

Université de Montréal

**Axe et Rotaxane Parapluie : vers de nouveaux
transporteurs transmembranaires de chlorures et de
médicaments cycliques**

par

Christine Chhun

Département de Chimie

Faculté des Arts et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D)
en Chimie

Janvier 2012

© Christine Chhun, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Axe et Rotaxane Parapluie : vers de nouveaux transporteurs transmembranaires de chlorures et de médicaments cycliques

Présentée par :
Christine Chhun

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

James Wuest, président-rapporteur
Andreea R. Schmitzer, directrice de recherche
Richard Giasson, membre du jury
Normand Voyer, examinateur externe
Carlos Silva, représentant du doyen de la FES

Résumé

La membrane cellulaire est principalement une bicouche phospholipidique constituant une barrière qui régule les échanges entre la cellule et son environnement. Son intérieur hydrophobe empêche le passage d'espèces hydrophiles, chargées, de grande masse moléculaire et polaires, qui sont généralement transportées par des protéines à travers la bicouche. Dans certains cas de systèmes défectueux (e.g. les canalopathies), l'équilibre des concentrations en ions à l'intérieur et à l'extérieur des cellules est perturbé et les cellules sont compromises. C'est pourquoi le développement de transporteurs transmembranaires synthétiques est nécessaire.

De nombreux travaux ont été faits dans le développement de transporteurs synthétiques d'anions (particulièrement du chlorure). Dans cette thèse, nous présentons nos travaux sur un nouveau transporteur d'anion appelé axe parapluie, capable de changer de conformation dépendamment de la polarité de son environnement. Dans un premier temps, nous avons conçu le design, puis synthétisé ces axes parapluie qui montrent une importante activité en tant que transporteur de chlorures. Ces composés réunissent deux concepts :

- Le parapluie, constitué d'acides biliaires amphiphiles (une face hydrophile, une face hydrophobe). La flexibilité des articulations combinée à la grande surface des acides choliques permettent d'empêcher les interactions défavorables entre les parties hydrophiles et hydrophobes, ce qui facilite l'insertion dans la bicouche.
- Un site ammonium secondaire en tant que site de reconnaissance, capable de former des ponts hydrogène avec des ions chlorure.

De plus, l'axe peut complexer une roue de type éther couronne pour former un pseudo-rotaxane ou rotaxane parapluie ce qui résulte en l'inhibition partielle de leurs propriétés de transport.

Ceci nous mène au second objectif de cette thèse, le développement d'un nouveau moyen de transport pour les médicaments cycliques. Certains macrocycles polaires et biologiquement actifs tels que les nactines ont besoin d'atteindre leur objectif à l'intérieur de la cellule pour jouer leur rôle. La membrane cellulaire est alors un obstacle. Nous avons imaginé tirer profit de notre axe parapluie pour transporter un médicament cyclique (en tant que roue d'un rotaxane parapluie). Les assemblages des rotaxanes parapluie furent accomplis par la méthode de clipage.

Le comportement de l'axe et du rotaxane parapluie fut étudié par RMN et fluorimétrie. Le mouvement du parapluie passant d'une conformation fermée à exposée dépendamment du milieu fut observé pour le rotaxane parapluie. Il en fut de même pour les interactions entre le rotaxane parapluie et des vésicules constituées de phospholipides.

Finalement, la capacité du rotaxane parapluie à franchir la bicouche lipidique pour transporter la roue à l'intérieur de la vésicule fut démontrée à l'aide de liposomes contenant de la α -chymotrypsine. Cette dernière pu cliver certains liens amide de l'axe parapluie afin de relarguer la roue.

Mots-clés : Parapluie moléculaire, acide cholique, amphiphilie faciale, conformation, axe, rotaxane, transport transmembranaire, bicouche phospholipidique, liposome, transport de chlorures, médicament cyclique, ponts hydrogène, enzyme.

Abstract

The cell membrane is a phospholipid bilayer barrier that controls the exchanges between the cell and its environment. Its hydrophobic core prevents the entrance of hydrophilic, charged or large polar species that are transported through the bilayer by proteins. In some dysfunctional systems (e.g. channelopathies), the balance of ion concentrations between the interior and exterior of the cell is no longer insured and the cell's health is compromised. That is why the synthesis of synthetic transmembrane transporters is needed.

There have been many synthetic anion carriers (especially chloride) developed in this area using different strategies. In this thesis we present our work on a new anion transporter, an umbrella thread. First, we designed and synthesized umbrella threads that showed significant chloride transport activity. These compounds combine two concepts:

- the umbrella moiety, made from facial amphiphilic bile acids. The flexibility and large surface of the cholic acids can shield disfavored interactions between hydrophilic and hydrophobic elements that should ease their insertion into the bilayer.
- a secondary ammonium recognition site on the thread that can form hydrogen bonds with chloride ions.

Furthermore, the thread moiety is able to complex a crown-ether like wheel to form an umbrella pseudo-rotaxane or rotaxane that showed partially inhibited properties for chloride transport.

This leads us to the second goal of this thesis, i.e. the development of a new vehicle for drug delivery. Some biologically active polar macrocycles (e.g. nactins) need to reach their target inside the cell to be efficient. The cell membrane also represents an obstacle here. In our work, we imagined using an umbrella thread as the vehicle for the cyclic drug

(as the wheel of the umbrella rotaxane). The umbrella rotaxanes were successfully assembled by the clipping method.

The behavior of both the umbrella thread and umbrella rotaxane was extensively studied by NMR and fluorimetry. The umbrella motion from a shield conformation to an exposed one depending on the environment was observed for the rotaxane. Interactions between the umbrella rotaxane and phospholipid vesicles were also noticed.

Finally, its ability to cross the lipid bilayer to deliver the wheel inside the vesicle was shown with α -chymotrypsin-filled liposome assays. This enzyme was able to cleave amide bonds on the umbrella thread to release the wheel.

Keywords : Molecular umbrella, cholic acid, facial amphiphilicity, conformation, thread, rotaxane, transmembrane transport, phospholipid bilayer, liposome, chloride transport, cyclic drug, hydrogen bonding, enzyme.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des schémas.....	xv
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xxii
Chapitre 1 Introduction générale.....	1
1.1. Transport d'ions.....	3
1.1.1. Canaux et pompes : principes.....	3
1.1.2. Transporteurs d'anions.....	5
1.1.2.1. Transporteurs naturels.....	7
1.1.2.2. Transporteurs synthétiques.....	8
1.1.2.2.1. Récepteurs versus transporteurs.....	8
1.1.2.2.2. Mobiles.....	9
1.1.2.2.3. Canaux monomériques.....	13
1.1.2.2.4. Auto-assemblage.....	14
1.1.3. Conclusion.....	18
1.2. Transport de grosses molécules polaires.....	19
1.2.1. Exemples.....	19
1.2.2. Parapluies moléculaires.....	22
1.2.2.1. Principes.....	22
1.2.2.1.1. Structure.....	22
1.2.2.1.2. Mécanisme de transport.....	24
1.2.2.2. Entités transportées.....	29
1.2.3. Conclusion.....	30

1.3.	Rotaxane.....	31
1.3.1.	Molécules enchevêtrées	31
1.3.2.	Assemblage de rotaxanes	32
1.3.3.	Applications	36
1.3.4.	Conclusion	39
1.4.	Axe et rotaxane parapluie.....	40
1.4.1.	Concept	40
1.4.2.	Mécanisme de transport proposé.....	41
1.4.3.	Objectifs	42
	Chapitre 2 Les axes parapluie	44
2.1.	Design	44
2.2.	Synthèse des axes parapluie dibenzylammonium	47
2.2.1.	Première voie de synthèse.....	47
2.2.2.	Deuxième voie de synthèse.....	53
2.3.	Synthèse de l'axe parapluie linéaire.....	56
2.3.1.	Première voie de synthèse.....	56
2.3.2.	Deuxième voie de synthèse.....	60
2.4.	Conclusion	61
	Chapitre 3 Assemblage du rotaxane-parapluie	62
3.1.	Encapage par le parapluie	62
3.1.1.	Mise en évidence de la complexation	63
3.1.2.	Essais avec différents agents de couplage.....	71
3.1.3.	Dérivation du parapluie.....	74
3.1.4.	Protection du parapluie	79
3.2.	Clipage	81
3.2.1.	Synthèse des clips	81
3.2.2.	Assemblage par clipage	83
3.3.	Encapage sur l'axe parapluie : études préliminaires	86
3.4.	Conclusion	90

Chapitre 4 Repliement et changement de conformation.....	91
4.1. Etude RMN de l'axe parapluie.....	91
4.2. Etude RMN du rotaxane.....	98
4.3. Etude par fluorimétrie du rotaxane	104
4.4. Conclusion	107
Chapitre 5 Étude du transport de chlorures.....	109
5.1. Méthodes.....	109
5.1.1. Liposome : modèle de membrane cellulaire	109
5.1.2. Détection des ions chlorure.....	110
5.1.3. Méthodes utilisées.....	112
5.2. Cinétique de transport de chlorures.....	114
5.2.1. Axes parapluie.....	114
5.2.2. Pseudo-rotaxane parapluie et rotaxanes parapluie	119
5.3. Mécanisme de transport	123
5.4. Conclusion	128
Chapitre 6 Transport de macrocycle et relargage	130
6.1. Essai de passage transmembranaire	130
6.2. Relargage : tests préliminaires	132
6.2.1. Choix de l'enzyme	132
6.2.2. Essais expérimentaux et résultats.....	134
6.3. Relargage in situ.....	136
6.4. Conclusion	138
Chapitre 7 Conclusion générale et perspectives.....	139
7.1. Retour sur les résultats obtenus et discussion	139
7.2. Perspectives.....	141
Partie expérimentale.....	143
Généralités	143
Protocoles expérimentaux	144
Synthèse	144

Préparation des liposomes.....	144
Pour les tests à la lucigénine	145
Pour les tests à la HPTS	145
Pour les tests de transport.....	146
Pour les tests de transport et digestion par l' α -chymotrypsine	146
Etude de repliement par fluorescence	147
Dans un mélange de solvants	147
En présence de liposomes	147
Cinétiques de transport de chlorures	147
Essais avec les liposomes contenant la lucigénine.....	147
Essais avec les liposomes contenant la HPTS	147
Test de transport du rotaxane parapluie 3.39	148
Test de digestion par l' α -chymotrypsine.....	148
Test préliminaire	148
Test in situ.....	149
Bibliographie.....	150
ANNEXE	I

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Concentration intra et extracellulaire des ions présents dans une cellule mammifère.	1
Tableau 2.1. Conditions testées pour la déprotection des amines.	51
Tableau 2.2. Criblage des agents de couplage.	55
Tableau 2.3. Essais de déprotection.	60
Tableau 3.1. Pourcentage de pseudo-rotaxane formé à différents temps à température ambiante.	71
Tableau 3.2. Tentatives de fermeture de rotaxane à l'aide d'un agent de couplage.	72
Tableau 3.3. Couplage du parapluie sur le rotaxane-DCC.	74
Tableau 3.4. Déprotection du parapluie-Gly-Boc en milieu acide.	75
Tableau 3.5. Couplage du rotaxane-DCC 3.5 avec le parapluie-Gly 3.9	76
Tableau 3.6. Couplage des rotaxanes-DCC avec le parapluie-GABA 3.10	78
Tableau 4.1. Différences de déplacement chimique des pics entre les spectres RMN ¹ H de 2.20 enregistrés dans le CDCl ₃ et le CD ₃ OD.	93

