0.5) sur la résine pyridinium **67b**.

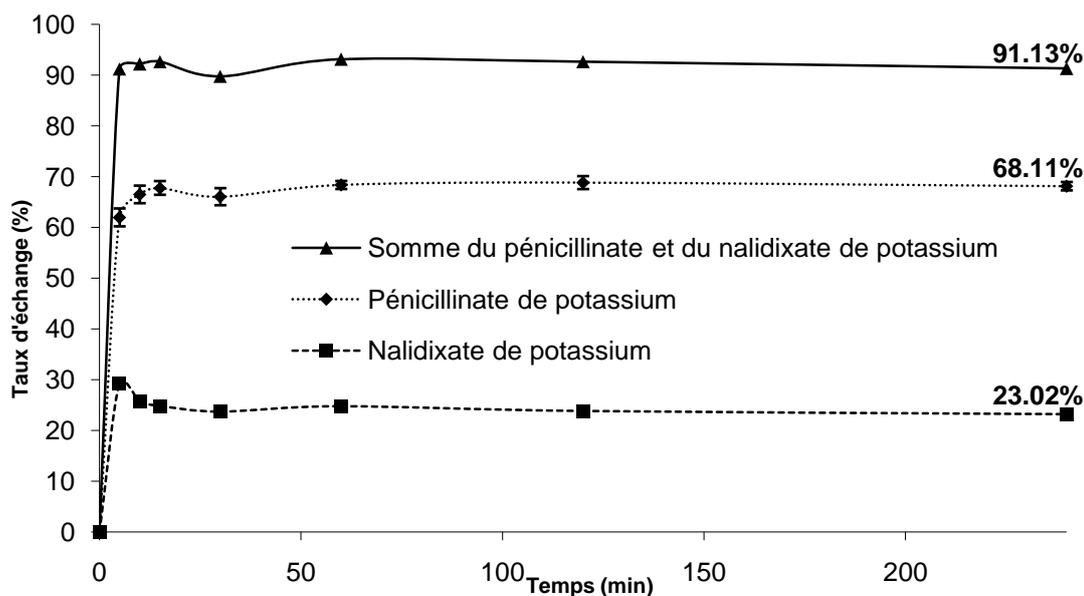


Fig. 142 : Echange des chlorures par un mélange équimolaire pénicillinate et nalidixate de potassium (1.2/1.2) sur la résine pyridinium **67b**.

13.3.5.1 Discussion sur le type d'anion préférentiellement échangé

Ces résultats démontrent la préférence significative de la résine pyridinium à échanger le pénicillinate par rapport au nalidixate de potassium (dans tous les cas). Cependant, il faut remarquer que cette préférence est nettement plus significative lorsque la quantité d'anions à échanger augmente. En effet, si l'on fait les rapports de la quantité de pénicillinate sur la

quantité de nalidixate dans chacun des essais, des rapports de 1.34 (pour 0.25 éq.), 1.47 (pour 0.5 éq.) et de 2.96 (pour 1.2 éq.) sont obtenus.

Les pKa du pénicillinate de potassium et de l'acide nalidixique^{133,134} sont respectivement de 2.8 et 8.6. Le pKa de l'acide nalidixique, très élevé alors que l'acide considéré est un acide hautement conjugué, s'explique par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire (Fig. 143). La conséquence est l'obtention d'une base conjuguée bien plus forte que celle du pénicillinate de potassium.

Fig. 143 : Liaison hydrogène intramoléculaire de l'acide nalidixique.

Si l'on reprend la comparaison précédente, l'acide nalidixique devrait être nettement plus compétitif que le pénicillinate de potassium, or ce n'est pas le cas du tout. L'explication pourrait venir alors de la différence de lipophilie des deux composés. Les valeurs expérimentales des log P (partition octanol/eau) sont de 2.09 pour la pénicilline V et de 1.59 pour l'acide nalidixique^{133,134}. Nous pensons qu'une molécule plus lipophile (pénicilline V dans ce cas) entrera probablement plus facilement à l'intérieur de la matrice polymérique (type hydrocarbure). Le caractère amphiphile plus marqué du pénicillinate aisément imaginable par sa structure allongée peut être aussi invoqué ici.

13.3.5.2 Discussion sur les quantités d'anions échangées

En ce qui concerne les quantités totales d'anions échangés, on peut remarquer que le fait de se placer en large défaut d'anions à capturer (0.25 éq. de chacun, soit 0.5 éq. au total) ne permet pas pour autant d'obtenir un échange quantitatif puisque seulement 44.1% des chlorures sur les 50% théoriques sont échangés.

Lorsque la stœchiométrie est respectée (0.5 éq. de chacun des anions, soit 1 éq. au total), on remarque que l'échange total est supérieur à l'échange de chaque anion pris séparément. Soit 79.01% contre 69.9% pour le pénicillinate de potassium et 62.1% pour le nalidixate de potassium.

Enfin, lorsque les anions sont placés en large excès (2.4 éq.), le pourcentage d'échange total monte cette fois-ci jusqu'à 91.1%. Proposer un large excès d'anions à échanger permet donc d'améliorer la capacité d'échange des chlorures de la résine.

Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un équilibre entre les anions échangés qui peuvent être déplacés par l'ajout d'un excès d'anions compétiteurs dans le milieu.

La suite du travail consiste à tester la recyclabilité de la résine pyridinium et pour cela, les essais ont été réalisés en se plaçant volontairement avec un excès d'anions à échanger afin de maximiser la quantité d'antibiotique portée par la résine.

13.3.6 Capture et relargage de pénicillinate de potassium en excès sur la résine pyridinium 67b

Un essai de capture et de relargage en présence d'un excès de pénicillinate de potassium sur la résine pyridinium a été tenté, puis les étapes de capture et de relargage ont été renouvelées une seconde fois (Fig. 144).

Fig. 144 : Cycles de capture et de relargage du pénicillinate de potassium mis en présence de résine pyridinium 67b.

L'excès de pénicillinate de potassium est fixé à 1.6 équivalents des chlorures de la résine pyridinium **67b** dans 1.5 mL d'eau. Cette solution de pénicillinate est mise en contact avec la résine pyridinium **67b** en tube Eppendorf de 2 mL. Après une heure d'agitation, la concentration en pénicillinate de potassium est quantifiée : elle correspond à un échange de 96% des chlorures de la résine. L'essai est poursuivi par 3 lavages de la résine à l'eau (conditions identiques à l'essai précédent) et est soumise au relargage par ajout de 1.5 mL de KCl 0.5M.

Cette opération se traduit par un relargage de 64% des pénicillines chargés sur la résine. Après un protocole de lavage supplémentaire, un second cycle de capture et de relargage est réalisé. Lors du second cycle, la capture est cette fois égale à 85% des anions de la résine échangés avec des pénicillines (en tenant compte des anions n'ayant précédemment pas été relargués). Le second relargage obtenu est de nouveau égal à 64% des pénicillines chargés sur la résine.

Cet essai permet de montrer deux choses :

- Un excès (1.6 éq. au lieu de 1 éq.) d'ions pénicillines permet d'augmenter l'échange des chlorures de la résine pyridinium de 70% à 96%.
- Bien que le nombre de cycles soit faible, le potentiel de recyclabilité (plusieurs captures et relargages) de cette résine pour l'échange d'anions est manifeste (96% et 85% pour la capture et deux fois 64% pour le relargage).

13.3.7 Contrôle du relargage de la résine

Un essai identique au précédent est tenté mais cette fois-ci en remplaçant le relargage au KCl 0.5M par un relargage au NaCl 0.15 M choisi pour son caractère isotonique (Fig. 145).

*Fig. 145 : Capture de pénicillinate de potassium sur la résine pyridinium **67b** et relargage par utilisation d'une solution de NaCl 0.15M.*

La capture dans cet essai permet d'échanger 89% des chlorures de la résine pyridinium. Par contre, l'utilisation d'une solution de NaCl 0.15 M entraîne le relargage d'uniquement 25% des pénicillines échangées de la résine.

Ce résultat est très intéressant car il présente une méthode permettant d'obtenir un relargage partiel des antibiotiques échangés à la surface de la résine. De plus, la concentration de NaCl 0.15 M n'est pas choisie au hasard, puisqu'elle correspond à une concentration de 9 g/L, elle-même correspondante à la concentration en NaCl d'une solution physiologique. Pour rappel, une solution physiologique (ou sérum physiologique) est une solution contenant la même concentration osmolaire que celle des principaux fluides corporels (notamment le sang).

13.4 Conclusion

La résine pyridinium **67b**, préalablement synthétisée et caractérisée a permis de réaliser la capture de deux antibiotiques modèles (une pénicilline et une quinolone) mis en solution dans l'eau.

La cinétique d'échange de ces deux composés avec les chlorures de la résine pyridinium est relativement rapide (< 5 min) et permet d'obtenir une résine pyridinium imprégnée d'anions antibactériens. De plus, ces derniers ne sont pas relargués lorsque la résine est rincée à l'eau, mais peuvent l'être, de manière contrôlée, lorsque le polymère est mis en suspension dans une solution saline de concentration définie (par exemple, une solution isotonique).

La recyclabilité de la résine, c'est à dire sa capacité à capter et à relarguer plusieurs fois les antibiotiques a été étudiée, et les premiers résultats indiquent un intérêt potentiel encore à confirmer.

La suite des travaux présents dans ce manuscrit concernent l'étude des capacités de la résine pyridinium **67b**, non plus à capter des antibiotiques par échange d'anion, mais à retenir des bactéries à sa surface par des interactions que nous supposons électrostatiques. Cette étude a pu être menée avec aisance et rapidité grâce à l'utilisation de l'électrophorèse capillaire comme outil de dosage de bactéries.

14 Electrophorèse capillaire

14.1 Quantification de bactéries par une méthode électrophorétique

14.1.1 Introduction

Le deuxième objectif principal ciblé avec la préparation des résines polycationiques décrite précédemment est leur utilisation comme agents potentiellement rétenteur/séquestrant de bactéries, dont la réalité trouverait son application dans la décontamination bactérienne des milieux aqueux.

Le Pr. Brissaud explique ainsi dans son rapport¹³⁵ remis au Sénat en 2003, qu'afin de traiter l'eau pour la rendre potable, des procédés physiques, chimiques et biologiques importants sont mis en œuvre (H_2O_2 , O_3 , chlore, UV, filtration, microfiltration ...). De plus, il sera de plus en plus utile dans notre pays de recourir à la réutilisation des eaux usées afin d'économiser au maximum cette ressource précieuse. Parmi les polluants présents dans ces eaux, les bactéries pathogènes posent un réel problème de décontamination et donc de santé publique.

Il faut alors distinguer deux types de décontamination : la décontamination par **destruction** et la décontamination par **séparation/collecte** des bactéries.

De façon intéressante, ces deux aspects sont bien comparés dans la thèse de Krishnamurthy¹³⁶ sur un liquide alimentaire : le lait. Il doit être décontaminé afin de prolonger sa conservation. Pour ce faire, différentes techniques de décontamination du lait existent telles que des méthodes destructives pour les bactéries : pasteurisation (chauffage haute température (HT) ou ultra haute température (UHT) pendant des temps très courts), irradiation gamma, UV ou infrarouge, traitement à hautes pressions ou application de champs électriques pulsés.

Il est également possible de réaliser la séparation de bactéries par l'utilisation de filtres (microfiltration et ultrafiltration) ou de centrifugation. Dans ce cas, les bactéries ne sont pas détruites mais séparées du milieu. Il est à noter que la qualité du lait obtenu par des techniques de séparation des bactéries est bien meilleure que celle obtenue par leur destruction. Le chauffage (responsable de la destruction des bactéries) entraîne en effet une dégradation d'une partie des constituants du lait (vitamines, protéines, lactose ...).

De la même façon qu'une méthode de séparation de type filtration ou centrifugation, notre objectif est de tester si les résines polycationiques sont capable de séparer les bactéries d'un milieu aqueux. Pour cela, le principe supposé consiste à retenir les bactéries, dont la charge globale nette est négative, à la surface du polymère cationique par des effets électrostatiques (cf §7.1). Si ce principe fonctionne, la concentration de la suspension bactérienne du milieu devrait décroître en présence des billes de polymère (Fig. 146).

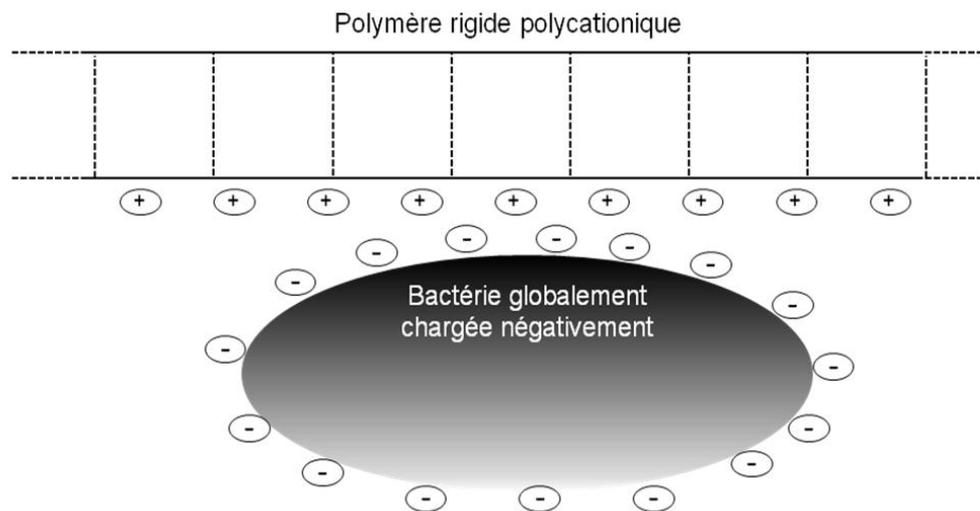


Fig. 146 : Schéma de la rétention d'une bactérie à la surface d'un polymère polycationique.

A ce stade, il s'est avéré nécessaire de trouver une méthode rapide et simple permettant de quantifier et de suivre l'évolution de la concentration en bactéries du milieu afin de pouvoir évaluer rapidement ces matériaux.

Des études microbiologiques « classiques » via une remise en culture des bactéries du milieu pourraient permettre leur quantification par comptage des cellules, comme le fait par exemple Kawabata⁵⁸. Cependant, cette méthode nécessite un savoir-faire et un matériel adaptés à la manipulation de bactéries de culture. De plus, le comptage est une technique peu précise et demandant plusieurs jours de manipulations.

Afin de résoudre ce problème de quantification, la littérature présente plusieurs études mettant en jeu des techniques d'électrophorèse capillaire (EC) qui permettent la séparation et la quantification de bactéries. En 1987, Hjertén *et al.*¹³⁷ initient l'analyse de matériels biologique par l'électrophorèse capillaire de zone centrée sur des ions inorganiques, organiques, des protéines, des virus et des bactéries.

Afin de mieux appréhender ces travaux, le principe de fonctionnement d'une électrophorèse capillaire sera décrit dans un premier temps et les différentes méthodes d'analyses de bactéries seront présentées par la suite.

14.1.2 Principe de fonctionnement de l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation d'espèces chargées (ou neutres dans le cas particulier de l'électrophorèse capillaire micellaire) reposant sur la différence de leur vitesse de migration dans un tampon. La différence de vitesse de migration peut provenir de la charge ou de la taille des particules. Par exemple, à charge égale, un ion de petite dimension se déplace plus vite qu'un ion de grande taille. De façon similaire, à taille égale, un ion doublement chargé se déplace plus rapidement qu'un ion porteur d'une seule charge. L'instrumentation à mettre en place n'est pas très lourde et le schéma suivant (Fig. 147) présente les différents composants de cet appareil.

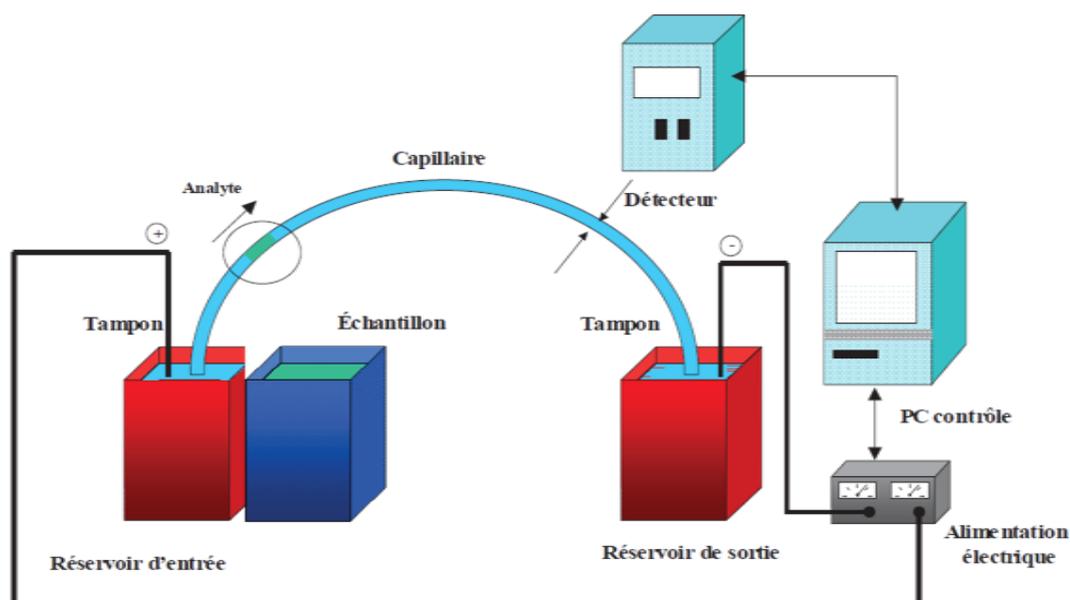


Fig. 147 : Schéma des composants principaux d'une électrophorèse capillaire.

Les composants indispensables du système sont : une cuve d'échantillon, deux cuves remplies de solutions tampon (entrée et sortie), des électrodes (anode et cathode), un capillaire, une alimentation électrique haute tension, un détecteur et un système de traitement de données.

Tout d'abord, un capillaire (tube) de silice fondue, ouvert à chaque extrémité, d'un diamètre interne pouvant aller de 20 à 100 μm et d'une longueur allant de 20 cm à 1 m est

rempli d'une solution tampon et plongé dans chacune des deux cuves de tampon. Ce capillaire peut-être facilement manipulé car il est recouvert d'une gaine de polyimide et ses propriétés de séparation peuvent être modifiées par la nature de son greffage interne (silice vierge, enduite ou greffée). L'introduction de l'échantillon est réalisée en plaçant le capillaire dans la cuve d'échantillon, puis en le replaçant dans la solution tampon. L'échantillon à ce moment-là est injecté par capillarité, par application d'une pression et/ou d'un courant électrique pendant un temps donné. Après l'injection, un courant électrique est appliqué aux deux extrémités du capillaire.

La première méthode développée en électrophorèse capillaire est l'électrophorèse capillaire de zone (CZE). Cette méthode permet la séparation des constituants du mélange dans le temps sous l'effet de deux facteurs appelés mobilité électroosmotique (μ_{eo}) et mobilité électrophorétique (μ_{ep}). La somme de ces deux termes est appelée mobilité apparente (μ_{app}) : $\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$.

La mobilité électroosmotique (ou électroosmose) contrôle le mouvement des solutés. La paroi interne du capillaire est tapissée de groupements silanol qui s'ionisent à partir d'un pH égal à 3 pour former une paroi intérieure chargée négativement. Afin d'assurer la neutralité, les cations du tampon viennent recouvrir la paroi, ce qui donne lieu à la formation d'une double couche (Fig. 148). Sous l'influence du champ électrique, les cations de cette double couche se mettent en mouvement et migrent en direction de la cathode. Cette migration de cations, ainsi que leurs sphères d'hydratation, entraîne la solution tampon et crée un flux appelé écoulement électroosmotique. Il est ainsi possible de faire migrer des espèces neutres, tel l'alcool benzylique, le long du capillaire.

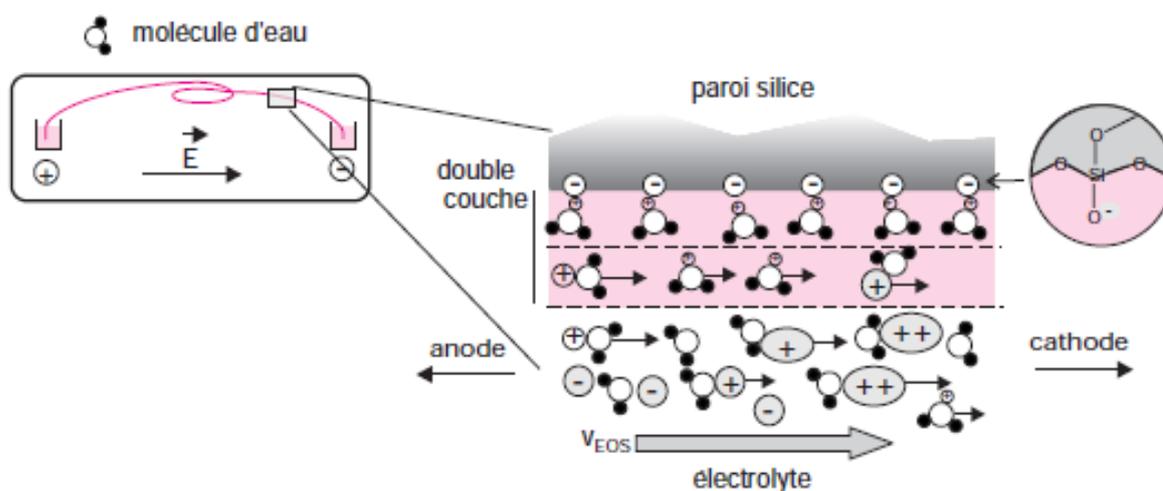


Fig. 148 : Représentation de la double couche responsable de l'écoulement électroosmotique dans le capillaire.¹³⁸

Le second facteur est la mobilité électrophorétique qui correspond au déplacement des molécules chargées sous l'influence d'un champ électrique vers l'électrode de signe opposé. Les molécules neutres n'ont donc pas de mobilité électrophorétique et ne seront pas séparées par cette technique puisqu'elles migreront toutes à la même vitesse (Fig. 149).

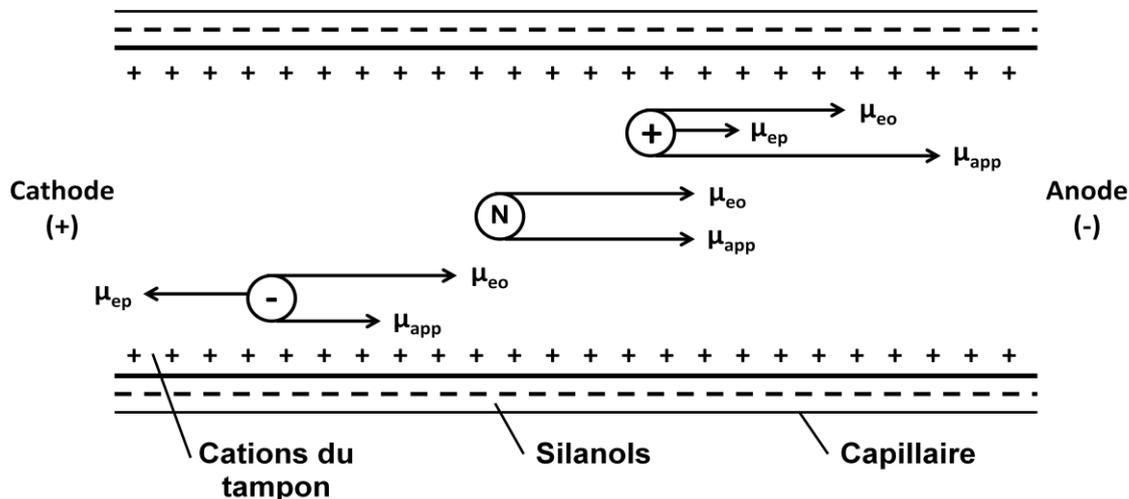


Fig. 149 : Représentation des forces de mobilité électroosmotique, électrophorétique et apparente d'une espèce neutre (N), d'une espèce chargée positivement (+) et d'une espèce chargée négativement (-).

Le choix d'un tampon adapté est crucial car de sa concentration (ou de sa force ionique) ainsi que de son pH dépendront les mobilités électrophorétiques et électroosmotiques, et donc la rapidité et les performances de séparations.

La détection et la quantification des espèces peuvent être effectuées par des détecteurs UV-Visible, de fluorescence, électrochimique ou de spectrométrie de masse. Ce dernier permet l'identification des composés séparés. La détection UV-Visible est réalisée sur une section du capillaire qui est utilisée comme cellule de détection (fenêtre du capillaire). Le signal obtenu est collecté, quantifié et permet d'obtenir un électrophorégramme (réponse UV en fonction du temps). De la même façon que pour un dosage UV classique, la loi de Beer-Lambert s'applique et une relation de proportionnalité peut être obtenue entre la concentration de l'espèce injectée et la hauteur ou l'intégration de l'aire du signal.

14.1.3 Séparation de bactéries par une méthode électrophorétique

L'injection de bactéries *E. coli* lyophilisée remise en suspension dans un tampon a tout d'abord été tentée en utilisant l'électrophorèse capillaire de zone. Le résultat suivant a été obtenu (Fig. 150).

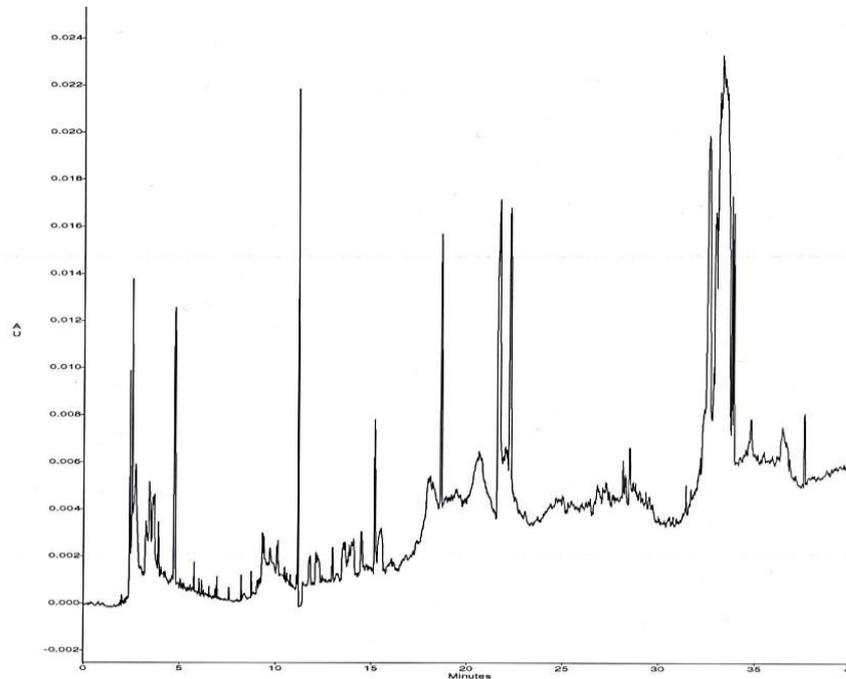


Fig. 150 : Electrophorégramme d'une injection d'E. coli par utilisation de conditions d'électrophorèse capillaire de zone.

L'électrophorégramme est une forêt de pics et des injections successives de la même suspension bactérienne ne permettent pas d'obtenir une répétabilité. Des problèmes connus sont associés à l'analyse de cellules vivantes comme par exemple, l'adsorption sur la paroi du capillaire ou l'auto-agrégation des cellules entre-elles, qui peuvent expliquer ce résultat. Cette méthode ne permettra pas, dans ces conditions, de séparer ni de quantifier des bactéries en suspension.

Heureusement, d'autres méthodes d'électrophorèse capillaire existent et permettent d'optimiser des paramètres particuliers. Les exemples suivants présentent certaines de ces techniques :

- L'électrophorèse capillaire micellaire : elle permet la séparation d'espèces neutres par ajout d'un tensio-actif (le sodium dodecyl sulfate : SDS), qui encapsule les espèces (formation de micelles chargées) et permet leurs migrations et leurs séparations.

- L'électrophorèse capillaire chirale : elle permet la séparation d'énantiomères par l'ajout d'un sélecteur chiral dans l'électrolyte (ex : éthers couronnes ou cyclodextrines).
- La focalisation isoélectrique capillaire : elle consiste à créer au sein du capillaire un gradient de pH croissant de l'anode à la cathode qui permettra la séparation des différentes espèces par leurs migrations vers leurs points isoélectriques respectifs.
- L'isotachophorèse capillaire

Comme l'explique très bien Philippe Anres dans sa thèse¹³⁹, l'isotachophorèse capillaire consiste à injecter l'échantillon de manière hydrodynamique entre un électrolyte meneur (EM) et un électrolyte terminal (ET). L'EM est placé dans le capillaire et dans le réservoir de sortie alors que l'ET est placé dans le réservoir d'entrée. L'EM et l'ET contiennent des ions de même signe que les analytes d'intérêt présents dans l'échantillon, ayant des mobilités respectivement supérieures et inférieures, à celles des analytes. Les ions se séparent alors selon leurs différences de mobilité entre l'EM et l'ET lorsqu'une tension est appliquée. Du fait de la discontinuité en mobilité et concentration des ions introduits dans le milieu de séparation, un gradient discontinu du champ électrique est créé entre ces différentes bandes, et le champ électrique régnant dans chaque bande est inversement proportionnel à la mobilité de l'analyte (condition d'isotachophorèse). Ce sont les ions de chaque bande qui assurent la conduction électrique et non un électrolyte unique comme en CZE. Ainsi, un ion rapide diffusant dans la zone d'un ion lent est soumis à un champ électrique plus élevé et est donc accéléré pour rejoindre sa propre bande où règne un champ plus faible.

Le schéma suivant permet de mieux comprendre le principe de séparation décrit ci-dessus (Fig. 151).

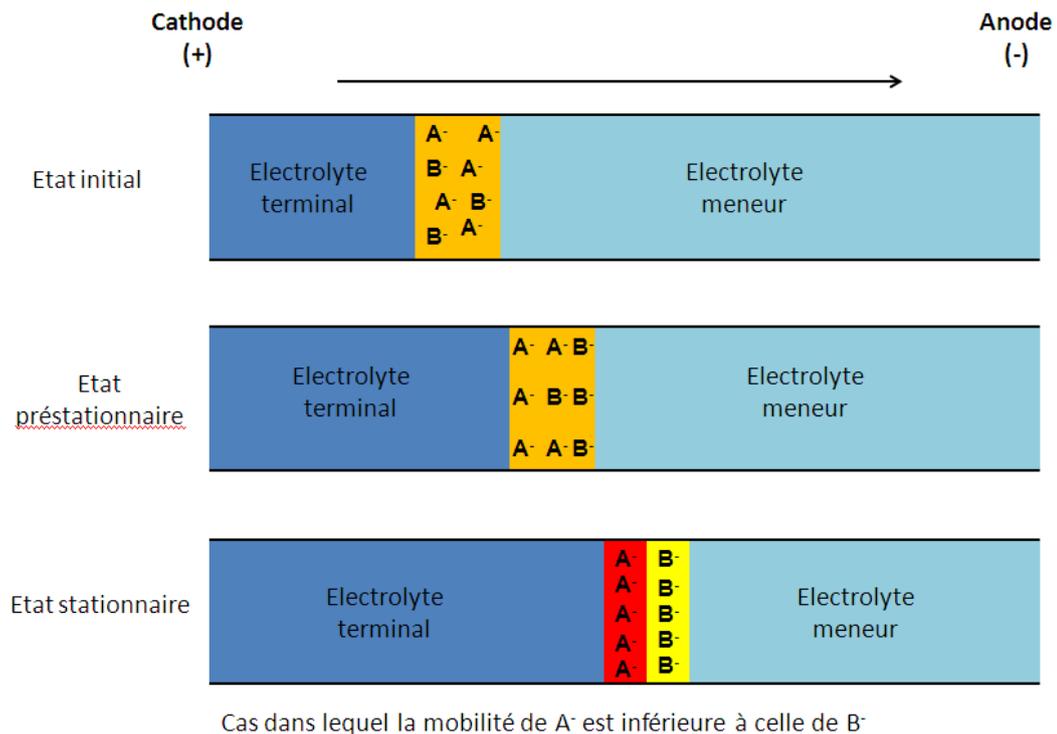


Fig. 151 : Schéma de la séparation de deux analytes (A⁻ et B⁻) par une méthode d'isotachophorèse capillaire.

Si l'on revient à la séparation de bactéries décrite dans la littérature, Armstrong *et al.*¹⁴⁰ décrivent en 1999 des méthodes de séparation de bactéries en utilisant une méthode de focalisation isoélectrique capillaire. Cette application part du principe que les densités de charge à la surface des bactéries (l'équivalent du point isoélectrique d'une molécule) sont différentes et qu'il est donc possible de les séparer par cette technique. Les résultats furent tout à fait concluants, reproductibles et permirent de séparer des mélanges de plusieurs espèces bactériennes différentes. Des applications pratiques en découlent rapidement comme par exemple une méthode de détection rapide (<10 min) permettant de caractériser les souches d'*E. coli* et de *S. saprophyticus* fréquemment responsables d'infections urinaires directement à partir d'un échantillon d'urine dilué est publiée l'année suivante par la même équipe¹⁴¹. Ce type d'analyse pourrait rapidement prendre sa place au sein d'un laboratoire de microbiologie, dans un laboratoire de biologie médicale par exemple.

En 2004, Palenzuela *et al.*¹⁴² montrent la possibilité de quantifier 8 bactéries différentes présentes dans des aliments tels que des flocons de maïs, du jus de fruits, de la nourriture pour bébé ou de la saucisse de Francfort par une méthode de quantification faisant appel à l'électrophorèse capillaire de zone. Cette quantification est d'ailleurs comparée à la méthode d'analyse classique par comptage des CFU après 24h ou 48h et des

résultats très proches sont obtenus en seulement 7 heures de développement des bactéries et 25 minutes d'analyse. Ces gains de temps sont véritablement remarquables et permettront peut-être d'effectuer en plus grand nombre, plus rapidement et à moindre coût des contrôles sanitaires.

En 2005, Buszewski *et coll.*¹⁴³ présentent la séparation de bactéries en utilisant un capillaire greffé avec des triméthylchlorosilanes ou des divinylbenzènes en complément de l'addition de polymères au tampon de migration qui permet de séparer un mélange de 5 bactéries différentes. Ces conditions sont intéressantes car elles présentent un moyen d'éviter grandement l'auto agrégation des bactéries entre elles.

Une méthode de quantification efficace et rapide a été obtenue par Oukacine *et al.*¹⁴⁴ qui ont réussi à quantifier des suspensions bactériennes à la fois de bactéries à Gram négatifs (*Erwinia carotovora*) et à Gram positifs (*Micrococcus luteus*). Cette quantification est obtenue par l'utilisation d'une méthode d'isotachophorèse capillaire qui va permettre d'accélérer les bactéries à l'intérieur du capillaire et d'obtenir des pics fins et bien séparés. De plus, les temps de migration sont courts, les courants utilisés sont faibles, ce qui permet de limiter l'effet Joule et ainsi d'éviter la lyse des bactéries à l'intérieur du capillaire. Les bactéries sont assimilées à des particules sphériques possédant une charge globale négative répartie uniformément en surface.

Cette dernière méthode a été utilisée par Oukacine *et al.*¹⁴⁴ afin d'obtenir une focalisation des signaux de bactéries en un seul massif. Pour cela, le tampon d'entrée BGE₁ (électrolyte terminal) et de sortie BGE₂ (électrolyte meneur) ont été préparés en créant volontairement une différence de pH. Cette différence de pH crée une accélération des bactéries dans le capillaire qui permet d'obtenir un signal répétable, ainsi que des temps de migration nettement plus courts (5 min) (Fig. 152).

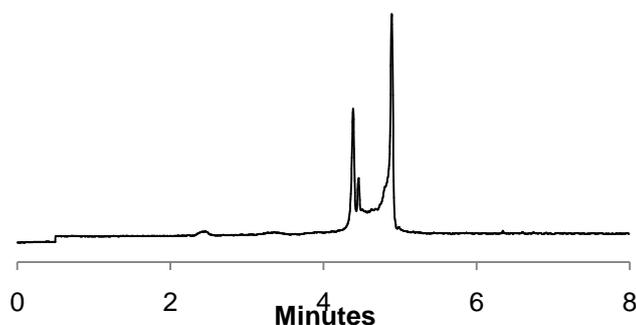


Fig. 152 : Electrophorégramme de l'injection d'une suspension bactérienne d'*E. coli* lyophilisée par la méthode d'isotachophorèse capillaire d'Oukacine *et al.*¹⁴⁴.

Cette méthode sera appliquée afin de tester les capacités de rétention de bactéries à l'ensemble des polymères cationiques précédemment synthétisés.

14.2 Matériel et méthode

Les concentrations bactériennes ont pu être quantifiées par isotachophorèse en utilisant les tampons d'entrée (BGE₁) et de sortie (BGE₂) différents. La composition et la préparation de ces tampons est décrite dans le Tableau 23 ci-dessous.

		Tampons	
		BGE ₁	BGE ₂
Composition	Tris (mmol/L)	4.5	4.5
	Acide borique (mmol/L)	50.0	50.0
	HCl (mmol/L)	3.3	0.0
Préparation	Tris (mg)	54.5	109.3
	Acide borique (mg)	309.2	618.4
	HCl (µl)	330.0	0.0
	Compléter avec de l'eau ultrapure		
	Volume final de tampon (mL)	100.0	200.0
pH (expérimental)		6.7	7.2

Tableau 23 : Composition et préparation des tampons BGE₁ et BGE₂.

Les pH des solutions tampons sont toujours vérifiés après leurs fabrications et les solutions sont conservées au frigo jamais plus de 5 jours.

Un capillaire de silice non traité (75 µm de diamètre interne) avec une longueur totale de 37 cm et une cellule de mesure placée à 29.4 cm est utilisé. Lors de sa première utilisation, ce capillaire est rincé 20 min à l'eau, à la soude 1N, à l'eau et à l'air. Avant chaque injection, le capillaire est rincé 2 min à la soude, à l'eau et au tampon BGE₂.

Tous les échantillons sont injectés en mode hydrodynamique (10 secondes sous pression) à 10 kV et des microvials (*inserts*) de 50 µL sont utilisés.

La détection est réalisée par un détecteur UV à $\lambda = 280$ nm. Une solution d'alcool benzylique (20 µL dans 20 mL d'eau) est préparée et injectée comme marqueur de flux avant chaque série d'expériences.

Les bactéries *Escherichia coli* (ATCC 11303) sont reçues lyophilisées et les suspensions bactériennes sont préparées dans le tampon BGE₂ à une concentration mère de 1.0 mg/mL. Pour cela, environ exactement 1.0 mg de bactéries sont pesées dans un tube Eppendorf de 2 mL et environ exactement 1.0 mL de BGE₂ est ajouté. Les suspensions filles de bactéries sont toutes préparées à partir de cette suspension mère et les suspensions bactériennes sont toutes renouvelées chaque jour. Par mesure de précaution et bien que non pathogène, la manipulation des bactéries s'opère en portant une blouse, des gants et un masque. Tout le matériel contaminé est plongé directement après utilisation dans un bain de javel et les surfaces sont nettoyées à l'éthanol.

Les tubes Eppendorf sont agités verticalement par rotation lente sur un disque de polystyrène à une vitesse comprise entre 10 et 20 tours par minute. Cette méthode d'agitation a été mise au point au laboratoire pour obtenir le meilleur contact possible des bactéries avec les billes de résine en suspension. (Fig. 153).

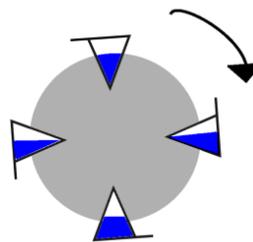


Fig. 153 : Schéma de l'agitation circulaire verticale des essais en tubes Eppendorf.

14.2.1 Discussion sur l'unité de quantification des bactéries

Pour un biologiste, une masse de bactéries n'est pas une unité de mesure adéquate. Les mesures sont le plus souvent exprimées, soit en nombre de bactéries, soit en unités formant colonies (UFC).

Afin de pouvoir corréler la masse pesée d'*E. coli* lyophilisée avec un nombre de bactéries, une valeur du poids moyen d'une bactérie *E. coli* a été cherchée dans la littérature. Les valeurs trouvées vont de $0.11 \cdot 10^{-12}$ g pour Burg *et al.*¹⁴⁵ à $0.95 \cdot 10^{-12}$ g pour Neidhardt *et al.*¹⁴⁶ par bactérie. Ces valeurs ont été obtenues par différentes méthodes.

Afin de conserver une lisibilité et une homogénéité dans la présentation des résultats, les concentrations en bactéries seront conservées en $\mu\text{g/mL}$. La conversion en nombre de bactéries peut être facilement calculée en utilisant les valeurs présentées ci-dessus. Par

exemple, une concentration de 100 µg/mL sera donc comprise entre $1.05 \cdot 10^8$ et $9.09 \cdot 10^8$ bactéries/mL.

14.3 Validation de la quantification de bactéries par la méthode électrophorétique

La validation de la quantification d'*E. coli* par la méthode électrophorétique proposée ci-dessous n'est pas une validation exhaustive. Si l'on se réfère aux documents publiés par l'ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) et particulièrement à celui sur les procédures de validations analytiques¹⁴⁷, ce document propose la liste suivante de critères à valider dans ce type de démarches :

1. **Spécificité**
2. **Linéarité**
3. Domaine de linéarité
4. Exactitude
5. Précision (**répétabilité**, précision intermédiaire et reproductibilité)
6. **Limite de détection**
7. **Limite de quantification**
8. Solidité

La validation suivante tiendra compte de la spécificité (une seule espèce injectée séparable et identifiable), de la linéarité (vérification de la proportionnalité du signal par rapport à la concentration), de la répétabilité (détermination de la précision en utilisant les mêmes conditions opératoires dans un intervalle de temps court), ainsi que des limites de détection et de quantification. Les autres critères n'ont pas encore été déterminés à l'heure actuelle.

14.3.1 Etude de linéarité

L'étude de la linéarité du signal obtenu en fonction de la concentration bactérienne injectée est réalisée. Cette étude ainsi que toutes les expériences qui suivront ont été réalisées en $n = 3$ machine, c'est à dire en répétant chaque injection d'un même échantillon 3 fois. Le signal obtenu peut être quantifié soit par son aire corrigée, soit par sa hauteur comme le montrent les électrophorégrammes suivants (Fig. 154). Le pic quantifié lors de cette étude est celui au temps de migration de 5.0 min. Les autres signaux ne sont pas pris en compte (à 4.5 min).

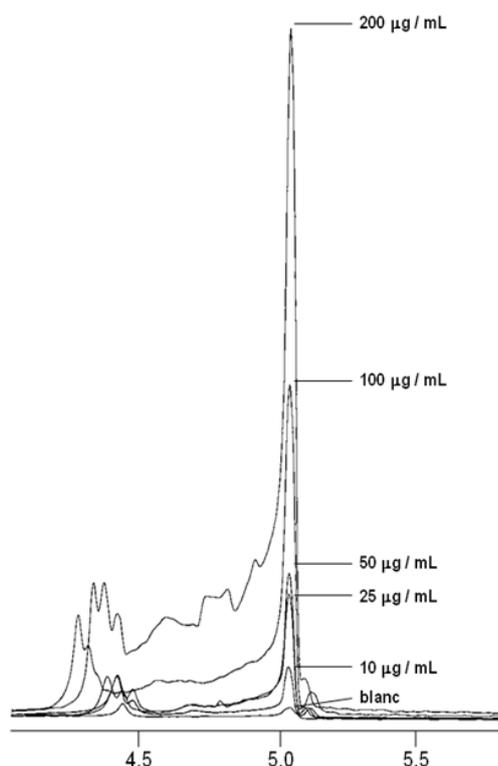


Fig. 154 : Electrophorégrammes des injections du tampon BGE₂ seul (blanc) de suspensions bactériennes de 10, 25, 50, 100 et 200 µg/mL.

Cette gamme de suspensions bactériennes d'*E. coli* de 10, 25, 50, 100 et 200 µg/mL de bactéries dans le tampon BGE₂ est préparée et injectée. Les aires corrigées et les hauteurs correspondantes sont reportées dans le Tableau 24 et les mêmes données sont également présentées sous forme de graphique dans la Fig. 155.

Concentration bactérienne (µg/mL)	10	25	50	100	200
Moyenne des surfaces corrigées (UA)	549	939	1 816	3 898	8 658
Ecart-type des surfaces corrigées (UA)	78.31	27.57	75.27	19.35	310.07
CV des surfaces corrigées (%)	14.26	2.94	4.14	0.50	3.58
Moyenne des hauteurs (UA)	1284	2357	4192	8176	19330
Ecart-type des hauteurs (UA)	48.99	73.01	128.75	448.74	723.24
CV des hauteurs (%)	3.81	3.10	3.07	5.49	3.74

Tableau 24 : Valeurs des surfaces corrigées et des hauteurs en fonction de la concentration bactérienne.

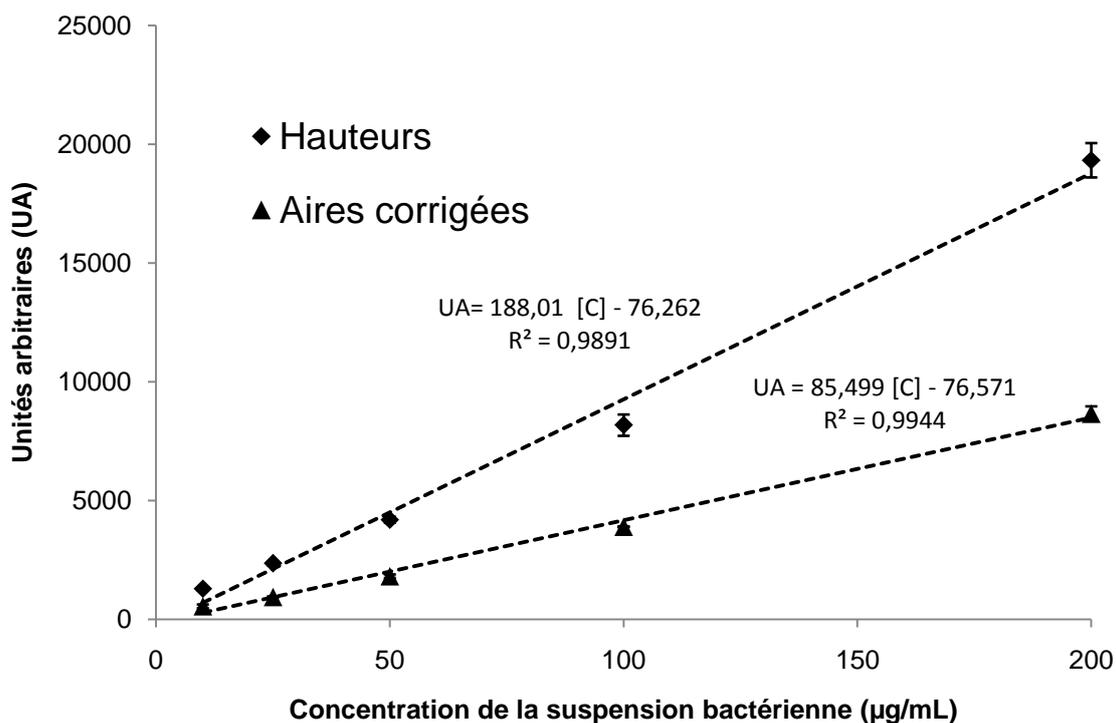


Fig. 155 : Surfaces corrigées et hauteurs en fonction de la concentration bactérienne.

Les résultats obtenus permettent d'observer une linéarité du signal de la réponse UV (aire corrigée et hauteur) en fonction de la concentration bactérienne injectée sur un domaine compris entre 10 et 200 µg/mL de bactéries (Fig. 155). Bien que très proches, le R² des aires corrigées est légèrement meilleur que celui des hauteurs (0.9944 contre 0.9891) et la quantification sera donc par la suite toujours effectuée par la mesure des aires corrigées.

14.3.2 Etude de répétabilité

Deux suspensions bactériennes de concentrations égales à 25 µg/mL pour la première et 50 µg/mL pour la seconde sont préparées.

Pour ces deux suspensions, trois injections successives sont réalisées et les résultats suivants sont obtenus (Tableau 25).

Concentration bactérienne (µg/mL)	25			50		
	Surfaces corrigées (UA)	653	814	789	1 354	1 376
Moyennes des surfaces corrigées (UA)	752			1 402		
Ecart-type des surfaces corrigées (UA)	86.64			65.59		
CV (%)	11.5			4.7		

Tableau 25 : Résultats de l'étude de répétabilité d'injections de suspensions d'E. coli à 25 et 50 µg/mL.

Les 3 valeurs obtenues pour chaque injection des concentrations bactériennes de 25 et 50 µg/mL sont proches, comme en témoignent les coefficients de variations (CV) de 11.5 et 4.7 %. Les 3 injections d'échantillons peuvent donc être considérés comme répétable.

14.3.3 Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et quantification (LQ) ont été déterminées par la mesure du rapport signal/bruit du pic de bactéries au temps de migration de 5.0 min. La LD et la LQ sont obtenues lorsque le rapport signal/bruit est respectivement égal à 3 et 10. Les valeurs expérimentales mesurées sont les suivantes :

- LD = $8.4 \cdot 10^{-2}$ µg/mL
- LQ = $2.8 \cdot 10^{-1}$ µg/mL

Ces valeurs sont largement inférieurs aux domaines de concentration des suspensions bactériennes étudiées ce qui permet de valider ce critère.

14.4 Détermination des capacités de capture de bactéries des résines greffées

14.4.1 Cas de la résine pyridinium 67b

Un fois la validation de l'outil de quantification des bactéries effectuée, la résine pyridinium **67b** a été mise en présence d'*E. coli* et l'évolution de la concentration bactérienne a pu être observée (Fig. 156).

Fig. 156 : Hypothèse de la rétention d'E. coli par la résine pyridinium 67b .

14.4.1.1 Test de relargage de la résine

La première expérience menée sur la résine pyridinium **67b** est un test de relargage afin de s'assurer que ce polymère ne relargue rien lorsqu'il est mis en suspension dans le tampon BGE₂. Un test identique est également réalisé sur la résine de Merrifield vierge **51**.

Dans des tubes Eppendorf, un premier échantillon est préparé contenant 5.0 mg de résine **67b** ainsi qu'un second échantillon contenant 5.0 mg de résine de Merrifield vierge **51**. Ces deux échantillons sont mis en suspension dans 1,5 mL de BGE₂, puis sont passés au vortex durant 30 secondes et laissés reposer pendant une heure. Ensuite, ces échantillons sont centrifugés durant 2 minutes à 13 400 tr/min. Le surnageant de chaque échantillon est injecté et des électrophorégrammes identiques sont obtenus pour chacun des échantillons.

Hormis la présence de deux petits pics fins (à 4.5 et 5.0 min) attribués à une perturbation système et toujours présents dans chaque injection utilisant le tampon BGE₂, les électrophorégrammes obtenus sont parfaitement identiques.

Les résines de Merrifield vierge **51** et pyridinium **67b** ne relarguent non plus rien de visible en UV dans ces conditions.

14.4.1.2 Cinétique de capture des bactéries par la résine

Une étude de la cinétique de capture des bactéries par la résine pyridinium est tentée en mettant en contact dans un tube en verre, 49.2 mg de résine pyridinium **67b** avec 5.0 mL d'une suspension d'*E. coli* à une concentration de 100 µg/mL dans le tampon BGE₂. Un témoin sans résine (*E. coli* seul) est traité de manière identique. Après 1, 2, 3, 4 et 24 heures d'agitation à température ambiante, le surnageant est injecté (en n = 3) et les électrophorégrammes suivants sont obtenus (

Fig. 157).

t0 : Concentration d'*E. coli* (100 µg/mL)

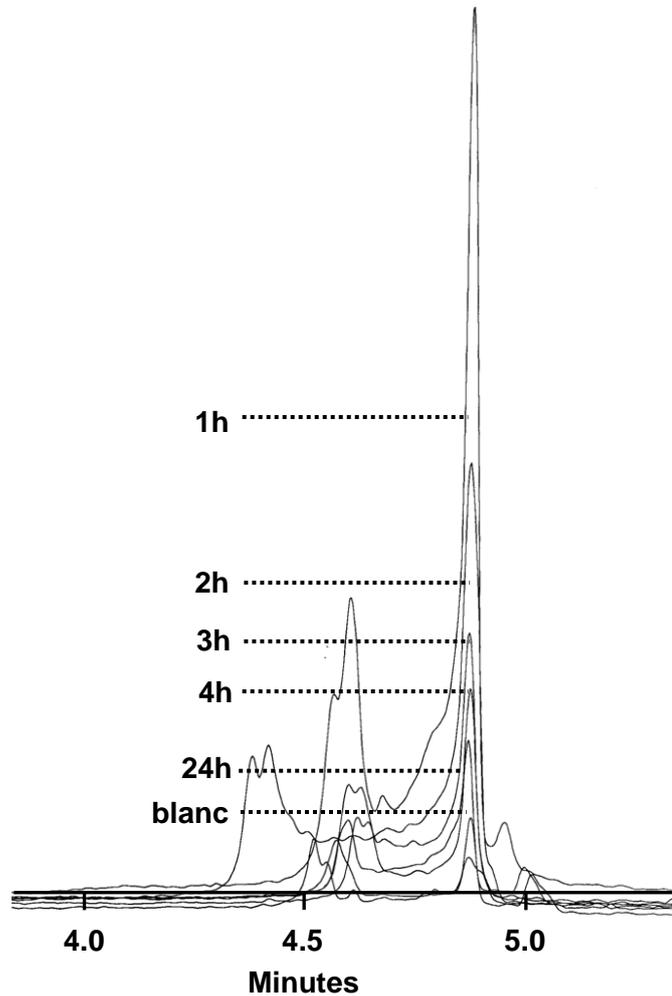


Fig. 157 : Electrophorégrammes correspondants à la cinétique de capture d'*E. coli* par la résine pyridinium **67b** à $t = 0, 1, 2, 3, 4$ et 24 heures ainsi qu'un blanc (BGE_2).

Afin de quantifier rapidement l'évolution de la concentration bactérienne, les moyennes des aires corrigées de chaque électrophorégramme (résine et témoin) sont rapportées à la moyenne des aires corrigées de la concentration initiale d'*E. coli* (100 µg/mL = 100%). Les valeurs obtenues sont reportées dans la Fig. **158** ci-dessous.

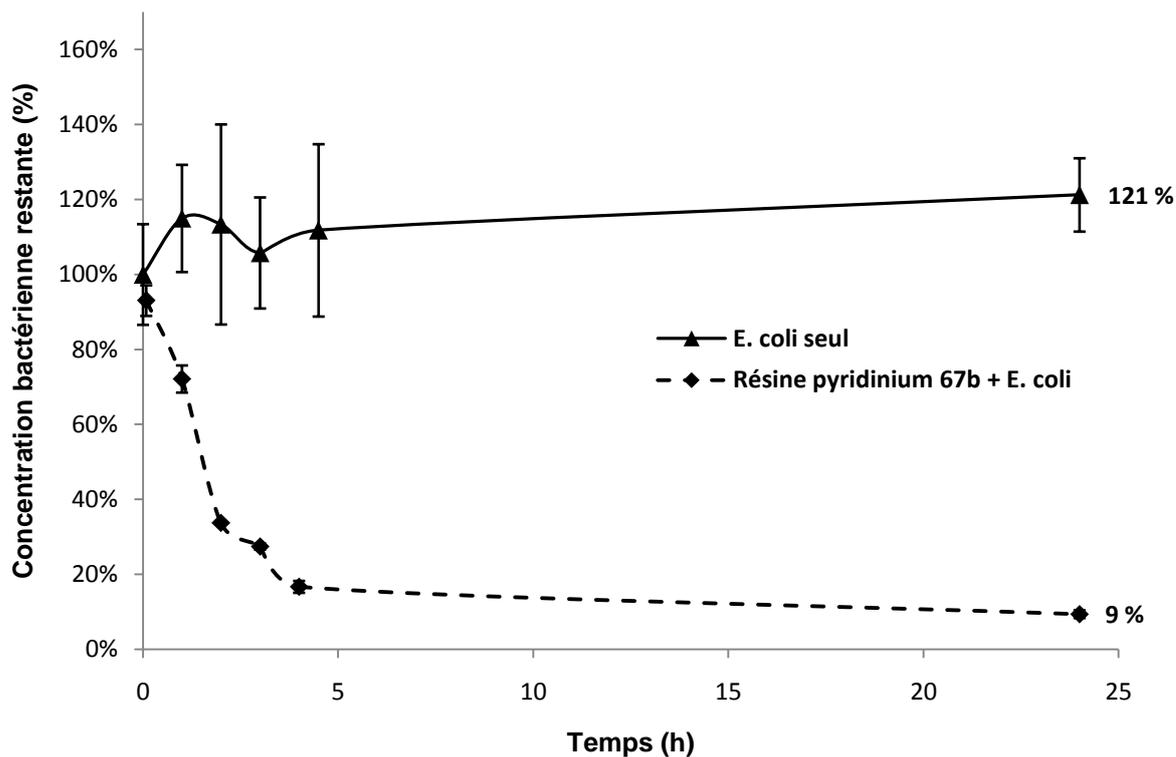


Fig. 158 : Quantification de la suspension d'*E. coli* avec et sans résine pyridinium **67b** pendant 24 heures.

Les résultats obtenus montrent une nette diminution de la concentration bactérienne lorsque les bactéries sont mises en contact avec la résine pyridinium **67b**. Cette diminution très importante prouve sans ambiguïté la capacité de rétention des bactéries de cette résine. De plus, la concentration bactérienne forme un plateau et n'augmente pas dans le temps même après 24 heures.

Le témoin a tendance à voir augmenter la quantité de signal du pic à 5.0 min (jusqu'à 121% après 24 heures). L'hypothèse d'une croissance des bactéries dans le milieu pourrait expliquer l'augmentation de l'absorbance. En effet, il est possible de remettre en culture une suspension de bactéries lyophilisées dans un bouillon de culture¹⁴⁸. Le tampon BGE₂ n'est pas un bouillon de culture mais il permet tout de même de réhydrater les bactéries à un pH favorable (pH = 7.2). A titre de comparaison, les bactéries *E. coli* doublent leurs populations toutes les 21 minutes en phase de croissance dans un milieu de culture à 40°C¹⁴⁹ alors que dans cet essai, la croissance n'est que de 21% en 24 heures. Cette allure de croissance, bien que relativement faible, est tout de même visible dans tous les témoins à chaque fois que cette expérience a été retentée.

L'hypothèse d'une croissance bactérienne n'est pas facile à vérifier, mais une expérience de mise en culture des bactéries sorties de l'électrophorèse pourrait être tentée afin de confirmer ou d'infirmer cette supposition. Une expérience de ce type est d'ailleurs décrite dès 1993 par Ebersole *et al.*¹⁵⁰ qui parviennent à récupérer en sortie d'électrophorèse, selon la souche, entre 79% et 121% de bactéries viables.

14.4.1.3 Quantification sur de faibles quantités de résine

La même quantification a été tentée en utilisant beaucoup moins de polymère. Le but est de parvenir à quantifier la rétention des bactéries du polymère greffé, de manière répétable, tout en économisant au maximum les quantités nécessaires. Il ne faut pas oublier que dans certains cas le polymère est issu d'une synthèse plutôt longue.

Pour ce faire, environ exactement 2.5 mg de résine de Merrifield vierge **51** et de résine pyridinium **67b** ont été mises chacune en suspension dans 200 µL de suspension bactérienne à 100 µg/mL en tube Eppendorf. Un témoin sans résine est agité en même temps (*E. coli* seule) et la suspension bactérienne est injectée à t = 0.

Les tubes Eppendorf sont agités 3 heures à température ambiante et la quantification donne les résultats suivants (Tableau 26).

Temps d'agitation (h)	Expérience	Masse de résine pesée (mg)	Quantité d' <i>E. coli</i> restante (%)	CV (%)
0	<i>E. coli</i> seule	0	100	4.4
3	<i>E. coli</i> seule	0	106.7	4.6
3	Résine vierge de Merrifield 51 + <i>E. coli</i>	3.3	104.6	3.5
3	 Résine pyridinium 67b + <i>E. coli</i>	2.3	19.4	7.7

Tableau 26 : Quantification des essais en Eppendorf des résines **51** et **67b** en présence d'*E. coli*.

Tout d'abord, la suspension bactérienne d'*E. coli* à 100 µg/mL, injectée à t = 0, permet de fixer la concentration initiale en bactéries (100%). Puis les 3 surnageants des Eppendorf (agités pendant 3 heures) sont injectés et quantifiés à leurs tours.

Les essais du témoin d'*E. coli* seule et de la résine de Merrifield vierge **51** en présence de bactéries après 3 heures d'agitation présentent des quantités de bactéries très proches (106.7% et 104.6%). Par contre, la résine pyridinium **67b** provoque la disparition de plus de 80% de la quantité initiale des bactéries.

Si l'on compare désormais cet essai avec le précédent, la concentration bactérienne du témoin est identique après 3 heures : 106.7% contre 105.7% précédemment. La chute de la concentration bactérienne de l'essai avec la résine pyridinium **67b** est toujours impressionnante : 19.4% restant. L'essai avec la résine de Merrifield vierge **51** indique que cette chute n'est pas due à la matrice polymérique ni aux chlorométhyles mais bien aux pyridiniums greffés, car il n'y a pas de rétention visible avec **51** (104.6%).

14.4.2 Etude de la capture de bactéries par des résines greffées

La quantification précédente par utilisation d'environ exactement 2.5 mg de résine est étendue à tous les polymères greffés finaux (Merrifield et Wang-benzaldéhyde) synthétisés. Le temps d'agitation est fixé à 3 heures à température ambiante, le volume de suspension bactérienne est fixé à 200 µL et les injections sont toutes réalisées en n = 3 machine.

Les résultats sont comparés par familles de motifs greffés :

- Merrifield greffées avec des pyridiniums et ammoniums sans calixarènes (§8 de la partie expérimentale + résines ammoniums **89** et **90**)
- Merrifield greffées avec des calixarènes (§5, 6 et 7 de la partie expérimentale)
- Wang-benzaldéhyde greffées avec des calixarènes (§9, 10 et 11 de la partie expérimentale)

14.4.2.1 Synthèse et caractérisations des résines pyridiniums et ammoniums

La résine pyridinium **67** étant efficace en termes de capture de bactéries, nous avons pensé qu'il serait utile d'évaluer le potentiel d'autres hétérocycles. A cette fin, nous avons développé les synthèses des résines incorporant à la place des pyridiniums des motifs 4,4'-bipyridiniums (**69** et **70**) et phénantroliums (**71**) (Fig. **159**).

Fig. 159 : Greffages de motifs 4,4'-bipyridinium et phénantroline sur la résine de Merrifield vierge 50.

La résine **69** est obtenue par réaction de la résine de Merrifield vierge **50** avec la 4,4'-bipyridine alors que la résine **70** est obtenue par réaction avec l'iodure de 1-méthyl-4,4'-bipyridinium **12**. Cette dernière molécule est obtenue par méthylation partielle à l'iodure de méthyle de la 4,4'-bipyridine¹⁵¹.

La synthèse de la résine **71** a été tentée une fois dans un mélange toluène-méthanol (**71a**) et une fois dans l'acétonitrile (**71b**). Le mélange toluène méthanol (2/1 : v/v) a été choisi car la phénantroline n'est pas soluble dans le toluène pur. Les résultats d'analyse élémentaire permettent de calculer le nombre de motifs greffés par gramme des résines **69**, **70**, **71a** et **71b** (Tableau 27).

	69	70	71a	71b
%N	3.84	3.03	2.58	<0.05
mmoles de motifs / g de résine	1.37	1.08	0.92	<1.78 10 ⁻⁵

*Tableau 27 : Résultats d'analyse élémentaire et présentation des nombre de motifs par gramme des résines **69**, **70**, **71a** et **71b**.*

Les nombres de motifs par gramme sont assez élevés à l'exception de la résine phénantrolium **71b**, qui n'a visiblement pas été greffée lors de sa préparation dans l'acétonitrile. La résine **71b** ne sera pas testée dans la suite du travail.

Les analyses infrarouges des résines **69**, **70** et **71a** montrent la présence de la bande caractéristique de la liaison C-N⁺ à 1630 cm⁻¹ ce qui confirme l'efficacité du greffages de ces polymères.

A titre de comparaison, deux résines ammoniums commerciales ont été étudiées. La première est la résine échangeuse d'anions Amberlite IRA-400 **89** dont les motifs sont des méthyles-ammoniums quaternaires portés par un polymère de type polystyrène (PS). Il est à noter que cette résine possède une forte réticulation (8%) introduite par des groupements divinylbenzène. Après plusieurs lavages acides et basiques, la résine **89** est rincée plusieurs fois à l'eau et séchée sous vide jusqu'à poids constant.

La seconde est également une résine échangeuse d'anions, faiblement réticulée (2%), fortement basique, sous forme de chlorure : la résine cholestyramine **90**¹⁵². C'est le principe actif d'un médicament hypocholestérolémiant, le Questran®, qui possède une très forte affinité pour les acides biliaires. Elle permet de les fixer sous forme d'un complexe insoluble, augmentant leur élimination fécale. Le foie compense cette perte d'acide biliaire en les recréant par l'utilisation de cholestérol qui est de nouveau rapidement éliminé sous forme d'acides biliaires. La cholestérolémie s'en voit abaissée chez la majorité des patients. Pour notre étude, cette résine est nettoyée de ses excipients par de nombreux lavages dans des solvants différents, puis est séchée jusqu'à poids constant.

Les nombres de mmoles de motifs aminés greffés par gramme de résine, évalués par l'analyse élémentaire via l'azote sont pour les résines **89** et **90** respectivement de 2.69 et 3.56, et les spectres infrarouges de ces deux résines ammoniums confirment la présence de liaisons C-N⁺ de type ammonium à 1475 cm⁻¹ et entre 3100 et 3400 cm⁻¹.

14.4.2.2 Tests de relargage de toutes les résines étudiées

De la même manière que pour la résine pyridinium **67b**, toutes les résines testées en électrophorèse capillaire sont d'abord mises en suspension ($\cong 2.5$ mg) dans 200 μ L de tampon BGE₂ (en tube Eppendorf) sous agitation à température ambiante pendant 3 heures afin de vérifier qu'il n'y a pas de relargage de substances du polymère.

Les surnageants de tous les essais sont injectés et le seul relargage observé parmi toutes les résines testées est celui de la résine bipyridinium **70**. Un test identique est réalisé dans l'eau et le résultat montre dans ce cas un relargage très faible (

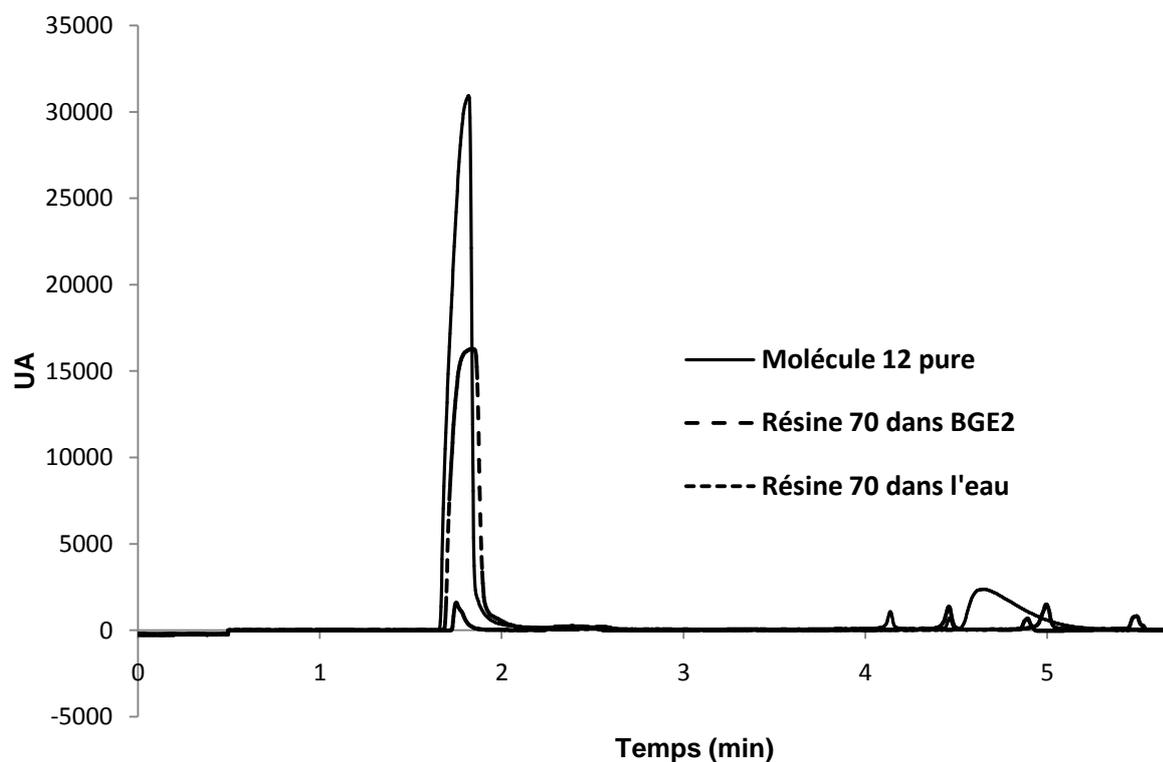


Fig. 160).

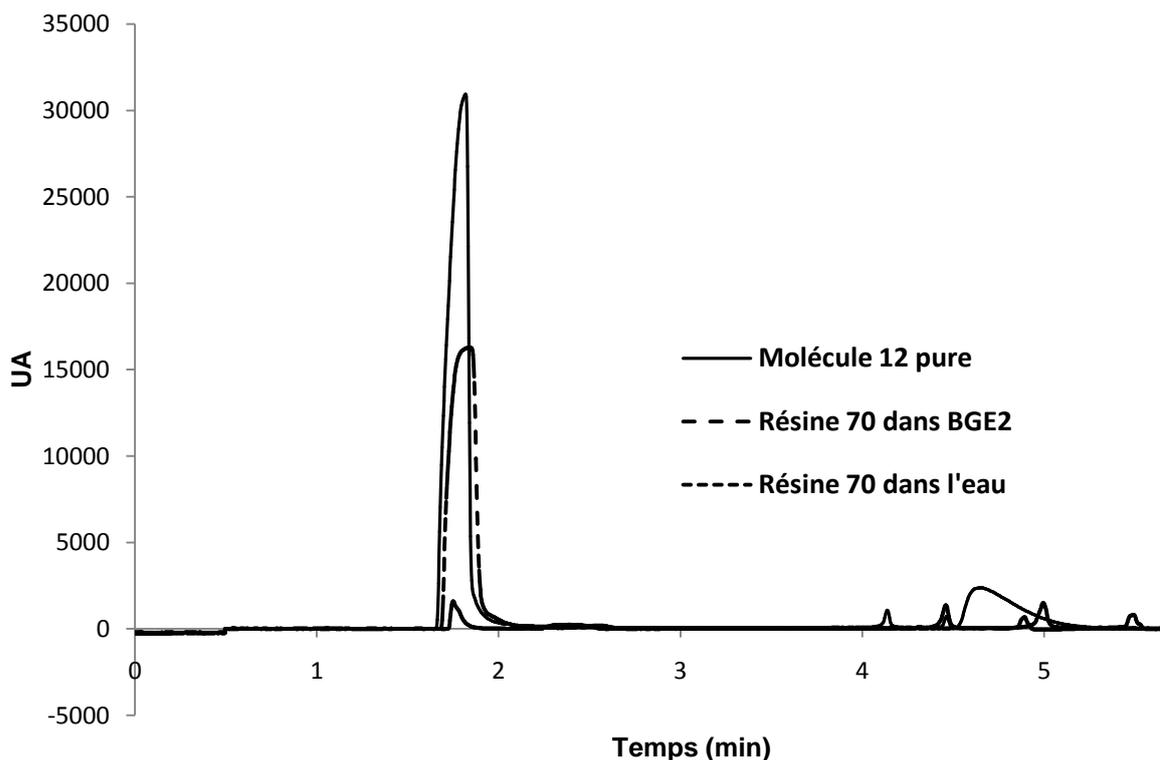


Fig. 160 : Test de relargage de la résine bipyridinium **70** dans le tampon BGE₂ et dans l'eau. Electrophorèse capillaire.

L'électrophorèse capillaire permet de donner une information sur la polarité des molécules en fonction du temps de migration observé. Le marqueur de neutre injecté (l'alcool benzylique) a un temps de migration de 2.5 min. Le temps de migration de la molécule relarguée est inférieur (1.8 min) ce qui indique que cette espèce est chargée positivement. A l'inverse, des temps de migration supérieur à 2.5 min indiquent des espèces chargées négativement.

Au vu de ces résultats, un relargage du greffon d'iodure d'1-méthyl-4-(4'-pyridyl)pyridinium **12** est probable. Une solution de cette molécule dans le tampon BGE₂ est injectée et un pic au même temps de migration est observé confirmant le relargage du greffon dans le tampon. Le relargage dans le tampon et non dans l'eau montre que c'est la composition du tampon (Tris et acide borique) qui entraîne le relargage de la molécule **12** et non un rinçage insuffisant de la résine lors de sa synthèse.

Cette résine sera tout de même testée en présence de bactéries, le pic correspondant au relargage étant très éloigné du temps de migration des bactéries. Cependant, son éventuelle activité antibactérienne pourrait fausser les résultats comme en témoignent les travaux de

Grenier et al.¹⁵³ sur les dérivés bipyridinés mono-alkylés utilisant des chaînes alkyles plus longues (Fig. 161).

Fig. 161 : Résultats des CMI des dérivés bipyridinés mono-alkylés de Grenier et al.¹⁵³

14.4.2.3 Etude de capture des résines pyridiniums et ammoniums

Les résultats de quantification de rétention des bactéries *E. coli* par les polymères pyridinium et ammoniums (sauf calixarènes) sont présentés dans le Tableau 28.

Tous les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la concentration initiale de bactéries (à t = 0). Cette méthode de quantification permet de se rendre facilement compte de l'évolution des concentrations bactériennes. Les témoins (*E. coli* sans résine) de chaque expérience à t = 3 h sont également présentés.

	66	67b	67a	68	69	70	71a	89	90
Numéro de la résine									
Quantité de résine (mg)	2.4	2.8	2.3	2.4	5.1	2.5	2.7	2.8	2.3
Résine + E. coli Pourcentage de bactéries restantes par rapport à la concentration initiale (%)	86.9	19.4	63.5	101.6	67.2	88.7	112.7	83.6	99.8
CV (%)	23.2	9.0	9.0	14.2	10.0	2.9	14.0	4.8	0.7
E. coli seule Pourcentage de bactéries restantes par rapport à la concentration initiale (%)	89.1	96.0	129.4	107.8	103.3	104.1	110.5	116.7	96.0
CV (%)	16.6	14.5	17.1	13.0	10.3	4.3	20.05	14.4	14.5

Tableau 28 : Résultats des capacités de rétention des bactéries des résines **66, 67a, 67b, 68, 69, 70, 71a, 89 et 90.**

Les mêmes résultats sont montrés dans le graphique ci-dessous (Fig. 162). Les résines sont triées par leurs capacités respectives de rétention des bactéries. Pour rappel, la différence entre les résines **67a** et **67b** provient de la capacité de la résine de Merrifield qui a servi à leurs synthèses respectives : résine **50** pour **67a** (2.95 mmol Cl/g) et résine **51** pour **67b** (5.00 mmol Cl/g).

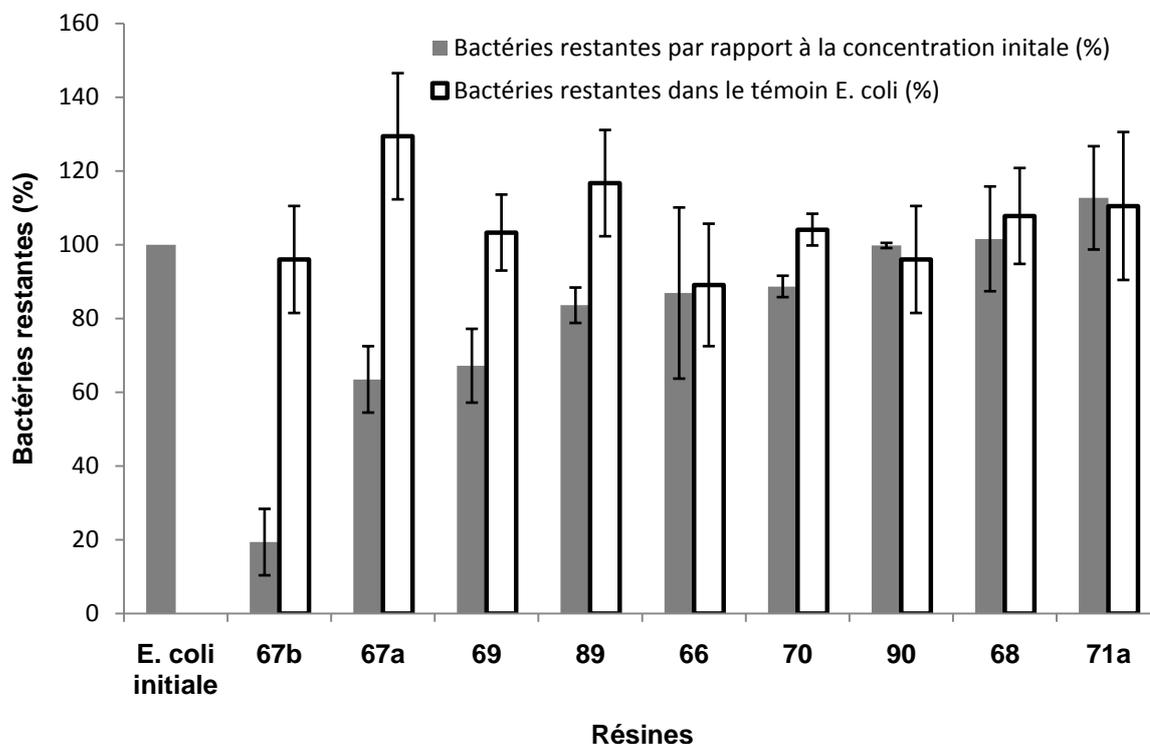


Fig. 162 : Evaluation de la capacité de rétention des bactéries par les résines pyridiniums et ammoniums comparée à leurs témoins respectifs de bactéries seules.

Tout d'abord, les témoins de bactéries seules varient de 95 à 130% de leurs concentrations initiales après 3 heures d'agitation. Cette augmentation globale, comme supposé précédemment, est assurément due à une croissance des bactéries dans le tampon.

Les résines pyridiniums **67b** et **67a** sont les deux résines les plus efficaces en terme de rétention des bactéries en suspension puisqu'elles captent respectivement 80.6% et 36.5% des bactéries du milieu. Elles sont suivies par les résines greffées avec des bipyridines non méthylées (**69** : 32.8 %) ou méthylées (**70** : 11.3 %). La résine échangeuse d'ions Amberlite IRA-400 **89** possède également une capacité plutôt bonne de rétention de 16.4%. Par contre, les résines cholestyramine **90**, pyrène-pyridinium **68** et phénantroline **71a** ne présentent pas ou très peu de capacité de rétention de bactéries.

Il est étonnant de constater que la résine pyridinium **66**, possédant un nombre de mmols de motifs pyridinium par gramme assez élevé (2.38), ne parvient pourtant pas à retenir plus de 13.1% de bactéries sur sa surface. Pour les résines pyridiniums **67a** et **67b**, si les nombres de motifs par gramme (2.51 et 3.34) sont comparés à leurs capacités respectives de capture de bactéries, le calcul montre que la résine **67b** a 33% de motifs pyridiniums de plus que la résine **67a**, mais capture 2.2 fois plus de bactéries. Ce résultat pourrait s'expliquer par la densité de charges positives à la surface du polymère qui augmente de 33% mais qui permettrait la rétention de bien plus de bactéries. Cet effet n'est pas sans rappeler le mécanisme d'action supposé du **Cx1** (*tétra-guanidinoéthyl-calix[4]arène*) qui permet l'organisation spatiale de 4 charges positives rapprochées lui conférant une activité antibactérienne démontrée en comparaison de son équivalent monomérique, le *para*-guanidinoéthylphénol qui ne présente aucune activité antibactérienne³⁵.

La suite du travail relate le développement de cette étude, via la quantification du pouvoir de rétention des bactéries sur les résines de Merrifield et de Wang-benzaldéhyde greffées avec des calixarènes cationiques.

14.4.2.4 Etude de capture des résines de Merrifield calixaréniques

Les résultats des captures de bactéries par les résines de Merrifield calixaréniques sont présentés ci-dessous de la même façon que pour les résines pyridinium (Tableau **29**).