Liste des figures

Figure 1.1. Représentation schématique d'une membrane cellulaire.	2
Figure 1.2. Perméabilité d'une bicouche phospholipidique envers différents composés.	2
Figure 1.3. Sites de liaisons des protéines de transport. A) Pompe LeuT Na ⁺ (PDB 2A65). B) Canal KcsA K ⁺ (PDB 1K4C). C) Pompe Ca ²⁺ ATPase (PDB 1EUL). D) Échangeur mutant CIC Cl ⁻ /H ⁺ (PDB 1OTU).	5
Figure 1.4. Schéma des modes de transport. A) Un canal. B) Un transporteur mobile.	6
Figure 1.5. Schéma représentant les deux mécanismes de co-transport. A) L'antiport. B) Le symport.	6
Figure 1.6. Structures de transporteurs naturels. A) La paramycine. B) La duramycine. C) La prodigiosine.	7
Figure 1.7. Récepteurs d'anion. A) Tripode. B) Calix[4]pyrrole. C) Cholapode.	9
Figure 1.8. Acides biliaires utilisés pour le développement des cholapodes.	10
Figure 1.9. Exemples de cholapodes.	10
Figure 1.10. Dérivés de la prodigiosine.	12
Figure 1.11. Mécanisme de transport de CsCl proposé pour 1.5	12
Figure 1.12. « Strapped » calix[4]pyrroles.	13
Figure 1.13. Dérivés de tren.	13
Figure 1.14. Dérivé de cyclodextrine.	14
Figure 1.15. Auto-assemblage de canaux synthétiques. A) Peptide synthétique et son insertion dans un feuillet de bicouche lipidique. B) Calix[4]arène et sa dimérisation en présence d'ions chlorure. C) Calix[4]arène (cône partiel) et son auto-assemblage. D) Stérolpolyamine et son insertion dans un feuillet de bicouche lipidique.	15
Figure 1.16. Canaux synthétiques appliquant les interactions π -anion.	16
Figure 1.17. Cycles urée/amide et leur mécanisme de transport proposé.	17
Figure 1.18. Composés dont l'agrégation s'organise en pores.	18
Figure 1.19. Divers transporteurs.	20
Figure 1.20. Transporteurs d'acides nucléiques.	21

Figure 1.21. Exemples de parapluies moléculaires.....	24
Figure 1.22. A) Parapluies moléculaires contenant un pont disulfure. B) Équation de la réaction d'échange entre le parapluie moléculaire et le glutathion (GSH).	25
Figure 1.23. Mécanisme proposé pour le transport transmembranaire des parapluies moléculaires.	26
Figure 1.24. Conformations possibles favorisées lors du transport transmembranaire.	28
Figure 1.25. Exemples de composés dérivés par un parapluie moléculaire et transportés. .	29
Figure 1.26. Exemples de rotaxanes mettant en jeu différents types d'interactions.	32
Figure 1.27. Représentation schématique d'un [2]-rotaxane.	33
Figure 1.28. Représentation schématique de l'assemblage d'un [2]-rotaxane. A) Enfilage et encapage. B) Clipage. C) Glissement.	33
Figure 1.29. Principes de la chimie covalente dynamique pour la formation de rotaxane. A) Enfilage/encapage. B) Clipage.....	35
Figure 1.30. Exemple de [2]-rotaxane bistable greffé sur des électrodes.	37
Figure 1.31. Application des nanovalves pour le transport de médicament : principe.	38
Figure 1.32. Exemples de rotaxane avec application biologique.....	39
Figure 1.33. Ionophores. A) La famille des nactines. B) Exemples d'éthers couronne.....	41
Figure 1.34. Mécanisme hypothétique du transport transmembranaire.....	42
Figure 2.1 Structure générale du rotaxane-parapluie.	45
Figure 3.1. Assemblage par encapage du parapluie.....	62
Figure 3.2. Spectres RMN ^1H 400 MHz de a) 3.2 b) 3.2 /DB18C6 après 24 h c) DB18C6 d) 3.1 /DB18C6 après 24 h e) 3.1 f) 3.1 /DB24C8 après 24 h et g) DB24C8 dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ 1/1 à température ambiante.	64
Figure 3.3. Spectres RMN ^1H 400 MHz de a) 3.1 b) 3.1 /DB24C8 après 24 h c) DB24C8 d) 3.2 /DB24C8 après 24 h et e) 3.2 dans CDCl_3 à température ambiante.....	65
Figure 3.4. Spectres RMN ^1H 400 MHz de a) 3.1 b) 3.1 /DB24C8 après 24 h c) DB24C8 d) 3.2 /DB24C8 après 24 h et e) 3.2 dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ 3/1 à température ambiante. ...	67
Figure 3.5. Spectres RMN ^1H 400 MHz et agrandissements de a) DB24C8 b) 3.1 /DB24C8 1/2 après 15 min et c) 3.1 dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ 3/1 à température ambiante..	68

Figure 3.6. Spectres RMN ^1H 400 MHz et agrandissements de a) DB24C8 b) 3.2 /DB24C8 1/2 après 24 h et c) 3.2 dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ 3/1 à température ambiante.....	70
Figure 3.7. Assemblage par clipage de la roue.	83
Figure 3.8. Agrandissement des spectres RMN ^1H 400 MHz d'une solution d'axe parapluie 2.23 à 1 mM dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{CN}$ 1/9 avec a) 6 éq b) 5 éq c) 4 éq d) 3 éq e) 2 éq f) 1 éq et g) 0 éq de roue 3.35 à température ambiante.....	87
Figure 3.9. Spectres d'émission d'une solution de 2.23 avec différents nombres d'équivalents de roue 3.36 à température ambiante.	88
Figure 3.10. Courbe de titrage de l'axe parapluie 2.23 avec la roue fluorescente 3.36	88
Figure 3.11 Spectres UV d'une solution de 2.23 avec différents nombres d'équivalents de roue 3.36 à température ambiante.....	89
Figure 4.1. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapluie protégé 2.20 à 5×10^{-2} M dans a) CD_3OD et b) CDCl_3 à température ambiante.....	92
Figure 4.2. Agrandissement du spectre ROESY 700 MHz de l'axe parapluie protégé 2.20 dans a) CD_3OD et b) CDCl_3 à 5×10^{-2} M.....	94
Figure 4.3. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapluie déprotégé 2.22 à 5×10^{-2} M dans a) CD_3OD et b) $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{CN}$ 1/1 à température ambiante.....	96
Figure 4.4. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapluie déprotégé 2.22 à 5×10^{-2} M dans CD_3OD à a) 5°C , b) température ambiante et c) 40°C	97
Figure 4.5. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapluie déprotégé 2.22 à 5×10^{-2} M dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{CN}$ 1/1 à a) 5°C , b) température ambiante et c) 40°C	98
Figure 4.6. Spectres RMN ^1H 400 MHz de a) l'axe parapluie 2.24 b) le rotaxane parapluie 3.37 et c) la roue 3.35 dans le CD_3OD à température ambiante.	99
Figure 4.7. Spectres RMN ^1H 400 MHz du rotaxane parapluie 3.37 dans a) CD_3CN b) CD_3OD et c) $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1 à température ambiante.....	100
Figure 4.8. Agrandissements des spectres RMN ^1H 400 MHz du rotaxane parapluie 3.37 dans a) CD_3CN b) CD_3OD et c) $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1 à température ambiante.	101
Figure 4.9. Spectres RMN ROESY 300 MHz du rotaxane parapluie 3.37 dans a) CD_3CN et b) CD_3OD à température ambiante.	103

Figure 4.10. Diagramme de Jablonski : relaxation du solvant. ¹⁶¹	105
Figure 4.11. Spectres d'émission d'une solution du rotaxane parapluie fluorescent 3.38 dans différents mélanges a) MeOH/CCl ₄ et b) MeOH/H ₂ O (50/1, 10/1, 1/1, 1/10 et 1/50) à 2 μM.....	106
Figure 4.12. Conformation favorisée selon la polarité du milieu.	107
Figure 5.1. Représentation schématique d'organisations sphériques de phospholipides...	109
Figure 5.2. Formation de liposomes.....	110
Figure 5.3. Diagramme des niveaux d'énergie. A) Après excitation de la lucigénine. B) Lors de la formation du complexe de transfert de charge. C) Au retour à l'état fondamental.....	111
Figure 5.4. Schéma des tests de transport avec la lucigénine..	112
Figure 5.5. Suivi par fluorescence A) en l'absence de transporteur et B) en présence de transporteur.	113
Figure 5.6. HPTS : forme protonnée et déprotonnée.	113
Figure 5.7. Molécules testées dans les études de transport.	114
Figure 5.8. Tests de transports avec des liposomes d'α-phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de A) lucigénine et NaCl ou B) HPTS et NaCl avec une solution extravésiculaire de NaNO ₃	115
Figure 5.9. Tests de transports avec des liposomes d'α-phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de lucigénine et NaCl avec une solution extravésiculaire de NaNO ₃ , NaHCO ₃ ou Na ₂ SO ₄	117
Figure 5.10. Tests de transports avec des liposomes d'α-phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de lucigénine et NaCl avec une solution extravésiculaire de NaNO ₃	118
Figure 5.11. Tests de transports avec des liposomes d'α-phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de A) lucigénine et NaCl 100 mM ou B) HPTS et NaCl avec une solution extravésiculaire de NaNO ₃	120
Figure 5.12. Tests de transports avec des liposomes d'α-phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de lucigénine et NaCl 100 mM et courbes dose-réponse pour	

A) le rotaxane parapluie 3.37 et B) le rotaxane parapluie fluorescent 3.39 avec une solution extravésiculaire de NaNO ₃	122
Figure 5.13. Modélisation moléculaire. Simulation de dynamique moléculaire de l'axe parapluie 2.23 dans une bicouche de phosphatidylcholines entourée de couches de 15 Å d'eau à A) 19 ns et B) 50 ns.....	124
Figure 5.14. Modélisation moléculaire. Auto-assemblage de l'axe parapluie 2.23 dans un milieu hydrophobe.	126
Figure 5.15. Spectres d'émission du rotaxane parapluie fluorescent 3.39 dans une solution tampon phosphate et NaNO ₃ en présence et en absence de liposomes.....	127
Figure 5.16. Positionnements possibles du rotaxane parapluie dans la bicouche.....	128
Figure 6.1. Procédure de suivi du passage du rotaxane parapluie fluorescent 3.39	131
Figure 6.2. Mécanisme d'hydrolyse de la triade catalytique de l' α -chymotrypsine.	133
Figure 6.3. Représentation du test de relargage de la roue dans un liposome.	136
Figure 6.4. Fragments possibles issus de l'hydrolyse d'un ou plusieurs liens amide.	137
Figure 7.1. Design d'un nouvel axe parapluie et assemblage du rotaxane parapluie par encapsage.....	141

Liste des schémas

Schéma 2.1. Première voie de rétrosynthèse générale des axes parapluie dibenzyle.	47
Schéma 2.2. Synthèse des deux axes dibenzylammonium protégé.	49
Schéma 2.3. Protection sélective des bras et couplage à l'axe.....	51
Schéma 2.4. Activation de l'acide cholique et formation des axes parapluie.....	53
Schéma 2.5. Rétrosynthèse des axes parapluie dibenzyle: deuxième voie.....	54
Schéma 2.6. Synthèse du parapluie et couplage avec les axes 2.10 et 2.11	56
Schéma 2.7. Première voie de rétrosynthèse de l'axe parapluie linéaire.....	57
Schéma 2.8. Synthèse de l'axe linéaire par SN_2	57
Schéma 2.9. Synthèse de l'axe linéaire par condensation.....	58
Schéma 2.10. Synthèse monotope de l'axe linéaire.....	59
Schéma 2.11. Protection de l'axe et couplage des bras.....	59
Schéma 2.12. Deuxième voie de rétrosynthèse de l'axe parapluie linéaire.....	60
Schéma 2.13. Couplage du parapluie et formation de l'axe parapluie linéaire.....	61
Schéma 3.1. Synthèse des axes hexafluorophosphate.....	63
Schéma 3.2. Synthèse des rotaxanes-DCC.	73
Schéma 3.3. Dérivations du parapluie.....	75
Schéma 3.4. Synthèse du dérivé parapluie-Gly acétylé 3.19	80
Schéma 3.5. Couplage du rotaxane-DCC 3.4 et le parapluie-Gly tétraprotégé 3.19	80
Schéma 3.6. Synthèse du clip.....	81
Schéma 3.7. Synthèse du clip fluorescent.....	82
Schéma 3.8. Cyclisation des clips.....	83
Schéma 3.9. Assemblage des rotaxanes parapluie.....	84

Liste des abréviations

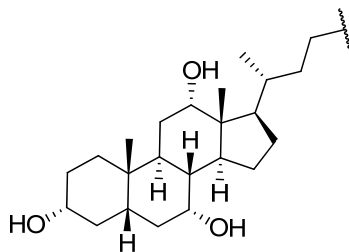
1D ou 2D une dimension ou deux dimensions

24C8 24-crown-8

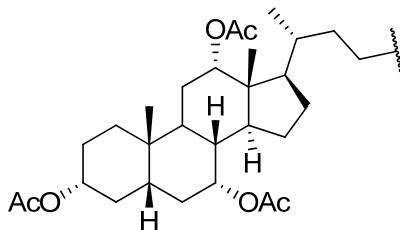
A ou Ala alanine

Ac acétyl

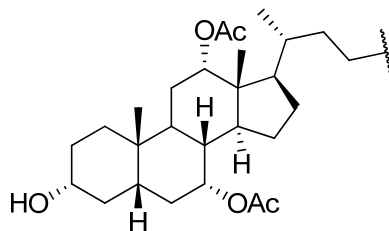
AC



ACP



ACP2



ADN acide désoxyribonucléique

AMBER assisted model building and energy refinement

AMP adénosine monophosphate

Arg arginine

ATP adénosine triphosphate

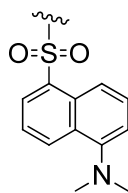
Bn benzyl

Boc *tert*-butyl carbamate

BOP hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium

br d doublet large (broad doublet)

br s	singulet large (broad singulet)
Bu	butyl
Bz	benzoyle
CAD	dollar canadien (canadian collar)
CCM	chromatographie sur couche mince
CDI	carbonyldiimidazole
CFTR	régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
COSY	correlation spectroscopy
Cys	cystéine
δ	déplacement chimique
d	doublet
D	debye
Da	dalton
$\Delta\delta$	différence de déplacements chimiques
dansyle	5-(diméthylamino)naphtalène-1-sulfonyle
DB18C6	dibenzo-18-crown-6
DB24C8	dibenzo-24-crown-8
DCC	dicyclohexyl carbodiimide
dd	doublet de doublet
DHBT	3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
DIEA	diisopropyléthylamine
$\Delta\mu$	différence de moments dipolaires
DM	dynamique moléculaire
DMAP	<i>N,N</i> -diméthylaminopyridine
DME	diméthoxyéthane
DMF	diméthylformamide



Ds	
EC ₅₀	concentration effective à laquelle la moitié de la réponse maximale est atteinte
e.g.	exempli gratia (latin de « par exemple »)
éq ou eq	equivalent
ESI-MS	spectrométrie de masse ionization électrospray (electrospray ionization mass spectrometry)
Et	éthyl
et al.	et alii (latin de « et les autres »)
EYPC	phosphatidylcholine issue de jaunes d'œuf (egg yolk phosphatidylcholine)
GABA	acide γ -aminobutyrique (gamma-aminobutyric acid)
Gln	glutamine
Glu	acide glutamique
Gly	glycine
Go	giga octets
GSH	glutathion
H ou His	histidine
HATU	hexafluorophosphate de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium
HMTA	hexaméthylènetétramine
HR	haute résolution
HPTS	8 - hydroxypyrrène - 1,3,6 - trisulfonate de trisodium
IBCF	isobutyl chloroformate
Ile	isoleucine
Inc.	incorporated
J	constante de couplage
K ou Lys	lysine ou degré Kelvin
K _a	constante d'association
L ou Leu	leucine

LC-MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (liquid chromatography-mass spectrometry)
LUV	large vésicule unilamellaire (large unilamellar vesicle)
λ_{\max}	longueur d'onde du maximum d'émission
m	multiplet
Me	méthyl
Met	méthionine
MHz ou Hz	mégahertz ou hertz
MLV	vésicule multilamellaire (multilamellar vesicle)
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NOE	effet nucléaire Overhauser (nuclear Overhauser effect)
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
PC	phosphatidylcholine
PDB	protein data bank
pH	potentiel hydrogène
Ph	phényl
Phe	phénylalanine
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
ppm	partie par million
Pr	propyl
Pro	proline
PyBroP	hexafluorophosphate de bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium
Pyr	pyridine
q	quadruplet
qn	quintuplet
quant.	quantitatif
R	groupe général
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROESY	rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy
rpm	rotations par minute (revolutions per minute)
s	singulet

Ser	sérine
SPQ	6-méthoxy- <i>N</i> -(3-sulfopropyl)quinolinium
SUV	petite vésicule unilamellaire (small unilamellar vesicle)
t	triplet
td	triplet dédoublé
t.a.	température ambiante
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
TEA	triéthylamine
TEG	tétra(éthylène glycol)
TFA	acide trifluoroacétique (trifluoroacetic acid)
THF	tétrahydrofurane
TMEDA	tétraméthyléthylènediamine
Thr	thréonine
tren	tris(2-aminoéthyl)amine
Trp	tryptophane
Ts	tosyl ou toluènesulfonyl
Tyr	tyrosine
Val	valine

A Andy,

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord adresser mes premiers remerciements et ma plus profonde reconnaissance à la personne qui a rendu toute cette aventure possible, Pr. Andreea Schmitzer. Je la remercie de m'avoir acceptée dans son groupe de recherche et de m'avoir accueillie comme je ne l'aurais jamais espéré. Elle a été d'un support et d'un encadrement irréprochable au cours de ces quatre dernières années. Son enthousiasme contagieux et sa bonne humeur ont créé une atmosphère de travail agréable et stimulante. La confiance, l'indépendance et les opportunités qu'elle accorde à ses étudiants, additionnés à sa disponibilité et ses conseils, en font une directrice de recherche hors pair. Pour tout ça et bien plus, je la remercie.

Mes remerciements vont également aux autres membres du jury : Pr. James Wuest, Pr. Richard Giasson, Pr. Normand Voyer et le représentant de la FES pour leur temps et d'avoir accepté de corriger et juger ce travail.

Je voudrais aussi remercier toute l'équipe de recherche, les membres passés et présents : Nadim, Marc, Salim, Vincent, Dat, Audrey, Samantha, Mathieu B., Paul, Christophe, Chester, Vanessa, Claude, Marc-André qui ont été des sources d'idées et de bonne humeur. Je souhaiterais tout particulièrement remercier Claude et Marc-André qui m'ont aidée de façon plus directe dans mes travaux, ainsi que mes stagiaires, Audrey, Stéphanie, Maria et Josée qui m'ont aidée à avancer et à développer mes talents de pédagogue; mais aussi tous les stagiaires, de passage ou ceux qui ne cessent de revenir, Mathieu L., Julien, Vaïzanne, Alexandre, Ludovic, Léa, Kévin, Arnaud, Bouchra, Mathieu C. et tous ceux que j'oublie.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude au département de chimie : tous les professeurs qui m'ont enseigné leur savoir et savoir-faire; Pr Keillor pour m'avoir laissée l'accès à son fluorimètre, Pr Lafleur pour l'extrudeur; les services de Résonance Magnétique Nucléaire et de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal; les techniciennes des laboratoires d'enseignement, Huguette Dinél et Hélène Laliberté, pour

leur aide lors des démonstrations, mais aussi Sylvie Marceau et Amina Khoury pour l'accès aux appareils; l'atelier mécanique; et le personnel du secrétariat.

Je souhaiterais aussi exprimer mon amitié à Hatouma, ma coloc d'enfer, avec qui j'ai partagé fous rires, désillusions et une tonne de pâtisseries, et qui m'a permis de garder la tête froide quand ça n'allait pas. Je n'oublie pas tous mes amis restés de l'autre côté de l'Atlantique et à qui je dois tellement de coups de fil, mails etc.

Je tiens à remercier ma famille, qui m'a soutenue et encouragée tout au long de mes études malgré qu'ils n'aient pas toujours compris ce que je faisais. Et finalement, je voudrais remercier de tout mon coeur Andy, pour sa patience et son soutien perpétuel durant ces dernières années malgré la distance. Ta présence à mes côtés a été une source d'énergie et de réconfort incomparable.

Merci!

Chapitre 1 Introduction générale

L'élément clé autour duquel tous nos travaux se sont axés est la membrane plasmique. Cet élément vital permet de contrôler des échanges entre l'intérieur et l'extérieur des cellules et donc de différencier les deux (Tableau 1.1).¹ Elle est principalement constituée de lipides (phospholipides, cholestérol, glycolipides) mais aussi de protéines (Figure 1.1). Les phospholipides, composants majoritaires de la membrane, sont des composés amphiphiles qui vont s'agréger et s'organiser dans l'eau, à cause de leurs longues chaînes hydrophobes, afin de former des bicouches lipidiques. Les queues hydrophobes interagissent entre elles de façon supramoléculaire à l'intérieur de la bicouche, exposant les têtes hydrophiles au milieu aqueux.

<i>Ions</i>	<i>Concentration intracellulaire (mM)</i>	<i>Concentration extracellulaire (mM)</i>
Cations		
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	30	1-2
Ca ²⁺	1-2 ($\leq 10^{-4}$ libre)	2,5-5
H ⁺	$4 \cdot 10^{-5}$ ($10^{-7,4}$ pH = 7,4)	$4 \cdot 10^{-5}$ ($10^{-7,4}$ pH = 7,4)
Anions		
Cl ⁻	4	110

Tableau 1.1. Concentration intra et extracellulaire des ions présents dans une cellule mammifère.¹