	51	53	55	57	58b	61
Numéro de la résine						
Quantité de résine (mg)	3.3	2.6	2.7	2.2	3.0	2.2
Résine + E. coli Pourcentage de bactéries restantes par rapport à la concentration initiale (%)	104.6	106.7	87.8	87.7	113.3	92.4
CV (%)	3.5	11.7	5.0	1.9	9.5	8.0
E. coli seule Pourcentage de bactéries restantes par rapport à la concentration initiale (%)	120.4	116.7	116.7	129.4	110.5	129.4
CV (%)	1.6	14.4	14.4	17.1	20.1	17.1

Tableau 29 : Résultats des capacités de rétention des bactéries des résines de Merrifield greffées par divers calixarènes cationiques.

Les mêmes résultats sont montrés dans le graphique ci-dessous triés par la capacité de rétention de bactéries de chacune des résines (Fig. 163).

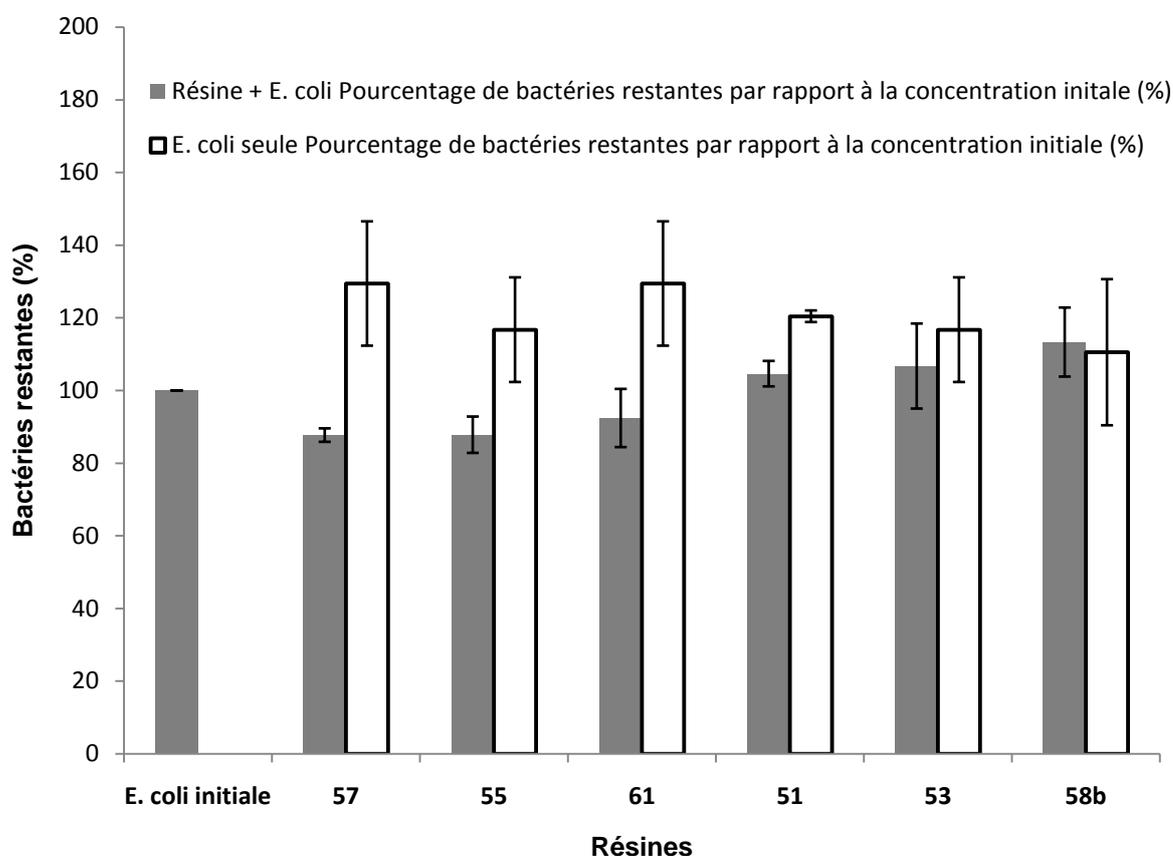


Fig. 163 : Evaluation de la capacité de rétention des bactéries par les résines de Merrifield greffées après 3 heures d'agitation à température ambiante. Classement par efficacité décroissante.

Dans cette série d'expériences, les témoins de bactéries seules (à t = 3h) augmentent encore dans le temps, puisqu'ils sont tous compris entre 110 et 130% de la concentration initiale de bactéries (à t = 0).

Les meilleurs résultats de rétention de bactéries sont obtenus pour les résines **57**, **55** et **61** (tous *tétra*-guanidinoéthyl-calix[4]arènes) greffés en top-down et bottom-up qui montrent des pourcentages de capture de 12.3, 12.2 et 7.6%. Il est intéressant d'observer que ces trois résines de type *tétra*-guanidiniums sont tout de même plus efficaces que les résines de type *tétra*-ammonium **53**, de type Merrifield vierge **51** et de type 4-pyridinium-carboxaldéhyde **58b**.

Ces résultats indiquent une tendance globale des résines de Merrifield greffées avec des calixarènes à capter des bactéries en suspension. Cependant, si les résultats de rétention de bactéries de ces dernières résines sont comparés avec les résultats des résines pyridiniums précédents, les résines pyridiniums conservent des capacités de rétention d'*E. coli* bien supérieurs.

14.4.2.5 Etude de capture des résines de Wang-benzaldéhyde calixaréniques

Les résultats des captures de bactéries par les résines de Wang-benzaldéhyde calixaréniques sont présentés ci-dessous de la même façon que pour les résines précédentes (Tableau **30**).

	72	75	77	82	85	88
Numéro de la résine						
Quantité de résine (mg)	2.3	1.8	7.5	2.4	2.7	5.4
Résine + E. coli Pourcentage de bactéries restantes par rapport à la concentration initiale (%)	94.8	86.9	101.1	90.8	91.0	87.5
CV (%)	3.0	8.8	16.2	1.7	14.1	9.5
E. coli seule Pourcentage de bactéries restantes par rapport à la concentration initiale (%)	95.9	107.8	108.0	95.9	89.1	103.3
CV (%)	11.3	13.0	4.2	11.3	16.6	10.3

Tableau 30 : Résultats des capacités de rétention des bactéries des résines de Wang-benzaldéhyde greffées.

Les mêmes résultats sont de nouveau montrés dans le graphique ci-dessous (Fig. 164). Les résines sont triées par capacité de rétention de bactéries.

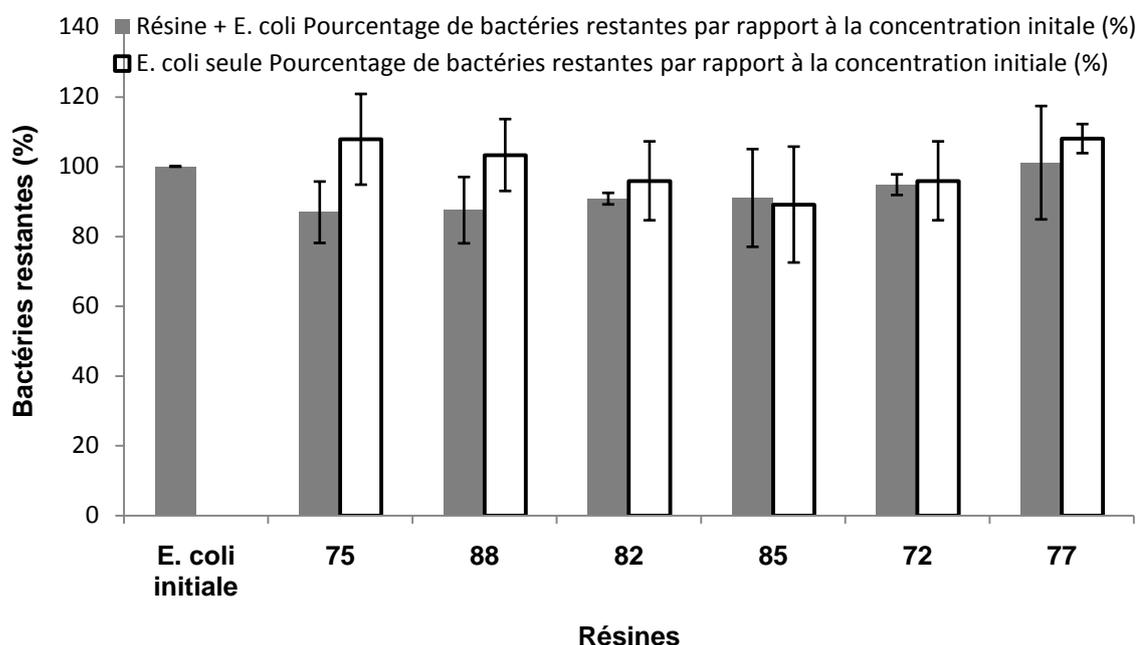


Fig. 164 : Evaluation de la capacité de rétention des bactéries par les résines de Wang-benzaldéhyde greffées après 3 heures d'agitation à température ambiante. Classement par efficacité décroissante.

Les meilleurs résultats sont obtenus pour les résines **75** et **88** qui présentent des pourcentages respectifs de capture de 13.1% et 12.5%. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que les concentrations des témoins en bactéries augmentent significativement dans le même temps (107.8% et 103.3%). Les structures des greffons de ces résines de Wang-benzaldéhyde sont un calixarène tétra-ammonium (**75**) et une chaîne guanidinoéthyl-phénoxyanilinopropane (**88**). Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus sur la résine de Merrifield puisque ces résines capturent plus de bactéries que les résines guanidiniums calixaréniques **82**, **85** et **72** (respectivement 9.2%, 9.0% et 5.2%).

La résine **77** ne montre aucune capture si elle est comparée à la concentration initiale de bactéries (101.1%), cependant la concentration du témoin de bactéries après 3 heures augmente jusqu'à 108.0% par rapport à cette concentration initiale, ce qui montre une différence de presque 7%. Cette constatation, valable pour la plupart des polymères testés, pousse à traiter les résultats sous un autre angle de vue et à comparer les concentrations bactériennes des essais avec leurs témoins respectifs après 3 heures d'agitation.

14.4.3 Présentation des résultats rapportés à la concentration bactérienne après 3 heures d'agitation

Tous les résultats étaient présentés jusqu'ici par une comparaison avec la concentration bactérienne initiale (à $t = 0$), cependant, il est également intéressant de présenter les résultats en fonction de la concentration finale en bactéries du témoin, c'est à dire en prenant en compte l'évolution des bactéries pendant les 3 heures d'agitation à température ambiante dans le tampon. De plus, il est indispensable, afin de pouvoir comparer efficacement ces captures, de normaliser les résultats en fonction de la masse de résine pesée. Pour cela, la formule suivante est proposée afin d'obtenir une valeur de la capture effective correspondant à une masse de bactéries captées par unité de masse de résine, en μg de bactéries captées par mg de résine.

$$\text{Capture effective} = \frac{mb \times \frac{\%(Résine + E. coli)}{\%(E. coli seule)}}{mr}$$

mb : masse de bactéries introduites initialement (20 μg).

mr : masse de résine introduite (exprimée en mg).

%(Résine + E. coli) : pourcentage de bactéries restantes dans l'échantillon après 3 heures d'agitation.

%(E. coli seule) : pourcentage de bactéries restantes dans le témoin après 3 heures d'agitation.

Le graphique suivant (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) présente les résultats de ce calcul pour chaque résine.

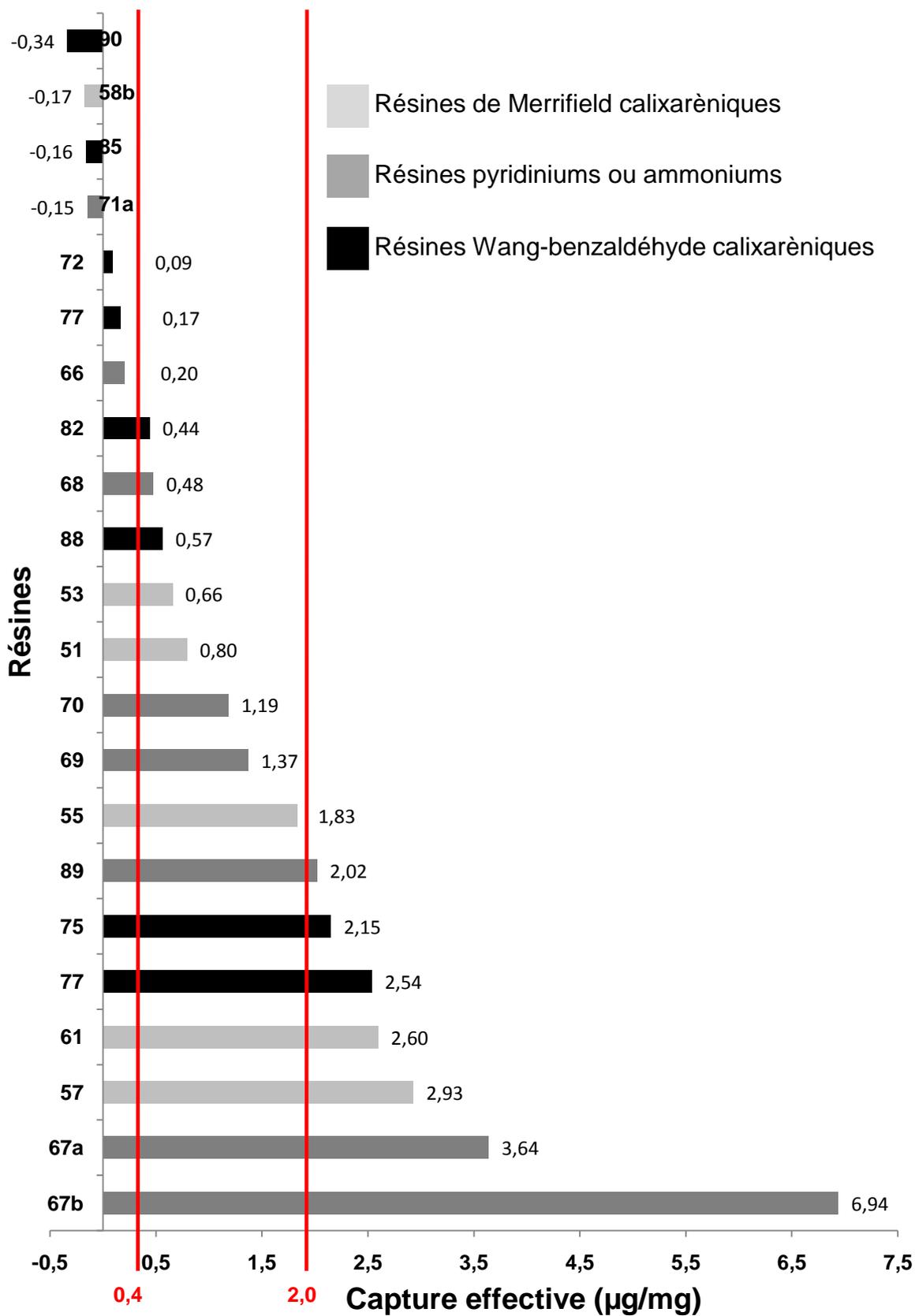


Fig. 165 : Comparaison des captures effectives des différentes résines après 3 heures d'agitation en fonction de la masse de résine introduite.

Cette vision globale permet de découper de manière arbitraire les polymères testés en 3 catégories (traits rouges sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) :

Capture effective < 0.4 µg/mg : Les résines **90, 58b, 85, 71a, 72, 77** et **66** présentent une capture effective des bactéries inférieure à 0.4 µg/mg. Dans ce cas, il n'est pas raisonnable, en tenant compte de la marge d'erreur des mesures, de considérer que ces résines présentent une capacité de rétention de bactéries significative.

0.4 µg/mg < Capture effective < 2.0 µg/mg : Ces résines possèdent des capacités de rétention de bactéries assez importantes. Parmi elles, les résines pyridiniums, ammoniums et de Merrifield **55, 69, 70, 51** et **53** sont plus efficaces que les résines de Wang-benzaldéhyde **82** et **88**.

Capture effective > 2.0 µg/mg : Les résines de Merrifield greffées avec des pyridines (**67a** et **67b**) sont capables de retenir plus de 3.5 µg/mg ce qui en fait les meilleurs résines pour la capture de bactéries. Cependant, les résines de Merrifield **57** et **61**, suivies des résines de Wang-benzaldéhyde **77** et **75** fournissent des résultats supérieurs à 2.0 µg/mg tout à fait intéressants.

Les structures des résines capables de retenir le plus de bactéries (rétention de plus de 2.0 µg/mg) sont les suivantes (Fig. **166**) :

Fig. 166 : Polymères greffés ayant les plus grandes capacités de rétention de bactéries.

On trouve en tête les résines pyridinium **67a** et **67b**, suivi des résines *tétra*-guanidinoéthyl-calixarène **57**, **61** et **77**, la résine *tétra*-aminoéthyl-calixarène **75** ainsi que la résine Amberlite **89**.

En conclusion, les résines pyridiniums, ammoniums, de Merrifield et de Wang-benzaldéhyde greffées avec des calixarènes présentent toutes des capacités de rétention de bactéries.

La résine pyridinium particulièrement est de très loin la résine la plus efficace. Elle demande également un temps de synthèse et des matières premières dérisoires comparés aux polymères greffés avec des calixarènes. Cependant, il faut souligner que le challenge de réaliser de la rétention de bactéries par le greffage de calixarènes polycationiques à la surface d'un polymère synthétique a été réussi, puisque l'on retrouve 4 de ces composés parmi les 7 meilleurs polymères testés.

14.4.4 Présentation de l'efficacité de rétention des bactéries des différentes résines étudiées

Une autre façon d'interpréter ces résultats est d'étudier la capacité de capture d'une résine par rapport aux nombres de motifs nécessaires à cette capture. Dans cette hypothèse, la résine idéale serait une résine avec très peu de motifs greffés et une grande capacité de rétention de bactéries.

Afin de quantifier cette grandeur qui sera appelée « Efficacité » de la résine, nous proposons de considérer le rapport suivant :

$$Efficacité = \frac{Capture\ effective}{Quantité\ de\ motifs\ / g}$$

Ce calcul a été réalisé, en utilisant les résultats rapportés à la concentration bactérienne après 3 heures d'agitation, pour toutes les résines présentant des pourcentages de capture positifs (les résines **90**, **58b**, **85** et **71a** ont été exclues). Les résultats sont présentés dans le graphique suivant (Fig. **167**).

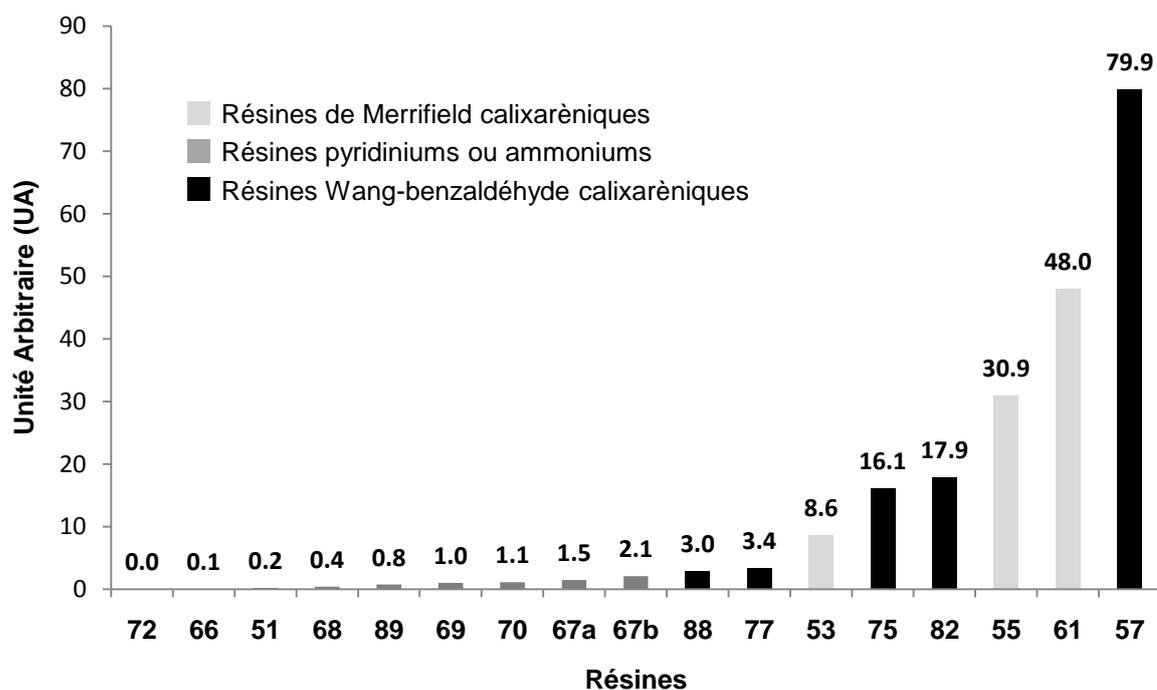


Fig. 167 : Efficacité de la rétention de bactéries des résines testées en fonction du nombre de motifs greffés sur le polymère.

Les 5 résines les plus efficaces sont les suivantes (Fig. 168). Par cette approche, ce sont les résines de Merrifield et de Wang-benzaldéhyde qui sont manifestement les plus efficaces pour la rétention de bactéries.

Résines					
Numéro	57	61	55	82	75
Type	Wang-benzaldéhyde	Merrifield	Merrifield	Wang-benzaldéhyde	Wang-benzaldéhyde
Efficacité	79.9	48.0	30.9	17.9	16.1

Fig. 168 : Résines greffées possédant la plus grande efficacité.

De plus, les 4 résines les plus efficaces sont des résines avec des groupements *tétra*-guanidiniums sur les parties hautes des calixarènes greffés. Ces résultats prouvent que le concept de greffer des motifs de **Cx1** sur la surface du polymère confère au matériau des propriétés de rétention de bactéries.

Cependant, **cette vision des résultats doit être relativisée**. Elle montre que plus le nombre de motifs greffés sera bas, meilleure sera l'efficacité, ce qui est totalement paradoxal avec l'idée de « tapisser » la résine de groupements permettant la capture de bactéries. L'efficacité doit plutôt être utilisée comme un outil permettant d'évaluer le **potentiel** d'une résine et ainsi de pouvoir choisir les voies de synthèses à améliorer en priorité. Par exemple, améliorer le nombre de motifs greffés sur la résine **57** permet d'espérer une capacité de rétention de bactéries très élevée.

Si l'on émet l'hypothèse que l'efficacité reste constante, quand la quantité de motifs greffés par gramme augmente, alors le potentiel de capture de la résine considérée augmente lui aussi. Dans ce cas de figure, l'efficacité apparaît alors comme un outil qui permet de sélectionner les meilleurs candidats à greffer. Cet outil permet par la même occasion de comparer facilement les différents motifs greffés sur différentes résines.

14.5 Conclusion

L'électrophorèse capillaire est une technique d'analyse simple et rapide qui, après validation de la méthode de quantification des bactéries, a permis d'évaluer les capacités de capture des polymères commerciaux et de synthèse, de suspensions d'*E. coli* en milieu aqueux.

Les résines possédant les meilleures capacités de capture de bactéries sont les résines pyridinium **67a** et **67b**. La résine **67b** est capable de capter 6.94 µg d'*E. coli* en suspension par mg de résine. Si les chiffres de la littérature sont repris comme référentiel (cf §14.2.1), cette capacité correspond à des valeurs comprises entre 0.73 et 6.31 10⁷ bactéries/mg de résine.

Les résines de Merrifield et de Wang-benzaldéhyde calixaréniques présentent des capacités de capture de bactéries correctes. Parmi celles-ci, la meilleure capacité de capture de bactéries est obtenue par la résine **57**. Cette résine est également celle qui possède la meilleur efficacité puisqu'elle retient beaucoup de bactéries avec un taux de greffage relativement faible.

Ces résultats de capture peuvent être également vus sous un autre angle en considérant l'efficacité (quantité de bactéries captées rapportée au nombre de motifs greffés sur chacune des résines. Cette vision permet de montrer un grand potentiel parmi les résines calixaréniques (de Merrifield et de Wang) synthétisées si les taux de greffage sont améliorés.

En ce sens, la suite des travaux à réaliser consiste sans aucun doute à améliorer la quantité de motifs calixaréniques *tétra*-guanidiniums greffés à la surface des polymères, cette étude ayant permis de prouver l'efficacité de rétention des bactéries de ce motif.

15 Validation de la fixation de bactéries par microscopie confocale

15.1 Principe de fonctionnement¹⁵⁴

La microscopie confocale est une technique moderne de microscopie de fluorescence. Elle vise à améliorer la résolution du microscope photonique et permettre une analyse tridimensionnelle des échantillons biologiques. Le microscope confocal repose sur deux principes décrits par Marvin Minsky (1957) :

- Une source ponctuelle d'éclairage est indispensable (contrairement à l'éclairage plein champ d'un microscope conventionnel). Le point source est focalisé par une lentille au niveau de l'échantillon.

- La lumière émise par l'échantillon est à son tour focalisée à la surface d'un détecteur.

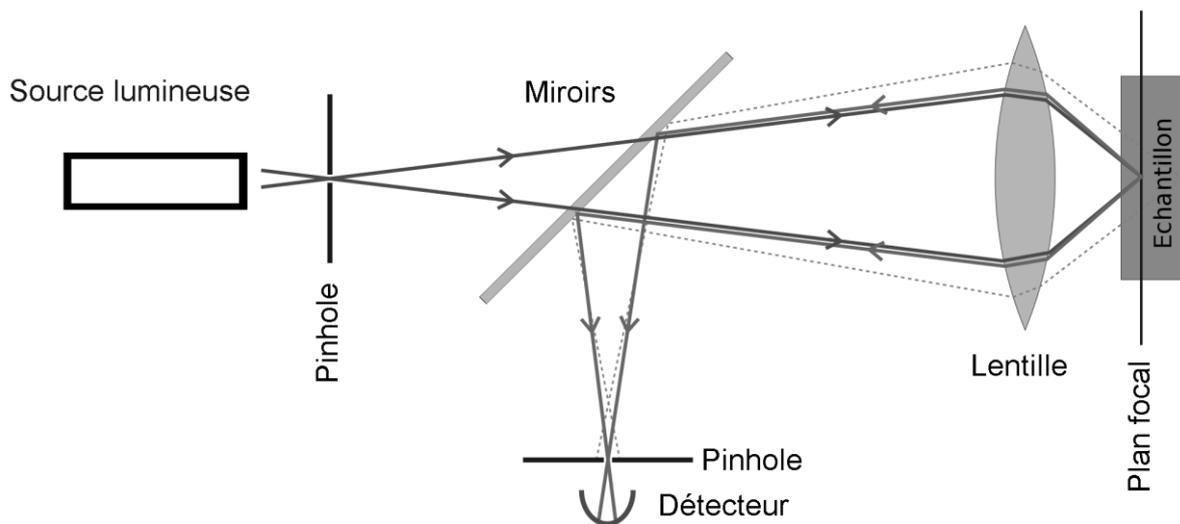


Fig. 169 : Schéma de fonctionnement d'un microscope confocal.

L'image obtenue par cette technique est une véritable coupe optique provenant de l'intérieur de l'échantillon (Fig. 169).

La source d'éclairage d'un microscope confocal doit être une source de lumière à l'excitation particulièrement intense et focalisée. La lumière laser répond à ces conditions et les lasers à gaz fournissent des faisceaux lumineux à l'excitation de faible diamètre

(quelques dixièmes de mm), intenses et monochromatiques (de longueur d'onde parfaitement définie).

La lumière à l'excitation étant une source ponctuelle, l'obtention d'une image d'un plan focal en x et y est réalisée par un système de balayage spatial de la préparation, à l'aide de deux miroirs galvanométriques. Une exploration spatiale de l'échantillon est possible en déplaçant l'objet selon l'axe des z (l'axe optique du microscope). Il est ainsi possible de réaliser des coupes pouvant aller jusqu'à 100 μm de profondeur.

15.2 Application à notre étude

15.2.1 Préparation de l'échantillon

L'intérêt de la microscopie confocale réside dans la possibilité d'obtenir des images précises des bactéries mises en contact avec le polymère greffé. Pour cela, il est indispensable de fixer un fluorophore sur les composés que l'on souhaite observer. Des colorants (stainers) qui ont la capacité de se fixer sur différentes cibles sont commercialisés. Le SYBR Green II[®], dont la structure est tenue secrète par le dépôt d'un brevet, est utilisé dans cette étude pour marquer l'ADN des bactéries. Ce colorant absorbe dans le bleu ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$) et émet dans le vert ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$).

Afin de marquer les bactéries retenues à la surface du polymère, le protocole suivant a été mis au point :

1. Mise en contact dans un tube Eppendorf de 2.3 mg de résine pyridinium **67b** avec 200 μL d'une suspension bactérienne d'*E. coli* lyophilisée à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le tampon BGE₂ (conditions identiques à celles d'électrophorèse capillaire).
2. Agitation pendant 3 heures de l'Eppendorf.
3. Rinçages (3 x 1 mL) des billes de résine par le tampon BGE₂.
4. Coloration par ajout de SYBR Green II[®] (1 dose) pendant 15 min à l'obscurité.
5. Récupération des billes de résine par filtration sur un filtre 0.2 μm .
6. Dépôt des billes entre une lame et une lamelle, en suspension dans une huile CITIFLUOR AF 87 (viscosité moyenne, indice de réfraction ~ 1.52 à 20°C).

Les lames et lamelles sont conservées au réfrigérateur. La préparation des échantillons a été effectuée par Mmes L. Mathieu et E. Angel au LCPME (UMR 7564, Nancy).

Le protocole ci-dessus est schématisé par le dessin de la Fig. **170**.

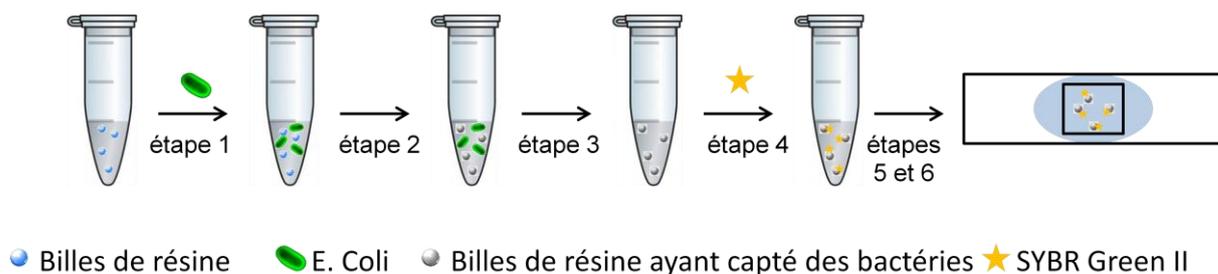


Fig. 170 : Schéma du protocole de préparation d'un échantillon de billes de résine marquées.

15.2.2 Résultats de la microscopie confocale

Afin de vérifier si et comment les bactéries sont associées aux billes de résine, les lames préparées ont été observées au microscope confocal. Les images suivantes (Fig. 171) ont été obtenues grâce au Dr C. Mustin au L.I.E.C; UMR 7360, Nancy.

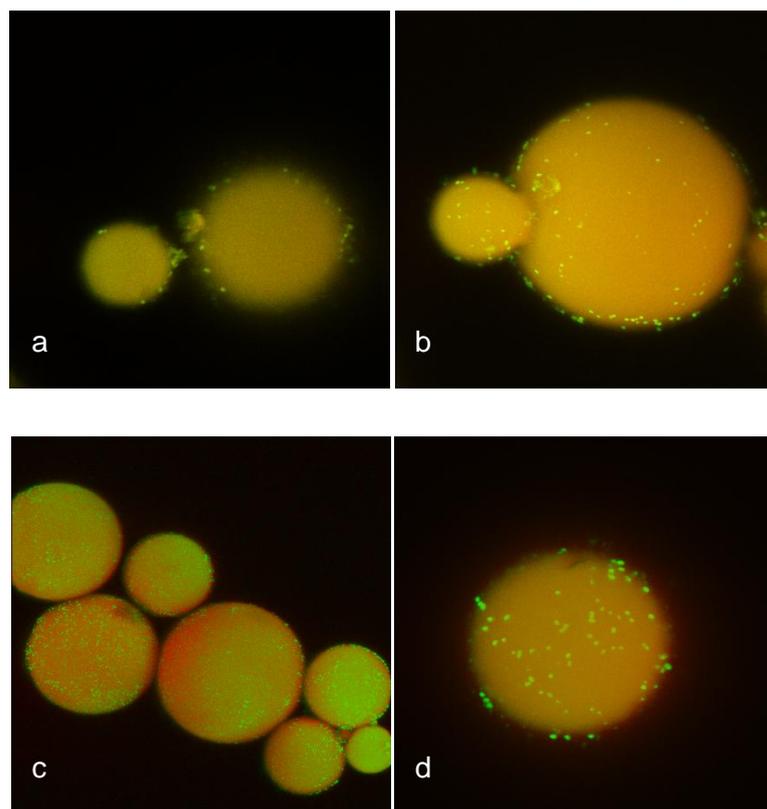


Fig. 171 : Images de microscopie confocale des billes de résine 67b. a) Vue des bords de deux billes proches. b) Tomographie des deux billes de a). c) Tomographie d'un groupe de billes. d) Tomographie de la calotte d'une bille de mesures connues.

Ces images montrent (avec des couleurs arbitraires), les billes de résine en jaune avec beaucoup de petits points verts sur la surface. Les points verts correspondent aux bactéries

capturées. La vision des billes de résine a été possible car les billes montrent une autofluorescence probablement due à la capture d'une partie du fluorophore SYBR GREEN II.

Ainsi un premier laser ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) a pu être réglé pour obtenir la vision des bactéries seules, un second laser ($\lambda_{\text{ex}} = 457 \text{ nm}$) a permis d'obtenir la vision des billes de résine seules et la superposition des deux a permis d'obtenir les images ci-dessus. La détection est réalisée sur une fenêtre spectrale comprise entre 530 et 540 nm. De plus, une tomographie des billes a pu être obtenue en déplaçant la lame selon l'axe z (avec un pas de $0.410 \mu\text{m}$), en collectant toutes les images et en réalisant leurs superpositions.

Les images **a** et **b** montrent la différence entre une seule coupe selon l'axe z (image **a**) et la superposition ou tomographie de 57 coupes selon l'axe z (image **b**). La tomographie **c** montre un groupe de billes ayant toutes capté des bactéries à leurs surfaces.

La tomographie **d** représente la calotte d'une bille, supposée parfaitement sphérique, constituée de la superposition de 16 coupes (15 tranches) de $0.410 \mu\text{m}$, soit d'une hauteur de calotte $h = 6.2 \mu\text{m}$. Le rayon de la calotte est égal à $r = 18.1 \mu\text{m}$ et le rayon de la bille complète est égal à $R = 27.35 \mu\text{m}$ (Fig. 172).

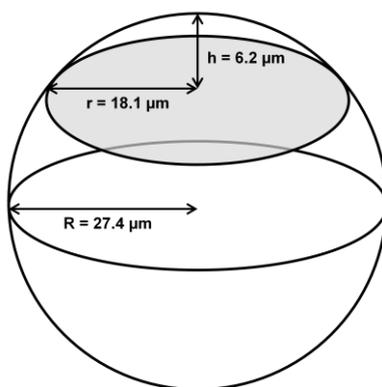


Fig. 172 : Représentation de la calotte de la bille de résine de l'image **d**.

15.2.2.1 Calcul de la quantité de bactéries par gramme de résine

Il a été compté 70 bactéries bien définies à la surface de cette calotte. Afin d'extrapoler le nombre de bactéries à la surface de la bille complète, le rapport entre la surface de la calotte et la surface totale de la bille est calculée par la formule suivante.

$$\text{Rapport} = \frac{\text{Surface de la calotte}}{\text{Surface de la bille}} = \frac{2\pi R h}{4\pi R^2} = \frac{h}{2R}$$

$$\text{Rapport} = \frac{6.2}{2 \times 27.35} = 0.115$$

Ce rapport permet de calculer le nombre de bactéries extrapolées sur la surface totale de la bille qui est d'environ $70 / 0.115 = 609$ bactéries. Cette bille a une surface de $9400 \mu\text{m}^2$ ce qui conduit à une valeur de **$6.41 \cdot 10^{10}$ bactéries / m^2** .

Ce résultat peut être converti en grammes de bactéries par unité de surface en utilisant une nouvelle fois les valeurs basses et hautes du poids d'une bactérie déterminée par Burg *et al.*¹⁴⁵ et Neidhardt *et al.*¹⁴⁶ (voir §14.2.1) comprises respectivement entre $0.11 \cdot 10^{-12}$ g et $0.95 \cdot 10^{-12}$ g. Les quantités obtenues sont comprises entre **$7.1 \cdot 10^{-3}$ et $61.3 \cdot 10^{-3}$ g de bactéries/ m^2** .

15.2.2.2 Calcul de la surface spécifique des billes de résine

Afin de calculer la surface spécifique des billes de résines, il est nécessaire dans un premier temps d'évaluer le nombre de billes par gramme de polymère. Pour déterminer le nombre de billes (***N***) dans un système polydispersé, la littérature industrielle¹⁵⁵ nous donne la formule suivante :

$$N = \frac{1}{\left(\frac{4}{3}\pi\right) \left(\frac{1}{2}D\right)^3 d}$$

Dans cette équation, *D* est le diamètre moyen d'une bille de résine en cm, *d* est la densité de la résine en g/cm^3 . Le diamètre moyen a pu être déterminée par microscopie à balayage électronique des billes (voir §9.7) et la valeur obtenue est de $37.4 \mu\text{m}$. La densité a été déterminée expérimentalement en pesant un volume défini de résine et celle-ci est égale à $0.66 \text{ g}/\text{cm}^3$. Le résultat obtenu est de **$55.3 \cdot 10^6$ billes par gramme de résine**.

Si l'on multiplie ce résultat par la surface d'une bille moyenne de la résine ($4394 \mu\text{m}^2$) d'un diamètre moyen toujours égal à $37.4 \mu\text{m}$, on obtient une surface spécifique de **$0.242 \text{ m}^2/\text{g}$** .

15.2.2.3 Surface spécifique calculée par un autre calcul

Cette surface spécifique, obtenue par microscopie confocale, peut être comparée avec un autre calcul de la surface spécifique de la résine. Cet autre calcul est issu du rapport entre la capacité de rétention de bactéries par gramme et la concentration de bactéries par

mètre carré de la résine. Ce rapport peut sembler abstrait dans un premier temps mais mathématiquement ce ratio permet d'obtenir une valeur en m²/g, c'est à dire une surface spécifique.

$$\text{Surface spécifique} = \frac{\text{Capacité de la résine (bactéries par g)}}{\text{Concentration (bactéries par m}^2\text{)}} = \frac{\text{m}^2}{\text{g}}$$

Pour cela, le numérateur est obtenu par les mesures **d'électrophorèse capillaire** de l'essai. 16.12 µg de bactéries sont capturées par 2.3 mg de résine ce qui correspond à une capacité de 7.01 10⁻³ g de bactéries captées / g de résine. Ce résultat est converti en nombre de bactéries en utilisant une nouvelle fois la fourchette des masses d'une bactérie *E. coli* de la littérature, ce qui conduit à un intervalle compris entre une capacité basse de **7.38 10⁹ bactéries / g** (Cap bas) et une capacité haute de **6.37 10¹⁰ bactéries / g** (Cap haut) de résine.

Le dénominateur quant à lui est obtenu au début du calcul de la quantité de bactéries par gramme de résine (§15.2.2.1) : **6.41 10¹⁰ bactéries / m²**.

L'application numérique du calcul est présentée ci-dessous :

$$\text{Surface spécifique (bas)} = \frac{\text{Cap bas}}{\text{Concentration}} = \frac{7.38 \cdot 10^9}{6.41 \cdot 10^{10}} = 0.115 \text{ m}^2/\text{g}$$

$$\text{Surface spécifique (haut)} = \frac{\text{Cap haut}}{\text{Concentration}} = \frac{6.37 \cdot 10^{10}}{6.41 \cdot 10^{10}} = 0.994 \text{ m}^2/\text{g}$$

15.2.3 Conclusion

La capture de bactéries, déjà suivie par la quantification en électrophorèse capillaire, a pu être visualisée par microscopie confocale. La résolution des clichés le permettant, une évaluation du nombre de bactéries capturées par unité de surface du polymère a pu être extrapolée.

Les deux techniques de microscopie confocale et d'électrophorèse capillaire ont pu être comparées, en calculant pour chacune d'elles la surface spécifique des billes de la résine pyridinium **67b**.

Cette valeur de la surface spécifique est de 0.242 m²/g par microscopie confocale et elle est comprise dans un intervalle entre 0.115 et 0.994 m²/g par les calculs de l'expérience d'électrophorèse capillaire. Bien que des hypothèses avec des marges d'erreurs

probablement importantes aient été envisagées, entre autre sur la forme et le diamètre des billes, les résultats obtenus sont cohérents. Ils permettent ainsi d'atteindre un degré de confiance correct dans la présentation de ce travail, bien que l'expérience nécessite d'être réitérée pour améliorer encore cette confiance.