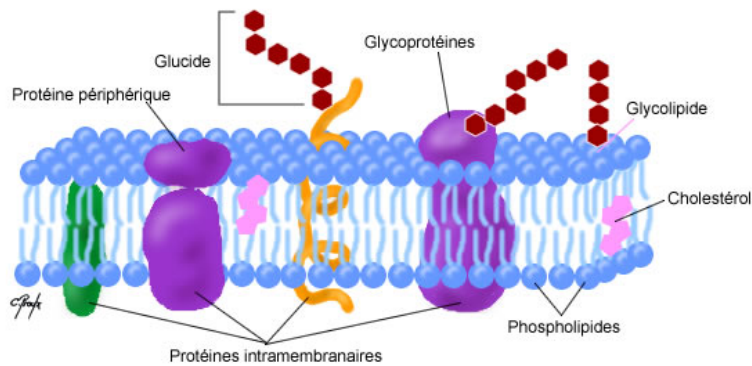


Figure 1.1. Représentation schématique d'une membrane cellulaire.²

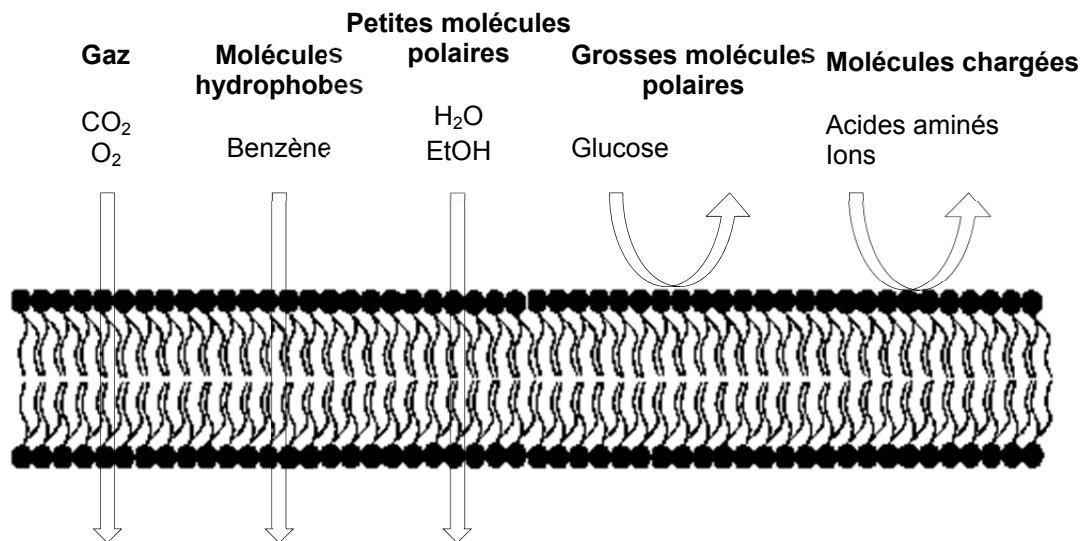


Figure 1.2. Perméabilité d'une bicouche phospholipidique envers différents composés.³

Malgré que cette bicouche reste fluide et en mouvement constant, elle représente une barrière hydrophobe entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, empêchant le libre passage d'espèces chargées ou de grosses molécules polaires (Figure 1.2) pourtant nécessaires à la vie de la cellule. Afin de contourner cet obstacle, la Nature a mis en place diverses protéines pour permettre leur passage. C'est dans le but de se substituer à ces protéines de transport transmembranaire défectueuses ou inexistantes qu'on a voulu développer des moyens synthétiques. Nos travaux se sont principalement intéressés au transport de chlorures et de médicaments cycliques.

1.1. Transport d'ions

1.1.1. Canaux et pompes : principes

Les ions jouent un rôle primordial dans le monde biologique. Leur échange dans les cellules affecte des fonctions vitales telles que l'absorption des nutriments lors de la digestion ou le contrôle de la contraction des muscles.⁴

Cependant la membrane cellulaire représente un obstacle ralentissant le passage de ces espèces chargées. Selon leur charge et leur énergie de déshydratation, les anions sont plus ou moins hydrophobes et suivent la série Hofmeister (anions organiques >ClO₄⁻ >SCN⁻ >I⁻ >salicylate >NO₃⁻ >Br⁻ >Cl⁻ >HCO₃⁻ >H₂PO₄⁻ >F⁻ >SO₄²⁻ >HPO₄²⁻).⁵ Dans le cas des anions les plus hydrophiles, l'énergie à fournir pour leur transport est considérable. Pour contourner cette barrière énergétique, la Nature utilise des protéines de transport, des canaux ou des pompes. La détermination des structures des canaux et pompes sélectives pour quatre des ions les plus abondants dans le monde biologique (sodium, potassium, calcium et chlorure) a permis d'éclaircir leur spécificité, mode d'action et leur conformation tridimensionnelle.⁶

Les pompes génèrent des gradients de concentration d'ions entre l'extérieur et l'intérieur des cellules. Elles accomplissent leur tâche en utilisant une source d'énergie telle que l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP).⁷ Par contre, les canaux ont un mode d'action passif et facilitent le passage de la bicouche en se servant du gradient de concentration, établi par les pompes, comme force motrice.

Chaque protéine est spécifique à un ion et doit être capable de le reconnaître lors de son passage. Ceci implique donc des interactions spécifiques avec l'ion en ôtant partiellement ou totalement sa sphère d'hydratation. La résolution de la structure des pompes LeuT Na⁺ et Ca²⁺ ATPase, du canal KcsA K⁺ et de l'échangeur CIC Cl⁻/H⁺ (Figure 1.3) a permis de visualiser et identifier les sites de liaisons. La pompe LeuT Na⁺ fait partie de la famille des symporteurs neurotransmetteur sodium et est un transporteur de leucine dépendant du Na⁺. La pompe est issue des bactéries *Aquifex aeolicus*.⁸ La pompe Ca²⁺ ATPase, responsable de la relaxation des muscles,⁹ permet d'échanger deux ions Ca²⁺ pour

deux ou trois protons par unité ATP hydrolysée.¹⁰ Le canal Kcsa K^+ provenant des *Streptomyces lividans* est qualifié de canal long pore où plusieurs ions sont alignés. Il montre une grande sélectivité pour le K^+ tout en affichant des vitesses de transport prodigieuses de l'ordre de 10^8 ions. s^{-1} .¹¹ L'échangeur CIC Cl^-/H^+ , issu de l'*Escherichia coli*, n'agit pas en canal contrairement à ses homologues eucaryotes. Il échange des ions chlorure pour des protons avec un ratio de 2/1.¹²

Pour les transporteurs de cations, les sites de liaison sont des atomes d'oxygène partiellement ou complètement chargés négativement. Dans le cas du chlorure, les ions Cl^- sont liés par des ponts hydrogène sur des groupements hydroxyle et amide. La sélectivité se base principalement sur la taille de la cavité, mais aussi sur la conformation de la protéine. Ces observations ont finalement permis de voir que les interactions utilisées par la nature concordent bien avec les stratégies utilisées dans la chimie hôte/invité ou supramoléculaire.

Malheureusement, lors de dysfonctionnement de ces systèmes d'échange d'ions, l'organisme peut en être fortement affecté et cela conduit à des maladies appelées canalopathies. Par exemple, dans le cas des ions chlorure (canal CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), cela peut amener à la fibrose kystique, une maladie héréditaire commune et très souvent mortelle.¹³ Elle affecte les poumons, le foie, le pancréas et les intestins. Les symptômes principaux sont des maladies pulmonaires obstructives chroniques, fibrose pancréatique et malabsorption et obstruction intestinale.

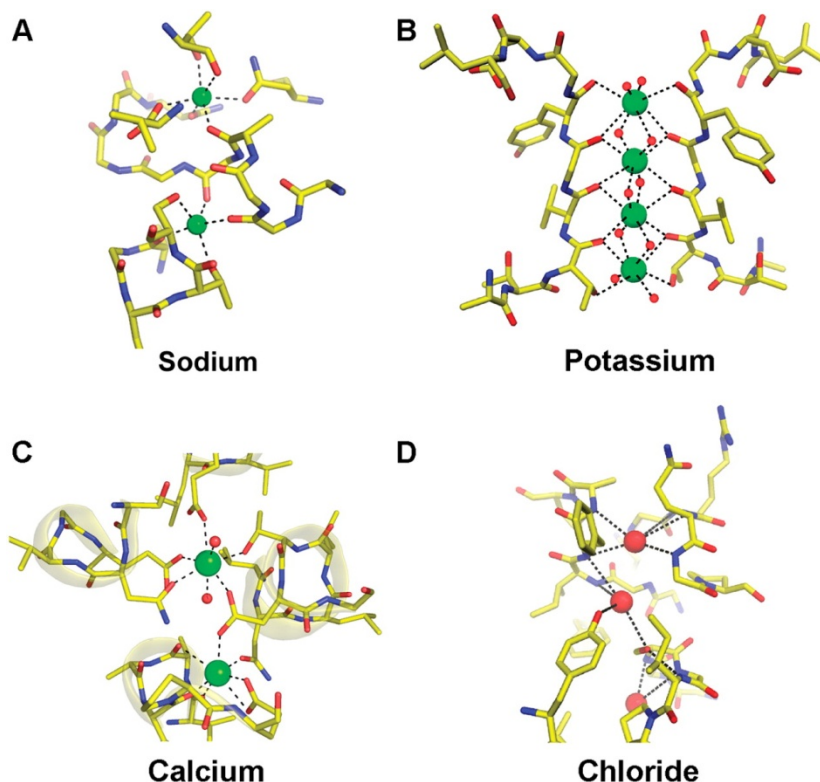


Figure 1.3. Sites de liaisons des protéines de transport. A) Pompe LeuT Na⁺ (PDB 2A65). B) Canal KcsA K⁺ (PDB 1K4C). C) Pompe Ca²⁺ ATPase (PDB 1EUL). D) Échangeur mutant CIC Cl⁻/H⁺ (PDB 1OTU).⁶

De même, les canalopathies des chlorures engendrent aussi des maladies rénales, la myotonie et l'épilepsie.¹⁴ Un dérèglement au niveau du transport des ions bicarbonate mène aussi à la fibrose kystique, mais peut aussi causer des maladies cardiaques ou l'infertilité.¹⁵ C'est pourquoi des alternatives sont recherchées pour remédier à ces canaux dysfonctionnels.

1.1.2. Transporteurs d'anions

Les transporteurs d'ions en général peuvent utiliser différents modes pour permettre le passage des ions à travers une membrane. Quel que soit le mode, le but est d'isoler ou du moins protéger l'ion hydrophile de l'intérieur hydrophobe de la bicouche lipidique. Ils peuvent agir comme des transporteurs mobiles en encapsulant l'ion (Figure 1.4.B), ou former des canaux traversant la bicouche de part et d'autre (Figure 1.4.A). Le principal

avantage des canaux est leur vitesse de transport plus élevée (de l'ordre de trois fois plus) que celle des transporteurs mobiles, qui est limitée par la vitesse de diffusion.¹⁶ Les canaux peuvent être formés d'une seule molécule ou de plusieurs par auto-assemblage de plus petites molécules. Il en est de même pour les transporteurs mobiles qui peuvent encapsuler un ion avec une seule molécule ou former des agrégats autour des ions.¹⁶

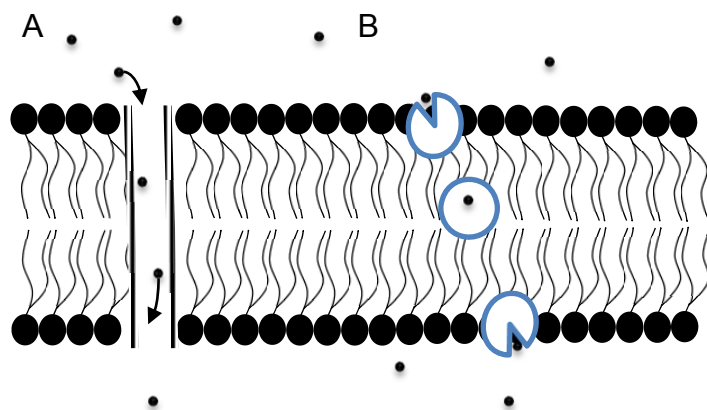


Figure 1.4. Schéma des modes de transport. A) Un canal. B) Un transporteur mobile.

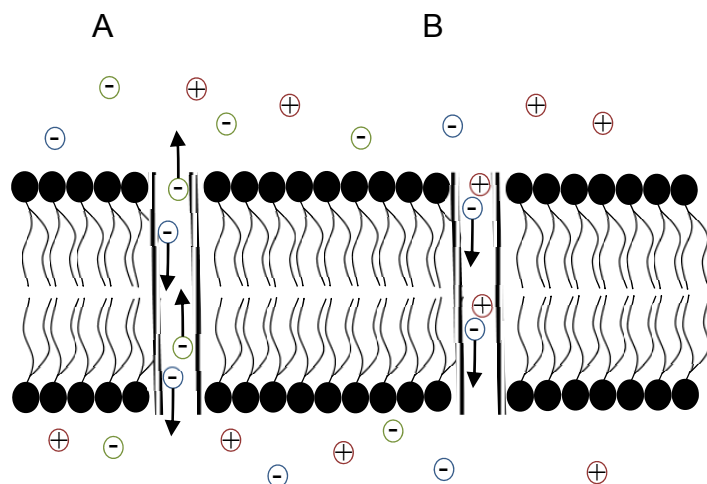


Figure 1.5. Schéma représentant les deux mécanismes de co-transport. A) L'antiport. B) Le symport.

De plus, étant donné que ce sont des espèces chargées qui sont échangées, il est impératif de conserver la neutralité des deux côtés de la bicouche lipidique. Par conséquent,

le déplacement d'un anion devra être accompagné du déplacement d'un autre ion : d'un cation dans le même sens, le mécanisme est alors appelé symport (Figure 1.5.B); ou d'un anion dans le sens inverse, il s'agit alors d'un antiport (Figure 1.5.A).¹⁷

1.1.2.1. Transporteurs naturels

Les structures des pompes et canaux n'ayant été résolues que récemment, les molécules naturelles ont été les premières étudiées en tant qu'alternatives pour le transport d'ions. Malheureusement, comparativement aux molécules naturelles capables de transporter des cations, les exemples de transporteurs anioniques sont peu nombreux. La paramycine, isolée à partir des bactéries *Streptomyces alboniger*, montre une aptitude à transporter MnO_4^- et Cl^- d'une solution aqueuse vers une solution organique (benzène ou acétate d'éthyle) en plus d'être un antibiotique (Figure 1.6.A).¹⁸ La duramycine, extraite des bactéries *Streptomyces longisporoflavus* et *Streptoverticillium hachijoense*, quant à elle, forme des canaux permettant le transport de différents anions sans discrimination (Figure 1.6.B).¹⁹ La prodigiosine, isolée à partir de bactéries *Serratia marcescens*,²⁰ transporte des ions Cl^- avec leur contre-ion H^+ , de façon isolée en tant que transporteur mobile (Figure 1.6.C). Elle a aussi des propriétés d'antiport $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ selon les conditions.^{21, 22}

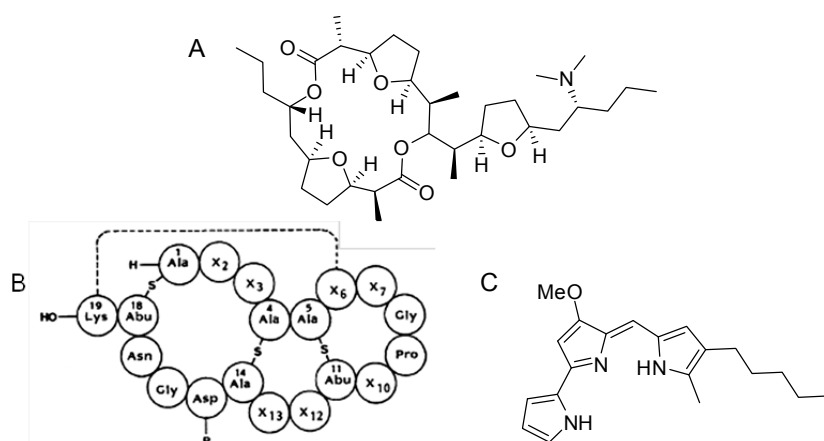


Figure 1.6. Structures de transporteurs naturels. A) La paramycine.¹⁸ B) La duramycine.²³ C) La prodigiosine.²²

Étant donné le nombre restreint de ces transporteurs naturels et de leur limitation, un intérêt grandissant s'est porté vers la synthèse de nouveaux transporteurs en se basant sur les spécificités observées sur leurs analogues naturels.

1.1.2.2. Transporteurs synthétiques

1.1.2.2.1. Récepteurs versus transporteurs

La résolution des structures des protéines de transport, ainsi que celle des transporteurs naturels, a permis de jeter les bases sur les groupements fonctionnels essentiels à la complexation des anions, plus particulièrement du chlorure.⁶ Dû à leur électronégativité et leur charge, les ions Cl^- sont capables de former des ponts hydrogène. Leur complexation est alors favorisée par tout groupement bon donneur de liens hydrogène : $-\text{NH}$ et $-\text{OH}$ et parfois $=\text{CH}$ dans les fonctions amine, amide, urée, thiourée, pyrrole, indole, hydroxyle et triazole. Même si la formation des ponts hydrogène reste la méthode la plus populaire, d'autres interactions pour lier et transporter des anions ont été exploitées pour le design de transporteurs artificiels: électrostatiques^{24, 25} et anion- π .^{26, 27}

De nombreux récepteurs ont été synthétisés dans le but de lier fortement les Cl^- .^{28, 29} Malheureusement, il est très difficile de prévoir si un récepteur pourra être un bon transporteur. Certaines structures très similaires peuvent ne pas présenter les mêmes propriétés de transport. Dans les exemples de tripodes de J. T. Davis *et al.* (Figure 1.7.A), le composé **1.1** ne montre aucun transport dans les conditions utilisées, tandis les composés **1.3** et **1.4** présentent un transport de chlorure ou bicarbonate conséquent.³⁰ Dans le cas des calix[4]pyrroles de Gale *et al.* (Figure 1.7.B), seul le composé **1.5** montre des propriétés de transport intéressantes, les autres analogues étant inactifs.³¹ Les cholapodes développés par A. P. Davis *et al.* (Figure 1.7.C) lient fortement les anions. Mais malgré leurs similarités, seul le composé **1.10** transporte des anions³² tandis que **1.9** est inactif.³³ Cela est probablement dû à la trop forte complexation de l'anion qui est relâché en conséquence très lentement.

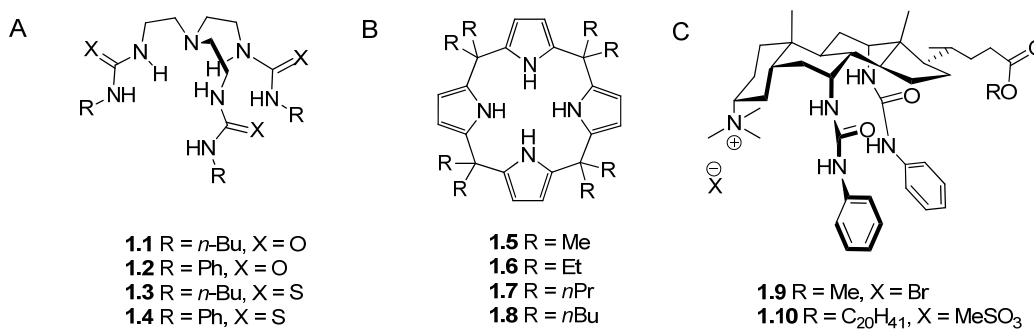


Figure 1.7. Récepteurs d'anion. A) Tripode.³⁰ B) Calix[4]pyrrole.³¹ C) Cholapode.^{32, 33}

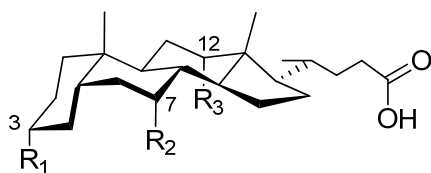
Tous les transporteurs sont des récepteurs, mais tous les récepteurs ne sont pas des transporteurs. Certains petits détails peuvent complètement changer leurs propriétés. La force de la complexation est évidemment cruciale pour entraîner le transport et extraire les anions de l'eau. Cependant, une trop forte liaison pourrait bloquer le site de liaison et, en plus d'inhiber le transporteur, empêcher le relargage de l'anion. La liaison doit être sélective. Le transporteur doit présenter une partie hydrophobe assez conséquente afin de s'insérer facilement dans la bicouche lipidique soit pour la traverser en tant que transporteur mobile, soit pour s'auto-assembler à l'intérieur de la membrane. Toutefois le manque de solubilité dans les conditions utilisées est aussi un obstacle difficile à contourner. Mais, la plupart du temps, l'incapacité de récepteurs à transporter est inexplicable d'où la difficulté à concevoir des transporteurs synthétiques.

Cependant, le vif intérêt dans ce domaine a produit bon nombre d'exemples de transporteurs synthétiques avec différentes structures, différents modes d'action et différentes sélectivités.

1.1.2.2.2. Mobiles

Les cholapodes, développés par A. P. Davis *et al.* depuis plus d'une décennie, sont basés sur des acides biliaires (acide cholique **1.11**, désoxycholique **1.12** ou chénodésoxycholique **1.13**).^{4, 34, 35} Ces stéroïdes peu coûteux présentent une grande surface et une amphiphilie faciale, c'est-à-dire une face hydrophobe et une hydrophile. Les groupements hydroxyles sur la partie hydrophile se situent à des positions axiales et de

manière à ce qu'aucun lien hydrogène ne puisse se faire de façon intramoléculaire. Ils forment ainsi une cavité où un anion peut se complexer.³⁵



1.11 $R_1, R_2, R_3 = OH$

1.12 $R_1, R_3 = OH, R_2 = H$

1.13 $R_1, R_2 = OH, R_3 = H$

Figure 1.8. Acides biliaires utilisés pour le développement des cholapodes.³⁵

Plusieurs générations de cholapodes (Figure 1.9) ont été élaborées afin d'améliorer leur force de liaison avec les anions et favoriser le transport. Le cholaphane **1.14**, utilisant deux acides choliques pour former un macrocycle, améliore la complexation du fluorure en augmentant le nombre de groupements hydroxyles. Il atteint alors une $K_a = 1,8 \times 10^3 M^{-1}$ avec les fluorures.³⁶ Mais ceci est limité par le faible caractère donneur de ponts hydrogène des groupements $-OH$. Des groupements plus donneurs tels que l'urée ou la thiourée ont permis alors d'élever la force de liaison. Notamment le cholapode **1.15** affiche un $K_a = 2 \times 10^9 M^{-1}$ avec les chlorures.³³

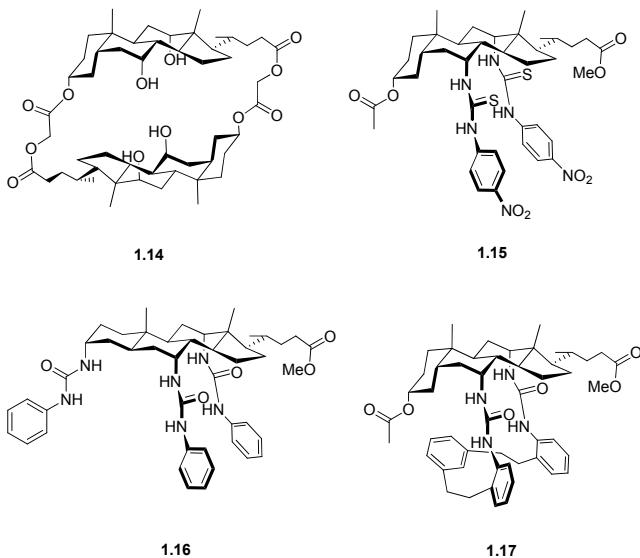


Figure 1.9. Exemples de cholapodes.^{36, 33, 37, 34}

Toujours dans le but d'augmenter l'affinité, la fonctionnalisation de la position 3 de l'ester de l'acide cholique avec un groupement urée, donneur de lien hydrogène, entraîne des liens hydrogène intramoléculaires entre le C=O en position 3 et les N-H en positions 7 et 12. Pour éviter cela, l'allocholapode **1.16** empêche géométriquement ces interactions. Il montre des constantes d'association cinq fois plus élevées que celle de son dérivé cholapode. Il présente une $K_a = 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ avec les chlorures mais demande beaucoup plus d'étapes de synthèse.³⁷ Les dernières générations de récepteurs ont été testées pour le transport de chlorure et la plupart ont des propriétés de transport intéressantes, dont le cholapode **1.15**, qui s'est avéré être un excellent transporteur à très faible rapport (1/250 000 : transporteur/lipide). Le transport se fait indépendamment du contre-cation, indiquant un mécanisme d'antiport entre le Cl^- et un autre anion. Par ailleurs, un meilleur transport peut aussi être promu par une meilleure encapsulation du Cl^- : meilleure désolvatation de l'ion et prévention de la translocation de la membrane. Le cholaphane **1.17** transporte dix-huit fois plus efficacement que son dérivé acyclique.³⁴

Aussi basés sur des produits naturels, certains transporteurs sont inspirés de la prodigiosine (Figure 1.10). Gale *et al.* ont repris deux caractéristiques clés du produit naturel : deux groupements -NH donneurs de ponts hydrogène pour lier le Cl^- et un groupement basique pour lier le H^+ . Tandis que le dérivé **1.18** montre une activité modérée en l'absence de gradient de pH et une meilleure activité en présence d'un gradient de pH, le composé **1.19** reste inactif.³⁸ Dans ce cas, il y a co-transport du Cl^- avec le H^+ , expliquant l'accélération avec le gradient de pH. Les résultats sont similaires avec les dérivés de Sessler *et al.* (**1.20-1.23**).³⁹ Seule la forme protonnée montre une affinité pour les Cl^- (K_a de l'ordre de 10^5 M^{-1}). Le mécanisme de co-transport H^+/Cl^- a été mis en évidence dans ces cas également.