16 Conclusion générale

Le travail qui m'a été proposé au commencement de ma thèse était double :

- D'une part : enrichir la chimiothèque du laboratoire par le design de nouvelles structures et, par la modulation structurale de nouvelles têtes de séries, de composés bioactifs, notamment anti-infectieux.
- D'autre part : intégrer un site fonctionnel à ces molécules autorisant l'ancrage covalent sur divers supports et permettant d'étudier et d'exploiter leurs propriétés à l'état supporté.

En ce qui concerne le premier objectif, sa réalisation utilise la synthèse et la caractérisation de macrocycles (les calixarènes) porteurs sur leurs parties haute de fonctions *tétra*-guanidinoéthyle. Ces molécules (le **Cx1** par exemple), développées avant mon arrivée au laboratoire, arborent une polarité localisée et spatialement organisée qui leur permet d'acquérir des propriétés thérapeutiques en solution.

Les modulations apportées à cette série de calixarènes bioactifs dans ce travail ont permis d'ajouter sur la partie basse du calixarène, la monosubstitution d'un bras espaceur. Ce bras espaceur a eu deux intérêts, le premier est de créer de nouvelles structures débouchant vers le test de nouveaux composés bioactifs tels que le *tétra*-guanidino-éthyle-[(4-nitrophényl)propyl]-calix[4]arène **41**, son homologue anilino **44** ou des composés bis-calixaréniques tétra-ammoniums ou tétra-guanidiniums **46** et **48**. Les activités antibactériennes de ces nouveaux composés ont pu être testées, prouvées et leurs toxicités cellulaires évaluées.

Le second intérêt de l'insertion d'un bras espaceur est de servir de lien pour greffer ces molécules à la surface de nouveaux matériaux et ainsi aborder le second objectif de ce travail de thèse. Pour être efficace, un bras espaceur doit comporter un point d'ancrage qui lui permettra d'être incorporé sur la surface du matériau et c'est dans la recherche de ce point d'ancrage que le motif pyridinium a été testé.

Ce motif, une fois greffé sur un polymère de Merrifield a prouvé tout d'abord son efficacité par un greffage quantitatif de cette résine. L'utilisation de techniques de microscopie à balayage électronique (MEB) ou de fluorescence à l'état solide (par incorporation d'un fluorophore pyrénique) ont permis, en plus des techniques de

spectroscopie infrarouge (IR) et d'analyse élémentaire (AE) de confirmer avec certitude le greffage de la résine par un point d'ancrage pyridinium.

Mais au-delà de fournir un point d'ancrage efficace, cette résine pyridinium greffée a également dévoilé des applications en tant que résine échangeuse d'anions, prouvant la possibilité de son utilisation dans la capture et le relargage de substances thérapeutiques anioniques dans l'eau. Des applications potentielles dans le domaine de la dépollution de milieux contaminés par ce type de composés sont tout à fait envisageables.

De plus, cette résine a prouvé sa capacité de rétention de bactéries à sa surface grâce à l'utilisation d'une technique d'isotachophorèse capillaire mise en place au laboratoire afin de pouvoir quantifier la concentration d'une suspension bactérienne quasiment en temps réel. La cinétique d'évolution de la concentration de la suspension d'*E. coli* (bactérie modèle de cette étude) a pu être suivie et les résultats présentent, lors de la mise en contact de la résine pyridinium avec les bactéries en milieu aqueux, la capture de 80% de la concentration initiale de bactéries en 3 heures. Cette baisse radicale de la concentration en bactérie montre la capacité de ce matériau à retenir les bactéries. C'est ainsi (issu d'un néologisme) qu'est né le terme employé dans le titre de ce manuscrit : « bactériophile ».

La clé de voute de ce travail a consisté à prouver que les bactéries sont retenues sur le polymère greffé par observation de cette rétention en imagerie confocale. Pour cela, la résine pyridinium, après capture des bactéries, a été mise en contact avec un stainer venant se fixer sur l'ADN des bactéries et permettant d'obtenir par fluorescence une vision de ces dernières. L'image obtenue a permis non seulement de confirmer la présence des bactéries à la surface du polymère, mais également d'effectuer un comptage fournissant une estimation du nombre de bactéries retenues par unité de surface de polymère.

Enfin, les synthèses de calixarènes tétra-guanidinium ont été réalisés sur les polymères synthétiques de Merrifield et de Wang benzaldéhyde en utilisant un point d'ancrage pyridinium pour la première et la formation d'une imine pour la seconde. Des stratégies de synthèse appelées Top-Down (avec un maximum de réactions en solution) ou Bottom-Up (avec un maximum de réactions à l'état solide) ont été utilisées et comparées. Ainsi, les résines obtenues ont été caractérisées et leurs taux de greffage ont été déterminés. Bien que modeste, le greffage de calixarènes *tétra*-guanidinium sur ces polymères est vérifié et la « bactériophilie » de ces nouveaux matériaux a également été évaluée par électrophorèse capillaire. Les résultats obtenus pour certaines de ces résines, bien qu'inférieurs à ceux de la résine pyridinium en terme de capture de bactéries, sont véritablement encourageant.

Perspectives

Les perspectives d'utilisation de ces matériaux capables de capturer des bactéries en suspension dans l'eau sont de pouvoir effectuer la dépollution des milieux aqueux.

Il a été envisagé dès le départ le greffage sur d'autres types de supports, tels que des polymères d'origine naturel (Dextran, chitosan ou cellulose par exemple) qui sont disponibles en abondance contrairement aux polymères synthétiques issus de produits pétroliers. Le choix des résines de synthèse s'est imposé mais quelques essais sur des polymères naturels confirment la nécessité d'élargir cette investigation avec ces derniers.

Egalement, la séparation et la quantification de nouvelles bactéries peuvent être mises en place assez rapidement pour apporter des informations quant au spectre d'activité de ces nouveaux polymères antibactériens.

Analyses

Solvants

Les solvants sont utilisés sans purification préalable, sauf dans les cas de la DMF (distillée avant utilisation sur CaH_2 sous vide poussé), du THF et du méthanol de synthèse (séchés sur colonnes filtrantes remplies de tamis moléculaire 4Å et conservés sous atmosphère inerte).

Appareillages

Les spectres RMN ont été enregistrés sur des appareils AVANCE III 400 MHz et DPX 250 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 ; D_2O : 4.79 ppm et $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$: 3.31 ppm.

En ^{13}C : CDCl_3 : 77.16 ppm ; DMSO-d_6 : 39.52 ppm et $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$: 49.00 ppm.

La multiplicité des signaux est décrite avec les abréviations suivantes : s (singulet), bs (singulet large), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), qt (quintuplet) et m (mutilpet). L'attribution des protons et des carbones de certains composés a été déterminée par des spectres bidimensionnels (COSY, HMQC, HMBC).

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil à point de fusion capillaire ELECTROTHERMAL IA 9200.

La spectroscopie Infra-Rouge (ν en cm^{-1}) a été réalisée sur les appareils suivants :

- SCHIMAZDU FT-IR Affinity 1. Les échantillons ont été déposés directement à l'état solide sur l'ATR PIKE GladiATR (diamant).
- BRUKER Vector 22. Les échantillons ont été déposés directement à l'état solide sur l'ATR PIKE MIRacle™ (germanium).

Les spectres de masse ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre de masse haute résolution QTOF : BRUKER - MICROTOFq et un spectromètre de masse à temps de vol MALDI/TOF : BRUKER ULTRAFLEX.

La fluorescence à l'état solide a été réalisée sur un spectrofluorimètre FLUOROLOG 3 (JOBIN YVON).

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre PHM210 MeterLab.

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 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour les coefficients d'absorption molaire.

Les analyses élémentaires sont effectuées sur un appareil Thermofinnigan FlashEA 1112. Les rendements ont été calculés en utilisant la masse molaire corrigée de l'analyse élémentaire. Cependant, la masse molaire théorique a été utilisée pour les molécules **3**, **4**, **17**, **19**, **20**, **21**, **29**, **31**, **32**, **35**, **40**, **42**, **44** et **45** pour lesquelles la différence entre les résultats

d'analyse élémentaire et le calcul théorique étaient supérieurs à $\pm 0.4\%$ sur le carbone, l'hydrogène ou l'azote.

Le nombre de trifluoroacétates liés aux résines ammoniums et guanidinium a été fixé de manière théorique car aucune analyse effectuée ne permet d'en obtenir une valeur précise.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées soit sur colonne en verre, soit sur COMBIFLASH et sur les supports suivants :

- Silice : MACHERAY-NAGEL, Gel de Silice 60 M, 40-63 μm
- Alumine : MERCK, Aluminium Oxide 90 standardisé.

Les chromatographies sur couches minces ont été réalisées sur les supports suivants :

Silice : MACHERAY-NAGEL, ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄

Alumine : MACHERAY-NAGEL, POLYGRAM[®] ALOX N/UV₂₅₄.

Les plaques sont révélées à l'aide d'une lampe UV 254 nm et/ou par les révélateurs suivants : KMnO_4 , ninhydrine, vapeurs d'iode et DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazine).

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été réalisée sur un système HPLC Merck Hitachi en utilisant la chaîne de modules suivants :

- Un système de quatre pompes, modèle 7100.
- Un autosamplieur équipé d'une boucle d'injection de 100 μL , modèle 7200.
- Un détecteur UV à barrette de diode 200-350 nm, modèle 7450.

La colonne utilisée est de type C18 (phase inverse) à température ambiante. La phase mobile est un mélange tampon acétate pH 2.2 (50 mM dans l'eau) / acétonitrile : 75/25. Le débit est de 1.5 mL/min. Le volume d'injection est de 5 μL et la longueur d'onde de détection est fixée à 256 nm.

L'électrophorèse capillaire a été réalisée sur un appareil BECKMAN P/ACE System 5000 équipé d'un détecteur UV réglé à 280 nm. Le capillaire a une longueur totale de 37 cm, une longueur effective de 29.4 cm et un diamètre de 75 μm . Avant chaque injection, le capillaire est rincé (NaOH 0.1M : 2 min, eau : 2 min et tampon BGE2 : 2min). L'injection hydrodynamique dure 10 s et la tension appliquée pendant la séparation est de 10 kV.

La microscopie électronique à balayage a été réalisée sur un microscope JEOL JSM 6010LA. Les modes de fonctionnement utilisés sont par la détection des électrons secondaires et des électrons rétrodiffusés avec des tensions d'accélération variant de 3 à 10 kV.

La microscopie confocale à balayage laser a été réalisée sur un microscope Nikon TE 2000U Eclipse. Le faisceau laser est généré par un Biorad Radiance 2100 Rainbow AGR3Q/BLD.

Evaluations des CMI

Chaque CMI a été déterminée 3 fois, par la méthode de dilution en milieu aqueux Mueller Hinton (dissolution de la drogue en eau distillée) en plaque de 96 puits. Pour chaque CMI, trois témoins ont été réalisés : témoin milieu, témoin milieu + drogue et témoin bactéries (sans drogue).

La solution mère de chaque molécule a été préparée à 1024 µg/mL dans de l'eau distillée stérile excepté pour la molécule **41** où le DMSO a été utilisé comme co-solvant à hauteur de 20% de la solution mère. Dans ces conditions aucun problème de solubilité, de précipité ou de trouble n'a été observé.

Toutes les solutions mères ont subi une filtration stérilisante sur filtre seringue de 0.22 µm. La gamme de concentration testée va de 256 à 1 µg/mL (n = 3).

Les plaques ont étéensemencées avec un inoculum de 10^5 à 10^6 bactéries suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)¹⁵⁶ et du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁵⁷.

Evaluation des toxicités cellulaires CI_{50}

Chaque CI_{50} a été déterminée 3 fois, par un test MTT (d'après Mossman *et al.* 1983) de dilution en milieu aqueux MEM (dissolution de la drogue en MEM + 2% SVF) en plaque de 96 puits. Pour chaque CI_{50} , trois témoins ont été réalisés : témoin milieu, témoin milieu + drogue et témoin cellules (sans drogue - 100% viabilité).

La solution mère de chaque molécule a été préparée à 256 µg/mL dans du MEM +2% SVF. La gamme de concentration testée est de 256-1 µg/mL (256-128-64-32-16-8-4-2-1). La valeur de CI_{50} est déterminée arithmétiquement en prenant en compte les deux valeurs de concentration encadrant le CI_{50} .

Les plaques ont étéensemencées avec un inoculum de 10^4 cellules et un temps de 48 heures leur a été laissé avant la mise en contact avec les drogues.

***Protocoles de synthèse des
molécules***

17 Synthons de base

Synthons de base

4-[(*N,N'*-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénol **1**

Mourer, M.; Dibama, H. M.; Fontanay, S.; Grare, M.; Duval, R. E.; Finance, C.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496-5509, "*p*-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation".

La *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*-triflylguanidine (0.789 g, 2.02 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 30 mL de mélange CH₂Cl₂/MeOH : 1/1. La triéthylamine (0.818 g, 8.08 mmol, 4 éq.) et la tyramine chlorhydrate (0.350 g, 2.02 mmol, 1 éq.) sont ajoutés au mélange et le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure à température ambiante sous argon. Après contrôle CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 98/2) et disparition totale des produits de départ, le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est repris dans un mélange CH₂Cl₂/eau, extrait 3 fois au dichlorométhane, lavé 3 fois à l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, évaporée à sec pour donner le produit attendu **1** (0.736 g, 96%, poudre blanche).

IR (ATR) : 3441.01 (OH) ; 1722.43 (CO) ; 1645.28 (C=N).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : 1.48 (s, 18H, Me₃C) ; 2.76 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NH) ; 3.53-3.61 (m, 2H, CH₂CH₂NH) ; 5.86 (bs, 1H, NH) ; 6.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH) ; 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, ArH) ; 8.39 (bs, 1H, OH) ; 11.45 (bs, 1H, NH).

N-carboxybenzyl-tyramine **2**

Dupont-Passlaigue, E.; Leroy, I.; Patoiseau, J.-F.; Junquero, D.; Rival, Y.; Delhon, A. *Brevet*, WO 2006/0925107A1, **2006**, "1,2,4-Triazine derivatives, preparation and use thereof in human therapy".

Le chlorhydrate de tyramine (2.00 g, 11.52 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL d'eau et 10 mL d'acétone. NaHCO₃ (1.94 g, 23.04 mmol, 2 éq.) est ajouté et le milieu réactionnel est refroidi à 0°C sous argon. Le chloroformiate de benzyle (3.14 g, 18.43 mmol, 1.6 éq.) est ajouté goutte à goutte puis la réaction est laissée remonter à température ambiante pendant la nuit. L'acétone est ensuite évaporée sous vide et la suspension obtenue est filtrée sur fritté et rincée longuement à l'eau. Le précipité est repris au dichlorométhane, séché sur Na₂SO₄ et concentré jusqu'à obtenir environ 10 mL de solution. Un très large excès de pentane est ajouté et le précipité obtenu est filtré et rincé au pentane pour donner le produit attendu **2** (2.69 g, 86%, poudre blanche).

IR (ATR) : 3321.42 (NH/OH), 1681.93 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 2.73 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH) ; 3.40-3.43 (m, 2H, CH₂CH₂NH) ; 4.82 (bs, 1H, OH) ; 5.10 (s, 2H, COOCH₂) ; 6.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₁) ; 7.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₂) ; 7.31-7.38 (m, 5H, Ar_{Cbz}).

1-Bromo-3-((*N*-carboxybenzyl-tyramine)-yl)-propane 3

La *N*-carboxybenzyl-tyramine **2** (1.650 g, 6.08 mmol, 1 éq.) est solubilisée dans 250 mL d'acétonitrile fraîchement distillé. K_2CO_3 (0.923 g, 6.69 mmol, 1.1 éq.), KI (0.300 g, 1.81 mmol, 0.3 éq) et le 1,3-dibromopropane (12.23 g, 60.82 mmol, 10 éq.) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est chauffé à reflux sous argon pendant la nuit. La CCM (SiO_2 , Heptane/AcOEt : 6/4) montre la disparition totale de la *N*-carboxybenzyl-tyramine et la formation d'un nouveau produit. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, le solvant est évaporé à sec et la suspension blanche obtenue est reprise dans environ 100 mL de dichlorométhane et filtrée sur fritté. Le filtrat est ensuite évaporé à sec et environ 150 mL d'heptane sont ajoutés. La suspension obtenue est laissée au frigo pendant 24 heures et filtrée sur fritté puis rincée plusieurs fois à l'heptane. Le solide est chromatographié (SiO_2 , CH_2Cl_2) pour donner le produit **3** (1.81 g, 76%, solide blanc).

F° : 80-81°C.

IR (ATR) : 3329.14 (NH), 1238.30 (CH du CH_2Br), 526.57 (CBr).

UV-Vis (CH_2Cl_2) : 277 (1945).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : 2.31 (app quint, $J_1 = J_2 = 6.1$ Hz, 2H, $BrCH_2CH_2CH_2$) ; 2.76 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $ArCH_2CH_2NH$) ; 3.43 (app quint, 2H, $ArCH_2CH_2NH$) ; 3.60 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $BrCH_2CH_2CH_2$) ; 4.08 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $BrCH_2CH_2CH_2$) ; 4.75 (bs, 1H, NH) ; 5.09 (s, 2H, $COOCH_2Ar$) ; 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_2) ; 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_3) ; 7.30-7.38 (m, 5H, H_{Cbz}).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : 30.18 ($BrCH_2CH_2CH_2$) ; 32.52 ($BrCH_2CH_2CH_2$) ; 35.30 ($ArCH_2CH_2$) ; 42.50 ($ArCH_2CH_2$) ; 66.45, 66.76 ($BrCH_2CH_2CH_2$ et $COOCH_2Ar$) ; 114.84 (C_2) ; 128.24, 128.65, 128.83, 129.90 (C_3 ou C_{Cbz}) ; 131.11 (C_4) ; 136.72 (C_5) ; 156.42 (COO), 157.53 (C_1).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{19}H_{22}NO_3Br$, 0.3 C_7H_{16} (422.35) : C 60.00 ; H 6.40 ; N 3.32 ; trouvée : C 60.47 ; H 5.95 ; N 3.77%.

ESI-HRMS (ES^+) : 414.0717 [$M + Na^+$] $^+$.

1-Bromo-3-((*N*-carboxybenzyl-tyramine)-butane 4

La *N*-carboxybenzyl-tyramine **2** (1.40 g, 5.16 mmol, 1 éq.) est solubilisée dans 75 mL d'acétonitrile fraîchement distillé. K_2CO_3 (0.784 g, 5.68 mmol, 1.1 éq.), KI (0.050 g, 0.301 mmol, 0.06 éq) et le 1,4-dibromobutane (11.14 g, 51.60 mmol, 10 éq.) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est chauffé à reflux sous argon pendant la nuit. La CCM (SiO_2 , Heptane/AcOEt : 6/4) montre la disparition totale de la *N*-carboxybenzyl-tyramine et la formation d'un nouveau produit. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, le solvant est évaporé à sec et la suspension blanche obtenue est reprise dans environ 100 mL de dichlorométhane et filtrée sur fritté. Le filtrat est ensuite évaporé à sec et environ 100 mL d'heptane sont ajoutés. La suspension obtenue est

laissée au frigo pendant 72 heures et filtrée sur fritté. Le précipité est séché pour donner le produit attendu **4** (2.0g, 95%, solide blanc).

F° : 97-98°C.

IR (ATR) : 3317.56 (NH), 1240.23 (CH du CH₂Br), 522.71 (CBr).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 277 (2081).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.90-1.98 (m, 2H, BrCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 2.01-2.12 (m, 2H, BrCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 2.75 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, ArCH₂CH₂NH) ; 3.42 (m, 2H, ArCH₂CH₂NH) ; 3.49 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, BrCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 3.97 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, BrCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 4.74 (bs, 1H, NH) ; 5.10 (s, 2H, COOCH₂Ar) ; 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₂) ; 7.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₃) ; 7.34 (bs, 5H, H_{Cbz}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.06 (BrCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 29.63 (BrCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 33.57 (BrCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 35.52 (ArCH₂CH₂) ; 42.52 (ArCH₂CH₂) ; 66.70, 67.00 (BrCH₂CH₂CH₂CH₂ et COOCH₂Ar) ; 114.79 (C₂) ; 128.23, 128.65, 129.87 (C₃ et C_{Cbz}) ; 130.91 (C₄) ; 136.75 (C₅) ; 156.43 (COO), 157.72 (C₁).

Analyse élémentaire calculée pour C₂₀H₂₄BrO₃N, 0.25 C₇H₁₄ (431.36) : C 60.56 ; H 6.54 ; N 3.25 ; trouvée : C 60.53 ; H 6.01 ; N 3.65%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 444.0620 [M + K⁺]⁺ ; 428.0858 [M + Na⁺]⁺ ; 406.1013 [M + H⁺]⁺.

4-(pyrène-1-yl)butan-1-ol **5**

Lampkins, A. J.; O'Neil, E. J.; Smith, B. D. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6053-6058, "Bio-orthogonal phosphatidylserine conjugates for delivery and imaging applications".

L'acide 1-pyrène butyrique (0.790 g, 2.74 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 40 mL de THF anhydre. L'hydrure d'aluminium lithium (0.150 g, 3.95 mmol, 1.4 éq.) est additionné par portions et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures. La CCM (SiO₂, CH₂Cl₂) montre la disparition totale du produit de départ et la formation d'un nouveau produit fluorescent. 0.15 mL d'eau, 0.15 mL de NaOH 2N et 0.30 mL d'eau sont successivement ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel puis la suspension est agitée pendant 2 heures à température ambiante puis filtrée sur coton et rincée 3 fois au THF. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec et le résidu est repris au CH₂Cl₂, lavé à l'eau et séché sur Na₂SO₄. Le brut est purifié par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂) et le produit attendu **5** (0.549 g, 73%, huile jaune) est obtenu.

IR (ATR) : 3205.69 (OH).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.71-1.79 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂OH ou CH₂CH₂CH₂CH₂OH) ; 1.91-1.98 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂OH ou CH₂CH₂CH₂CH₂OH) ; 3.38 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂OH) ; 3.71 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂OH) ; 7.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{pyrène}) ; 7.97-8.18 (m, 7H, H_{pyrène}) ; 8.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{pyrène}).

1-(4-Bromobutyl)-pyrène 6

Lampkins, A. J.; O'Neil, E. J.; Smith, B. D. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6053-6058, "Bio-orthogonal phosphatidylserine conjugates for delivery and imaging applications".

Le 4-(pyrène-1-yl)butan-1-ol **5** (1.00 g, 3.64 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 100 mL d'acétonitrile. Le tétra-bromure de carbone (1.81g, 5.47 mmol, 1.5 éq.) est ajouté, le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et la triphénylphosphine (1.43g, 5.47 mmol, 1.5 éq.) est additionnée par portions. Le mélange est ensuite mis à chauffer à 80°C pendant la nuit. La CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/Hexane : 1/1) montre la formation d'un nouveau produit et la disparition partielle du produit de départ. 1.5 éq. supplémentaires de tétra-bromure de carbone et de triphénylphosphine sont ajoutés et la réaction est de nouveau laissée à 80°C pendant la nuit. La CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/Hexane : 1/1) montre la formation très majoritaire d'un nouveau produit. Le milieu réactionnel est partiellement évaporé à sec jusqu'à environ 20 mL, un très large excès d'éther est ajouté et le précipité formé est filtré sur fritté. Le premier filtrat est mis de côté. Le précipité est solubilisé dans un minimum de dichlorométhane et de nouveau un large excès d'éther est ajouté. Le précipité est filtré et les 2 filtrats sont réunis puis évaporés à sec pour obtenir un brut. Ce brut est purifié par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/Hexane : 8/2) pour donner le produit attendu **6** (0.719 g, 58%, solide blanc).

IR (ATR) : 1192.01 (C-H₂Br) ; 707.88 (C-Br).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : 2.02-2.05 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂Br et CH₂CH₂CH₂CH₂Br) ; 3.35-3.39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂Br) ; 3.46-3.49 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂Br) ; 7.86 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H_{pyrène}) ; 7.98-8.19 (m, 7H, H_{pyrène}) ; 8.27 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H_{pyrène}).

4-Chlorométhyl-nitrobenzène 7

Gant, T., G. ; Sarshar, S. *Brevet*, WO 2008/049116 A2, **2008**, "Substituted Indoles".

De l'acide nitrique à 65% (18.73 g, 175 mmol, 1 éq.) est versé très doucement sur de l'acide sulfurique (12.03 g, 191 mmol, 1.1 éq.) dans un bain de glace. Le mélange est ensuite coulé très lentement sur du chlorure de benzyle (21.98 g, 174 mmol, 1 éq.) toujours à froid et conservé à basse température pendant une heure. Le milieu réactionnel est alors coulé lentement sur de la glace. Le précipité jaune formé est filtré sur fritté et rincé à l'eau puis solubilisé à chaud dans un minimum d'éthanol. La solution est laissée précipiter à -21°C pendant 3 heures puis la suspension est de nouveau filtrée sur fritté pour donner le produit attendu **7** (0.950 g, 3%, solide blanc).

IR (ATR) : 1537.27 (ArNO₂) ; 1290.38 (ArNO₂) ; 1244.09 (C-H₂Cl) ; 694.37 (C-Cl).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : 4.65 (s, 2H, CH₂) ; 7.57 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H₂) ; 8.22 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₁).

4-Bromoéthyl-nitrobenzène **8**

Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Monopoli, A.; Ongini, E.; Varani, K.; Borea, P. A. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 115–126, "7-Substituted 5-Amino-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines as a 2A adenosine receptor antagonists: A study on the importance of modifications at the side chain on the activity and solubility".

L'acide nitrique 65% (25.0 g, 397 mmol, 11 éq.) est coulé lentement à 0°C sur le 1-bromoéthylbenzène (6.78 g, 36.6 mmol, 1 éq.). Le mélange est agité pendant 3 heures et laissé remonter à température ambiante. L'acide sulfurique (38.9 g, 397 mmol, 11 éq.) est ajouté à 0°C et le milieu réactionnel est de nouveau laissé remonter à température ambiante sous agitation pendant 3 heures. La CCM (SiO₂, Heptane/CH₂Cl₂ : 1/1) montre la formation de 3 nouveaux produits et la disparition totale du produit de départ. Le mélange est versé très lentement sur de la glace, puis 3 extractions au dichlorométhane et 3 lavages à l'eau sont réalisés jusqu'à obtenir un pH de la phase aqueuse égal à 6. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec. L'huile obtenu est couverte d'un large excès d'éther de pétrole et le mélange est mis au congélateur à -21°C pendant 45 minutes. L'huile cristallise et les cristaux sont ensuite filtrés et rincés à l'éther de pétrole. La CCM (SiO₂, Heptane/CH₂Cl₂ : 1/1) montre 2 produits majoritaires. Une chromatographie (SiO₂, Heptane/CH₂Cl₂ : 6/4) des cristaux permet d'obtenir le produit attendu **8** (1.89 g, 22%, solide blanc).

IR (ATR) : 1508.33 (ArNO₂) ; 1340.53 (ArNO₂) ; 1222.87 (C-H₂Br) ; 657.73 (C-Br).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 3.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₂Br) ; 3.61 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂Br) ; 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₂) ; 8.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₁).

1-(3-Bromopropyl)-4-nitrobenzène **9**

Kim, H. J.; Lee, W. S. *Brevet*, WO 2007/126262 A1, **2007**, "Anion receptor, and electrolyte using the same".

Le (3-bromopropyl)benzène (6.54 g, 32.85 mmol, 1 éq.) est additionné d'un mélange d'acide nitrique 65% (22.7 g, 361 mmol, 11 éq.) et d'acide sulfurique (35.4 g, 361 mmol, 11 éq.), goutte à goutte à -2°C pendant 30 min. Le milieu réactionnel est ensuite coulé très lentement sur de la glace, puis extrait 3 fois au dichlorométhane et lavé 3 fois à l'eau (pH final = 6). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec pour obtenir un brut (7.627 g). 2.00 g de ce brut sont chromatographiés (SiO₂, Cyclohexane) pour donner le produit attendu **9** (1.139 g, 54 %, huile jaune).

IR (ATR) : 1512.19 (ArNO₂) ; 1340.53 (ArNO₂) ; 1240.23 (C-H₂Br) ; 696.30 (C-Br).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 2.16-2.23 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂Br) ; 2.91 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂Br) ; 3.40 (t, *J* = 6.40 Hz, CH₂CH₂CH₂Br) ; 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₂) ; 8.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₁).

Chlorure de benzylpyridinium 10

Li, X.; Eli, W. *J. Mol. Catal. Chem.* **2008**, 279, 159–164, "A green approach for the synthesis of long chain aliphatic acid esters at room temperature".

La pyridine (1.00 g, 12.6 mmol, 1 éq.) est diluée dans 5 mL de toluène. La solution est refroidie à 2°C à l'aide d'un bain de glace. Le chlorure de benzyle (1.60 g, 12.6 mmol, 1 éq.) est ajouté goutte à goutte et le milieu réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 72 h. Le milieu réactionnel est ensuite mis à chauffer à 70°C pendant 24 heures supplémentaires. Le toluène est évaporé à sec puis environ 300 mL d'eau sont ajoutés et la phase aqueuse est lavée 3 fois à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est ensuite lyophilisée pour donner le produit attendu **10** (2.374 g, 91%, huile orange).

IR (ATR) : 3358.07 (H-CN⁺) ; 1629.85 (C=N⁺) ; 1485.19, 1456.26 (C=C ou C=N⁺).

RMN ¹H (250 MHz, D₂O) : 5.83 (s, 2H, CH₂) ; 7.47-7.54 (m, 5H, ArH) ; 8.07 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H₂) ; 8.57 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H₁) ; 8.91 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H₃).

Dibromure de 1,1'-xylène-bis(pyridinium) 11

Musilek, K.; Komloova, M.; Zavadova, V.; Holas, O.; Hrabnova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Jung, Y.-S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1763–1766, "Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage-initial study for Myasthenia gravis implications".

Le *p*-dibromoxylène (0.063 g, 0.237 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 5 mL d'acétonitrile. La pyridine (0.038 g, 0.474 mmol, 2 éq.) est ajoutée et le milieu réactionnel est mis à chauffer à 80°C et agité pendant la nuit. Un précipité blanc se forme en suspension et après retour à température ambiante, le précipité est filtré sur fritté et rincé plusieurs fois à l'éther pour donner **11** (0.098 g, 97%, poudre blanche).

IR (ATR) : 1625.99 (C=N⁺).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO) : 5.93 (s, 4H, CH₂) ; 7.64 (s, 4H, ArH) ; 8.19 (t, J = 7.0 Hz, 4H, H₂) ; 8.64 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H₃) ; 9.26 (d, J = 5.7 Hz, 4H, H₁).

Iodure d'1-Méthyl-4-(4'-pyridyl)pyridinium 12

Alvaro, M.; Aprile, C.; Atienzar, P.; Garcia, H. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 7692–7697, "Preparation and Photochemistry of Single Wall Carbon Nanotubes Having Covalently Anchored Viologen Units".

La 4,4'-bipyridine (1.00 g, 6.40 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 20 mL d'acétonitrile. L'iodure de méthyle (0.854 g, 6.02 mmol, 1 éq.) est ajouté et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant la nuit. Un précipité orange se forme dans le ballon et ce dernier est filtré et rincé plusieurs fois à l'acétonitrile puis de nombreuses fois au dichlorométhane. La poudre obtenue est mise en suspension dans 50 mL d'acétonitrile, agitée pendant 5 min à

température ambiante, filtrée sur fritté et le filtrat est évaporé à sec pour donner le produit attendu **12** (0.738 g, 39%, poudre jaune).

IR (ATR) : 1637.56 (C=N⁺).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO) : 4.39 (s, 3H, CH₃) ; 8.04 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, ArH) ; 8.62 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, ArH) ; 8.87 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, ArH) ; 9.14 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, ArH).

Bromure de 1-benzyl-4-formylpyridinium 13

Ponnaiah, R.; Prasad, A.; Panchasara, D. R.; Chavan, G. J.; Prajapati, B. H.; Patel, I. M. Brevet, WO 2010/070511 A2, June 24, 2010, "A process for the preparation of Donepezil hydrochloride".

La 4-pyridinecarboxaldehyde (0.113 g, 1.06 mmol, 1 éq.) est solubilisée dans 2 mL de DMF. Le bromure de benzyle (0.181 g, 1.06 mmol, 1 éq.) est ajouté et la réaction est laissée agiter à température ambiante pendant 5 jours. La CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 99/1) montre la disparition totale des produits de départ et la formation d'un nouveau produit. Environ 200 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel et un léger précipité blanc se forme. La suspension est filtrée sur fritté et le filtrat est lyophilisé pendant la nuit permettant d'obtenir le produit attendu **13** (0.144 g, 49%, coton blanc).

IR (ATR) : 1639.49 (C=N⁺).

RMN ¹H (250 MHz, D₂O) : 5.84 (s, 2H, CH₂) ; 6.22 (s, 1H, CHO) ; 7.51 (s, 5H, ArH) ; 8.16 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₁) ; 8.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, H₂).

Dibromure de 1,1'-(*p*-phénylènediméthylène)bisformylpyridinium 14

Howard, C. H.; Arlington, D. T.; Everett, M. Brevet, US3316089A, 1967, "Photographic products and processes utilizing cross-linking agents containing intralinear quaternary nitrogen atoms".

Le *p*-dibromoxylène (0.140 g, 0.53 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 5 mL d'acétonitrile. Le 4-pyridinecarboxaldehyde (0.148 g, 1.38 mmol, 2.6 éq.) est ajouté à la suspension et le milieu réactionnel est mis à chauffer à 60°C pendant 4 heures. Un précipité jaune se forme et le chauffage est arrêté. Le précipité est filtré sur fritté et rincé à l'acétonitrile plusieurs fois puis séché sous vide poussé pour donner le produit attendu **14** (0.162 g, 64%, poudre jaune).

IR (ATR) : 2707.00 (CHO) ; 1635.64 (C=N⁺).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) : 5.88 (s, 4H, CH₂) ; 6.22 (s, 2H, CHO) ; 7.56 (s, 4H, ArH) ; 8.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H, H₁) ; 8.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H, H₂).

(4-(pyridin-4-ylméthoxy)phényl)méthanol **15**

Le 4-(hydroxyméthyl)phénol (2.35 g, 18.92 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 50 mL de DMF anhydre. Le chlorhydrate de 4-(chlorométhyl)pyridine (3.10 g, 18.92 mmol, 1 éq.) est ajouté solubilisé dans 50 mL de DMF supplémentaires. K_2CO_3 (7.83g, 56.76 mmol, 6 éq.) est ajouté et le milieu réactionnel est chauffé à 85°C pendant la nuit. La CCM (SiO_2 , AcOEt) montre la disparition totale des produits de départ et la formation d'un nouveau produit unique. Le milieu réactionnel est évaporé à sec par distillation sous vide poussé à 42°C. Le résidu est mis en suspension dans environ 150 mL d'un mélange $CH_2Cl_2/MeOH$: 1/1 puis filtré sur fritté et rincé plusieurs fois avec 200 mL du même mélange. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est mis en suspension dans 200 mL d'eau, de nouveau filtré sur fritté et rincé à l'eau. L'insoluble est récupéré par solubilisation dans le méthanol qui est évaporé à sec pour obtenir un brut. Le brut est chromatographié une première fois (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$: 95/5). Le mélange obtenu est repris dans un minimum de dichlorométhane et précipité par ajout d'un large excès d'heptane. Le précipité est filtré sur fritté et chromatographié une seconde fois (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$: 96/4) pour donner le produit attendu **15** (2.02 g, 50%, solide blanc).

IR (ATR) : 3113.11 (OH) ; 1606.70 (C=N_{Pyridine}).

RMN ¹H (400 MHz, $CDCl_3$) : 2.03 (bs, 1H, OH) ; 4.63 (s, 2H, CH_2OH) ; 5.10 (s, 2H, CH_2Pyr) ; 6.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_2) ; 7.31 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_1) ; 7.37 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_3) ; 8.60 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H_4).

18 Dérivés monomériques et pyréniques

Dérivés monomériques et pyréniques

Para-(Boc-aminoéthyl)phénol **16**

Fujii, N.; Actis, M.; Punchihewa, C.; Connlely, M.; Wu, Z. *Brevet*, WO2013006734A1, **2013**, "Substituted 4-phenoxyphenol analogs as modulator; antigen activity".

Le chlorhydrate de tyramine (4.00 g, 23.04 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans un mélange dioxane/eau : (100/50 mL) puis l'on additionne une solution aqueuse de NaOH (1.84 g, 46.08 mmol, 2 éq., 30 mL). Le milieu réactionnel est agité 10 min avant l'ajout du *di-tert-butyl*-dicarbonate (5.02 g, 23.04 mmol, 1 éq.). La réaction est laissée une nuit sous agitation à température ambiante sous argon. La CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 99/1) montre la formation d'un nouveau produit et le milieu réactionnel est filtré sur fritté puis le filtrat est évaporé à sec. Le solide blanc obtenu est repris dans 200 mL d'eau, extrait 3 fois au dichlorométhane et lavé 2 fois à l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec. Le solide blanc obtenu est mis en suspension dans 100 mL d'heptane, placé à 4°C pendant 2 heures, trituré et filtré sur fritté pour donner le produit attendu **16** (5.12 g, 94%, poudre blanche).

IR (ATR) : 3367.71 (OH) ; 1681.93 (CO).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.44 (s, 9H, Me₃C) ; 2.69 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂N) ; 3.31-3.33 (m, 2H, CH₂CH₂N) ; 4.66 (bs, 1H, NH) ; 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.00 (d, *J* = 8.3 Hz, ArH).

1-(4-[(*N*-Boc)aminoéthyl]-phénoxy)-3-(4-nitrophényl)propane **17**

Le *para*-(Boc-aminoéthyl)phénol **16** (0.1 g, 0.421 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 8 mL d'acétonitrile. K₂CO₃ (0.087 g, 0.632 mmol, 1.5 éq.) est ajouté et le milieu réactionnel est chauffé à 90°C pendant 30 min. Le 1-(3-bromopropyl)-4-nitrobenzène **9** (0.103 g, 0.421 mmol, 1 éq.) est ajouté dilué dans 2 mL d'acétonitrile et le milieu réactionnel est laissé chauffer à 90°C pendant la nuit. La plaque CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 99/1) montre la formation d'un nouveau produit. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, la réaction est évaporée à sec et le résidu est repris au dichlorométhane, filtré sur fritté et rincé au dichlorométhane. Le filtrat est évaporé à sec pour donner après chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 99/1) le produit attendu **17** (0.120 g, 71%, pâte beige).

F° : 62-63°C.

IR (ATR) : 3373.50 (NH) ; 1678.07 (CO) ; 1510.26 (ArNO₂).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 277 (18811).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.43 (s, 9H, Me₃C) ; 2.13 (m, 2H, CH₂CH₂ArNO₂) ; 2.73 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂ArNO₂) ; 2.93 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NH) ; 3.33 (m, 2H, CH₂CH₂N) ; 3.95 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂ArNO₂) ; 4.53 (bs, 1H, CH₂CH₂NH) ; 6.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃) ; 7.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₂) ; 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H₆) ; 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H₇).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : 28.55 (Me_3C) ; 30.58 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 32.34 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 35.44 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 42.09 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 66.54 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 79.35 (Me_3C) ; 114.70 (C_3) ; 123.86 (C_7) ; 129.48 (C_6) ; 129.93 (C_2) ; 131.40 (C_1) ; 146.62 (C_8) ; 149.62 (C_5) ; 156.01 (COO) ; 157.55 (C_4).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$, 0.8 C_5H_{12} (458.19) : C 68.16 ; H 8.27 ; N 6.11 ; trouvée : C 68.63 ; H 7.90 ; N 6.18%.

ESI-HRMS (ES^+) : 423.1872 [$\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$.

1-(4-aminoéthyl-phénoxy)-3-(4-nitrophényl)propane 18

Le produit **17** (0.072 g, 0.157 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 4 mL de dichlorométhane. 1 mL de TFA est ajouté au milieu réactionnel et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant 3 heures. Le milieu réactionnel est évaporé à sec et repris au dichlorométhane, au méthanol, à l'éther et à l'acétonitrile plusieurs fois. 5 mL d'éther sont coulés et retirés délicatement 3 fois sur l'huile jusqu'à obtenir un pH égal à 7. L'huile est ensuite diluée dans 15 mL d'eau et lyophilisée pendant la nuit pour donner le produit attendu **18** (0.040 g, 56%, huile noire).

IR (ATR) : 3323.35 (NH_2) ; 1510.26 (ArNO_2).

UV-Vis (MeOH) : 274 (33833).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) : 2.11 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) ; 2.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 3.13 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) ; 3.97 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_6) ; 7.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_7) ; 7.45 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_3) ; 8.13 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_2).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) : 31.72 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 33.19 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 33.88 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) ; 42.25 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) ; 67.90 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 116.12 (C_6) ; 124.67 (C_2) ; 129.99 (C_8) ; 130.79 (C_3) ; 130.97 (C_7) ; 147.93 (C_1) ; 151.40 (C_4) ; 159.71 (C_5).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$, 0.85 CF_3COOH (397.28) : C 56.53 ; H 5.29 ; N 7.05 ; trouvée : C 56.77 ; H 5.23 ; N 6.76%.

ESI-HRMS (ES^+) : 301.1577 [$\text{M} - 0.85 \text{CF}_3\text{COOH} + \text{H}^+$] $^+$.

1-(4-[(*N,N*-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénoxy)-3-(4-nitrophényl)propane 19

Le 4-[(*N,N*-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénol **1** (0.100 g, 0.264 mmol, 1 éq.) et le 1-(3-Bromopropyl)-4-nitrobenzène **9** (0.193 g, 0.791 mmol, 3 éq.) sont solubilisés dans 2 mL de DMSO. Une solution aqueuse de soude 4N (0.264 mL, 1.054 mmol, 4 éq.) est ajoutée goutte à goutte et la solution prend rapidement une couleur noire. Le milieu réactionnel est agité pendant 4 heures à température ambiante. La CCM (SiO_2 , CH_2Cl_2) montre la formation d'un nouveau produit et environ 150 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL), lavé à l'eau (2 x 100 mL) et lavé avec une solution saturée de NaCl (100 mL). La phase organique est

séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec. Le brut obtenu est purifié par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂) et le produit attendu **19** est obtenu après une précipitation dans un mélange éther/pentane (0.143 g, 100%, poudre jaune pâle).

F° : 112-115°C.

IR (ATR) : 3373.50 (NH) ; 1678.07 (CO) ; 1510.26 (ArNO₂).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 277 (16118).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.48 (s, 9H, Me₃C) ; 1.50 (s, 9H, Me₃C) ; 2.12 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.81 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂NH) ; 2.93 (t, J = 7.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.61-3.66 (m, 2H, CH₂CH₂NH) ; 3.95 (t, J = 6.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 6.81 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₃) ; 7.12 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H₂) ; 7.37 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H₆) ; 8.15 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H₇) ; 8.36 (t, J = 4.9 Hz, 1H, NH) ; 11.47 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.18, 28.45 (Me₃C) ; 30.57 (OCH₂CH₂CH₂) ; 32.23 (OCH₂CH₂CH₂) ; 34.54 (CH₂CH₂NH) ; 42.60 (CH₂CH₂NH) ; 66.51 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.40, 83.15 (Me₃C) ; 114.68 (C₃) ; 123.86 (C₇) ; 129.48 (C₆) ; 129.96 (C₂) ; 130.99 (C₁) ; 146.62 (C₈) ; 149.64 (C₅) ; 153.33 (COO) ; 156.26 (C₄) ; 157.59 (COO) ; 163.76 (NCNN).

Analyse élémentaire calculée pour C₂₈H₃₈N₄O₇, 2.25 C₅H₁₂ (704.96) : C 66.87 ; H 9.29 ; N 7.95 ; trouvée : C 67.77 ; H 8.41 ; N 8.79%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 543.2844 [M + H]⁺.

1-(4-[(N,N-Di-Boc)guanidinoéthyl]-phénoxy)-3-(4-anilino)propane 20

La molécule **19** (0.127 g, 0.234 mmol, 1 éq.) est solubilisée par un chauffage léger dans 10 mL d'éthanol. L'hydrazine monohydrate (0.468 g, 9.36 mmol, 40 éq.) et le Pd/C 10% (30 mg) sont ajoutés au mélange et la réaction est laissée agiter à 85°C pendant 10 minutes. La CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 99/1) montre la disparition totale du produit de départ et la formation d'un nouveau produit. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé à sec, repris à l'acétate d'éthyle puis filtré sur un coton tassé. Le filtrat est ensuite lavé 3 fois à l'eau jusqu'à obtenir un pH neutre de phase aqueuse. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec. Le brut est purifié par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 98/2) pour donner le produit attendu **20** (0.120 g, 100%, poudre jaune pâle).

F° : 111-112°C.

IR (ATR) : 3325.28 (NH/NH₂) ; 1720.50 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 278 (4931).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.48 (s, 9H, Me₃C) ; 1.51 (s, 9H, Me₃C) ; 2.03 (m, 2H, ArCH₂CH₂CH₂) ; 2.69 (t, J = 7.6 Hz, 2H, ArCH₂CH₂CH₂) ; 2.81 (t, J = 7.2 Hz, 2H, ArCH₂CH₂NH) ; 3.56 (bs, 2H, ArNH₂) ; 3.63 (m, 2H, ArCH₂CH₂NH) ; 3.92 (t, J = 6.3 Hz, 2H, ArCH₂CH₂CH₂) ; 6.63 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H₇) ; 6.82 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H₃) ; 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₆) ; 7.11 (d, J = 8.7 Hz, H₂) ; 8.36 (s, 1H, NH) ; 11.47 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.19, 28.46 (Me₃C) ; 31.26 (ArCH₂CH₂CH₂) ; 31.36 (ArCH₂CH₂CH₂) ; 34.54 (ArCH₂CH₂NH) ; 42.62 (ArCH₂CH₂NH) ; 67.09 (ArCH₂CH₂CH₂) ; 79.35, 83.12 (Me₃C) ; 114.77 (C₃) ; 115.42 (C₇) ; 129.44 (C₆) ; 130.57 (C₁) ; 131.70 (C₅) ; 144.45 (C₈) ; 153.31 (NHCOO) ; 156.26 (C₄) ; 157.92 (NCOO) ; 163.77 (NHCNHN).

Analyse élémentaire calculée pour C₂₈H₄₀N₄O₅ (512.64) : C 65.60 ; H 7.86 ; N 10.93 ; trouvée : C 66.66 ; H 8.09 ; N 10.81%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 513.3040 [M + H]⁺ ; 413.2542 [M - Boc + H]⁺ ; 313.2030 [M - 2 Boc + H]⁺.

1-(4-guanidinoéthyl-phénoxy)-3-(4-nitrophényl)propane **21**

Le produit **19** (0.110 g, 0.203 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 4 mL de dichlorométhane. 1 mL de TFA est ajouté au milieu réactionnel et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant 3 heures. Le milieu réactionnel est évaporé à sec et repris au dichlorométhane, au méthanol, à l'éther et à l'acétonitrile plusieurs fois. 5 mL d'éther sont ajoutés et retirés délicatement 3 fois sur l'huile jusqu'à obtenir un pH égal à 7. L'huile est ensuite diluée dans 40 mL d'eau et lyophilisée pendant la nuit pour donner le produit attendu **21** (0.040 g, 43%, huile jaune).

F° : 115-116°C.

IR (ATR) : 3421.72 (NH₂) ; 1672.28 (CO) ; 1500.62 (NO₂) ; 1340.53 (NO₂).

UV-Vis (MeOH) : 222 (21525), 275 (15451).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : 2.11 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.81 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH) ; 2.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NH) ; 3.95 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, *H*₆) ; 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, *H*₇) ; 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, *H*₃) ; 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, *H*₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 31.75 (OCH₂CH₂CH₂) ; 33.20 (OCH₂CH₂CH₂) ; 35.22 (CH₂CH₂NH) ; 42.02 (CH₂CH₂NH₂) ; 67.88 (OCH₂CH₂CH₂) ; 115.86 (C₆) ; 124.67 (C₂) ; 130.79 (C₃) ; 131.01 (C₇) ; 131.48 (C₈) ; 147.93 (C₁) ; 151.42 (C₄) ; 158.77 (NCNN) ; 159.39 (C₅).

Analyse élémentaire calculée pour C₁₈H₂₂N₄O₃, 0.8 CF₃COOH (436.61) : C 54.29 ; H 5.30 ; N 12.92 ; trouvée : C 54.26 ; H 5.53 ; N 12.48%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 343.1794 [M - 0.8 CF₃COOH + H]⁺.

1-(4-guanidinoéthyl-phénoxy)-3-(4-aminophényl)propane **22**

Le produit **20** (0.040 g, 0.078 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 3 mL de dichlorométhane. 3 mL de TFA sont ajoutés au milieu réactionnel et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant la nuit. Le milieu réactionnel est évaporé à sec et repris au méthanol et à l'éther plusieurs fois. 5 mL d'éther sont coulés et retirés délicatement 3 fois sur l'huile jusqu'à obtenir un pH égal à 7. L'huile est ensuite diluée dans 40 mL d'eau et lyophilisée pendant la nuit pour donner le produit attendu **22** (0.040 g, 98 %, huile orange).

IR (ATR) : 3338.78 (NH/NH₂) ; 1660.71 (CO).

UV-Vis (MeOH) : 228 (18645), 277 (3051).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : 2.01-2.08 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.78-2.83 (m, 2H et 2H, OCH₂CH₂CH₂ et CH₂CH₂NH) ; 3.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NH) ; 3.94 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*₆) ; 7.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, *H*₂) ; 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, *H*₇) ; 7.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, *H*₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 32.27 (OCH₂CH₂CH₂) ; 32.67 (OCH₂CH₂CH₂) ; 35.23 (CH₂CH₂NH) ; 44.03 (CH₂CH₂NH) ; 68.02 (OCH₂CH₂CH₂) ; 115.87 (*C*₆) ; 122.22 (*C*₂) ; 130.99 (*C*₇) ; 131.11 (*C*₃) ; 131.38 (*C*₈) ; 141.38 (*C*₁) ; 158.79 (NCNN) ; 159.52 (*C*₅).

Analyse élémentaire calculée pour C₁₈H₂₄ON₄, 1.85 CF₃COOH (523.36) : C 49.80 ; H 4.98 ; N 10.71 ; trouvée : C 49.78 ; H 5.12 ; N 10.68%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 335.1827 [M - 1.85 CF₃COOH + Na⁺]⁺ ; 313.2041 [M - 1.85 CF₃COOH + H⁺]⁺.

4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-pyridine **23**

Le 1-pyrèncarboxaldehyde (0.500 g, 2.17 mmol, 1 éq.) et la 4-aminopyridine (0.204 g, 2.17 mmol, 1 éq.) sont mélangés solide, sans solvant et mis à chauffer à 175°C à pression atmosphérique dans un four à boules pendant 3h30. La CCM (Al₂O₃, CH₂Cl₂) montre la formation de l'imine attendue. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dissout dans 13 mL d'éthanol anhydre et le borohydrure de sodium (0.165 g, 4.34 mmol, 2 éq.) est ajouté par portions. Le mélange est agité à température ambiante sous argon pendant la nuit. Le précipité formé est filtré sur fritté et rincé à l'éthanol puis séché pour donner le produit attendu **23** (0.395 g, 50%, solide beige).

F° : 193-196°C.

IR (ATR) : 3238.46 (N-H) ; 1598.99 (C=N_{pyridine}).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 266 (41749), 277 (55824), 315 (17900), 329 (39890), 344 (55384).

RMN ¹H (400 MHz, d₆-DMSO) : 5.03 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂NH) ; 6.62 (dd, *J*₁ = 1.6 Hz *J*₂ = 4.8 Hz, 2H, *H*₂) ; 7.26 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH) ; 8.02 (dd, *J*₁ = 1.5 Hz *J*₂ = 4.9 Hz, 2H, *H*₁) ; 8.06-8.26 (m, 9H, *H*_{pyrene}).

RMN ^{13}C (100 MHz, d_6 -DMSO) : 43.75 (CH_2) ; 107.44 (C_2) ; 123.14, 123.92, 124.16, 124.77, 125.21, 126.11, 127.07, 127.37, 127.61, 128.29, 130.16, 130.32, 130.78, 132.29 (C_{pyrene} et $\text{CH}_{\text{pyrene}}$) ; 149.47 (C_7) ; 153.57 ($\text{C}_{\text{pyridine}}$).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2$, 0.9 $\text{B}(\text{OH})_3$ (364.03) : C 72.59 ; H 5.18 ; N 7.70 ; trouvée : C 72.39 ; H 5.05 ; N 7.56%.

ESI-HRMS (ES^+) : 311.1585 [$\text{M} + 3\text{H}^+$] $^{3+}$, 310.1413 [$\text{M} + 2\text{H}^+$] $^{2+}$, 309.1413 [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$.

Chlorure de *N*-4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-benzylpyridinium 24

La 4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-pyridine **23** (0.070 g, 0.227 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 9 mL de toluène. Le chlorure de benzyle (0.029 g, 0.227 mmol, 1 éq.) est ajouté dilué dans 1 mL de toluène. Le milieu réactionnel est laissé agiter à 80°C sous argon pendant la nuit. Un précipité s'est formé et celui-ci correspond en CCM (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 8/2) à la formation d'un nouveau produit. La CCM montre également la conservation d'une grande partie de l'amine de départ. Le toluène est évaporé à sec et 10 mL d'acétonitrile ainsi que du chlorure de benzyle (0.057 g, 0.454 mmol, 2 éq.) supplémentaires sont ajoutés au mélange qui est remis à chauffer à 80°C pendant la nuit. La CCM (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15) montre la consommation totale de l'amine de départ et un précipité blanc s'est formé. Le milieu réactionnel est filtré et rincé à l'acétonitrile. Le premier précipité est mis de côté et séché. Le filtrat quant à lui, est évaporé à sec puis repris dans un minimum de dichlorométhane et précipité par un large excès d'éther. Le second précipité est filtré sur fritté et rincé à l'éther. Les deux précipités obtenus sont mélangés pour donner le produit attendu **24** (0.058 g, 69%, poudre jaune pâle).

F° : >250°C (décomposition).

IR (ATR) : 1645.25 ($\text{C}=\text{N}^+$).

UV-Vis (MeOH) : 240 (139846), 266 épaulement (81051), 276 (117260), 312 (43527), 327 (82888), 343 (113039).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : 5.31 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2NH) ; 5.44 (s, 2H, CH_2Ar) ; 7.17 (app ddd, $J_1 = 2.8$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz et $J_3 = 20.6$ Hz, 2H, H_2) ; 7.44 (m, 5H, CH_2Ar) ; 8.13-8.54 (m, 11H, H_1 et pyrene).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) : 44.31 (CH_2NH) ; 59.69 (CH_2Ar) ; 106.21 (C_2) ; 123.08 ($\text{CH}_{\text{pyrene}}$, CH_{Ar} ou C_1) ; 123.79, 124.18 (C_{pyrene} ou C_{Ar}) ; 124.92, 125.49, 125.61, 126.51, 126.61, 127.33, 127.54, 128.04, 128.09 ($\text{CH}_{\text{pyrene}}$, CH_{Ar} ou C_1) ; 128.50 (C_{pyrene} ou C_{Ar}) ; 128.76, 129.01 ($\text{CH}_{\text{pyrene}}$, CH_{Ar} ou C_1) ; 129.78, 130.27, 130.67, 130.77, 135.67 (C_{pyrene} ou C_{Ar}) ; 141.73, 143.98 ($\text{CH}_{\text{pyrene}}$, CH_{Ar} ou C_1) ; 156.94 (C_3).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{ClN}_2$, 0.2 H_2O (438.56) : C 79.42 ; H 5.38 ; N 6.39 ; trouvée : C 79.23 ; H 5.53 ; N 6.59%.

ESI-HRMS (ES^+) : 400.1872 [$\text{M} - \text{Cl} + \text{H}^+$] $^{2+}$, 399.1852 [$\text{M} - \text{Cl}$] $^+$.

19 Voie de synthèse des calixarènes monosubstitués



Voie de synthèse des calixarènes monosubstitués

Tétra-(diméthylaminométhyl)-calix[4]arène 25

Gutsche, C. D.; Nam, K. C. *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 6162–6172, "Synthesis, Properties, and Metal Complexation of Aminocalixarenes".

Le calix[4]arène (7.88 g, 18.58 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 140 mL de THF. La diméthylamine (40% dans l'eau, 4.52 g, 100.33 mmol, 5.4 éq.) est ajoutée et le milieu réactionnel devient limpide. Sont également ajoutés, l'acide acétique (25 mL) et le formaldéhyde (36.5 % dans l'eau, 3.01 g, 100.33 mmol, 5.4 éq) et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante sous argon pendant la nuit. Le milieu réactionnel est ensuite concentré jusqu'à obtenir une huile qui est additionnée de 200 mL d'eau. et lavé à Et₂O (2 x 100 mL). La solution aqueuse est neutralisée par ajout de 200 mL de K₂CO₃ 10% entraînant la précipitation d'un solide blanc qui est filtré, rincé abondamment à l'eau, puis à Et₂O et séché pour donner le produit attendu **25** (8.77 g, 72%, poudre blanche).

IR (ATR) : 3335.22 (OH) ; 2970.38 (CH₃) ; 2819.93 (NMe₂).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : 2.06 (s, 24 H, N(CH₃)₂) ; 3.09 (s, 8H, ArCH₂N(Me₂)) ; 3.12-4.25 (AB, *J* = 11.8 Hz, 8H, ArCH₂Ar) ; 6.77 (s, 8H, ArH).

Tétra-(cyanométhyl)-calix[4]arène 26

Gutsche, C. D.; Nam, K. C. *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 6162–6172, "Synthesis, Properties, and Metal Complexation of Aminocalixarenes".

Le Tétra-(diméthylaminométhyl)-calix[4]arène **25** (5.00 g, 7.66 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 95 mL de DMSO et l'iodométhane (6.53 g, 46 mmol, 6 éq.) est ajouté au mélange. La réaction est agitée pendant 30 min à température ambiante avant l'ajout de cyanure de potassium (5.99 g, 92 mmol, 12 éq.) et la réaction est mise à chauffer à 85°C pendant la nuit. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, le milieu réactionnel est coulé très précautionneusement sur 310 mL d'HCl 2M refroidi dans un bain de glace. Le précipité formé est ensuite filtré sur fritté et rincé plusieurs fois à l'eau. Le solide obtenu est remis en suspension une nouvelle fois dans 200 mL d'eau et de nouveau filtré pour donner un solide marron séché au dessiccateur (3.52 g, 79%, solide marron).

Mise au point d'une méthode de purification : Le solide marron est mis en suspension dans 240 mL de mélange CH₃CN / EtOH : 1/1. La suspension est chauffée à 100°C pendant 30 min puis laissée refroidir à température ambiante. Un précipité jaune pâle est filtré sur fritté. Le filtrat est évaporé à sec, l'opération de lavage à chaud est répété 2 fois pour donner le produit attendu **25** (2.92 g, 66% rendement global, poudre jaune pâle).

IR (ATR) : 3130.47 (OH) ; 2247.07 (CN).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d₆) : 3.74 (s, 8H, ArCH₂CN) ; 3.89 (bs, 8H, ArCH₂Ar) ; 7.04 (s, 8H, ArH) ; 9.28 (bs, 4H, OH).

Chlorhydrate de *tétra-para-aminoéthyle-calix*[4]arène **27**

Mourer, M.; *Thèse*; **2006** "Calixarènes hydrosolubles à propriétés antivirales et antibactériennes", Université Henri Poincaré Nancy 1.

Le *tétra*-cyano-méthyl-calix[4]arène **26** (7.20 g, 12.4 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 300 mL de THF anhydre. Le triméthyle borate (10.39 g, 100 mmol, 8 éq.) et le borane (1M dans le THF, 2.77 g, 100 mmol, 8 éq.) sont ajoutés et la réaction est chauffée à 75°C pendant la nuit. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, 300 mL de méthanol sont coulés lentement sous agitation. Le mélange est évaporé à sec puis 300 mL de méthanol, 100 mL d'eau et 100 mL d'HCl concentré sont ajoutés. Le mélange est porté à 100°C pendant la nuit. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé à sec, repris dans environ 350 mL d'acétone, filtré sur fritté et rincé plusieurs fois à l'acétone. Le précipité est ensuite entièrement solubilisé dans 250 mL de méthanol, concentré jusqu'à environ 100 mL et précipité par ajout de 350 mL d'Et₂O. Le précipité est filtré pour donner le produit attendu **27** (8.3 g, 90%, solide rose).

IR (ATR) : 3402.54 (OH) ; 3007.02 (NH₃⁺) ; 1600.92 (NH₃⁺) ; 1456.26 (NH₃⁺).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 2.67 (bs, 8H, CH₂CH₂NH₂) ; 2.92 (bs, 8H, CH₂CH₂NH₂) ; 3.70-4.50 (étalement, 8H, ArCH₂Ar) ; 7.02 (s, 8H, ArH) ; 8.14 (bs, 12H, NH₃Cl) ; 9.92 (bs, 4H, OH).

Tétra-para-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène **28**

Mourer, M.; Dibama, H. M.; Fontanay, S.; Grare, M.; Duval, R. E.; Finance, C.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496–5509, "p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation".

Le chlorhydrate de *tétra-para*-aminoéthyle-calix[4]arène **27** (5.32 g, 7.16 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans un mélange dioxane/eau (250 mL/50 mL). Une solution aqueuse de NaOH (2.29 g, 57.3 mmol, 8 éq., 100 mL) est additionnée suivi du di-*tert*-butyl dicarbonate (6.19 g, 28.4 mmol, 4 éq.) et la réaction est laissée agiter à température ambiante pendant la nuit. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec et le résidu est repris dans l'eau, extrait 3 fois à l'AcOEt et lavé 3 fois à l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec pour obtenir un brut chromatographié (Al₂O₃, CH₂Cl₂/MeOH/Et₂O : 80/3/17) pour obtenir une mousse blanche. Le produit attendu **28** est obtenu par reprecipitation dans CH₃CN (3.47 g, 49%, poudre blanche).

IR (ATR) : 3353.64 (OH) ; 1681.93 (CO) ; 1514.12 (NH).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) : 1.31 (s, 36H, Me₃C) ; 2.59 (t, J = 6.5 Hz, 8H, CH₂CH₂N) ; 3.27 (bs, 8H, CH₂CH₂N) ; 3.44-4.22 (AB, J = 11.5 Hz, 8H, ArCH₂Ar) ; 4.60 (bs, 4H, NH) ; 6.86 (s, 8H, ArH) ; 10.25 (s, 4H, OH).

5,11,17,23-Tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(*N*-carboxybenzylaminoéthyl)-phénoxy]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 29

Le tétra-para-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène **28** (1.530 g, 1.53 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 70 mL d'acétonitrile fraîchement distillé. Les 1-bromo-3-((*N*-carboxybenzyl-tyramine)-yl)-propane **3** (0.601 g, 1.53 mmol, 1 éq.), NaHCO₃ (0.141 g, 1.68 mmol, 1.1 éq.) et KI (0.200 g, 1.20 mmol, 0.8 éq.) sont ajoutés et le milieu réactionnel est chauffé sous argon à reflux pendant la nuit. La CCM (SiO₂, Heptane/AcOEt : 1/1) montre que la réaction n'est pas terminée et le milieu est laissé à chauffer une nuit supplémentaire à reflux. La CCM (SiO₂, Heptane/AcOEt : 1/1) montre une formation majoritaire d'un nouveau produit, le chauffage est arrêté et le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est repris dans l'eau et extrait trois fois au dichlorométhane, puis la phase organique est lavée deux fois à l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec. Le brut obtenu est purifié par chromatographie (SiO₂, Hexane/AcOEt : 6/4) pour donner **29** (1.007 g, 50%, solide blanc).

F° : 113-115°C.

IR (ATR) : 3305.99 (NH) ; 1685.79 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 281 (10641).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.37 (bs, 36H, Me₃C) ; 2.58 (m, 2H, H₂) ; 2.58 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 2.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz) ; 3.27 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 3.37, 4.19 (AB, *J* = 13.8 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.37, 4.29 (AB, *J* = 12.8 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.41-3.45 (m, 2H, CH₂CH₂NHCbz) ; 4.29-4.32 (m, 2H, H₁) ; 4.44 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H₃) ; 4.61, 4.76 (m, 5H, NHBoc et NHCbz) ; 5.09 (s, 2H, NCOOCH₂Ar) ; 6.81 (bs, 2H, ArH) ; 6.82 (bs, 2H, ArH) ; 6.86 (bs, 2H, ArH) ; 6.90 (bs, 2H, ArH) ; 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₅) ; 7.10 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H₆) ; 7.34 (s, 5H, H_{Cbz}) ; 9.40 (s, 2H, OH) ; 9.82 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.49 (Me₃C) ; 29.95 (C₂) ; 31.67, 32.23 (ArCH₂Ar) ; 35.32, 35.69 (CH₂CH₂NHBoc et CH₂CH₂NHCbz) ; 41.91 (CH₂CH₂NHBoc) ; 42.54 (CH₂CH₂NHCbz) ; 64.66 (C₃) ; 66.73 (NHCOOCH₂Ar) ; 74.21 (C₁) ; 79.24 (Me₃C) ; 114.97 (C₅) ; 128.23 (NHCOOCH₂Ar) ; 128.48 (C₀) ; 128.64 (NHCOOCH₂Ar) ; 128.94 (C₀) ; 129.35 (C_m) ; 129.91 (C_m et C₆) ; 131.09 (C₈) ; 131.43, 132.24 (C_p) ; 134.25 (C₀) ; 136.74 (C_p) ; 136.78 (C₈) ; 148.02, 149.37, 150.05 (C_{ipso}) ; 156.05, 156.09 (NHCOOCCH₃) ; 156.43 (NHCOOCH₂Ar), 157.67 (C₄).

Analyse élémentaire calculée pour C₇₅H₉₇O₁₅N₅ (1308.60) : C 68.84 ; H 7.47 ; N 5.35 ; trouvée : C 68.34 ; H 7.17 ; N 5.32%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1308.7009 [M + H⁺]⁺ ; 1330.6873 [M + Na⁺]⁺.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(aminoéthyl)-phénoxy]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 30

Le calixarène **29** (0.100g, 0.076 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL d'isopropanol. Le Pd/C 10% (37 mg) est ajouté et de l'hydrogène est injecté pendant 3 heures à température ambiante et 1 heure supplémentaire à 60°C. La réaction est laissée sous pression d'hydrogène à température ambiante pendant la nuit. La CCM (SiO₂, Heptane/AcOEt : 1/1) montre la disparition totale du produit de départ et la CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 7/3) montre la formation d'un nouveau produit. Le milieu réactionnel est filtré sur Célite et rincé plusieurs fois à l'isopropanol puis au dichlorométhane. Le filtrat est évaporé à sec pour obtenir un brut qui est purifié par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 90/10) pour donner **30** (0.056g, 61%, solide blanc).

F° : 135-136°C.

IR (ATR) : 3300.20 (NH) ; 1681.93 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 281 (8610).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.37 (bs, 36H, Me₃C) ; 2.58 (m, 2H, H₂) ; 2.58 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 2.93 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂) ; 3.26 (bs, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 3.38, 4.16 (AB, J = 13.6 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.38, 4.27 (AB, J = 13.0 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.41-3.10 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂) ; 4.28-4.30 (m, 2H, H₁) ; 4.42-4.46 (m, 2H, H₃) ; 4.55-5.20 (m, 6H, NHBoc et NH₂) ; 6.81 (bs, 4H, ArH) ; 6.85 (bs, 2H, ArH) ; 6.89 (bs, 2H, ArH) ; 6.95 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H₅) ; 7.14 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H₆) ; 8.50-10.50 (bs, 3H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.51 (Me₃C) ; 29.84 (C₂) ; 31.63, 32.23 (ArCH₂Ar) ; 34.65 (CH₂CH₂NH₂) ; 35.45, 35.61, 35.63 (CH₂CH₂NHBoc) ; 41.93, 42.02, 42.09 (CH₂CH₂NHBoc et CH₂CH₂NH₂) ; 64.57 (C₃) ; 74.04 (C₁) ; 79.25 (Me₃C) ; 115.23 (C₅) ; 128.49, 128.94 (C₀) ; 129.23 (C₇) ; 129.40 (C_m) ; 129.98 (C_m et C₆) ; 131.41, 132.27 (C_p) ; 134.25 (C₀) ; 136.92 (C_p) ; 147.98, 149.37, 150.04 (C_{ipso}) ; 156.04, 156.13 (NHCOOCCH₃) ; 158.03 (C₄).

Analyse élémentaire calculée pour C₆₇H₉₁O₁₃N₅, H₂O (1192.48) : C 67.48 ; H 7.86 ; N 5.87 ; trouvée : C 67.64 ; H 7.68 ; N 5.57%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1196.6506 [M + Na]⁺ ; 1174.6686 [M + H]⁺ ; 598.8289 [M + Na]^{2+/2}.

5,11,17,23-Tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[4-[4-(N-carboxybenzylaminoéthyl)-phénoxy]-butane]-yl} -26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 31

Le tétra-para-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène **28** (0.600 g, 0.602 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 30 mL d'acétonitrile fraîchement distillé. Le 1-bromo-3-(N-carboxybenzyl-tyramine)-butane **4** (0.245 g, 0.602 mmol, 1 éq.), NaHCO₃ (0.056 g, 0.662 mmol, 1.1 éq.) et KI (0.070 g, 0.422 mmol, 0.7 éq.) sont ajoutés et le milieu réactionnel est chauffé sous argon à reflux pendant la nuit. La CCM (SiO₂, Heptane/AcOEt : 1/1) montre que la réaction n'est pas terminée et du NaHCO₃ (0.020 g, 0.238 mmol, 0.4 éq.) est ajouté, puis la réaction est de nouveau laissée à chauffer une nuit supplémentaire à reflux. La CCM (SiO₂, Heptane/AcOEt : 1/1) ne montre aucun changement, le chauffage est arrêté et le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est repris dans l'eau et extrait trois fois au dichlorométhane, puis la phase organique est lavée deux fois à l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec. Le brut obtenu est purifié par chromatographie (SiO₂, Hexane/AcOEt : 6/4) pour donner le produit **30** (0.411 g, 52%, solide blanc).

F° : 101-102°C.

IR (ATR) : 3319.49 (NH) ; 1681.93 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 281 (10327).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.37 (bs, 36H, Me₃C) ; 2.19-2.24 (m, 2H, H₂ ou H₃) ; 2.31-2.37 (m, 2H, H₂ ou H₃) ; 2.59 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 2.76 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz) ; 3.27 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 3.38, 4.22 (AB, J = 13.5 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.38, 4.32 (AB, J = 12.7 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.41-3.45 (m, 2H, CH₂CH₂NHCbz) ; 4.14-4.17 (m, 2H, H₁ ou H₄) ; 4.16-4.19 (m, 2H, H₁ ou H₄) ; 4.60, 4.76 (m, 5H, NHBoc et NHCbz) ; 5.09 (s, 2H, NCOOCH₂Ar) ; 6.81-6.83 (m, 2H, H₆) ; 6.81-6.91 (m, 8H, ArH) ; 7.10 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H₇) ; 7.34 (s, 5H, H_{Cbz}) ; 9.45 (s, 2H, OH) ; 9.86 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 26.07, 26.99 (C₂ ou C₃) ; 28.49 (Me₃C) ; 31.82, 32.28 (ArCH₂Ar) ; 35.47, 35.62, 35.94 (CH₂CH₂NHBoc et CH₂CH₂NHCbz) ; 41.97 (CH₂CH₂NHBoc) ; 42.55 (CH₂CH₂NHCbz) ; 66.76 (NHCOOCH₂Ar) ; 67.61, 77.36 (C₁ et C₄) ; 79.24 (Me₃C) ; 114.92 (C₆) ; 128.24 (NHCOOCH₂Ar) ; 128.47 (C₀) ; 128.66 (NHCOOCH₂Ar) ; 128.96 (C₀) ; 129.38 (C_m) ; 129.90 (C_m et C₇) ; 130.90 (C₈) ; 131.40, 132.18 (C_p) ; 134.30 (C₀) ; 136.77 (C_p et C₉) ; 148.41, 149.41, 150.20 (C_{ipso}) ; 156.06, 156.09 (NHCOOCH₃) ; 156.45 (NHCOOCH₂Ar), 157.85 (C₅).

Analyse élémentaire calculée pour C₇₆H₉₉N₅O₁₅, 3 H₂O (1376.67) : C 66.31 ; H 7.69 ; N 5.09 ; trouvée : C 65.89 ; H 7.23 ; N 5.03%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1344.7030 [M + Na]⁺.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(aminoéthyl)-phénoxy]-butane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 32

Le calixarène **31** (0.100 g, 0.076 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 20 mL d'isopropanol. Le Pd/C 10% (40 mg) est ajouté et le milieu réactionnel est chauffé à 60°C. Deux baudruches d'hydrogène sont injectées et le milieu réactionnel est laissé sous pression d'hydrogène pendant 3 heures à 60°C. La CCM (SiO₂, Heptane/AcOEt : 1/1) montre la consommation totale du produit de départ et la formation d'un nouveau produit. Le milieu réactionnel est filtré sur un Célite et rincé plusieurs fois à l'isopropanol. Le filtrat est évaporé à sec pour donner le produit attendu **32** (0.070 g, 78%, solide blanc).

F° : 156-163°C.

IR (ATR) : 3313.71 (NH) ; 1693.50 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 281 (9309).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.36 (bs, 36H, Me₃C) ; 2.18 (m, 2H, H₂ ou H₃) ; 2.31 (m, 2H, H₂ ou H₃) ; 2.58 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 3.04 (t, J = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂) ; 3.20 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂) ; 3.26 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc) ; 3.37, 4.17 (AB, J = 13.5 Hz, 2H, ArCH₂Ar) ; 3.37, 4.28 (AB, J = 12.8 Hz, 2H, ArCH₂Ar) ; 4.11-4.16 (m, 2H, H₁ ou H₄) ; 4.16-4.21 (m, 2H, H₁ ou H₄) ; 4.64 (bs, 4H, NHBoc) ; 5.09 (bs, 2H, NH₂) ; 6.81 (s, 2H, ArH) ; 6.82 (s, 2H, ArH) ; 6.86 (s, 2H, ArH) ; 6.90 (m, 2H, H₆) ; 6.91 (s, 2H, ArH) ; 7.15 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₇) ; 9.45 (bs, 1H, OH) ; 9.83 (bs, 2H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 26.03, 26.94 (C₂ et C₃) ; 28.48 (Me₃C) ; 31.73, 32.25 (ArCH₂Ar) ; 33.07 (CH₂CH₂NH₂) ; 35.48, 35.60 (CH₂CH₂NHBoc) ; 41.48, 41.91, 42.03 (CH₂CH₂NHBoc et CH₂CH₂NH₂) ; 67.58 (C₄) ; 77.12 (C₁) ; 79.25 (Me₃C) ; 115.16 (C₆) ; 128.37, 128.91 (C₀) ; 128.97, 129.37, 129.91 (C_m) ; 129.99 (C₇) ; 131.40, 132.20 (C_p) ; 134.27 (C₀) ; 148.09, 149.34 (C_{ipso}) ; 150.15 (C₈) ; 156.06, 156.12 (NCOO) ; 158.25 (C₅).

Analyse élémentaire calculée pour C₆₈H₉₃O₁₃N₅, 3 H₂O (1188.49) : C 65.73 ; H 8.03 ; N 5.64 ; trouvée : C 65.49 ; H 7.62 ; N 5.55%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1210.6680 [M + Na⁺]⁺ ; 1188.6881 [M + H⁺]⁺ ; 605.8382 [M + Na⁺]^{2+/2}.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(nitro)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 33

Le tétra-para-(Boc-aminoéthyl)-calix[4]arène **28** (0.94 g, 0.94 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 70 mL de CH₃CN. Le mélange est porté à reflux sous argon et additionné de NaHCO₃ (0.09 g, 1.04 mmol, 1.1 éq.) et de KI (0.16 g, 0.94 mmol, 1 éq.). Après 30 minutes, une solution de 1-(3-bromopropyl)-4-nitrobenzène **9** (0.23 g, 0.94 mmol, 1 éq.) dans 10 mL de CH₃CN est ajoutée rapidement et la réaction est laissée à reflux durant la nuit. Après 20 heures de réaction, le retour à température ambiante est suivi d'une évaporation du

solvant. Le résidu est repris dans environ 100 mL de CH_2Cl_2 et filtré sur fritté afin d'éliminer les impuretés minérales. La phase organique est évaporée à sec, puis le brut est purifié par chromatographie (Al_2O_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 99.4 / 0.6) pour donner le produit attendu **33** (0.41 g, 37%, poudre blanche).

F° : 127-130°C.

IR (ATR) : 3329.14 (NH); 1681.93 (CO); 1514.12 (NO_2); 1365.60 (NO_2).

UV-Vis (CH_2Cl_2) : 281 (35083).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : 1.37 (m, 36 H, Me_3C); 2.50 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ArNO}_2$); 2.58 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.24 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, CH_2ArNO_2); 3.26 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.38-4.27 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.8$ Hz, 4H, ArCH_2Ar); 3.40-4.23 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.8$ Hz, 4H, ArCH_2Ar); 4.12 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ArNO}_2$); 4.63 (bs, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6.84 (s, 4H, ArH); 6.88 (s, 2H, ArH); 6.91 (s, 2H, ArH); 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArNO_2); 8.22 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArNO_2); 9.49 (s, 2H, OH); 9.89 (s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : 28.59 (Me_3C); 31.30 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 31.77 (ArCH_2Ar) ; 32.25 (ArCH_2Ar) ; 32.25 (CH_2ArNO_2) ; 35.46, 35.60, 35.94 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 41.92 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 76.12 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 79.22 (Me_3C) ; 124.05 (C_2) ; 128.43, 128.90 (C_o) ; 129.00, 129.37, 129.46 (C_m) ; 129.55 (C_3) ; 130.01 (C_m) ; 131.60, 132.32 (C_p) ; 134.16 (C_o) ; 146.80 (C_1) ; 147.97, 149.18 (C_{ipso}) ; 149.28 (C_4) ; 150.00 (C_{ipso}) ; 155.99, 156.04, 156.07 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{65}\text{H}_{85}\text{O}_{14}\text{N}_5$ (1160.40) : C 67.28 ; H 7.38 ; N 6.04 ; trouvée : C 67.29 ; H 7.39 ; N 5.99%.

ESI-HRMS (ES^+) : 1182.5929 [$\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$, 1198.5722 [$\text{M} + \text{K}^+$] $^+$.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-(4-anilino-propyl)-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène **34**

Méthode n°1 : Le calixarène **33** (0.40 g, 0.35 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 30 mL d'EtOH. 75 mg de Pd/C à 10% sont ajoutés au mélange. 2 baudruches d'hydrogène sont injectées à l'aiguille dans le milieu réactionnel sous agitation vive à température ambiante. Après une heure d'agitation, le milieu réactionnel est filtré sur Célite et rincé abondamment à l'EtOH. Le filtrat est évaporé à sec puis le brut est purifié par chromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$: 75/25) pour donner le produit attendu **34** (0.20 g, 43%, mousse jaune pâle).

Méthode n°2 : Le calixarène **33** (0.300 g, 0.26 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL d'EtOH. 50 mg de Pd/C à 10% sont ajoutés au mélange. L'hydrazine monohydrate (0.525 g, 10.5 mmol, 40 éq.) est ajoutée au milieu réactionnel sous agitation vive à température ambiante. Le milieu réactionnel est mis à chauffer à 85°C pendant 15 min. La CCM (SiO_2 , Cyclohexane/AcOEt : 6/4) montre la disparition totale du produit de départ et la formation d'un nouveau produit qui devient rose après chauffage de la plaque trempée dans la ninhydrine. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré sur Célite et rincé abondamment à l'EtOH. Le filtrat est évaporé à sec pour donner le produit attendu **34** sans purifications supplémentaires (0.261 g, 75%, mousse jaune pâle).

F° : 133-136°C.