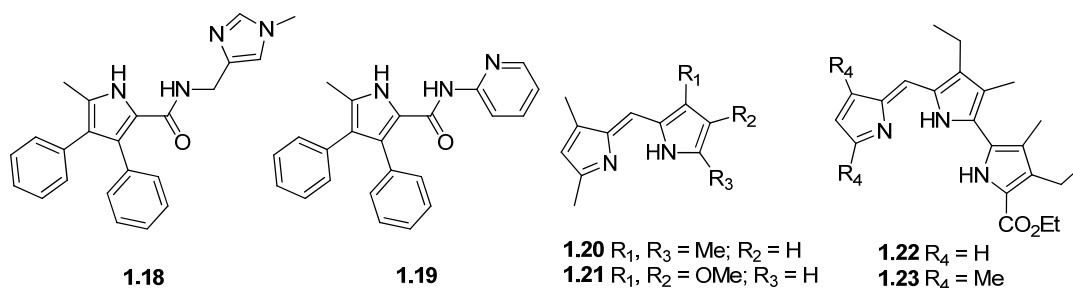


Figure 1.10. Dérivés de la prodiginosine.^{38, 39}

Les calix[4]pyrroles (Figure 1.7.B) font partie d'une autre classe de transporteurs mobiles. Ils sont connus pour être de bons récepteurs d'anion (K_a allant jusqu'à 10^4 M^{-1}) et être facilement synthétisés et fonctionnalisés.⁴⁰ Ils ont la particularité de co-transporter un cation en même temps que le chlorure (Figure 1.11). Cependant ils ne peuvent accommoder qu'un contre-cation césium.³¹

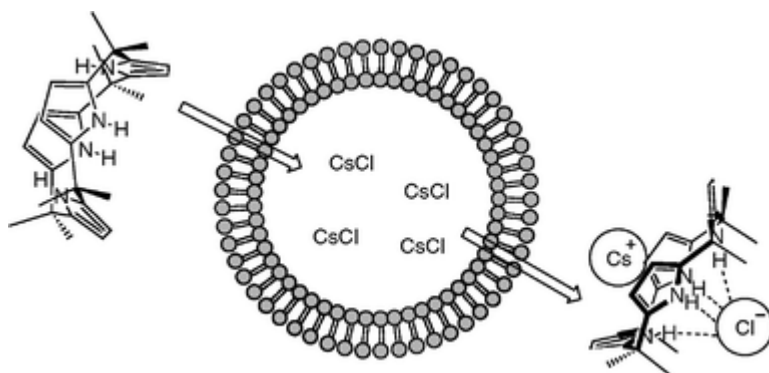


Figure 1.11. Mécanisme de transport de CsCl proposé pour **1.5**.³¹

Dans le but d'améliorer le transport, une seconde et troisième générations ont été élaborées.^{41, 42} L'ajout d'une arcade supplémentaire contenant une ou plusieurs unités triazole permet d'accroître le nombre de liens hydrogène ainsi que de mieux encapsuler l'anion (Figure 1.12). Ceci résulte en une meilleure affinité avec le Cl^- et en un meilleur transport lié à la combinaison de deux modes de transport : co-transport avec le Cs^+ et antiport avec le NO_3^- .

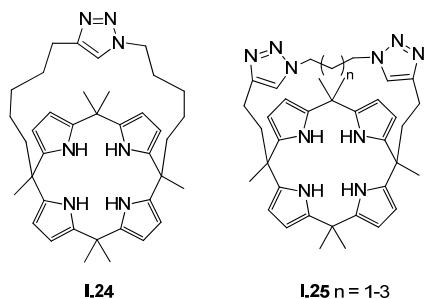


Figure 1.12. « Strapped » calix[4]pyrroles.^{41, 42}

Le squelette de la tris(2-aminoéthyl)amine (tren) permet de former une cavité pour complexer des anions. Différents groupements terminaux ont été utilisés dans le but de les lier. La fonctionnalisation à partir de longues chaînes alkyles a permis à Smith *et al.* d'extraire H^+/Cl^- vers du dichlorométhane (Figure 1.13).⁴³ Le dérivé **1.28** avec les chaînes les plus longues a aussi montré le meilleur transport mettant en avant l'importance d'encapsuler l'ion chlorure efficacement.

J. T. Davis *et al.* ont dérivé la tren en tris-urées ou tris-thiourées (Figure 1.7.A). Ceux-ci sont des transporteurs de Cl^- efficaces. De plus, les tris-thiourées **1.3** et **1.4** sont aussi capables de transporter du bicarbonate par un mécanisme d'antiport.³⁰

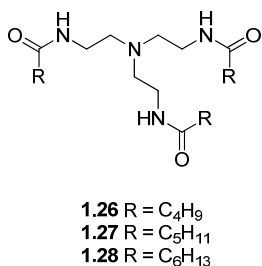


Figure 1.13. Dérivés de tren.⁵¹

1.1.2.2.3. Canaux monomériques

Contrairement aux transporteurs mobiles dont la vitesse dépend de la diffusion, les canaux sont susceptibles d'échanger les anions plus rapidement. Tandis que les exemples de canaux monomériques sont connus pour le transport de cations, leurs homologues pour le transport d'anion sont beaucoup plus rares. Gin *et al.* se sont basés sur une β -cyclodextrine fonctionnalisée avec des chaînes polybutylène glycol capable de co-

transporter Na^+ , Br^- et Cl^- (Figure 1.14).⁴⁴ Le flux d'ions dépend du pH et de la forme protonnée ou déprotonnée des sept amines secondaires.

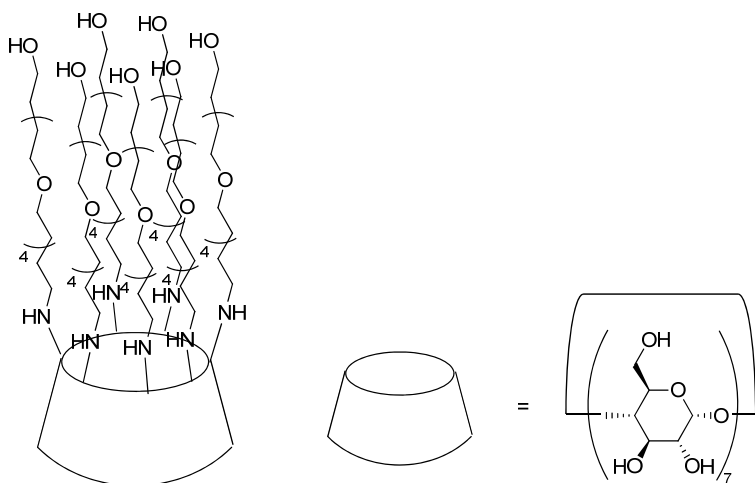


Figure 1.14. Dérivé de cyclodextrine.⁴⁴

1.1.2.2.4. Auto-assemblage

1.1.2.2.4.1. Canaux

Un composé capable de traverser entièrement la membrane requiert une synthèse longue et conduit souvent à des grosses molécules. De ce fait, pour simplifier, beaucoup de chercheurs ont misé sur l'auto-assemblage d'entités plus petites capables de former un canal. A partir d'un peptide naturel, le CK4-M2GlyR, Freeman *et al.* ont montré que la formation d'un canal synthétique augmentait l'échange transmembranaire de Cl^- .⁴⁵ De leur côté, toujours à base de peptides, Gokel *et al.* ont développé un heptapeptide synthétique **1.30** qui se dimérise pour former un canal favorisant le transport de Cl^- (Figure 1.15.A).⁴⁶

A partir de calix[4]arènes fonctionnalisés avec des amides, J. T. Davis *et al.* ont observé l'auto-assemblage de deux unités pour permettre le transport de Cl^- (par co-transport H^+/Cl^- ou antiport Cl^-/OH^-) (Figure 1.15.B).⁴⁷ En inversant un arène pour créer un cône partiel, la même équipe a remarqué que selon le substituant R, l'agrégation des calix[4]arènes inversés entraînait ou non le transport de Cl^- (Figure 1.15.C). De plus, l'ajout du composé inactif **1.32** dans les agrégats du composé actif **1.33** inhibe le transport.⁴⁸

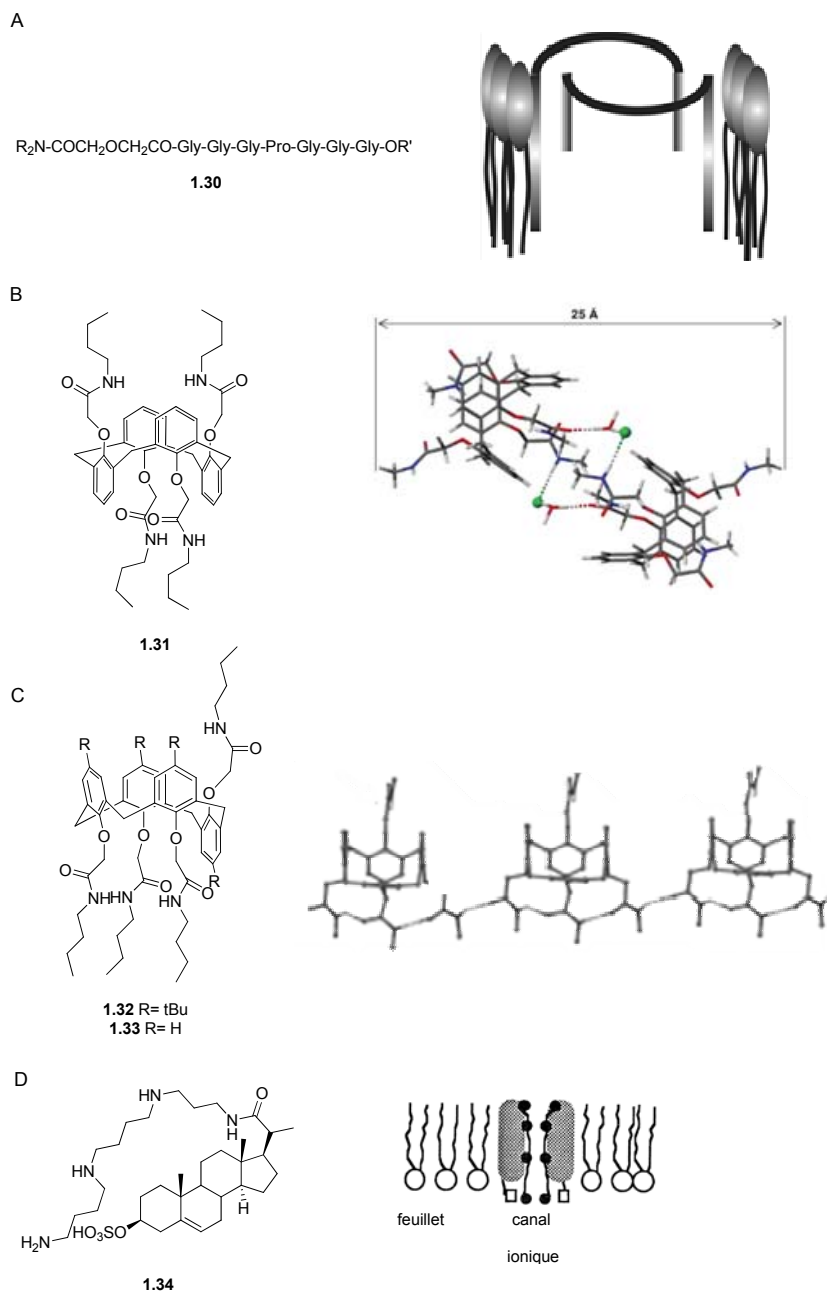


Figure 1.15. Auto-assemblage de canaux synthétiques. A) Peptide synthétique et représentation schématique de son insertion dans un feuillet de bicouche lipidique.⁴⁶ B) Calix[4]arène et sa dimérisation en présence d'ions chlorure.⁴⁷ C) Calix[4]arène (cône partiel) et son auto-assemblage.⁴⁸ D) Stérolpolyamine et son insertion dans un feuillet de bicouche lipidique.⁴⁹

Regen *et al.* ont élaboré un stérolpolyamine capable de se dimériser et s'insérer dans la membrane. Le flux de HCl permet de rééquilibrer un gradient de pH. Le mécanisme de canal est favorisé, mais pas confirmé (Figure 1.15.D).⁴⁹

En se reposant sur les interactions π -anion, Matile *et al.* ont synthétisé un système π pauvre en électrons et capable de s'introduire dans la bicouche lipidique. Entre deux de ces composés les anions Cl^- sautent d'un site de reconnaissance à l'autre, ce qui occasionne le flux de Cl^- (Figure 1.16.A). En modifiant les groupements terminaux, ils ont pu jouer sur la sélectivité et l'efficacité du transport.²⁶ En tirant profit des interactions π -anions, Schmitzer *et al.* ont développé des sels imidazolium difonctionnalisés par des systèmes π rigides et hydrophobes.²⁷ Leur auto-assemblage au travers de la membrane engendre un échange $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ (Figure 1.16.B).

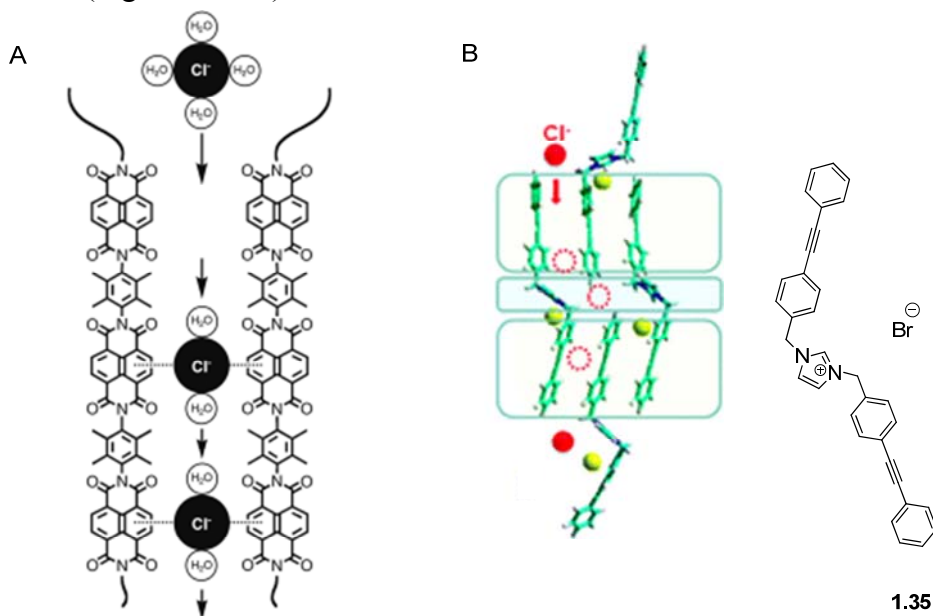


Figure 1.16. Canaux synthétiques appliquant les interactions π -anion.^{26, 27}

Une autre classe de transporteurs ne formant pas des canaux, mais des nanotubes, ont montré leur efficacité et ingéniosité pour l'acheminement d'anions. Basés sur des cycles urée/amide, Matile *et al.* ont montré que chaque cycle présentant un dipôle peut s'empiler pour générer un nanotube (macro-dipôle).⁵⁰ Une face présente des groupements donneurs de liens hydrogène pouvant lier un anion. Cependant, le diamètre du cycle est trop étroit pour permettre le passage d'anion hydraté au travers. De ce fait, un autre mécanisme

a été imaginé pour expliquer le transport. Les cycles formeraient une sorte de relais. Ils effectueraient chacun à leur tour une rotation de 180° , mouvement favorisé par les liens hydrogène supplémentaires qui vont se former avec le cycle adjacent, permettant de se passer l'anion au travers de la bicouche lipidique (Figure 1.17). Le composé **1.36** affiche une certaine sélectivité pour le chlorure.

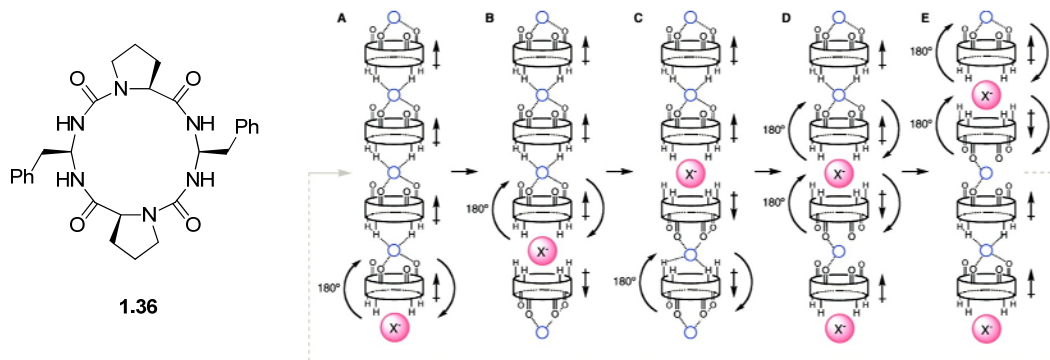


Figure 1.17. Cycles urée/amide et leur mécanisme de transport proposé.⁵⁰

1.1.2.2.4.2. Autres

L'auto-assemblage permet aussi l'encapsulation d'anions. J. T. Davis *et al.* ont dérivé des motifs tren pour y attacher des catéchols capables de lier des anions (Figure 1.18.A). La difficulté est d'obtenir un juste milieu entre une partie assez hydrophobe pour pouvoir s'introduire dans la bicouche lipidique sans pour autant entraîner la précipitation du composé dans l'eau. Sur les exemples testés, **1.39** se montre comme le meilleur transporteur de NO_3^- .⁵¹ Plusieurs unités sont nécessaires pour l'encapsulation.

Tomich *et al.* ont utilisé un segment d'une protéine transmembranaire M2GlyR afin de favoriser l'échange d'anion (Figure 1.18.B). Leurs agrégats en forme d'hélice s'insèrent dans la membrane pour former des pores.⁵²

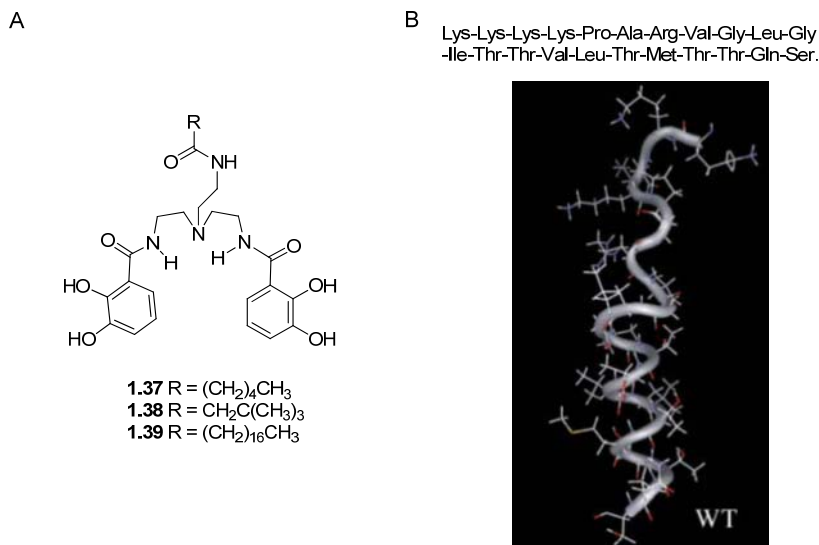


Figure 1.18. Composés dont l'agrégation s'organise en pores.^{51, 52}

1.1.3. Conclusion

Comme survolé dans cette partie, la chimie des récepteurs et transporteurs d'anions a connu un essor majeur durant ces deux dernières décennies. La simplicité ou complexité des structures, les interactions mises en jeu et les stratégies mises en place ont créé une très grande diversité dans ce domaine.⁵³ Ces avancées ont été primordiales dans la compréhension des mécanismes de transport d'anions dans les organismes vivants et le traitement des canalopathies.

1.2. Transport de grosses molécules polaires

Le transport transmembranaire d'entités plus grandes que de simples ions est un défi de l'industrie pharmaceutique. De nombreuses thérapies requièrent une action à l'intérieur des cellules et donc un acheminement. Comme mentionné auparavant pour les ions, la membrane cellulaire va constituer une barrière pour le passage de grosses molécules polaires. En effet, si une molécule, même non chargée, ne présente pas une liposolubilité suffisante, son transport par diffusion passive sera difficile. C'est pourquoi il y a eu un effort croissant dans ce domaine pour créer différents modes de transport adaptés à différents médicaments.

1.2.1. Exemples

Les nucléotides montrent des propriétés thérapeutiques importantes pour le traitement de maladies virales et cancéreuses.⁵⁴ Mais leur forme hautement chargée les rend difficiles à transporter à travers la bicouche lipidique. Pour contrer ce problème, des analogues ont été synthétisés afin de faciliter leur transport, puis ils sont activés par les kinases cellulaires ou virales. Huynh-Dinh *et al.* ont synthétisé un dérivé cholestéryloxy-carbonyl adénosine 5'-triphosphate **1.40** (Figure 1.19).⁵⁵ Après internalisation dans des liposomes, l'hydrolyse mène à la libération du triphosphate, la forme biologiquement active.