IR (ATR) : 3325.28 (NH) ; 1687.71 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 283 (7600).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.37 (m, 36H, Me₃C) ; 2.43 (app quint, J₁ = J₂ = 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂ArNH₂) ; 2.59 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 2.93 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂ArNH₂) ; 3.27 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 3.35-4.29 (AB, J_{AB} = 12.9 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.39-4.23 (AB, J_{AB} = 13.7 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.63 (bs, 2H, ArNH₂) ; 4.10 (t, J = 6.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂ArNH₂) ; 4.60 (bs, 4H, CH₂CH₂NH) ; 6.68 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H₂) ; 6.82 (s, 2H, ArH) ; 6.83 (s, 2H, ArH) ; 6.86 (s, 2H, ArH) ; 6.89 (s, 2H, ArH) ; 7.14 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H₃) ; 9.52 (s, 2H, OH) ; 9.91 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.48 (Me₃C) ; 31.35 (OCH₂CH₂CH₂) ; 31.85 (ArCH₂Ar et OCH₂CH₂CH₂) ; 32.27 (ArCH₂Ar) ; 35.49, 35.58, 35.94 (CH₂CH₂N) ; 41.97 (CH₂CH₂N) ; 76.84 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.24 (Me₃C) ; 115.57 (C₂) ; 128.51, 128.64, 128.99 (C_o) ; 129.34 (C_m) ; 129.47 (C₃) ; 129.89 (C_m) ; 131.22 (C₄) ; 131.38, 132.14 (C_p) ; 134.35 (C_o) ; 136.77 (C_p) ; 144.66 (C₁) ; 148.19, 149.41, 150.28 (C_{ipso}) ; 156.10 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour C₆₅H₈₇O₁₂N₅, 2.5 CH₂Cl₂ (1342.74) : C 60.38 ; H 6.91 ; N 5.22 ; trouvée : C 60.32 ; H 6.82 ; N 5.37%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1130.6398 [M + H]⁺, 1152.6224 [M + Na]⁺, 1168.5978 [M + K]⁺.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(éthyllamino)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène **35**

Le calixarène **33** (0.500 g, 0.431 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 50 mL d'éthanol anhydre. Le Pd/C 10% (0.120 g) est ajouté et une baudruche d'hydrogène est injectée avant de laisser le milieu réactionnel agiter à température ambiante sous pression d'une quadruple baudruche d'hydrogène pendant la nuit. La CCM (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 1/1) montre une disparition partielle du calixarène de départ et une formation importante du dérivé anilino **34**. 0.120 g de Pd/C 10% supplémentaires sont ajoutés en suspension dans 10 mL d'éthanol et deux baudruches d'hydrogène sont injectées à température ambiante pendant 2 heures. La CCM (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 1/1) montre une disparition quasi-totale du calixarène de départ, du dérivé anilino et une formation du produit attendu. Le milieu réactionnel est alors filtré sur un pad de célite et rincé plusieurs fois à l'éthanol. Le filtrat est évaporé à sec pour obtenir un brut qui est purifié par chromatographie sur combi-flash (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 55/45). Le produit attendu **35** (0.302 g, 70%, poudre blanche) est obtenu sous forme solide par précipitation dans un mélange éther/pentane.

F° : 115-117°C.

IR (ATR) : 3327.21 (NH) ; 1693.50 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 282 (14333).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, *H*₆) ; 1.37 (bs, 36H, *Me*₃C) ; 2.44 (app quint, *J*₁ = *J*₂ = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₂ArNH) ; 2.57 (bs, 8H, CH₂CH₂NH) ; 2.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂ArNH) ; 3.16 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, *H*₅) ; 3.27 (bs, 8H, CH₂CH₂NH) ; 3.35-4.30 (AB, *J*_{AB} = 12.9 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.38-4.24 (AB, *J*_{AB} = 13.7 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 4.10 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂ArNH) ; 4.60 (bs, 4H, CH₂CH₂NH) ; 6.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *H*₂) ; 6.82-6.89 (m, 8H, ArH) ; 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *H*₃) ; 9.52 (s, 2H, OH) ; 9.91 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 15.10 (*C*₆) ; 28.49 (*Me*₃C) ; 31.31 (OCH₂CH₂CH₂) ; 31.89 (ArCH₂Ar et OCH₂CH₂CH₂) ; 32.29 (ArCH₂Ar) ; 35.59, 35.96 (CH₂CH₂N) ; 38.86 (*C*₅) ; 41.91 (CH₂CH₂N) ; 76.84 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.24 (*Me*₃C) ; 113.19 (*C*₂) ; 128.52, 128.67, 128.99 (*C*₀) ; 129.34 (*C*_m) ; 129.42 (*C*₃) ; 129.81 (*C*_m) ; 129.88 (*C*₄) ; 131.37, 132.12 (*C*_p) ; 134.37 (*C*₀) ; 136.73 (*C*_p) ; 146.98 (*C*₁) ; 148.22, 149.43, 150.31 (*C*_{ipso}) ; 156.10 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour C₆₇H₉₁N₅O₁₂, C₅H₁₂ (1230.61) : C 70.27 ; H 8.44 ; N 5.69 ; trouvée : C 70.62 ; H 8.17 ; N 6.12%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1180.6580 [M + Na⁺]⁺ ; 1158.6756 [M + H⁺]⁺ ; 1058.6232 [M - Boc + H⁺]⁺.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-((4'-picolyl)amino)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène **36**

Le calixarène **34** (0.530 g, 0.469 mmol, 1 éq.) est déposé dans un mortier puis solubilisé dans quelques gouttes d'éther. Quelques gouttes de pentane sont ajoutées et après trituration du mélange, les solvants sont évaporés à l'air libre. La 4-pyridinecarboxaldehyde est ajoutée dans le mortier et le mélange est broyé pendant 5 min jusqu'à obtenir une huile marron. L'huile est ensuite transférée dans un ballon par rinçage avec 25 mL d'éthanol, puis rapidement et par portion, le borohydrure de sodium (0.124 g, 3.282 mmol, 7 éq.) est ajouté rapidement. La réaction est laissée agiter 2 heures à température ambiante sous argon, puis le solvant est évaporé à sec. Le résidu est repris dans l'eau puis est extrait 3 fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont mélangées puis lavées 3 fois à l'eau jusqu'à pH = 7. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec pour obtenir un résidu solide qui est purifié par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/Et₂O/MeOH : 49/49/2) pour donner le produit attendu **36** (0.451 g, 94%, solide blanc).

F° : 126-127°C.

IR (ATR) : 3331.07 (NH), 3061.03 (CH de la pyridine), 1681.93 (CO), 1514.12 (C=N ou C=C).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 282 (11669).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.37 (bs, 36H, *Me*₃C) ; 2.42 (app s qt, *J* = 7.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂) ; 2.57 (bs, 8H, CH₂CH₂NH) ; 2.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.27 (bs, 8H, CH₂CH₂NH) ; 3.34-4.29 (AB, *J*_{AB} = 12.8 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.38-4.22 (AB, *J*_{AB} = 13.7 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 4.10 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂) ; 4.38 (s, 2H, pyrCH₂NH) ; 4.62 (bs, 4H, CH₂CH₂NH) ; 6.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *H*₆) ; 6.82-6.89 (m, 8H, ArHcalix) ; 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz,

2H, H_7) ; 7.31 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_2) ; 8.55 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_1) ; 9.51 (s, 2H, OH) ; 9.89 (s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : 28.48 (Me_3C) ; 31.29 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 31.81 ou 31.86 (ArCH_2Ar ou $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 32.27 (ArCH_2Ar) ; 35.47, 35.59, 35.96 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 41.93 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 47.48 (C_4) ; 76.84 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 79.23 (Me_3C) ; 113.32 (C_6) ; 122.28 (C_2) ; 128.49, 128.97 (C_o) ; 129.31, 129.36 (C_m) ; 129.56 (C_7) ; 129.89 (C_m) ; 130.79 (C_5) ; 131.41, 132.25 (C_p) ; 134.35 (C_o) ; 136.78 (C_p) ; 145.91 (C_8) ; 148.16 (C_3) ; 149.39 (C_{ipso}) ; 149.99 (C_1) ; 150.26 (C_{ipso}) ; 156.07, 156.10 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{71}\text{H}_{92}\text{O}_{12}\text{N}_6$ (1221.52) : C 69.81 ; H 7.59 ; N 6.88 ; trouvée : C 69.93 ; H 7.48 ; N 6.83%.

ESI-HRMS (ES^+) : 1221.6810 [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$, 1243.6636 [$\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$, 1259.6436 [$\text{M} + \text{K}^+$] $^+$, 1265.64 [$\text{M} - \text{H}^+ + 2 \text{Na}^+$] $^+$.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-((N-(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)-amino)-phényl]-propane]-yl]-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 37

Le chlorure de cyanuryle (0.016 g, 0.088 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 2 mL d'acétone et refroidit à 2°C. Le calixarène **34** (0.100 g, 0.088 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 8 mL d'acétone, refroidit à 2°C et ajouté à la première solution. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min sous argon à 2°C puis il est évaporé à sec (température du bain < 30°C). Le brut obtenu est purifié par chromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$: 9/1) pour donner le produit attendu **37** (0.070g, 74%, solide blanc).

F° : 218-219°C (decomposition).

IR (ATR) : 1681.93 (CO), 781.17 (C-Cl).

UV-Vis (CH_2Cl_2) : 280 (37469).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : 1.37 (bs, 36H, Me_3C) ; 2.47 (app s quint, $J_1 = J_2 = 7.2$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2.59 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 3.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 3.27 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 3.36-4.28 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.0$ Hz, 4H, ArCH_2Ar) ; 3.38-4.22 (AB, $J_{\text{AB}} = 13.7$ Hz, 4H, ArCH_2Ar) ; 4.12 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 4.63 (bs, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$) ; 6.82 (s, 4H, ArH) ; 6.86 (s, 2H, ArH) ; 6.89 (s, 2H, ArH) ; 7.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_6) ; 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_5) ; 8.09 (bs, 1H, H_3) ; 9.50 (s, 2H, OH) ; 9.89 (s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : 28.49 (Me_3C) ; 31.63, 31.79, 32.26 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ et $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ et ArCH_2Ar) ; 35.49, 35.96 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 41.98 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 76.54 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 79.26 (Me_3C) ; 121.71 (C_5) ; 128.48, 128.55 (C_o) ; 129.32, 129.41 (C_m) ; 129.50 (C_6) ; 129.94 (C_m) ; 131.48 (C_7 et C_p) ; 132.22 (C_p) ; 134.24 (C_o) ; 136.90 (C_p) ; 138.98 (C_4) ; 148.09, 149.35, 150.15 (C_{ipso}) ; 156.11 (COO) ; 164.08 (C_2) ; 170.12, 171.42 (C_1 et C_1).

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{68}\text{H}_{86}\text{O}_{12}\text{N}_8\text{Cl}_2$, 1.2 CH_2Cl_2 (1380.28) : C 60.22 ; H 6.46 ; N 8.12 ; trouvée : C 59.99 ; H 6.47 ; N 7.86%.

ESI-HRMS (ES^+) : 1299.5595 [$\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$, 1315.5403 [$\text{M} + \text{K}^+$] $^+$.

5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-(4-pyrène-but-1-yl)-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 38

Le tétra- para-(Boc-aminoéthyl)calix[4]arène **28** (0.540 g, 0.542 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 40 mL d'acétonitrile fraîchement distillée. La suspension est chauffée à 95°C sous argon jusqu'à solubilisation totale, puis le 1-(4-Bromobutyl)-pyrène **6** (0.183 g, 0.442 mmol, 1 éq.), NaHCO₃ (0.050 g, 0.596 mmol, 1.1 éq.) et KI (0.099 g, 0.596 mmol, 1.1 éq.) sont ajoutés. Le mélange est chauffé à reflux sous argon pendant 72 heures jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'évolution visible sur plaque CCM (Al₂O₃, CH₂Cl₂/Et₂O : 7/3). Le milieu réactionnel est alors évaporé à sec et le résidu est repris au dichlorométhane et filtré sur fritté puis rincé plusieurs fois au dichlorométhane. Le filtrat est évaporé à sec pour obtenir un brut qui est purifié par chromatographie une première fois (Al₂O₃, CH₂Cl₂/MeOH : 99/1), puis une seconde fois (Al₂O₃, CH₂Cl₂/Et₂O/MeOH : 7/3/0.05) pour donner le produit attendu **38** (0.173 g, 25%, poudre jaune pâle).

F° : 140-146°C.

IR (ATR) : 3307.92 (NH) ; 1691.57 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 267 (30637), 277 (52581), 315 (13451), 328 (30468), 344 (41844).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.37 (bs, 36 H, Me₃C); 2.30-2.35 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₂ et OCH₂CH₂CH₂CH₂); 2.57 (m, 8H, CH₂CH₂N); 3.26 (m, 8H, CH₂CH₂N); 3.31-4.24 (AB, J = 12.9 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.36-4.17 (AB, J = 13.9 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.58 (t, J = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₂); 4.14 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₂); 4.60 (bs, 4H, NH) ; 6.79 (s, 2H, ArH); 6.82 (s, 4H, ArH); 6.87 (s, 2H, ArH) ; 7.95-8.06 (m, 4H, H_{pyrene}) ; 8.13-8.17 (m, 4H, H_{pyrene}) ; 8.40 (app d, J = 9.2 Hz, 1H, H_{pyrene}) ; 9.43 (s, 2H, OH); 9.83 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.49 (Me₃C); 28.35 (OCH₂CH₂CH₂CH₂); 30.10 (OCH₂CH₂CH₂CH₂); 31.73, 32.22 (ArCH₂Ar) ; 33.56 (OCH₂CH₂CH₂CH₂); 35.48, 35.58, 35.95 (CH₂CH₂N) ; 41.94 (CH₂CH₂N) ; 77.32 (OCH₂CH₂CH₂CH₂); 79.25 (Me₃C) ; 123.55, 124.86, 124.99, 125.02 (CH_{pyrene}) ; 125.19, 125.34 (C_{pyrene}) ; 125.92, 126.80, 127.56, 127.64 (CH_{pyrene}) ; 128.44, 128.56 (C_{ipso}) ; 128.91 (C_{pyrene}) ; 129.32, 129.88 (C_m) ; 130.11, 131.08 (C_{pyrene}) ; 131.34 (C_p) ; 131.56 (C_{pyrene}) ; 132.06 (C_p), 134.29 (C_o), 136.36 (C_{pyrene}) ; 136.74 (C_p) ; 150.22 (C_{ipso}) ; 156.01, 156.09 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour C₇₆H₉₂O₁₂N₄ (1253.56) : C 72.82 ; H 7.40 ; N 4.47 ; trouvée : C 72.69 ; H 7.41 ; N 4.46%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1275.6558 [M + Na]⁺.

5,11,17,23-tétra-(amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(nitro)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène, tétra-trifluoroacétate **39**

Le calixarène **33** (0.430 g, 0.370 mmol, 1 éq) est mis en solution dans 30 mL de dichlorométhane. 10 mL de TFA sont ajoutés goutte à goutte en 2 min et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant une heure. Le milieu réactionnel est alors évaporé à sec, repris et évaporé plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, Et₂O) pour éliminer l'excès de TFA. Le résidu semi-solide est ensuite solubilisé dans un minimum de méthanol et additionné d'un large excès d'éther. La gomme obtenue est triturée jusqu'à obtenir une fine poudre. La poudre est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois à l'éther jusqu'à obtenir un filtrat de pH neutre. La poudre est ensuite solubilisée dans 40 mL d'eau et lyophilisée pour donner le sel produit attendu **39** (0.437 g, 92%, coton blanc).

F° : 130-131°C.

IR (ATR) : 2800-3000 (NH₃⁺) ; 1514.12 (NO₂) ; 1344.38 (NO₂).

UV-Vis (MeOH) : 283 (18012).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) : 2.29-2.30 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.60-2.74 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂) ; 2.90-3.10 (m, 8H, CH₂CH₂NH₂) ; 2.96-3.00 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.26, 3.87 (AB, *J* = 13.7 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.40, 4.03 (AB, *J* = 13.1 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.95-4.00 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 6.76 (s, 2H, ArH) ; 6.88 (s, 2H, ArH), 6.93 (s, 2H, ArH) ; 6.98 (s, 2H, ArH) ; 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₂) ; 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₃).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) : 30.75, 30.95, 31.26 (ArCH₂Ar et OCH₂CH₂CH₂) ; 31.96 (OCH₂CH₂CH₂) ; 32.08, 32.20 (CH₂CH₂NH₂) ; 40.33, 40.49, 40.68 (CH₂CH₂NH₂) ; 76.16 (OCH₂CH₂CH₂) ; 116.57 (q, *J* = 292.0 Hz, CF₃COOH) ; 123.63 (C₃) ; 128.44, 128.58 (C_m) ; 128.90 (C₂, C_m et C_o), 129.27 (C_m), 129.62, 130.40 (C_p), 134.20, 134.52 (C_o), 145.77 (C₄) ; 147.22, 149.48 (C_{ipso}) ; 150.05, 150.16 (C_{ipso} et C₁) ; 162.75 (q, *J* = 37.4 Hz, CF₃COOH).

Analyse élémentaire calculée pour C₄₅H₅₃O₆N₅, 3.5 H₂O, 4 CF₃COOH (1279.10) : C 49.77 ; H 5.04 ; N 5.48 ; trouvée : C 49.74 ; H 4.64 ; N 5.33%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 759.4049 [M + H⁺]⁺.

5,11,17,23-tétra-(di-Boc-guanidino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(nitro)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène **40**

Le calixarène **39** (0.400 g, 0.329 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 9 mL de dichlorométhane et 9 mL de méthanol. La triéthylamine (0.400 g, 3.95 mmol, 12 éq.) et la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*triflylguanidine (0.772 g, 1.97 mmol, 6 éq.) sont ajoutées et la réaction est agitée à température ambiante sous argon pendant 5 heures. Après disparition du produit de départ sur CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 99/1), le milieu réactionnel est évaporé à sec puis repris à l'eau. La phase aqueuse est extraite 3 fois au dichlorométhane, la phase organique est lavée 2 fois à l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec. Le brut est

purifié par chromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 98.75/1.25) et le produit attendu **40** (0.470 g, 87%, solide blanc) est obtenu après précipitation dans un mélange éther/pentane.

F° : 186-187°C (décomposition).

IR (ATR) : 3321.42 (NH) ; 1722.43 (COO) ; 1614.42 (C=N) ; 1552.70 (NO₂) ; 1344.38 (NO₂).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 280 (20477).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.47-1.50 (bs, 72H, Me₃C) ; 2.44-2.54 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.62-2.70 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 3.24 (t, J = 7.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.38-4.25 (AB, J_{AB} = 13.1 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.41-4.21 (AB, J_{AB} = 13.9 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.53-3.64 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 4.12 (t, J = 6.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 7.57 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₃) ; 8.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H₂) ; 8.34-8.40 (m, 8H, ArH) ; 8.38 (m, 4H, NHCNN) ; 9.49 (bs, 3H, OH) ; 11.47 (m, 4H, NHCOO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.02, 28.46 (Me₃C) ; 31.37 (OCH₂CH₂CH₂) ; 31.63, 32.06 (ArCH₂Ar) ; 32.30 (OCH₂CH₂CH₂) ; 34.62, 34.89 (CH₂CH₂N) ; 42.18, 42.34, 42.41 (CH₂CH₂N) ; 76.08 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.41, 79.46, 83.15, 83.18 (Me₃C) ; 124.07 (C₂) ; 128.47, 128.54 (C_o) ; 128.93 (C_m) ; 128.97 (C_o) ; 129.36, 129.47 (C_m) ; 129.58 (C₃) ; 130.07 (C_m) ; 131.08, 132.00 (C_p) ; 134.20 (C_o) ; 136.49 (C_p) ; 146.81 (C₁) ; 147.89 (C_{ipso}) ; 149.20 (C₄) ; 149.28, 149.45, 150.09 (C_{ipso}) ; 153.32 (COO) ; 156.19, 156.24 (NCNN) ; 163.71, 163.74 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour C₈₉H₁₂₅O₂₂N₁₃ (1729.02) : C 61.82 ; H 7.29 ; N 10.53 ; trouvée : C 61.38 ; H 6.94 ; N 10.65%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1728.9047 [M + H⁺]⁺, 1750.8875 [M + Na⁺]⁺, 1767.8561 [M + K⁺]⁺.

5,11,17,23-tétra-(guanidino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(nitro)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène, tétra(trifluoroacétate) **41**

Le calixarène **40** (0.205 g, 0.119 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 7.5 mL de dichlorométhane. 2.5 mL de TFA sont ajoutés et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant 4 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec, puis repris et évaporé à sec de nombreuses fois à l'éther pour éliminer l'excès de TFA, jusqu'à obtention d'une gomme puis d'une poudre jaune pâle. La poudre est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois à l'éther jusqu'à obtenir un filtrat neutre. La poudre est ensuite mise en suspension dans 250 mL d'eau, agitée pendant une nuit, filtrée sur coton et lyophilisée pour donner le produit attendu **41** (0.132 g,

76%, coton blanc).

F° : 134-135°C (décomposition).

IR (ATR) : 3321.42 (NH/NH₂) ; 1670.35 (C=O) ; 1613.35 (-NH₃⁺) ; 1512.19 (ArNO₂).

UV-Vis (MeOH) : 285 (20638).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO) : 2.31-2.33 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.47-2.62 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 3.17-3.24 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.21-3.26 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 3.29, 4.17 (AB, J_{AB} = 12.8 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.32, 4.29 (AB, J_{AB} = 12.2 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.95-4.00 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 6.87 (s, 2H, ArH) ; 6.90-7.50 (m, 16H, NH et NH₂) ; 6.94 (s, 2H, ArH) ; 6.98 (s, 2H, ArH) ; 7.04 (s, 2H, ArH) ; 7.69 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₃) ; 8.23 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₂).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO) : 30.50, 31.08, 31.45 (OCH₂CH₂CH₂ et ArCH₂Ar) ; 31.84 (OCH₂CH₂CH₂) ; 33.65, 33.90 (CH₂CH₂N) ; 42.08, 42.33, 42.55 (CH₂CH₂N) ; 75.52 (OCH₂CH₂CH₂) ; 117.10 (q, J = 299.3 Hz, CF₃COO⁻) ; 123.63 (C₂) ; 128.40, 128.57 (C_m) ; 128.82 (C_o) ; 129.81 (C₃) ; 133.95 (C_o) ; 145.98 (C₁) ; 150.33 (C₄) ; 156.76, 156.80 (NCNN) ; 158.79 (q, J = 31.5 Hz, CF₃COO⁻).

Analyse élémentaire calculée pour C₄₉H₆₁O₆N₁₃, 4 CF₃COOH, 5 H₂O (1474.28) : C 46.44 ; H 5.13 ; N 12.35 ; trouvée : C 46.29 ; H 4.85 ; N 12.20%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 464.7558 [M + 2H]^{2+/2} ; 310.1740 [M + 3H]^{3+/3} ; 232.8819 [M + 4H]^{4+/4}.

5,11,17,23-tétra-(di-Boc-guanidino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(amino)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène **42**

Le palladium sur charbon 10% (0.09 g) est mis en suspension dans 20 mL de THF anhydre. 2 baudruches d'hydrogène (~1L) sont injectées dans la suspension puis le calixarène nitré **40** (0.100 g, 0.058 mmol, 1 éq.) est ajouté solubilisé dans 10 mL de THF. Une troisième baudruche d'hydrogène est injectée puis le milieu réactionnel est laissé agiter sous pression d'hydrogène (4 baudruches) pendant la nuit à température ambiante. La CCM (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 6/4) montre une consommation totale du produit de départ. Le milieu réactionnel est filtré sur un tampon de Célite® et rincé de nombreuses fois au dichlorométhane. Le filtrat est évaporé à sec pour obtenir un brut qui est purifié par chromatographie sur combi-flash (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 75/25) pour donner le produit

attendu **42** (0.091 g, 93%, poudre blanche).

F° : 230-231°C (décomposition).

IR (ATR) : 3319.49 (NH) ; 1720.50 (CO) ; 1612.49 (NCO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 282 (25194).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.47-1.50 (m, 72H, Me₃C) ; 2.41 (app quint, J₁ = J₂ = 8.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.65 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 2.93 (t, J = 7.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.36-4.28 (AB, J_{AB} = 13.0 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.39-4.22 (AB, J_{AB} = 13.7 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.57 (m, 8H, CH₂CH₂N) ; 4.10 (t, J = 6.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 6.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H₂) ; 6.86-6.91 (m, 8H, ArH) ; 7.14 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H₃) ; 8.39 (m, 4H, CH₂CH₂NH) ; 9.42 (s, 2H, OH) ; 9.76 (s, 1H, OH) ; 11.47 (bs, 4H, NHCOO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.20, 28.46 (Me₃C) ; 31.41 (OCH₂CH₂CH₂) ; 31.67 (ArCH₂Ar) ; 31.96 (OCH₂CH₂CH₂) ; 32.08 (ArCH₂Ar) ; 34.61, 34.88 (CH₂CH₂N) ; 42.19, 42.38, 42.44 (CH₂CH₂N) ; 76.85 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.42, 79.46, 83.15, 83.18, 83.31 (Me₃C) ;

115.57 (C₂) ; 128.59, 128.68 (C_o) ; 128.89 (C_m) ; 129.05 (C_o) ; 129.29, 129.34 (C_m) ; 129.47 (C₃) ; 129.92 (C_m) ; 130.83 (C₄) ; 131.32, 131.77 (C_p) ; 134.38 (C_o) ; 136.12 (C_p) ; 144.64 (C₁) ; 148.10, 149.57, 150.39 (C_{ipso}) ; 153.29 (COO) ; 156.20, 156.24 (CNN) ; 163.71 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour C₈₉H₁₂₇O₂₀N₁₃, 4 H₂O (1771.10) : C 60.36 ; H 7.68 ; N 10.28 ; trouvée : C 59.94 ; H 6.93 ; N 10.70%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1698.9406 [M + H⁺]⁺, 849.9700 [M + 2H⁺]^{2+/2}.

5,11,17,23-tétra-(di-Boc-guanidino-éthyl)-25-{1-[3-[4-((4'-picolyl)amino)-phényl]-propane]-yl]-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 43

Le calixarène **42** (0.112 g, 0.066 mmol, 1 éq.) est transféré dans un mortier par solubilisation dans quelques gouttes d'éther et précipité par ajout de quelques gouttes de pentane. Après évaporation des solvants à l'air libre, la 4-pyridinecarboxaldehyde (0.141 g, 1.32 mmol, 20 éq.) est coulée dans le mortier puis le mélange est broyé pendant 5 min jusqu'à obtenir une huile marron. La CCM (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 2/8) montre la disparition totale du calixarène de départ. L'huile est ensuite transférée dans un ballon par dissolution dans 10 mL d'éthanol. Le borohydrure de sodium (0.060 g, 1.586 mmol, 24 éq.) est ajouté rapidement par petites portions et le milieu réactionnel est agité sous argon à température ambiante pendant 10 minutes. Le mélange est ensuite évaporé à sec et repris dans un mélange dichlorométhane/eau. Après séparation, la phase organique est lavée 3 fois à l'eau jusqu'à obtenir un pH neutre de la phase aqueuse. Cette phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec pour obtenir un résidu solide qui est purifié par chromatographie sur combi-flash (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 4/6) et précipité dans un mélange éther/pentane pour donner le produit attendu **43** (0.073 g, 61%, poudre blanche).

F° : 230-231°C (décomposition).

IR (ATR) : 3325.28 (N-H) ; 1720.50 (COO) ; 1614.42 (C=N).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 281 (12566).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.47-1.50 (m, 72H, Me₃C) ; 2.40 (app s qt, J = 7.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂) ; 2.65 (m, 8H, CH₂CH₂NH) ; 2.93 (t, J = 7.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.57 (m, 8H, CH₂CH₂NH) ; 3.36-4.28 (AB, J_{AB} = 12.9 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.39-4.21 (AB, J_{AB} = 13.9 Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 4.10 (t, J = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂) ; 4.38 (s, 2H, pyrCH₂NH) ; 6.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H₆) ; 6.86-6.91 (m, 8H, ArH) ; 7.17 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H₇) ; 7.31 (d, J = 5.9 Hz, 2H, H₂) ; 8.39 (m, 4H, CH₂CH₂NH) ; 8.55 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H₁) ; 9.41 (s, 2H, OH) ; 9.75 (s, 1H, OH) ; 11.47 (bs, 4H, NHCOO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.21, 28.47 (Me₃C) ; 31.39 (OCH₂CH₂CH₂) ; 31.68, 32.01, 32.08 (ArCH₂Ar et OCH₂CH₂CH₂) ; 34.62, 34.88 (CH₂CH₂N) ; 42.19, 42.37, 42.43 (CH₂CH₂N) ; 47.51 (C₄) ; 77.36 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.38, 79.43, 83.13, 83.16 (Me₃C) ; 113.32 (C₆) ; 122.26 (C₂) ; 128.58, 128.65 (C_o) ; 128.88 (C_m) ; 129.04 (C_o) ; 129.30, 129.35 (C_m) ; 129.56 (C₇) ; 129.93 (C_m) ; 130.86, 130.91 (C₅ et C_p) ; 131.81 (C_p) ; 134.36 (C_o) ; 136.15 (C_p) ;

145.93 (C_8) ; 148.08 (C_{ipso}) ; 149.23 (C_3) ; 149.55 (C_{ipso}) ; 150.15 (C_I) ; 150.37 (C_{ipso}) ; 153.30, 153.32 (COO) ; 156.19, 156.24 (CNN) ; 163.72, 163.74 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour $C_{95}H_{132}O_{20}N_{14}$, 1.5 H_2O (1817.17) : C 62.79 ; H 7.49 ; N 10.79 ; trouvée : C 62.71 ; H 7.32 ; N 10.92%.

ESI-HRMS (ES^+) : 1790.9823 [$M + H^+$] $^+$, 1811.9605 [$M + Na^+$] $^+$.

5,11,17,23-tétra-(guanidino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(amino)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène, (trifluoroacétate) $_n$ **44**

Le calixarène **42** (0.156 g, 0.092 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 5 mL de dichlorométhane et 5 mL de TFA. La réaction est agitée sous argon à température ambiante pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est évaporé à sec et repris au méthanol et à l'éther plusieurs fois. L'huile obtenue est ensuite triturée dans l'éther jusqu'à obtenir une gomme puis une poudre. Cette poudre est filtrée sur fritté et rincée à l'éther jusqu'à pH neutre du filtrat. La poudre est solubilisée dans 20 mL d'eau et lyophilisée pour donner le produit attendu **44** (0.080 g, 59%, coton blanc cassé).

F° : 115-116°C (décomposition).

IR (ATR) : 3346.50 (NH/NH₂), 1654.92 (CO).

UV-Vis (MeOH) : 287 (10064).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : 2.43 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 2.60-2.75 (m, 2H, CH₂CH₂NH) ; 3.15 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 3.29-3.38 (m, 8H, CH₂CH₂NH) ; 3.48, 4.22 (AB, $J = 13.6$ Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 3.48, 4.31 (AB, $J = 12.9$ Hz, 4H, ArCH₂Ar) ; 4.13 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, OCH₂CH₂CH₂) ; 6.97 (bs, 2H, ArH) ; 7.01 (bs, 2H, ArH), 7.06 (bs, 4H, ArH) ; 7.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_3) ; 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_2).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 32.27, 32.49 (ArCH₂Ar) ; 32.82, 33.12 (OCH₂CH₂CH₂ et OCH₂CH₂CH₂) ; 35.16, 35.25 (CH₂CH₂NH) ; 43.62, 43.89, 44.04 (CH₂CH₂NH) ; 76.30 (OCH₂CH₂CH₂) ; 122.89 (C_3) ; 130.05, 130.13 (C_o) ; 130.21, 130.39 (C_m) ; 130.55 (C_I) ; 130.96 (C_m et C_o) ; 131.26 (C_2) ; 131.77, 136.12 (C_p) ; 140.63 (C_4) ; 149.19, 151.14, 151.91 (C_{ipso}) ; 158.76, 158.80 (NCNN).

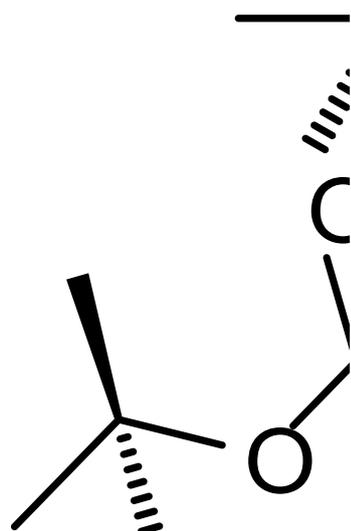
Analyse élémentaire calculée pour $C_{49}H_{63}O_{14}N_{13}$, 3 CF₃COOH (1400.19) : C 47.18 ; H 4.75 ; N 13.00 ; trouvée : C 47.31 ; H 4.87 ; N 11.93%.

ESI-HRMS (ES^+) : 449.7654 [$M + 2H^+$] $^{+2/2}$; 300.1772 [$M + 3H^+$] $^{3+/3}$.

20 Voie de synthèse des Bis-calixarènes

Voie de synthèse des Bis-calixarènes

Para-Xylène-Bis- α,α' -{N,N'-[5,11,17,23-tétra-(Boc-amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(amino)-phényl]-propane]-yl}]}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 45



Le calixarène **34** (0.100 g, 0.089 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 5 mL de méthanol anhydre en présence de 5 billes de tamis moléculaire 3Å. Le téréphthalaldéhyde (0.006 g, 0.044 mmol, 0.5 éq.) est ajouté et le milieu réactionnel est agité à 65°C sous argon pendant 7 heures. La CCM (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 1/1) montre la formation de deux nouveaux produits en plus des produits de départ. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant la nuit et remise à chauffer à 90°C pendant 2 heures. La CCM (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 1/1) ne montre plus qu'un unique nouveau produit formé. Après retour à température ambiante, le borohydrure de sodium (0.050 g, 1.32 mmol, 15 éq.) est ajouté dissout dans 5 mL de méthanol et la réaction est laissée agiter pendant 15 min. Le solvant est évaporé à sec, le résidu est repris dans un mélange AcOEt/eau. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'AcOEt et la phase organique est lavée 2 fois à l'eau et une fois avec une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée à sec pour obtenir un brut qui est purifié par chromatographie sur combi-flash (SiO₂, Cyclohexane/AcOEt : 4/6). Les fractions contenant le bon produit sont évaporées et reprises dans un mélange éther/pentane. Le précipité obtenu est filtré et séché pour donner le produit attendu **45** (0.075 g, 63%, poudre blanche).

F° : 162-163°C.

IR (ATR) : 3325.28 (OH) ; 1691.57 (CO) ; 1517.97 (NH).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 281 (29019).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.11-1.50 (m, 72H, Me₃C) ; 2.43 (app quint, J₁ = J₂ = 7.1 Hz, 4H, CH₂CH₂ArNH) ; 2.58 (m, 16H, CH₂CH₂N) ; 2.92 (t, J = 7.4 Hz, 4H, CH₂ArNH) ; 3.27 (m, 16H, CH₂CH₂N) ; 3.35-4.29 (AB, J_{AB} = 12.5 Hz, 8H, ArCH₂Ar) ; 3.39-4.23 (AB, J_{AB} = 13.7 Hz, 8H, ArCH₂Ar) ; 3.98 (bs, 2H, ArNH) ; 4.11 (t, J = 6.7 Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂ArNH) ; 4.32 (s, 4H, ArCH₂NH) ; 4.61 (bs, 8H, CH₂CH₂NH) ; 6.64 (d, J = 8.5 Hz, 4H, H₂) ; 6.82 (s, 4H, ArH) ; 6.83 (s, 4H, ArH) ; 6.86 (s, 4H, ArH) ; 6.89 (s, 4H, ArH) ; 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 4H, H₃) ; 7.36 (s, 4H, Ar_{central}) ; 9.52 (s, 4H, OH) ; 9.91 (s, 2H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.49 (Me₃C) ; 31.34 (OCH₂CH₂CH₂) ; 31.84, 31.92 (ArCH₂Ar et OCH₂CH₂CH₂) ; 32.28 (ArCH₂Ar) ; 35.49, 35.59, 35.94 (CH₂CH₂N) ; 41.97 (CH₂CH₂N) ; 48.46 (ArCH₂NH) ; 76.84 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.24 (Me₃C) ; 113.28 (C₂) ; 127.99 (C₆) ; 128.51, 128.63, 128.98 (C₀) ; 129.34 (C_m) ; 129.46 (C₃) ; 129.89 (C_m et C₄) ; 131.37, 132.13 (C_p) ; 134.37 (C₀) ; 136.74 (C_p) ; 138.67 (C₅) ; 146.64 (C₁) ; 148.20, 149.42, 150.29 (C_{ipso}) ; 156.10 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour C₁₃₈H₁₈₀N₁₀O₂₄, 2.3 C₅H₁₂ (2528.90) : C 71.00 ; H 8.27 ; N 5.54 ; trouvée : C 71.47 ; H 7.89 ; N 6.02%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1204.1470 [M + 2 Na]^{2+/2}.

Para-Xylène-Bis- α,α' -{N,N'-[5,11,17,23-tétra-(amino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(amino)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène, (trifluoroacétate)_n 46

Le calixarène **45** (0.300 g, 0.127 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 9 mL de dichlorométhane anhydre. 3 mL de TFA sont ajoutés et la réaction est agitée à température ambiante sous argon pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est évaporé à sec puis repris et évaporé à sec plusieurs fois dans les solvants suivants : CH₂Cl₂, MeOH, Et₂O, cyclohexane et acétonitrile jusqu'à obtenir une huile. 40 mL d'éther sont ajoutés sur l'huile pendant une nuit sans agitation pour ôter l'excès de TFA et l'éther est délicatement retiré. L'opération est répétée une deuxième et une troisième fois en 30 minutes jusqu'à obtenir un filtrat éther neutre. L'huile est ensuite triturée jusqu'à obtenir une gomme puis une poudre filtrée sur fritté et rincée à l'éther. La poudre est séchée puis solubilisée dans 40 mL d'eau et lyophilisée pour donner le produit attendu **46** (0.327 g, 97%, coton blanc).

F° : 146-148°C (décomposition).

IR (ATR) : 3419.79 (NH₂) ; 1514.12 (NH).

UV-Vis (MeOH) : 285 (28156).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : 2.40 (m, 4H, CH₂CH₂ArNH) ; 2.70-2.82 (m, 16H, ArCH₂CH₂NH₂) ; 2.98-3.02 (m, 4H, CH₂ArNH) ; 3.00-3.10 (m, 16H, ArCH₂CH₂NH₂) ; 3.45-3.55 (m, 8H, ArCH₂Ar) ; 4.11 (t, *J* = 6.0Hz, 4H, ArCH₂CH₂CH₂) ; 4.21-4.35 (m, 8H, ArCH₂Ar) ; 4.43 (s, 4H, ArNHCH₂Ar) ; 6.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, H₃) ; 6.99 (s, 4H, ArH) ; 7.02-7.03 (m, 4H, ArH) ; 7.04-7.14 (m, 8H, ArH) ; 7.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, H₂) ; 7.38 (s, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 32.02, 32.23 (ArCH₂Ar) ; 32.52, 33.06 (ArCH₂CH₂ ou ArCH₂CH₂) ; 33.64, 33.67, 33.74 (ArCH₂CH₂NH₂) ; 41.68, 41.93, 42.10 (ArCH₂CH₂NH₂) ; 51.00 (ArNHCH₂Ar) ; 77.73 (ArCH₂CH₂CH₂) ; 118.95 (C₃) ; 123.88 (C₁) ; 128.34 (C₀) ; 130.02 (C₆) ; 130.15, 130.28, 130.63 (C_m) ; 130.79 (C₂) ; 131.32, 131.41 (C_p) ; 135.79 (C₀) ; 136.18 (C_p et C₅) ; 142.15 (C₄) ; 149.42, 151.30, 152.10 (C_{ispo}).

Analyse élémentaire calculée pour C₉₈H₁₁₆N₁₀O₈, 10 CF₃COOH (2645.30) : C 53.12 ; H 4.78 ; N 5.30 ; trouvée : C 53.09 ; H 4.77 ; N 5.20%.

ESI-HRMS (ES⁺) : non visible.

ESI-HRMS (MALDI) : 1562.057 [M - 10 CF₃COOH + H⁺]⁺ sur matrice d'acide Sinapique (CH₃CN/H₂O : 1/1).

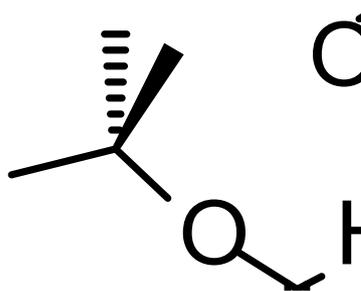
Para-Xylène-Bis- α,α' -{N,N'-[5,11,17,23-tétra-(di-Boc-guanidino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(amino)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène 47

Le calixarène **46** (0.250 g, 0.093 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 7 mL de dichlorométhane et 7 mL de méthanol. La triéthylamine (0.281 g, 2.78 mmol, 30 éq.) et la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*triflylguanidine (0.290 g, 0.740 mmol, 8 éq.) sont ajoutées à la réaction qui est agitée à température ambiante sous argon pendant la nuit. La CCM (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 98/2) montre la consommation totale du produit de départ et la formation d'un nouveau produit. Le solvant est évaporé à sec et le résidu est repris au dichlorométhane et lavé 3 fois à l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec. Le brut est chromatographié (SiO₂ désactivée avec 2mL d'Et₃N, CH₂Cl₂/MeOH : 98/2) pour donner le produit attendu **47** (0.293 g, 89%, poudre blanche).

F° : >250°C (décomposition).

IR (ATR) : 3313.71 (NH) ; 1714.72 (CO).

UV-Vis (CH₂Cl₂) : 280 (26368).



(bs, 8H, NH_{guanidine}).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : 1.48 (d, J = 2.6 Hz, 72H, Me₃C) ; 1.50 (s, 72H, Me₃C) ; 2.41 (app quint, J₁ = J₂ = 7.9 Hz, 4H, CH₂CH₂ArNH) ; 2.65 (m, 16H, CH₂CH₂N) ; 2.93 (t, J = 7.7 Hz, 4H, CH₂ArNH) ; 3.36-4.30 (AB, J_{AB} = 12.6 Hz, 8H, ArCH₂Ar) ; 3.40-4.21 (AB, J_{AB} = 13.4 Hz, 8H, ArCH₂Ar) ; 3.54-3.65 (m, 16H, CH₂CH₂N) ; 4.10 (t, J = 6.4 Hz, 4H, OCH₂CH₂CH₂ArNH) ; 4.32 (s, 4H, ArCH₂NH) ; 6.64 (d, J = 8.4 Hz, 4H, H₂) ; 6.86 (s, 4H, ArH) ; 6.87 (s, 4H, ArH) ; 6.89 (s, 4H, ArH) ; 6.91 (s, 4H, ArH) ; 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 4H, H₃) ; 7.37 (s, 4H, Ar_{central}) ; 8.32-8.40 (m, 8H, NH_{guanidine}) ; 9.43 (bs, 4H, OH) ; 9.75 (s, 2H, OH) ; 11.48

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : 28.20, 28.46 (Me₃C) ; 31.37 (OCH₂CH₂CH₂) ; 31.68 (ArCH₂Ar) ; 32.07 (ArCH₂Ar et OCH₂CH₂CH₂) ; 34.63, 34.88 (CH₂CH₂N) ; 42.17, 42.41 (CH₂CH₂N) ; 48.51 (ArCH₂NH) ; 77.36 (OCH₂CH₂CH₂) ; 79.33, 79.38, 83.10, 83.13 (Me₃C) ; 113.25 (C₂) ; 128.04 (C₆) ; 128.59, 128.67 (C_o) ; 128.88 (C_m) ; 129.04 (C_o) ; 129.30, 129.34 (C_m) ; 129.45 (C₃) ; 129.92 (C_m) ; 130.34 (C₄) ; 130.85, 131.79 (C_p) ; 134.37 (C_o) ; 136.13 (C_p) ; 138.69 (C₅) ; 146.66 (C₁) ; 148.10, 149.56, 150.39 (C_{ipso}) ; 153.30, 153.32 (COO) ; 156.18, 156.22 (NCNN) ; 163.74, 163.77 (COO).

Analyse élémentaire calculée pour C₁₈₆H₂₆₀O₄₀N₂₆ (3500.20) : C 63.82 ; H 7.49 ; N 10.40 ; trouvée : C 63.47 ; H 7.34 ; N 10.11%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 1166.9763 [M + 3 H⁺]³⁺ ; 1749.9630 [M + 2 H⁺]²⁺.

[Bis- α,α' -{N,N'-[5,11,17,23-tétra-(guanidino-éthyl)-25-{1-[3-[4-(amino)-phényl]-propane]-yl}-26,27,28-tris-hydroxy-calix[4]arène]Para-Xylène, déca(trifluoroacétate) 48

Le composé **47** (0.221 g, 0.063 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 8 mL de dichlorométhane et 2 mL de TFA sont ajoutés. La réaction est agitée à température ambiante sous argon pendant 4 heures. Le milieu réactionnel est évaporé à sec et repris plusieurs fois au dichlorométhane, au méthanol et à l'éther pour ôter l'excès de TFA, jusqu'à obtenir une précipitation dans ce dernier. La gomme obtenue est triturée dans l'éther, filtrée et rincée à l'éther jusqu'à obtenir un filtrat de pH neutre. La gomme est solubilisée dans le méthanol qui est ensuite évaporé à sec et l'huile obtenue est diluée dans 25 mL d'eau. La lyophilisation de la solution permet l'obtention du produit attendu **48** (0.117 g, 62%, coton blanc).

F° : 120-121°C (décomposition).

IR (ATR) : 3362.64 (OH) ; 3151.69 (=NH) ; 1664.57 (NH₂) ;

UV-Vis (MeOH) : 214 (107449), 280 (32442).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : 2.36-2.46 (m, 4H, CH₂CH₂ArNH) ; 2.63-2.75 (m, 16H, ArCH₂CH₂NH₂) ; 3.04 (t, 4H, J = 7.2 Hz, CH₂ArNH) ; 3.29-3.39 (m, 16H, ArCH₂CH₂NH₂) ; 3.47, 4.21 (AB, 8H, ArCH₂Ar) ; 3.48, 4.30 (AB, 8H, ArCH₂Ar) ; 4.09 (t, J = 5.2Hz, 4H, ArCH₂CH₂CH₂) ; 4.42 (s, 4H, ArNHCH₂Ar) ; 6.93 (d, J = 7.9 Hz, 4H, H₃) ; 6.96 (s, 4H, ArH) ; 7.00 (bs, 4H, ArH) ; 7.06 (bs, 8H, ArH) ; 7.30 (d, J = 7.3 Hz, 4H, H₂) ; 7.39 (s, H₆).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 32.29, 32.51 (ArCH₂Ar) ; 32.70 (ArCH₂CH₂), 32.88 (ArCH₂CH₂), 35.16, 35.25 (ArCH₂CH₂NH) ; 43.63, 43.89, 44.05 (ArCH₂CH₂NH) ; 50.90 (ArNHCH₂Ar) ; 77.67 (ArCH₂CH₂CH₂) ; 118.23 (C₃) ; 124.02 (C₁) ; 130.05, 130.16 (C₀), 130.21, 130.38 (C₆ ou C_m), 130.59 (C₀) ; 130.81 (C₂) ; 130.96, 131.45 (C_m), 131.79, 132.90 (C_p), 140.99 (C₄) ; 149.20, 151.11, 151.94 (C_{ipso}), 158.76, 158.80 (NCNN).

Analyse élémentaire calculée pour C₁₀₆H₁₃₂N₂₆O₈, 10 CF₃COOH (2993.02) : C 50.24 ; H 4.77 ; N 12.17 ; trouvée : C 50.31 ; H 4.87 ; N 12.02%.

ESI-HRMS (ES⁺) : 475.2760 [M + 4 H⁺]^{4+/4} ; 633.3657 [M + 3 H⁺]^{3+/3} ; 959.5434 [M + 2 H⁺]^{2+/2}.

***Protocoles des résines de
Merrifield greffées***

21 Calixarènes greffés en mode bottom-up sur résine de Merrifield

22 Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Merrifield

23 Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Merrifield-Pyridinium carboxaldéhyde

Résines de Merrifield Vierge

Résine de Merrifield Vierge 50

Fournisseur : Acros Organics - référence : 349170500

Capacité : 2.95 mmol Cl/g

Réticulation : 1% de Divinylbenzène

Tailles des billes : 200 – 400 Mesh

IR (ATR) : 3024.38 (C-H CH₂Cl) ; 1263.37 (C-H CH₂Cl) ; 815.89, 673.16 (C-Cl).

Analyse élémentaire calculée pour C₈₃₈H₁₀₄₀Cl₃₇ : C : 81.10% ; H : 8.44% ; trouvée : C : 80.90% ; H : 6.79% ; N : <0.05%.

Résine de Merrifield Vierge 51

Fournisseur : Fluka - référence : B920659

Capacité : 5.0 mmol Cl/g

Réticulation : 1% de Divinylbenzène

Tailles des billes : 200 – 400 Mesh

IR (ATR) : 3022.45 (C-H du CH₂Cl) ; 1263.37 (C-H du CH₂Cl) ; 815.89, 665.44 (C-Cl).

Analyse élémentaire calculée pour C₈₇₂H₁₀₇₄Cl₇₀ : C : 74.57% ; H : 7.71% ; trouvée : C : 75.29% ; H : 6.33% ; N : <0.05%.

Calixarènes greffés en mode bottom-up sur résine de Merrifield

Résine de Merrifield greffée 52

La résine de Merrifield vierge **50** (2.95 mmol Cl /g ; 0.400 g) est mise en suspension dans 8 mL d'acétonitrile. Le calixarène pyridiné **36** (54.5 mg, 4.5 10⁻⁵ mol) est ajouté dans 2 ml d'acétonitrile et la réaction est portée à 80°C sous agitation douce et sous argon pendant 5 jours. Le chauffage est arrêté et le milieu réactionnel est filtré sur fritté, puis rincé plusieurs fois (CH₃CN, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, H₂O et acétone). La résine est évaporée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **52** (0.437 g, billes de couleur marron).

IR (ATR) : 1699.29 (C=N⁺).

Δm : 37 mg.

Analyse élémentaire : C : 80.12% ; H : 6.85 % ; N : 0.64 %.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $7.62 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Merrifield greffée 53

La résine **52** (0.391 g) est mise en suspension dans 7.5 mL de CH_2Cl_2 et 2.5 mL de TFA. La suspension est agitée à température ambiante sous argon pendant la nuit, puis la résine est filtrée sur fritté et rincée abondamment (THF, H_2O et méthanol). Après vérification que le dernier filtrat soit à $\text{pH} = 7$, les billes de résine sont séchées sous vide jusqu'à poids constant pour donner **53** (0.394 g, billes de couleur marron clair).

IR (ATR) : 1770.32 (CF_3COOH) ; 1676.14 ($\text{C}=\text{N}^+$) ; 1100-1300 (CF_3COOH large).

Δm : 3 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.81% ; H : 6.63% ; N : 0.64%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $7.62 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Merrifield greffée 54

La résine de Merrifield greffée **53** (0.266 g) est mise en suspension dans 1 ml de CH_2Cl_2 et 1 ml de MeOH. La triéthylamine (19.5 μl ; 6 éq) puis la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*triflylguanidine (36.9 mg ; 4 éq) sont ajoutées au milieu réactionnel. La suspension est agitée à température ambiante sous argon pendant 2 jours. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur fritté, puis la résine est rincée au CH_2Cl_2 , au MeOH, à l'eau et de nouveau au MeOH puis séchée sous vide poussé pour donner **54** (0.263 g, billes de couleur rouge foncé).

IR (ATR) : 1712.92 ($\text{C}=\text{N}^+$).

Δm : - 3 mg.

Analyse élémentaire : C : 79.16% ; H : 6.72% ; N : 0.96%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $4.90 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Merrifield greffée 55

La résine **54** (0.150 g) est mise en suspension dans 7.5 mL de CH₂Cl₂ et 2.5 mL de TFA. La suspension est agitée à température ambiante sous argon pendant la nuit, puis la résine est filtrée sur fritté et rincée abondamment (CH₂Cl₂, MeOH, H₂O et MeOH). Les billes de résine sont séchées sous vide jusqu'à poids constant pour donner **55** (0.151 g, billes de couleur rouge-orangé).

IR (ATR) : 1774.59 (CF₃COOH) ; 1662.64 (C=N⁺) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : 1 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.47% ; H : 6.37% ; N : 1.16%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine :
5.92 10⁻².

Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Merrifield

Résine de Merrifield greffée 56

Le dérivé pyridiné octa-(di-Boc-guanidinoéthyl)calixarène **43** (0.010 g, 5.59 10⁻⁶ mol) est solubilisé dans 5 mL d'acétonitrile. La solution est coulée sur la résine de Merrifield vierge **50** (0.203 g, 2.95 mmol Cl/g) et la suspension est agitée à température ambiante sous argon pendant 3 heures. Le suivi CCM (SiO₂, AcOEt) ne montre aucune consommation du dérivé pyridiné. La solution est mise à chauffer à 70°C pendant 2 heures et la CCM ne montre toujours aucune consommation. La solution est mise à chauffer à 90°C pendant 2 heures et la consommation sur plaque CCM est quasiment totale. Le milieu réactionnel est laissé agiter à 90°C pendant la nuit. La CCM ne montre plus de trace de produit de départ et 0.010 g (5.59 10⁻⁶ mol) de dérivé pyridiné supplémentaire sont ajoutés. Après 2 heures d'agitation à 90°C, la CCM indique de nouveau une consommation totale. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, la résine est filtrée sur verre fritté puis rincée plusieurs fois à l'acétonitrile, au dichlorométhane, au dichlorométhane/méthanol : 1/1, au méthanol, à l'eau et à l'acétone. La résine est ensuite évaporée sous vide jusqu'à poids constant pour donner la résine **56** (0.212 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : 1625.45 (C=N⁺).

Δm : 9 mg.

Analyse élémentaire : C : 79.50% ; H : 6.57% ; N : 0.70%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $3.57 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Merrifield greffée 57

La résine **56** (0.160 g) est mise en suspension dans 5 mL de dichlorométhane et 2.5 mL de TFA sont ajoutés. La réaction est laissée agiter sous argon à température ambiante pendant 5 heures. La suspension est ensuite filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois au dichlorométhane, dichlorométhane/méthanol : 1/1, méthanol, eau et acétone. La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner la résine **57** (0.162 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : 1676.91 (C=N⁺) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : 2 mg.

Analyse élémentaire : C : 79.38% ; H : 6.53% ; N : 0.72%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $3.67 \cdot 10^{-2}$.

Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Merrifield-Pyridinium carboxaldéhyde

Synthèse de la résine de Merrifield greffée pyridinium carboxaldéhyde 58a dans le toluène.

La résine de Merrifield vierge **50** (1.210 g, 2.95 mmol Cl/g) est mise en suspension dans 10 mL de toluène. La 4-pyridinecarboxaldéhyde (0.765 g, 7.14 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel et la réaction est mise à chauffer sous argon à 85°C pendant la nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (toluène ou CH₃CN, acétone, H₂O, acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **58a** (1.287 g, billes de couleur orange).

IR (ATR) : 1633.22 (C=N⁺).

Δm : 77 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.97% ; H : 6.77% ; N : 0.64%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $4.57 \cdot 10^{-1}$.

Synthèse de la résine de Merrifield greffée pyridinium carboxaldéhyde **58b** dans l'acétonitrile

La résine de Merrifield vierge **50** (0.205 g, 2.95 mmol Cl/g) est mise en suspension dans 10 mL d'acétonitrile. La 4-pyridinecarboxaldéhyde (0.126 g, 1.18 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel et la réaction est mise à chauffer sous argon à 85°C pendant la nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₃CN, acétone, H₂O, acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **58b** (0.182 g, billes de couleur marron).

IR (ATR) : 1633.25 (C=N⁺).

Δm : - 23 mg.

Analyse élémentaire: C : 77.81% ; H : 6.51% ; N : 0.68%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $4.86 \cdot 10^{-1}$.

Résine de Merrifield greffée **59**

La résine pyridinium carboxaldéhyde **58a** (0.100 g) est mise en suspension dans 4 mL d'EtOH puis le tétra-(diBoc-guanidinoéthylcalixarène **42** ($5.89 \cdot 10^{-6}$ mol, 0.010 g) solubilisé dans 1 mL de CH₂Cl₂ est ajouté au milieu réactionnel. La réaction est laissée à température ambiante sous argon pendant 4 jours (faible consommation et aucune dégradation du calixarène **42** sur plaque CCM). Le milieu réactionnel est alors évaporé à sec puis 5 mL de toluène sont ajoutés et la réaction est chauffée à 30°C pendant 30 minutes. Une dégradation partielle du produit **42** est observée sur plaque CCM. Le chauffage est arrêté et la résine est filtrée sur fritté puis rincée plusieurs fois (toluène, acétone, H₂O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **59** (0.092 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : 1703.14 (CO) ; 1629.84 (C=N⁺).

Δm : - 8 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.85% ; H : 6.77% ; N : 1.35%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $6.89 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Merrifield greffée 60

La résine **59** (0.074 g) est mise en suspension sous agitation dans 3 mL de méthanol. Le borohydrure de sodium (0.045 g, 1.19 mmol) est ajouté goutte à goutte solubilisé dans 2 mL de méthanol. La réaction est laissée agiter pendant 5 heures à température ambiante sous argon. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur fritté et rincé plusieurs fois au méthanol, au dichlorométhane, au dichlorométhane/méthanol : 1/1, à l'eau et à l'acétone. La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **60** (0.073 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : Disparition de la bande à 1629.84 (C=N⁺).

Δm : - 1 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.62% ; H : 6.57% ; N : 1.22%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $6.22 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Merrifield greffée 61

La résine **60** (0.050 g) est mise en suspension dans 5 mL de dichlorométhane. 2.5 mL de TFA sont ajoutés et la réaction est laissée agiter à température ambiante pendant la nuit. La suspension est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois au dichlorométhane, méthanol, dichlorométhane/méthanol : 1/1, eau et acétone. La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **61** (0.051 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : 1775.92 (CF₃COOH) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : 1 mg.

Analyse élémentaire : C : 75.33% ; H : 6.22% ; N : 1.06%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $5.41 \cdot 10^{-2}$.

24 Dérivés pyridinium non calixaréniques sur résine de Merrifield

Dérivés pyridinium non calixaréniques sur résine de Merrifield

Synthèse de la résine de Merrifield greffée **62a** dans le toluène

0.200 g de résine de Merrifield vierge **50** (2.95 mmol Cl/g, 0.59 mmol de Cl) est mise en suspension dans 10mL de toluène. Le (4-(pyridin-4-yl)-méthoxy)phénylméthanol **15** (0.117g, 0.55 mmol) est ajouté au milieu réactionnel et la réaction est agitée et chauffée à 95°C sous argon pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante puis la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (toluène, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, eau et acétone). La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **62a** (0.312 g, billes de couleur marron).

IR (ATR) : 3300 (O-H et H-C=N⁺ large) ; 3024.38 (C-H du CH₂Cl) ; 1641.42 (C=N⁺) ; 819.75, 698.23 (C-Cl).

Δm : 112 mg.

Analyse élémentaire : C : 75.95% ; H : 6.40% ; N : 2.38%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.70.

Synthèse de la résine de Merrifield greffée **62b** dans l'acétonitrile

0.200 g de résine de Merrifield vierge **50** (0.59 mmol de Cl) est mise en suspension dans 10mL d'acétonitrile. Le (4-(pyridin-4-yl)méthoxy)phénylméthanol **15** (0.117g, 0.55 mmol) est ajouté au milieu réactionnel et la réaction est agitée et chauffée à 95°C sous argon pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante puis la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₃CN, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, eau et acétone). La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **62b** (0.309 g, billes de couleur marron).

Analyse élémentaire : C : 74.88% ; H : 6.28% ; N : 2.39%.

Δm : 109 mg.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.71.

IR (ATR) : 3300 (O-H et H-C=N⁺ large) ; 3024.38 (C-H du CH₂Cl) ; 1641.42 (C=N⁺) ; 819.75, 698.23 (C-Cl).

Résine de Merrifield greffée 63

La résine **62a** (0.100 g) est mise en suspension dans 10 mL de CHCl_3 puis est refroidie à 0°C dans un bain de glace. Le chlorure de thionyle (1.89 g, 15.9 mmol) est ajouté goutte à goutte puis le milieu réactionnel est laissé remonter à température ambiante sous agitation, puis chauffé à 60°C sous argon pendant la nuit. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CHCl_3 , CH_2Cl_2 , MeOH, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 1/1, H_2O et acétone). La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **63** (0.096 g, billes de couleur marron clair).

IR (ATR) : 3300 (H-C=N⁺ large) ; 3024.38 (C-H du CH_2Cl) ; 1641.42 (C=N⁺) ; 815.89, 698.23 (C-Cl).

Δm : - 4 mg.

Analyse élémentaire : C : 70.81% ; H : 5.68% ; N : 2.16% ; S : 1.09%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.54.

Résine de Merrifield greffée 64

La résine **62a** (0.500 g) est mise en suspension dans 10 mL de pyridine. Le milieu réactionnel est chauffé à 70°C sous argon pendant une nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH_2Cl_2 , MeOH, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 1/1, H_2O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **64** (0.494 g, billes de couleur marron-rouge foncé).

IR (ATR) : 3300 (O-H et H-C=N⁺ large) ; 3022.45 (C-H du CH_2Cl) ; 1633.71 (C=N⁺) ; 817.82, 698.23 (C-Cl).

Δm : - 6 mg.

Analyse élémentaire : C : 74.14% ; H : 6.12% ; N : 2.74%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.96.

Résine de Merrifield greffée 65

La résine **64** (0.400 g) est mise en suspension dans 10 mL de CHCl_3 puis est refroidie à 0°C dans un bain de glace. Le chlorure de thionyle (7.57 g, 63.6 mmol) est ajouté goutte à goutte puis le milieu réactionnel est laissé remonter à température ambiante sous argon, puis chauffé à 60°C pendant 3 heures. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CHCl_3 , CH_2Cl_2 , MeOH, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 1/1, H_2O et acétone). La résine est séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **65** (0.399 g, billes de couleur marron).

IR (ATR) : 3300 (H-C=N⁺ large) ; 3022.45 (C-H du CH₂Cl) ; 1639.49 (C=N⁺) ; 819.75, 700.16 (C-Cl).

Δm : - 1 mg.

Analyse élémentaire : C : 72.19% ; H : 6.07% ; N : 2.78%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.99.

Résine de Merrifield greffée 66

La résine **65** (0.202 g) est mise en suspension dans 10 mL de pyridine sous argon. Le milieu réactionnel est chauffé à 70°C pendant une nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, H₂O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **66** (0.194 g, billes de couleur noire).

IR (ATR) : 3300 (H-C=N⁺ large) ; 3022.45 (C-H du CH₂Cl) ; 1631.78 (C=N⁺) ; 698.23 (C-Cl).

Δm : - 8 mg.

Analyse élémentaire : C : 73.87% ; H : 6.13% ; N : 3.33%.

Nombre de mmoles d'azote par gramme de résine : 2.38.

Résine de Merrifield greffée 67a

1.000 g de résine de Merrifield vierge **50** (2.95 mmol Cl/g ; 2.95 10⁻³ mol) est mise en suspension dans 10 mL de pyridine sous argon. La suspension est agitée à 70°C pendant la nuit. La résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, H₂O, Acétone). La résine est séchée jusqu'à poids constant pour donner **67a** (1.282 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 3361.93 (H-C=N⁺ large) ; 3022.45 (C-H du CH₂-Cl) ; 1629.85, 1485.19 (C=C, C=N) ; 761.88, 677.01 (C-H).

Δm : 282 mg.

Analyse élémentaire : C : 86.08% ; H : 6.89% ; N : 3.52%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 2.51.

Résine de Merrifield greffée 67b

1.001 g de résine de Merrifield vierge **51** (5 mmol Cl/g ; 5.00 10⁻³ mol) est mise en suspension dans 10 mL de pyridine sous argon. La suspension est agitée à 70°C pendant la nuit. La résine est filtrée sur fritté et rincée

plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, H₂O, Acétone). La résine est séchée jusqu'à poids constant pour donner **67b** (1.516 g, billes de couleur jaune pâle).

IR : 3361.93 (H-C=N⁺ large) ; 2920.23 (C-H du CH₂-Cl) ; 1629.85, 1483.26 (C=C, C=N) ; 767.67, 677.01 (C-H).

Δm : 515 mg.

Analyse élémentaire : C : 71.52% ; H : 6.61% ; N : 4.68%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 3.34.

Résine de Merrifield greffée 68

0.130 g de résine de Merrifield vierge **50** (2.95 mmol Cl/g ; 0.384 10⁻³ mol) est mise en suspension dans 5 mL de toluène. Le 4-[(pyrène-1-yl)-méthylamino]-pyridine **23** (0.324 mmol, 0.100 g) est ajouté au milieu réactionnel. La réaction est chauffée à 100°C pendant 72 heures sous argon. Le chauffage est arrêté et après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (Toluène, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, H₂O et acétone). La résine est séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **68** (0.196 g, billes de couleur beige).

IR (ATR) : 1645.28 (C=N⁺) ; 698.23 (C-Cl).

Δm : 66 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.51% ; H : 6.01% ; N : 3.35%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.20.

Résine de Merrifield greffée 69

1.019 g de résine de Merrifield vierge **50** (2.95 mmol Cl/g ; 3.01 10⁻³ mol) est mise en suspension dans 20 mL d'acétonitrile. La 4,4'-bipyridine (0.951 g, 6.01 mmol) est ajoutée et le milieu réactionnel est chauffé à 85°C sous argon pendant la nuit. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré sur fritté et rincé plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, acétone, H₂O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **69** (1.337 g, billes de couleur marron foncé).

IR (ATR) : 3300 (H-C=N⁺ large) ; 1633.71 (C=N⁺) ; 806.25, 698.23 (C-Cl).

Analyse élémentaire : C : 74.93% ; H : 6.41% ; N : 3.84%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.37.

Résine de Merrifield greffée 70

La résine de Merrifield vierge **50** (0.500 g, 1.48 mmol) est mise en suspension dans 40 mL d'acétonitrile. L'iodure de 1-méthyl-4,4'-bipyridinium **12** (0.662 mg, 2.22 mmol) est ajouté au milieu réactionnel et la réaction est chauffée à 85°C sous argon pendant la nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₃CN, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, acétone, H₂O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **70** (0.811 g, billes de couleur noire).

IR (ATR) : 3300 (H-C=N⁺ large) ; 1633.71 (C=N⁺) ; 817.82, 698.23 (C-Cl).

Δm : 311 mg.

Analyse élémentaire : C : 63.84% ; H : 5.52% ; N : 3.03%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 1.08.

Résine de Merrifield greffée 71a dans le toluène-méthanol

1.017 g de résine de Merrifield vierge **50** (2.95 mmol Cl/g, 3.00 10⁻³ mol) est mise en suspension dans 10 mL de toluène puis la phénantroline (1.08 g, 6 10⁻³ mol) est ajoutée solubilisée dans 5 mL de méthanol. Le milieu réactionnel est chauffé sous argon à 85°C pendant la nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (toluène, acétone, H₂O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **71a** (1.227 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 1625.99 (C=N⁺).

Δm : 210 mg.

Analyse élémentaire : C : 80.48% ; H : 6.34% ; N : 2.58%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 9.21 10⁻¹.

Résine de Merrifield greffée 71b dans l'acétonitrile

1.022 g de résine de Merrifield vierge (2.95 mmol Cl/g, 3.01 10⁻³ mol) est mise en suspension dans 20 mL d'acétonitrile puis la phénantroline (1.08 g, 6 10⁻³ mol) est ajoutée et se solubilise complètement. Le milieu réactionnel est chauffé sous argon à 85°C pendant la nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₃CN, MeOH, CH₂Cl₂, acétone, H₂O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **71b** (1.022 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 3022.45 (C-H du CH₂Cl) ; 1263.37 (C-H du CH₂Cl) ; 815.75, 673.16 (C-Cl).

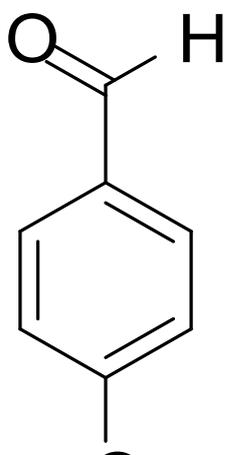
Δm : 0 mg.

Analyse élémentaire (CH₃CN) : C : 79.77% ; H : 6.60% ; N : <0.05%.

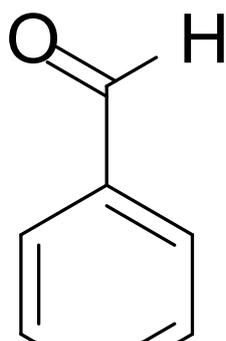
Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine (CH₃CN) : aucun greffage.

***Protocoles de synthèse des
résines de Wang benzaldéhyde
greffées et de préparation des
résines ammoniums
commerciales***

25 Calixarènes greffés en mode bottom-up sur résine de Wang benzaldéhyde



+



26 Calixarènes greffés en mode top-down sur résine de Wang benzaldéhyde

27 Monomères greffés sur résine de Wang benzaldéhyde

Résine de Wang-benzaldéhyde vierge

Résine de Wang benzaldéhyde 72

Nom commercial : StratoSpheres™ PL-CHO (Benzaldehyde) resin

Fournisseur : Aldrich - référence : 06524AE

Capacité : 3.0 mmol CHO/g

Réticulation : 1% DVB

Tailles des billes : 50 – 100 Mesh

IR (ATR) : 1685.79 (CHO).

Analyse élémentaire : pour $C_{32}H_{30}O_2$: C : 86.06% ; H : 6.77% ; trouvée : C : 81.48% ; H : 6.61% ; N : 0.16%.

Calixarènes greffés en bottom-up sur résine de Wang benzaldéhyde

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 73

0.401 g de résine de Wang benzaldéhyde vierge **72** (1.2 mmol de CHO) est mise en suspension dans 10mL de toluène. La molécule **34** (0.100 g, 0.088 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel et la réaction est chauffée à 70°C sous argon pendant 48 heures. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante puis la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (toluène, CH_2Cl_2). La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **73** (0.485 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 1685.79 (CHO), 1597.06 (C=N).

Δm : 84 mg.

Analyse élémentaire: C : 81.31% ; H : 6.83% ; N : 1.01%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $1.44 \cdot 10^{-1}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 74

0.300 g de résine **73** est mise en suspension dans 30 mL de THF anhydre. Le borohydrure de sodium (0.036 g, 0.943 mmol) est ajouté au milieu réactionnel et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant 7 heures. La résine est ensuite filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois jusqu'à ce que le filtrat soit à pH neutre (THF, H₂O, MeOH, H₂O/MeOH : 1/1). La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **74** (0.290 g, « caillou » de couleur blanc).

IR (ATR) : Disparition des bandes 1685.79 (CHO) et 1597.06 (C=N).

Δm : - 10 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.99% ; H : 6.95% ; N : 1.15%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $1.64 \cdot 10^{-1}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 75

La résine **74** (0.250 g) est mise en suspension dans 15 mL de CH₂Cl₂. 5 mL d'acide trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte et le milieu réactionnel est agité pendant 3h30 à température ambiante sous argon. La résine blanche au début devient successivement jaune, verte, puis marron. La résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, THF, H₂O et MeOH) et reprend une coloration jaune pâle. La résine est séchée jusqu'à poids constant pour donner **75** (0.238 g, poudre de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 1789.54 (CF₃COOH) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : - 12 mg.

Analyse élémentaire: C : 77.97% ; H : 6.27% ; N : 0.94%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $1.34 \cdot 10^{-1}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 76

La résine **75** (0.144 g) est mise en suspension dans 2.5 mL de dichlorométhane et 2.5 mL de MeOH. La triéthylamine (0.006 g, $58 \cdot 10^{-3}$ mol) ainsi que la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N''*triflylguanidine (0.015 g, $39 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés au milieu réactionnel. La réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant la nuit. La CCM (CH₂Cl₂/Hexane : 1/1) indique la consommation totale de la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N''*triflylguanidine. 2 ajouts de cette dernière (0.010 g et 0.014 g) sont nécessaires pour ne plus observer de disparition sur plaque CCM. Après 48 heures d'agitation à température ambiante supplémentaires, la réaction est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, H₂O et MeOH). La résine est séchée jusqu'à poids constant pour donner **76** (0.135 g, poudre de couleur blanche).

IR (ATR) : Disparition des bandes 1789.54 (CF₃COOH) et 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : - 9 mg.

Analyse élémentaire : C : 83.24% ; H : 6.85% ; N : 1.00%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $5.49 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 77

La résine **76** (0.099 g) est mise en suspension dans 7.5 mL de dichlorométhane. 2.5 mL de TFA sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité à température ambiante sous argon pendant la nuit. La résine est ensuite filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, H₂O et MeOH) puis séchée jusqu'à poids constant pour donner **77** (0.101 g, billes de couleur blanche).

IR (ATR) : 1772.98 (CF₃COOH) et 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : 2 mg.

Analyse élémentaire : C : 80.06% ; H : 6.31% ; N : 0.91%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $5.00 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 78

0.500 g de résine de Wang benzaldéhyde vierge **72** (1.5 mmol de CHO) est mise en suspension dans 10 ml de toluène. Le calixarène **30** (0.020 g, 0.017 mmol) est ajouté au milieu réactionnel et la disparition est suivie sur plaque CCM (SiO₂ : CH₂Cl₂/MeOH : 9/1). La réaction est chauffée à 70°C sous argon pendant 24 heures et 5 nouveaux ajouts de **20 mg** (100 mg, 0.085 mmol) sont effectués afin d'obtenir une consommation totale sur plaque CCM. Lorsqu'il n'y a plus de consommation, le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante puis la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (toluène, CH₂Cl₂, acétone). La résine est séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **78** (0.558 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 1687.71 (CHO), 1597.06 (C=N).

Δm : 58 mg.

Analyse élémentaire : C : 80.50 % ; H : 6.55 % ; N : 0.58 %.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $8.29 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 79

0.518 g de résine **78** sont mis en suspension dans 50 ml de MeOH anhydre. Le borohydrure de sodium (63.1 mg, $1.67 \cdot 10^{-3}$ mol) est ajouté au milieu réactionnel et la réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant 4 heures. La résine est ensuite filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois jusqu'à ce que le filtrat soit à pH neutre (MeOH, H₂O, acétone). La résine est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant pour donner **79** (0.496 mg, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : Disparition des bandes 1687.71 (CHO) et 1597.06 (C=N).

Δm : - 22 mg.

Analyse élémentaire : C : 80.34 % ; H : 6.60 % ; N : 0.61 %.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $8.71 \cdot 10^{-2}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 80

La résine **79** (0.455 g) est mise en suspension dans 30 ml de CH₂Cl₂. 9.2 ml d'acide trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte et le milieu réactionnel est agité pendant 3h30 à température ambiante sous argon. La résine jaune devient rouge, elle est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, H₂O et acétone) jusqu'à avoir un pH de phase aqueuse neutre. Les billes sont séchées jusqu'à poids constant pour donner la résine **80** (0.445 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 1780.30 (CF₃COOH) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : - 10 mg.

Analyse élémentaire : C : 78.89 % ; H : 6.20 % ; N : 0.51 %.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 7.29 10⁻².

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 81

La résine **80** (0.383 g) est mise en suspension dans 7 ml de CH₂Cl₂ et 7 ml de MeOH. 21.9 μL de triéthylamine (0.016 g, 158 μmol) ainsi que la *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*-triflylguanidine (0.040 g, 1.02 10⁻⁴ mol) sont ajoutés au milieu réactionnel. La réaction est laissée agiter à température ambiante sous argon pendant la nuit. 100 μl de triéthylamine sont rajoutés pour rendre le milieu réactionnel basique. La CCM (CH₂Cl₂/Cyclohexane : 1/1) montre la présence de *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl),*N'*-triflylguanidine restante. Le milieu réactionnel est filtré sur fritté et rincé plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, H₂O et MeOH). La résine est séchée jusqu'à poids constant pour donner la résine **81** (0.381 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : Disparition des bandes 1780.30 (CF₃COOH) et 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : - 2 mg.

Analyse élémentaire : C : 81.36 % ; H : 6.80 % ; N : 0.83 %.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 4.56 10⁻².

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 82

La résine **81** (0.323 g) est mise en suspension dans 7.5 ml de CH₂Cl₂. 2.5 ml d'acide trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte et le milieu réactionnel est agité pendant la nuit à température ambiante sous argon. La résine jaune devient rouge, elle est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, H₂O et acétone) jusqu'à avoir un pH de phase aqueuse neutre. Les billes sont séchées jusqu'à poids constant pour donner la résine **82** (0.336 g, billes de couleur jaune-orangé).

IR (ATR) : 1780.30 (CF₃COOH) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm : 13 mg.

Analyse élémentaire : C : 77.82 % ; H : 6.23 % ; N : 0.45 %.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $2.47 \cdot 10^{-2}$.

Calixarènes greffés en top-down sur résine de Wang benzaldéhyde

Synthèse de la résine de Wang benzaldéhyde greffée 83a dans l'acétonitrile

La résine de Wang benzaldéhyde vierge **72** (0.401 g, 1.20 mmol de CHO) est mise en suspension dans 5 mL d'acétonitrile. Le calixarène anilino **42** (0.010 g, 0.006 mmol) est ajouté solubilisé dans 1 mL d'acétonitrile. Le milieu réactionnel est laissé agiter à température ambiante sous argon pendant 6 heures. La consommation de la molécule **42** sur plaque CCM (Cyclohexane / AcOEt : 6/4) est totale, 0.008 g supplémentaires (0.005 mmol) dans 1 mL d'acétonitrile sont ajoutés et la réaction est laissée agiter à température ambiante pendant la nuit. La consommation est de nouveau totale sur plaque CCM et 0.020 g (0.012 mmol) dans 2 mL d'acétonitrile sont ajoutés. Après 6 heures d'agitation à température ambiante, la disparition sur plaque CCM n'est pas totale. La résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₃CN, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1 et CH₂Cl₂) et est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **83a** (0.410 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 1691.57 (CHO) ; 1597.06 (C=N).

Δm : 9 mg.

Analyse élémentaire : C : 80.33% ; H : 6.61% ; N : 0.56%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $3.08 \cdot 10^{-2}$.

Synthèse de la résine de Wang benzaldéhyde greffée **83b** dans le toluène

La résine de Wang benzaldéhyde vierge **72** (0.401 g, 1.20 mmol de CHO) est mise en suspension dans 5 mL de toluène. Le calixarène anilino **42** (0.010 g, 0.006 mmol) est ajouté solubilisé dans 1 mL de toluène. Le milieu réactionnel est laissé agiter à température ambiante sous argon pendant la nuit. La consommation de **42** sur plaque CCM (Cyclohexane / AcOEt : 6/4) n'est pas totale. Le milieu réactionnel est chauffé à 35°C pendant la nuit et une dégradation de la molécule **42** est observée sur plaque CCM après une nuit. Après retour du milieu réactionnel à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (Toluène, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1 et CH₂Cl₂). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **83b** (0.395 g, solide de couleur blanche).

IR (ATR) : 1681.93 (CHO) ; 1597.06 (C=N).

Δm : - 6 mg.

Analyse élémentaire : C : 80.60% ; H : 6.55% ; N : 0.55%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $3.02 \cdot 10^{-2}$.

Synthèse des résines de Wang benzaldéhyde greffées **84a** et **84b**

La résine **83a** (0.351 g) et la résine **83b** (0.348 g) sont mises chacune en suspension dans 5 mL de méthanol. Le borohydrure de sodium (0.030 g, 0.80 mmol) est ajouté goutte à goutte solubilisé dans 5 mL de méthanol. Les réactions sont laissées agiter à température ambiante sous argon pendant 2 heures. Les résines sont ensuite filtrées sur verre fritté et rincées plusieurs fois (MeOH, H₂O et acétone). Les résines sont ensuite séchées jusqu'à poids constant (respectivement **84a** : 0.360 g et **84b** : 0.363 g) pour donner des billes de couleur jaune pâle (**84a**) et un solide blanc (**84b**).

IR **84a** (ATR) : Disparition des bandes 1691.57 (CHO) et 1597.06 (C=N).

Δm **84a** : 9 mg.

Analyse élémentaire **84a** : C : 82.33% ; H : 6.68% ; N : 0.28%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine **84a** : $1.54 \cdot 10^{-2}$.

IR 84b (ATR) : Disparition des bandes 1681.93 (CHO) et 1597.06 (C=N).

Δm 84b : 15 mg.

Analyse élémentaire 84b : C : 82.38% ; H : 6.33% ; N : 0.29%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine 84b : $1.59 \cdot 10^{-2}$.

Synthèse des résines de Wang benzaldéhyde greffées 85a et 85b

La résine **84a** (0.269 g) et la résine **84b** (0.301 g) sont mises chacune en suspension dans 7.5 mL de CH₂Cl₂. 2.5 mL de TFA sont ajoutés goutte à goutte et les réactions sont laissées agiter à température ambiante sous argon pendant 2 heures. Les résines sont ensuite filtrées sur fritté crayon et rincées plusieurs fois (CH₂Cl₂, H₂O et acétone). Les résines sont séchées jusqu'à poids constant (respectivement **85a** : 0.263 g et **85b** : 0.299 g) pour donner des billes jaune pâle dans les deux cas.

IR 85a (ATR) : 1780.30 (CF₃COOH) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

IR 85b (ATR) : 1780.30 (CF₃COOH) ; 1100-1300 (CF₃COOH large).

Δm 85a : - 6 mg.

Δm 85b : - 2 mg.

Analyse élémentaire 85a : C : 81.80% ; H : 6.26% ; N : 0.26%.

Analyse élémentaire 85b : C : 81.30% ; H : 6.31% ; N : 0.27%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine 85a : $1.43 \cdot 10^{-2}$.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine 85b : $1.48 \cdot 10^{-2}$.

Monomères greffés sur résine de Wang benzaldéhyde

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 86

La résine de Wang benzaldéhyde vierge **72** (0.251 g, 0.75 mmol de CHO) est mise en suspension dans 8 mL toluène. La molécule **20** (0.050 g, 0.098 mmol) est ajoutée solubilisée dans 2 mL de toluène et la réaction est chauffée à 70°C sous argon et sous agitation douce pendant la nuit. Après retour à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (toluène, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂/MeOH : 1/1, acétone, eau et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **86** (0.275 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : 1687.71 (CHO) ; 1597.06 (C=N).

Δm : 24 mg.

Analyse élémentaire : C : 81.94% ; H : 6.64% ; N : 1.05%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $1.88 \cdot 10^{-1}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 87

La résine **86** (0.215 g) est mise en suspension dans 8 mL de méthanol anhydre. Le borohydrure de sodium (0.022 g, 0.583 mmol) est ajouté goutte à goutte, solubilisé dans 2 mL de méthanol. Le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures sous argon à température ambiante. La résine est ensuite filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (MeOH, H₂O et acétone). La résine est ensuite séchée jusqu'à poids constant pour donner **87** (0.216 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : Diminution des bandes 1687.71 (CHO) et 1597.06 (C=N).

Δm : 1 mg.

Analyse élémentaire : C : 81.33% ; H : 6.67% ; N : 1.18%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : $2.11 \cdot 10^{-1}$.

Résine de Wang benzaldéhyde greffée 88

La résine **87** (0.160 g) est mise en suspension dans 7.5 mL de CH₂Cl₂ et 2.5 mL de TFA sont ajoutés. La résine prend une couleur rouge orangé et le milieu réactionnel est agité à température ambiante sous argon pendant 2 heures. La résine est filtrée sur fritté et rincée plusieurs fois (CH₂Cl₂, H₂O et acétone). La résine est séchée jusqu'à poids constant pour donner **88** (0.161 g, billes de couleur jaune).

IR (ATR) : 1782.23 (CF₃COOH).

Δm : 1 mg.

Analyse élémentaire : C : 79.50% ; H : 6.46% ; N : 1.07%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine (CH₃CN) : $1.91 \cdot 10^{-1}$.

Préparation des résines ammoniums commerciales

Résine ammonium 89

Fournisseur : Sigma-Aldrich - référence : 63H0205

Nom commercial : Amberlite IRA-400

Matrice : Styrène / Divinylbenzène (gel)

Réticulation : 8%

Humidité : 40-47%

Taille des particules : 20 - 25 mesh (600 - 750 μm)

Capacité : 1.4 méq / mL de volume de lit mouillé

La résine Amberlite IRA-400 (15.0 g) est mise en suspension dans une colonne sur de la laine de verre puis rincée abondamment à l'eau (200 mL), HCl 1N (200 mL), eau (200 mL), NaOH 1N (170 mL), eau (200 mL), HCl 1N (200 mL) et eau (200 mL). Pour chacun des rinçages à HCl, H₂O et NaOH, les pH sont respectivement de 1, 7 et 14. La résine est ensuite collectée sur papier filtre et séchée sur P₂O₅ jusqu'à poids constant (7.51 g, billes de couleur jaune pâle).

IR (ATR) : 3100-3400 (C-N⁺) ; 1475.54 (C-N⁺).

Analyse élémentaire : C : 54.84% ; H : 6.86% ; N : 3.77%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 2.69.

Résine ammonium 90

Nom : Cholestyramine

Réticulation : 2%

2 sachets de Questran® (9.52 g) sont mis en suspension dans 100 mL d'eau et mis à agiter à température ambiante pendant la nuit. La suspension est ensuite filtrée sur fritté et rincée abondamment à l'eau (~700 mL de filtrat). La résine est ensuite rincée au méthanol (3 x 100 mL), au CH₂Cl₂ (3 x 100 mL) et à l'acétone (3 x 100 mL). La poudre obtenue est ensuite séchée sous vide jusqu'à poids constant (8.624 g, poudre de couleur blanche).

IR (ATR) : 3100-3400 (C-N⁺) ; 1479.40 (C-N⁺).

Analyse élémentaire : C : 64.45% ; H : 8.05% ; N : 4.98%.

Nombre de mmoles de motifs par gramme de résine : 3.56.

Bibliographie

- 1) Duce, G.; Fabry, J.; Nicolle, L. Prévention des infections nosocomiales 2ème édition - guide pratique **2008**.
- 2) Infections nosocomiales <http://www.inserm.fr/thematiques/microbiologie-et-maladies-infectieuses/dossiers-d-information/infections-nosocomiales> consultation le **10 Feb 2014**.
- 3) Coignard, B.; Thiolet, J.; Lacavé, L. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales **2006**.
- 4) Alekshun, M. N.; Levy, S. B. *Cell* **2007**, *128*, 1037–1050, "Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance".
- 5) Petrelli, D.; Repetto, A.; D'Ercole, S.; Rombini, S.; Ripa, S.; Prenna, M.; Vitali, L. A. *J. Med. Microbiol.* **2008**, *57*, 364–372, "Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital".
- 6) Wenzel, R. P. *J. Hosp. Infect.* **1995**, *31*, 79–87, "The economics of nosocomial infections".
- 7) The World Factbook <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/us.html> consultation le **1 Sep 2014**.
- 8) Azman, A. S.; Rudolph, K. E.; Cummings, D. A. T.; Lessler, J. *J. Infect.* **2013**, *66*, 432–438, "The incubation period of cholera: A systematic review".
- 9) The global plan to stop TB 2011-2015 http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf consultation le **8 Oct 2014**.
- 10) McManus, C. J.; Kelley, S. T. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 502–508, "Molecular survey of aeroplane bacterial contamination".
- 11) Golberg, A.; Belkin, M.; Rubinsky, B. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 881–886, "Irreversible Electroporation for Microbial Control of Drugs in Solution".
- 12) Mourer, M.; Duval, R. E.; Finance, C.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2960–2963, "Functional organisation and gain of activity: The case of the antibacterial tetra-para-guanidinoethyl-calix[4]arene".
- 13) Gutsche, C. D. *Calixarenes Revisited*; The Royal Society of Chemistry; **1998**.
- 14) Zerong, W. *Compr. Org. Name React. Reag.* **2010**, 3183–3196, "Zinke Synthesis".
- 15) Zinke, A.; Ziegler, E.; Sperk, E.; Troger, F.; Weinhardt, E. *J Prakt Chem* **1939**, *152*, 126.
- 16) Zinke, A.; Kretz, R.; Leggewie, E.; Hossinger, K.; Hoffmann, G.; Ostwalden, P.; Weber, V.; Wisenberger, E.; Sobotka, M. *Monatsh Chem* **1952**, 1213.
- 17) Dietrich, B. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1211–1212, "Calixarenes. Von C. D. Gutsche. Herausgegeben von J. F. Stoddart. Royal Society of Chemistry, London 1989. XII, 222 S., ISBN 0-85186-916-5".

- 18)** Gutsche, C. D. *Monographs in Supramolecular Chemistry*; The Royal Society of Chemistry.; **1998**.
- 19)** Ninagawa, A.; Matsuda, H. *Makromol Chem Rapid Commun* **1982**, *3*, 65, "Preparation of p-tert-butylcalix[8]arene derivatives and their properties".
- 20)** Gutsche, C. D.; Iqbal, M.; Stewart, D. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 742–745, "Calixarenes. 19. Syntheses procedures for p-tert-butylcalix[4]arene".
- 21)** Boehmer, V.; Marschollek, F.; Zetta, L. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3200–3205, "Calix [4] arenes with four differently substituted phenolic units".
- 22)** Goldmann, H.; Vogt, W.; Paulus, E.; Boehmer, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6811–6817, "A series of calix[4]arenes, having two opposite para positions connected by an aliphatic chain".
- 23)** Georgiev, E. M.; Wolf, N.; Roundhill, D. M. *Polyhedron* **1997**, *16*, 1581–1584, "Lower rim alkylammonium-substituted calix[4]arenes as "proton-switchable" extractants for chromate and dichromate anions".
- 24)** Beer, P. D.; Martin, J. P.; Drew, M. G. B. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9917–9928, "Calix[4]arene cryptand and new 1,3-bis-pyridyl-,bipyridyl and -alkylthioether calix[4]arenes designed to coordinate transition metal cations".
- 25)** Regnouf de Vains, J.-B.; Dalbavie, J.-O.; Lamartine, R.; Fenet, B. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2681–2684, "Quantitative solvent extraction from neutral aqueous nitrate media of silver(I) against lead(II) with a new calix[4]arene-based bipyridine podand".
- 26)** Mourer, M.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1895–1899, "New water-soluble calix[4]arene-based bipyridyl podands incorporating carboxylate groups".
- 27)** Horn, F.; Lidenmeier, G.; Grillhösl, C.; Moc, I.; Berghold, S.; Schneider, N.; Münster, B. *Biochimie humaine*; Flammarion; Médecine Sciences.; **2002**.
- 28)** Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. *Microbiologie*; 2ème édition.; de boeck: **2003**.
- 29)** Cornforth, J. W.; Hart, P.; Nicholls, G. A.; Rees, R. J. W.; Stock, J. A. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1955**, *10*, 73–86, "Antituberculous effects of certain surface-active polyoxoethylene ethers".
- 30)** Casnati, A.; Fabbi, M.; Pelizzi, N.; Pochini, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2699–2704, "Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arène based vancomycin mimics".
- 31)** Williams, D. H.; Bardsley, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1172–1193, "The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria".
- 32)** Williams, D. H.; Williamson, M. P.; Butcher, D. W.; Hammond, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1332–1339, "Detailed binding sites of the antibiotics vancomycin and ristocetin A: determination of intermolecular distances in antibiotic/substrate complexes by use of the time-dependent NOE".
- 33)** Bagnacani, V.; Sansone, F.; Donofrio, G.; Baldini, L.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3953–3956, "Macrocyclic Nonviral Vectors: High Cell Transfection Efficiency and Low Toxicity in a Lower Rim Guanidinium Calix[4]arene".

- 34)** Psychogios, N. *Univ. Henri Poincaré Nancy 1* **2003**, "Thèse - Synthèse de calixarènes hydrosolubles porteurs d'unités chélatantes. Evaluation des propriétés de complexation d'ions métalliques; étude toxicologique et évaluation des activités antivirales et antibactériennes."
- 35)** Grare, M.; Mourer, M.; Fontanay, S.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Finance, C.; Duval, R. E. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 575–581, "In vitro activity of para-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria".
- 36)** Dibama, H. M.; Clarot, I.; Fontanay, S.; Salem, A. B.; Mourer, M.; Finance, C.; Duval, R. E.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2679–2682, "Towards calixarene-based prodrugs: Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid/calix[4]arene ester adduct".
- 37)** Mourer, M.; Dibama, H. M.; Fontanay, S.; Grare, M.; Duval, R. E.; Finance, C.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5496–5509, "p-Guanidinoethyl calixarene and parent phenol derivatives exhibiting antibacterial activities. Synthesis and biological evaluation".
- 38)** Mourer, M.; Psychogios, N.; Laumond, G.; Aubertin, A.-M.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 36–45, "Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands".
- 39)** Mourer, M. *Univ. Henri Poincaré Nancy 1* **2006**, "Thèse - Calixarènes hydrosolubles à propriétés antivirales et antibactériennes".
- 40)** Yin, L. M.; Edwards, M. A.; Li, J.; Yip, C. M.; Deber, C. M. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7738–7745, "Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions".
- 41)** Formosa, C.; Grare, M.; Jauvert, E.; Coutable, A.; Regnouf-de-Vains, J. B.; Mourer, M.; Duval, R. E.; Dague, E. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, "Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain" <http://www.nature.com/doi/10.1038/srep00575>.
- 42)** Sautrey, G.; Orlof, M.; Korchowicz, B.; Regnouf de Vains, J.-B.; Rogalska, E. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 15002–15012, "Membrane Activity of Tetra- p - guanidinoethylcalix[4]arene as a Possible Reason for Its Antibacterial Properties".
- 43)** Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154, "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide".
- 44)** Gutte, B.; Merrifield, R. B. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1922–1941, "The synthesis of ribonuclease A".
- 45)** Martin, F. G.; Albericio, F. *Chem. Today* **2008**, *26*, 29, "Solid supports for the synthesis of peptides".
- 46)** Popova, E. A.; Nikolskaia, S. K.; Gluzdikov, I. A.; Trifonov, R. E. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5041–5046, "An efficient synthesis of a novel analog of octreotide with an unnatural l-lysine-like tetrazolyl amino acid".
- 47)** Bauer, W.; Briner, U.; Doepfner, W.; Haller, R.; Huguenin, R.; Marbach, P.; Petcher, T. J.; Pless, J. *Life Sci.* **1982**, *31*, 1133–1140, "SMS 201–995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action".

- 48)** Yang, J.; Li, P.; Wang, L. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5543–5549, "Merrifield resin supported phenanthroline–Cu(I): a highly efficient and recyclable catalyst for the synthesis of 2-aminobenzothiazoles via the reaction of 2-haloanilines with isothiocyanates".
- 49)** Pina-Luis, G.; Ochoa-Teran, A.; Rivero, I. A. *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 83–90, "Solid Phase Synthesis of *N*-Alkyl-bis-*o*-aminobenzamides for Metal Ion Sensing Based on a Fluorescent Dansyl Platform".
- 50)** Wang, S.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328–1333, "p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments".
- 51)** Yang, H.; Peng, Y.; Song, G.; Qian, X. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9043–9046, "Microwave-assisted preparation of functionalized resins for combinatorial synthesis".
- 52)** Guinó, M.; Kuok (Mimi) Hii, K. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3188, "Wang-aldehyde resin as a recyclable support for the synthesis of α,α -disubstituted amino acid derivatives".
- 53)** Ayres, J. T.; Charles, M. K. *Polym. Lett.* **1965**, *3*, 505–508, "Some chemical reactions of poly(p-chloromethylstyrene) resin in dimethylsulfoxide".
- 54)** Beebe, X.; Schore, N. E.; Kurth, M. J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4196–4203, "Polymer-supported synthesis of cyclic ethers: Electrophilic cyclization of isoxazolines".
- 55)** Kornblum, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4113–4114, "A new and selective method of oxidation. The conversion of alkyl halides and alkyl tosylates to aldehydes".
- 56)** Xie, L.; Favre-Reguillon, A.; Wang, X.-X.; Fu, X.; Vrinat, M.; Lemaire, M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 3973–3977, "Selective Extraction of Neutral Nitrogen-Containing Compounds from Straight-Run Diesel Feed Using Polymer-Supported Ionic Liquid Moieties".
- 57)** Favre-Reguillon, A.; Lemaire, M.; Pellet-Rostaing, S.; Fu, X.; Wang, X. Brevet, WO 2008/034885 A1, **2007**, "*Utilisation d'un matériau pour extraire des composés polyaromatiques ou azotés d'un mélange d'hydrocarbures de la gamme d'élution du diesel*".
- 58)** Kawabata, N.; Hayashi, T.; Matsumoto, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46*, 203–210, "Removal of bacteria from water by adhesion to cross-linked poly (vinylpyridinium halide)".
- 59)** Kawabata, N.; Nishiguchi, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2532–2535, "Antibacterial activity of soluble pyridinium-type polymers".
- 60)** Burguete, M. I.; Gavara, R.; Galindo, F.; Luis, S. V. *Catal. Commun.* **2010**, *11*, 1081–1084, "New polymer-supported photocatalyst with improved compatibility with polar solvents. Synthetic application using solar light as energy source".
- 61)** Son, Y.-A.; Sun, G. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *90*, 2194–2199, "Durable antimicrobial nylon 66 fabrics: Ionic interactions with quaternary ammonium salts".
- 62)** Schmidt, A.; Albrecht, M.; Mordhorst, T.; Topp, M.; Jeschke, G. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2793, "Studies on photocatalytically active materials containing structure elements of a pyridinium alkaloid from *Punica granatum*".
- 63)** Albrecht, M.; Yulikov, M.; Kohn, T.; Jeschke, G.; Adams, J.; Schmidt, A. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 3025, "Pyridinium salts and ylides as partial structures of photoresponsive Merrifield resins".

- 64)** Sahana, A.; Das, S.; Banerjee, A.; Lohar, S.; Karak, D.; Das, D. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185*, 1448–1457, "Pyridine appended L-methionine: A novel chelating resin for pH dependent Cr speciation with scanning electron microscopic evidence and monitoring of yeast mediated green bio-reduction of Cr(VI) to Cr(III) in environmental samples".
- 65)** Harris, S. J.; Barrett, G.; McKervey, M. A. *J Chem Soc Chem Commun* **1991**, 1224–1225, "Polymeric calixarenes. Synthesis, polymerisation and Na⁺ complexation of a calix [4] arene methacrylate".
- 66)** Alexandratos, S. D.; Natesan, S. *Macromolecules* **2001**, *34*, 206–210, "Synthesis and Ion-Binding Affinities of Calix[4]arenes Immobilized on Cross-Linked Polystyrene".
- 67)** Trivedi, U. V.; Menon, S. K.; Agrawal, Y. K. *React. Funct. Polym.* **2002**, *50*, 205–216, "Polymer supported calix [6] arene hydroxamic acid, a novel chelating resin".
- 68)** Engrand, P.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8863–8866, "A bifunctional calixarene designed for immobilisation on a natural polymer and for metal complexation".
- 69)** de Gaetano, Y.; Clarot, I.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 1339, "Selective complexation and extraction of Ag(I) and Zn(II) versus Pb(II) by polymer beads modified by attachment of a bipyridyl–calixarene-based chelate".
- 70)** Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 281–339, "Polymeric materials with antimicrobial activity".
- 71)** Li, G.; Shen, J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *78*, 676–684, "A study of pyridinium-type functional polymers. IV. Behavioral features of the antibacterial activity of insoluble pyridinium-type polymers".
- 72)** Li, G.; Shen, J.; Zhu, Y. *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *67*, 1761–1768, "Study of pyridinium-type functional polymers. II. Antibacterial activity of soluble pyridinium-type polymers".
- 73)** Sambhy, V.; Peterson, B. R.; Sen, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1250–1254, "Antibacterial and Hemolytic Activities of Pyridinium Polymers as a Function of the Spatial Relationship between the Positive Charge and the Pendant Alkyl Tail".
- 74)** Sharma, S. K.; Chauhan, G. S.; Gupta, R.; Ahn, J.-H. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 717–724, "Tuning anti-microbial activity of poly(4-vinyl 2-hydroxyethyl pyridinium) chloride by anion exchange reactions".
- 75)** Anderson, E. B.; Long, T. E. *Polymer* **2010**, *51*, 2447–2454, "Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications".
- 76)** Timofeeva, L. M.; Kleshcheva, N. A.; Moroz, A. F.; Didenko, L. V. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2976–2986, "Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity".
- 77)** Gelman, M. A.; Weisblum, B.; Lynn, D. M.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 557–560, "Biocidal activity of polystyrenes that are cationic by virtue of protonation".
- 78)** Gottenbos, B.; Gripma, D. W.; C. van der Mei, H.; Feijen, J.; Busscher, H. J. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 7–13, "Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria".

- 79)** McCubbin, P. J.; Forbes, E.; Gow, M. M.; Gorham, S. D. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *100*, 381–389, "Novel self-disinfecting surface".
- 80)** Dong, H.; Huang, J.; Koepsel, R. R.; Ye, P.; Russell, A. J.; Matyjaszewski, K. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1305–1311, "Recyclable Antibacterial Magnetic Nanoparticles Grafted with Quaternized Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) Brushes".
- 81)** Xing, C.; Xu, Q.; Tang, H.; Liu, L.; Wang, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13117–13124, "Conjugated Polymer/Porphyrin Complexes for Efficient Energy Transfer and Improving Light-Activated Antibacterial Activity".
- 82)** Mizerska, U.; Fortuniak, W.; Chojnowski, J.; Hałasa, R.; Konopacka, A.; Werel, W. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 779–787, "Polysiloxane cationic biocides with imidazolium salt (ImS) groups, synthesis and antibacterial properties".
- 83)** Gao, B.; Zhang, X.; Zhu, Y. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 531–544, "Studies on the preparation and antibacterial properties of quaternized polyethyleneimine".
- 84)** Waschinski, C. J.; Barnert, S.; Theobald, A.; Schubert, R.; Kleinschmidt, F.; Hoffmann, A.; Saalwächter, K.; Tiller, J. C. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1764–1771, "Insights in the Antibacterial Action of Poly(methyloxazoline)s with a Biocidal End Group and Varying Satellite Groups".
- 85)** Said, M.; Badshah, A.; Shah, N.; Khan, H.; Murtaza, G.; Vabre, B.; Zargarian, D.; Khan, M. *Molecules* **2013**, *18*, 10378–10396, "Antitumor, Antioxidant and Antimicrobial Studies of Substituted Pyridylguanidines".
- 86)** Zhang, Y.; Jiang, J.; Chen, Y. *Polymer* **1999**, *40*, 6189–6198, "Synthesis and antimicrobial activity of polymeric guanidine and biguanidine salts".
- 87)** Wei, D.-F.; Zhou, R.-H.; Zhang, Y.-W.; Guan, Y.; Zheng, A.-N. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *130*, 419–425, "Acrylonitrile copolymers containing guanidine oligomer: Synthesis and use for the preparation of nonleaching antimicrobial acrylic fibers".
- 88)** Ilker, M. F.; Nüsslein, K.; Tew, G. N.; Coughlin, E. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15870–15875, "Tuning the Hemolytic and Antibacterial Activities of Amphiphilic Polynorbornene Derivatives".
- 89)** Gabriel, G. J.; Madkour, A. E.; Dabkowski, J. M.; Nelson, C. F.; Nüsslein, K.; Tew, G. N. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2980–2983, "Synthetic Mimic of Antimicrobial Peptide with Nonmembrane-Disrupting Antibacterial Properties".
- 90)** Epand, R. F.; Raguse, L.; Gellman, S. H.; Epand, R. M. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43*, 9527–9535, "Antimicrobial 14-Helical β -Peptides: Potent Bilayer Disrupting Agents [†]".
- 91)** Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6848–6849, "Unexpected Relationships between Structure and Function in α,β -Peptides: Antimicrobial Foldamers with Heterogeneous Backbones".
- 92)** Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 417–428, "Interplay among Folding, Sequence, and Lipophilicity in the Antibacterial and Hemolytic Activities of α/β -Peptides".
- 93)** Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 5449–5453, "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor".

- 94)** Woo, G. L. Y.; Yang, M. L.; Yin, H. Q.; Jaffer, F.; Mittelman, M. W.; Santerre, J. P. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59*, 35–45, "Biological characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer synthesized with fluoroquinolones".
- 95)** Woo, G. L. Y.; Mittelman, M. W.; Santerre, J. P. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1235–1246, "Synthesis and characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer".
- 96)** Yang, M.; Santerre, J. P. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 134–141, "Utilization of Quinolone Drugs as Monomers: Characterization of the Synthesis Reaction Products for Poly(norfloxacin diisocyanatododecane polycaprolactone)".
- 97)** Patel, P.; Shah, B.; Ray, A.; Patel, R. *J. Polym. Res.* **2004**, *11*, 65–73, "Acrylic Homo-and Co-polymers Based on 2, 4-dichlorophenyl Methacrylate and 8-quinolinyl Methacrylate".
- 98)** Patel, M. V.; Dolia, M. B.; Patel, J. N.; Patel, R. M. *React. Funct. Polym.* **2005**, *65*, 195–204, "Synthesis and characterization of novel acrylic copolymers: Determination of monomer reactivity ratios and biological activity".
- 99)** Chen, Z.; Sun, Y. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2005**, *43*, 4089–4098, "Antimicrobial polymers containing melamine derivatives. II. Biocidal polymers derived from 2-vinyl-4,6-diamino-1,3,5-triazine".
- 100)** Liang, J.; Wu, R.; Wang, J.-W.; Barnes, K.; Worley, S. D.; Cho, U.; Lee, J.; Broughton, R. M.; Huang, T.-S. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *34*, 157–163, "N-halamine biocidal coatings".
- 101)** Kocer, H. B.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Huang, T. S. *React. Funct. Polym.* **2011**, *71*, 561–568, "A novel N-halamine acrylamide monomer and its copolymers for antimicrobial coatings".
- 102)** Hui, F.; Debiemme-Chouvy, C. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 585–601, "Antimicrobial N-Halamine Polymers and Coatings: A Review of Their Synthesis, Characterization, and Applications".
- 103)** Gant, T., G.; Sarshar, S. Brevet, WO 2008/049116 A2, **2008**, "Substituted Indoles".
- 104)** Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Monopoli, A.; Ongini, E.; Varani, K.; Borea, P. A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 115–126, "7-Substituted 5-Amino-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-*e*]-1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pyrimidines as A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists: A Study on the Importance of Modifications at the Side Chain on the Activity and Solubility".
- 105)** Kim, H. J.; Lee, W. S. Brevet, WO 2007/126262 A1, **2007**, "Anion receptor, and electrolyte using the same".
- 106)** Pitts, M. R.; Harrison, J. R.; Moody, C. J. *J Chem Soc Perkin Trans 1* **2001**, 955–977, "Indium metal as a reducing agent in organic synthesis".
- 107)** Bellamy, F. D.; Ou, K. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 839–842, "Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium".
- 108)** Beale, T. M.; Bond, P. J.; Brenton, J. D.; Charnock-Jones, D. S.; Ley, S. V.; Myers, R. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1749–1759, "Increased endothelial cell selectivity of triazole-bridged dihalogenated A-ring analogues of combretastatin A-1".

- 109)** Coleman, A. W.; Mbemba, C.; Falson, P.; Matar, R.; Huché, F. Brevet, WO 2009/144419 A1, **2009**, "Method for selectively extracting membrane proteins using calixarenes."
- 110)** Regnouf de Vains, J.-B.; Lamartine, R. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1817–1825, "Synthesis and Complexation Properties of a New Class of Receptors based on a cone-configured tetra-p-(tert-butyl)calix[4]arene and bipyridyl subunits."
- 111)** Xie, L.; Favre-Reguillon, A.; Wang, X.-X.; Fu, X.; Vrinat, M.; Lemaire, M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 3973–3977, "Selective Extraction of Neutral Nitrogen-Containing Compounds from Straight-Run Diesel Feed Using Polymer-Supported Ionic Liquid Moieties".
- 112)** Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*; Blackwell Publishing; 5ème édition.; **2010**; http://books.google.fr/books?id=cwe-Ebc64bkC&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- 113)** Li, X.; Eli, W. *J. Mol. Catal. Chem.* **2008**, *279*, 159–164, "A green approach for the synthesis of long chain aliphatic acid esters at room temperature".
- 114)** Musilek, K.; Komloova, M.; Zavadova, V.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Jung, Y.-S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1763–1766, "Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage—initial study for Myasthenia gravis implications".
- 115)** Avram, E.; Lisa, G. *Rev. Roum. Chim.* **2008**, *53*, 759–768, "Thermal degradation behaviour and kinetic analysis of polystyrene with pendant viologen groups".
- 116)** Song, Y.-F.; Long, D.-L.; Cronin, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3900–3904, "Noncovalently Connected Frameworks with Nanoscale Channels Assembled from a Tethered Polyoxometalate–Pyrene Hybrid".
- 117)** Tanaka, K.; Shiraishi, R. *Green Chem.* **2000**, *2*, 272–273, "Clean and efficient condensation reactions of aldehydes and amines in a water suspension medium".
- 118)** Schmeyers, J.; Toda, F.; Boy, J.; Kaupp, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 989–994, "Quantitative solid–solid synthesis of azomethines".
- 119)** Lampkins, A. J.; O'Neil, E. J.; Smith, B. D. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6053–6058, "Bio-orthogonal Phosphatidylserine Conjugates for Delivery and Imaging Applications".
- 120)** Ben Salem, A.; Sautrey, G.; Fontanay, S.; Duval, R. E.; Regnouf-de-Vains, J.-B. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7534–7540, "Molecular drug-organiser: Synthesis, characterization and biological evaluation of penicillin V and/or nalidixic acid calixarene-based podands".
- 121)** Poirier, D.; Roy, J.; Maltais, R. Brevet, WO 2012/129673 A1, **2012**, "Inhibitors of 17b-HSD1, 17b-HSD3 and 17b-HSD10".
- 122)** Danila, C.; Bolte, M.; Böhmer, V. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 172, "1,3-Alternate calix[4]arenes, selectively functionalized by amino groups".
- 123)** Baker, T. J.; Tomioka, M.; Goodman, M. *Org. Synth.* **2002**, *78*, 91, "PREPARATION AND USE OF N,N'-DI-BOC-N"-TRIFLYLGUANIDINE".

- 124)** Ponnaiah, R.; Prasad, A.; Panchasara, D. R.; Chavan, G. J.; Prajapati, B. H.; Patel, I. M. Brevet, WO 2010/070511 A2, **2010**, "A process for the preparation of Donepezil hydrochloride".
- 125)** Howard, C. H.; Arlington, D. T.; Everett, M. Brevet, US3316089A, **1967**, "Photographic products and processes utilizing cross-linking agents containing intralinear quaternary nitrogen atoms".
- 126)** Wichitnithad, W.; O'Callaghan, J. P.; Miller, D. B.; Train, B. C.; Callery, P. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7482–7492, "Time-dependent slowly-reversible inhibition of monoamine oxidase A by N-substituted 1,2,3,6-tetrahydropyridines".
- 127)** Panouse, J. S. *C R Acad Sci Paris* **1951**, *233*, 1200, "Reduction of quaternary pyridinium salts with potassium borohydride. Application to the preparation of arecoline and determination of the structure of dihydro codehydrases".
- 128)** Lyle, R. E.; Nelson, D. A.; Anderson, P. S. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 553–557, "The mechanism of the reduction of pyridinium ions with sodium borohydride".
- 129)** Grare, M.; Mourer, M.; Regnouf de Vains, J.-B.; Finance, C.; Duval, R.-E. *Pathol. Biol.* **2006**, *54*, 470–476, "Vers de nouvelles molécules antibactériennes. Intérêt du paraganidinoéthylcalix[4]arène".
- 130)** Ueno, H.; Yokota, K.; Hoshi, J.; Yasue, K.; Hayashi, M.; Hase, Y.; Uchida, I.; Aisaka, K.; Katoh, S.; Cho, H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3586–3604, "Synthesis and Structure–Activity Relationships of Novel Selective Factor Xa Inhibitors with a Tetrahydroisoquinoline Ring".
- 131)** Petitjean, O. La pollution de l'eau par les produits pharmaceutiques, une menace dont on commence seulement à prendre la mesure <http://www.partagedeseaux.info/article16.html> consultation le **23 Sep 2014**.
- 132)** Penicillin V Potassium Oral - AHFS® Consumer Medication Information <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a685015.html> consultation le **23 Sep 2014**.
- 133)** DrugBank - Nalidixic Acid <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00779> consultation le **23 Sep 2014**.
- 134)** DrugBank - Penicillin V <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00417> consultation le **23 Sep 2014**.
- 135)** Brissaud, F. La réutilisation des eaux usées urbaines <http://www.senat.fr/rap/l02-215-2/l02-215-277.html> consultation le **5 Dec 2014**.
- 136)** Krishnamurthy, K. *Decontamination of milk and water by pulsed UV-light and infrared heating*; ProQuest: **2006**; <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Uo0L4KBhDE4C&oi=fnd&pg=PR15&dq=%22Reductions+of+0.10+to+8.41+log10+CFU/ml+were+obtained+for+treatments+up+%22+%22in+activation+mechanism+for+pulsed+UV-light+and+infrared+heating%22+%22with+pulsed+UV-light,+cell+wall+breakage,+cytoplasm+leakage,+damage+in%22+&ots=MA-9gTDxwO&sig=9gGVhqYekZK0-QDJAMQ1g9aL-Gw>
- 137)** Hjertén, S.; Elenbring, K.; Kilar, F.; Liao, J.-L.; Chen, A. J. C.; Siebert, C. J.; Zhu, M.-D. *J. Chromatogr. A* **1987**, *403*, 47–61, "Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus".

- 138)** Rouessac, F.; Rouessac, A. *Analyse chimique*; 6ème édition.; Dunod.
- 139)** Anres, P. *Univ. Pierre Marie Curie* **2012**, "Thèse - Développement de nouvelles méthodologies de préconcentration électrocinétique in-situ en électrophorèse capillaire pour l'analyse de traces" http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/74/46/59/PDF/ANRES_Philippe_-_These.pdf.
- 140)** Armstrong, D. W.; Schulte, G.; Schneiderheinze, J. M.; Westenberg, D. J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5465–5469, "Separating Microbes in the Manner of Molecules. 1. Capillary Electrokinetic Approaches".
- 141)** Armstrong, D. W.; Schneiderheinze, J. M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4474–4476, "Rapid Identification of the Bacterial Pathogens Responsible for Urinary Tract Infections Using Direct Injection CE".
- 142)** Palenzuela, B.; Simonet, B. M.; García, R. M.; Ríos, A.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3012–3017, "Monitoring of Bacterial Contamination in Food Samples Using Capillary Zone Electrophoresis".
- 143)** Szumski, M.; Kłodzińska, E.; Buszewski, B. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1084*, 186–193, "Separation of microorganisms using electromigration techniques".
- 144)** Oukacine, F.; Garrelly, L.; Romestand, B.; Goodall, D. M.; Zou, T.; Cottet, H. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1571–1578, "Focusing and Mobilization of Bacteria in Capillary Electrophoresis".
- 145)** Burg, T. P.; Godin, M.; Knudsen, S. M.; Shen, W.; Carlson, G.; Foster, J. S.; Babcock, K.; Manalis, S. R. *Nature* **2007**, *446*, 1066–1069, "Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid".
- 146)** Neidhardt, F. C.; Curtiss, R.; Ingraham, J. L.; Lin, E. C. C.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Reznikoff, W. S.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umberger, H. E. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*; Umberger Eds.; ASM Press: **1996**; Vol. 1.
- 147)** Guideline, I. H. T. Text on validation of analytical procedures <http://members3.jcom.home.ne.jp/yrq01133/ctd/quality/q2a/q2astep4.pdf> consultation le **10 Sep 2014**.
- 148)** Le Saux, M. Mise en culture des bactéries lyophilysées <http://www-intranet.angers.inra.fr/cfbp/culture.html> consultation le **29 Sep 2014**.
- 149)** Filion, M. Microbiologie - La croissance http://www8.umoncton.ca/umcm-filion_martin/cours/microbiologie/Chapitre%206.pdf consultation le **29 Sep 2014**.
- 150)** Ebersole, R. C.; McCormick, R. M. *Nat. Biotechnol.* **1993**, *11*, 1278–1282, "Separation and Isolation of Viable Bacteria by Capillary Zone Electrophoresis".
- 151)** Alvaro, M.; Aprile, C.; Atienzar, P.; Garcia, H. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 7692–7697, "Preparation and Photochemistry of Single Wall Carbon Nanotubes Having Covalently Anchored Viologen Units".
- 152)** Cholestyramine resin
http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/errata467CholestyramineResin.pdf
consultation le **14 Oct 2014**.

153) Grenier, M. C.; Davis, R. W.; Wilson-Henjum, K. L.; LaDow, J. E.; Black, J. W.; Caran, K. L.; Seifert, K.; Minbiole, K. P. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4055–4058, "The antibacterial activity of 4,4'-bipyridinium amphiphiles with conventional, bicephalic and gemini architectures".

154) Gaulin, E. Cours de microscopie confocale http://w3.cie.u.univ-tlse2.fr/fr/3-1_La%20recherche/doc/CF_Principe.pdf consultation le **18 Sep 2014**.

155) Resins for Solid Phase Peptide Synthesis - Core Resins <http://www.aapptec.com/resins-solid-phase-peptide-synthesis-core-resins-i-250.html> consultation le **15 Oct 2014**.

156) Madec, J.-Y.; Decousser, J.-W.; Fortineau, N.; Haenni, M.; Jouy, E.; Kempf, I. Antibiogramme vétérinaire du comité de l'antibiogramme e la société française de microbiologie <http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2013vjuin.pdf> consultation le **16 Sep 2014**.

157) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6 **2007**.

COMPOSES POLYIONIQUES CONTRAINTS BIOACTIFS LIBRES ET SUPPORTES. ACCES A DE NOUVEAUX MATERIAUX ANTIBACTERIENS

La mise au point de nouveaux matériaux possédant des propriétés antibactériennes est un sujet intéressant le monde médical et environnemental. Pour cela, les polymères commerciaux de Merrifield et de Wang-benzaldéhyde ont été modifiés par greffage de motifs calixaréniques polycationiques antibactériens inspirés des travaux du laboratoire et désignés pour interagir avec la surface bactérienne chargée négativement. Ces calixarènes ont été modifiés sur la partie basse, de façon contrôlée, par incorporation d'un groupe espaceur fonctionnel permettant d'accéder à un greffage ciblé du polymère.

Nous avons en premier lieu évalué plusieurs types de fonctionnalités introduites sur le calixarène, permettant la fixation de ces motifs sur le support polymérique. Ainsi une amination réductrice a été choisie pour l'ancrage sur la résine de Wang-benzaldéhyde, tandis qu'un point d'ancrage de type pyridinium, pour la résine de Merrifield, a retenu notre attention et s'est avéré être un excellent candidat pour le greffage des calixarènes.

La validité de ce point d'ancrage pyridinium a pu être vérifiée par l'incorporation d'une sonde fluorescente (pyrène) et caractérisée par fluorescence à l'état solide, par spectroscopie infrarouge et analyse élémentaire, ces deux dernières étant appliquées à l'ensemble des polymères préparés par la suite.

Au travers d'une étude de capture –relargage en milieu aqueux de deux antibiotiques carboxyliques (type quinolone et β -lactame) le polymère pyridinium modèle, sans calixarène, a montré tout son intérêt, face à la cholestyramine (Questran[®]) ou à l'Amberlite IRA-400, en tant que résine échangeuse d'anions et pouvant mener à une utilisation en tant que dépolluant/décontaminant.

En amont des études antibactériennes de ces nouveaux matériaux nous avons cherché à quantifier la capacité du matériau à retenir/séquestrer des bactéries. L'électrophorèse capillaire, méthode analytique rapide et sensible, s'est présentée comme une solution adéquate. Sur le modèle *E. coli.*, les résines polycationiques synthétisées ont été évaluées en tant que séquestrants en milieu aqueux. Les résultats obtenus prouvent l'efficacité de certaines d'entre elles; la capture a finalement été confirmée par microscopie de fluorescence confocale. Le nombre de bactéries fixées à la surface du matériau a pu être visuellement évalué.

Mots-Clés : calixarène, antibactérien, supporté, polymère, résine, polycation, électrophorèse capillaire.

FREE AND SUPPORTED BIOACTIVE STRAINED POLYIONIC COMPOUNDS. ACCESS TO NEW ANTIBACTERIAL MATERIALS

Development of new materials with antibacterial properties is a major concern in medical and environmental world. It's for that reason that, Merrifield and Wang commercial polymers were modified by grafting polycationic calixarenic sub-units inspired by laboratory work and designed to interact with negatively charged bacterial surface. Those calixarenes were modified on the lower part, in a controlled manner, by the incorporation of a functional spacer group leading to a targeted grafting of the polymer.

We have, at first, evaluated several kinds of functionalities introduced on the calixarene, giving us the opportunity to graft them on the polymeric support. Like this, a reductive amination was chosen to anchor the Wang-benzaldehyde resin, whereas a pyridinium anchoring point was pointed out as a very good candidate for the grafting of calixarenes.

The validation of this pyridinium anchoring point was checked by incorporation of a fluorescent probe (pyrene) and characterized by solid state fluorescence, by infrared spectroscopy, those two last analysis were applied for all the other grafted polymers grafted after that. Through a capture-release study in aqueous media of two carboxylic antibiotics (quinolone and β -lactame kind), the pyridinium polymer model, without calixarène, showed his interest faced to Cholestyramine (Questran[®]) or Amberlite IRA-400, as an anion exchange resin and leading to depolluting/decontamination applications.

Before antibacterial studies of thoses new materials, we wanted to find a way to quantify the material capacity to catch/hold bacteria. Capillary electrophoresis, rapid and sensitive analytical method, appeared as a perfect solution. Using *E. coli* model, synthesized polycationic resins were evaluated as sequestering agent in aqueous media. Results obtained prove the efficiency of some of them; capture was finally confirmed by confocal fluorescent microscopy. The number of bacteria fixed by material surface could be visually evaluated.

Keywords : calixarene, antibacterial, supported, polymer, resin, polycation, capillary electrophoresis