L'acide glutamique, l'un des vingt acides aminés naturels, joue un rôle important dans le fonctionnement et la vie des cellules : c'est un précurseur pour la synthèse de protéines, de nucléotides, acides nucléiques, glutathions et neurotransmetteurs.⁵⁶ Ghadiri *et al.* ont développé un cyclopeptide **1.41** capable de s'auto-assembler afin de former des nanotubes assez larges pour favoriser le transport de glutamates. Le cyclopeptide est constitué d'un enchaînement d' α -acides aminés hydrophobes alternés entre des configurations L et D. Il présente une vitesse de transport de $2,7 \times 10^4 \text{ mol.s}^{-1}$ de glutamate pour 1 M de **1.41** (Figure 1.19).

Yang *et al.* ont, quant à eux, développé un système efficace pour transporter une grande quantité d'un médicament anticancéreux, la doxorubicine. Ils se sont basés sur un

polyrotaxane **1.42** ayant une chaîne polyéthylène glycol comme axe et des cyclodextrines comme roues, des composés qui sont biocompatibles (Figure 1.19).⁵⁷ L'agent anticancéreux est attaché aux cyclodextrines par un lien facilement hydrolysable et le transport transmembranaire lui est permis par la liaison de deux peptides facilitant son insertion dans la cellule. Le médicament est alors lentement libéré sur quatre jours dans les cellules cancéreuses visées.

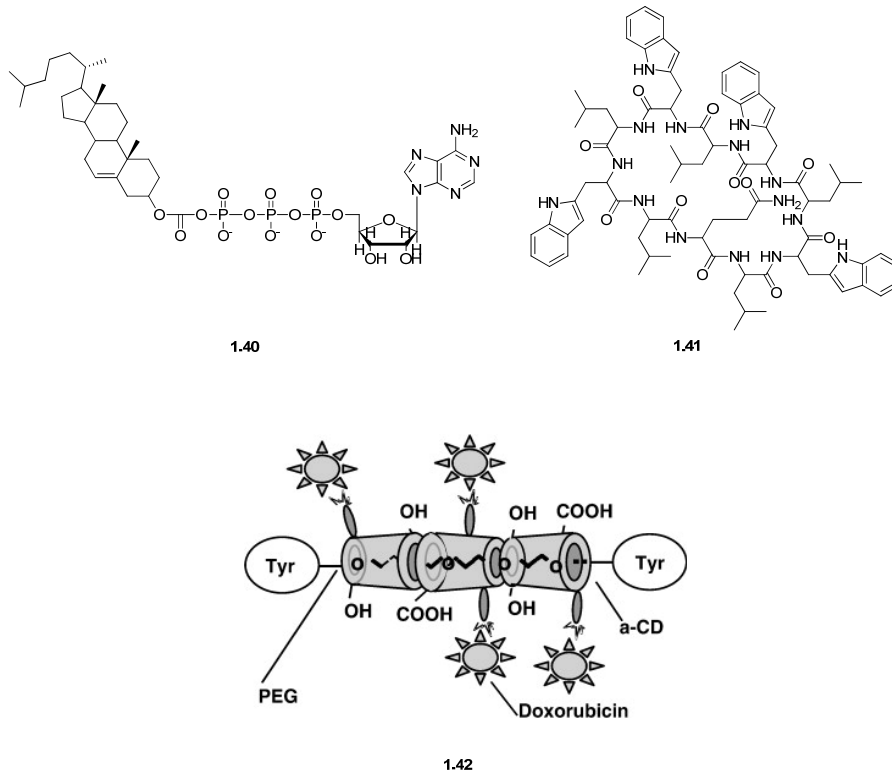


Figure 1.19. Divers transporteurs.^{55, 56, 57}

Kichler *et al.* se sont intéressés au transport d'acides nucléiques, nécessaires lors de traitement de maladies génétiques. En introduisant plusieurs résidus histidine dans leurs peptides **1.43** (Figure 1.20), ils ont observé l'interaction avec des fragments d'ADN, et par la suite le passage à travers la membrane cellulaire par endocytose et déstabilisation de l'endosome.⁵⁸ Aussi dans le but de transporter des acides nucléiques, Park *et al.* ont dérivé un dendrimère polypropylènimine avec des résidus arginine **1.44**. Ces dendrimères entraînent la condensation de l'ADN plasmidique en particules et mènent à une transfection efficace tout en gardant une basse cytotoxicité.⁵⁹ De leur côté, Reineke *et al.* ont

fonctionnalisé des β -cyclodextrines par chimie « click » pour y incorporer des dendrons polyaminés **1.45**.⁶⁰

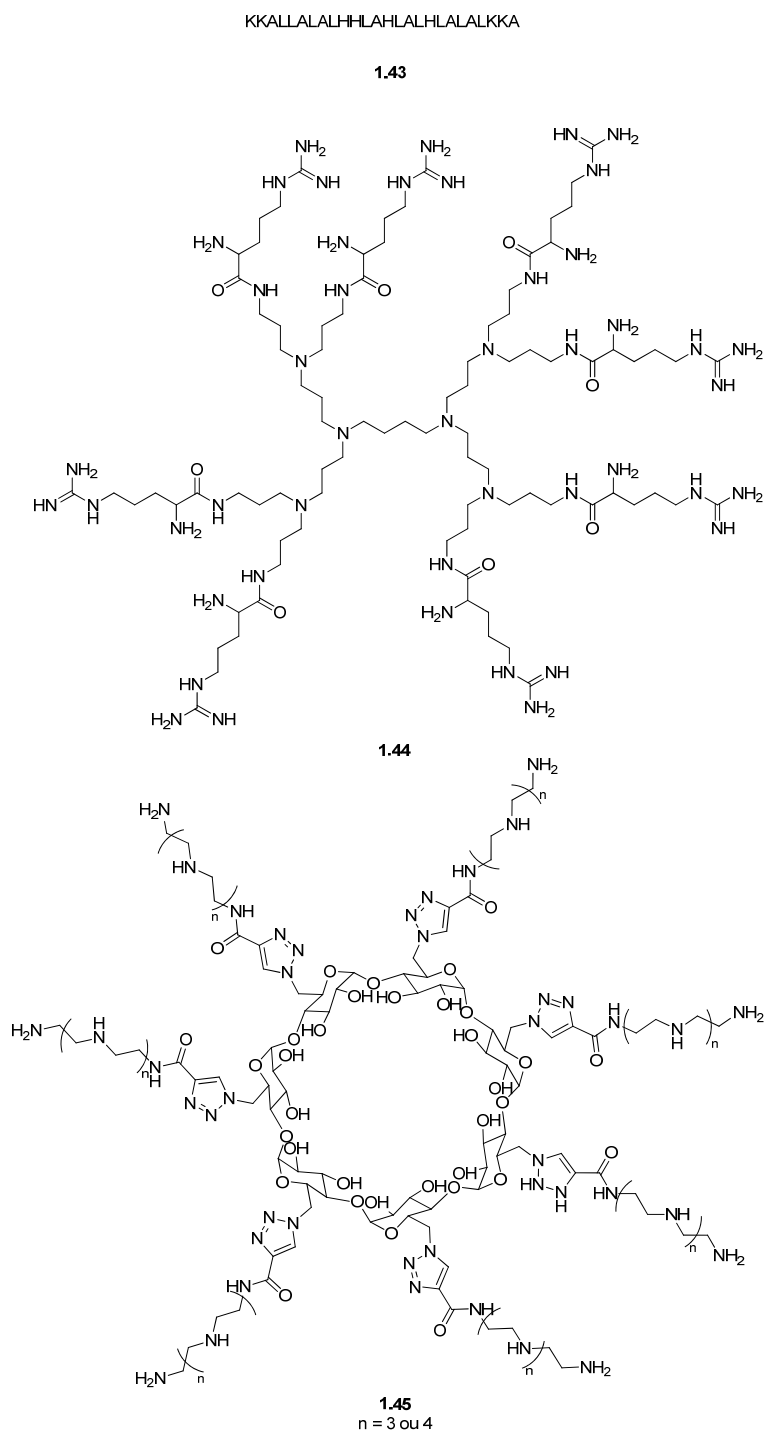


Figure 1.20. Transporteurs d'acides nucléiques.^{58, 59, 60}

Ces entités sont alors capables de complexer et encapsuler de l'ADN plasmidique en nanoparticules. Ceci stabilise les acides nucléiques et les protègent de la dégradation par les nucléases en plus de permettre le transport transmembranaire. De plus, ils présentent une basse toxicité.

Les exemples de transporteurs sont multiples et variés. Un exemple qui a montré son efficacité et sa capacité à s'adapter à différents composés à transporter est le parapluie moléculaire.

1.2.2. Parapluies moléculaires

Les parapluies moléculaires ont été développés par Regen *et al.* depuis la moitié des années 90 dans le but de faciliter le transport transmembranaire de médicaments ou d'ADN, ou d'améliorer leur solubilité dans l'eau.⁶¹ La liaison de l'agent à transporter au parapluie lui permet d'être solubilisé même dans un environnement défavorable, c'est-à-dire qu'un agent hydrophobe pourra être solubilisé dans l'eau et un agent hydrophile pourra, quant à lui, l'être dans un milieu hydrophobe. Les propriétés de ces parapluies moléculaires résident dans l'amphiphilie de ces composés et leur capacité à changer de conformation selon le composé et l'environnement.

1.2.2.1. Principes

1.2.2.1.1. Structure

La clé de leur structure est la présence des acides biliaires et en particulier de l'acide cholique. Comme mentionné plus tôt (Chapitre 1.1), l'acide cholique présente une face hydrophobe et une face hydrophile et son squelette stéroïde permet de couvrir une large surface (Figure 1.8). Les groupements hydroxyles de la face hydrophile peuvent aussi être transformés en groupements sulfate afin d'augmenter encore plus l'hydrophilie. L'agent aussi bien hydrophile qu'hydrophobe est alors lié à un ou plusieurs de ces dérivés d'acide cholique par des produits naturels tels que la spermine, la spermidine ou la *L*-lysine (Figure 1.21). Leurs nombreux travaux ont montré que pour afficher un recouvrement efficace, un minimum de deux acides choliques était nécessaire.⁶² Cependant, différents parapluies

moléculaires avec quatre ou huit acides choliques ont aussi été expérimentés. Plus le nombre d'acides choliques est élevé, meilleur est l'encapsulation de l'agent.^{63, 64, 65} Cependant, cela implique aussi une augmentation non négligeable de la masse moléculaire, rendant le parapluie moléculaire plus large qu'un phospholipide (masse supérieure à 750 Da), ce qui risque de ralentir la diffusion de manière drastique. Mais leurs travaux montrent qu'au contraire la vitesse de transport augmente avec le nombre d'acides choliques : deux bras < quatre bras < huit bras.⁶⁶ De plus, le composé **1.48** a montré sa capacité et rapidité à s'insérer dans des cellules HeLa (lignée de cellules résistantes issue de cellules cancéreuses prélevées en 1951 à Henrietta Lacks, atteinte d'un cancer de l'utérus).⁶⁷ Ceci est probablement dû à la présence des protéines et l'interface protéine/phospholipide qui leur procure un certain accès.⁶⁸ De plus, les parapluies sulfate, plus hydrophiles, traversent la membrane beaucoup plus rapidement que les parapluies hydroxylés.⁶⁶

Ces transporteurs vont complètement à l'encontre du modèle classique de diffusion à travers les bicouches lipidiques⁶⁶, où:

$$P = \frac{K \cdot D}{x}$$

avec P : coefficient de perméabilité

K : coefficient de partition eau/lipide

D : coefficient de diffusion

x : épaisseur de la bicouche

Une augmentation de la taille amène une diminution de D tandis qu'une augmentation de l'hydrophilie entraîne une diminution de K. Les deux facteurs combinés devraient causer la diminution de la perméabilité et produire un mauvais transporteur. Il y a clairement d'autres facteurs que la taille et la lipophilie mis en cause dans le transport des parapluies moléculaires.

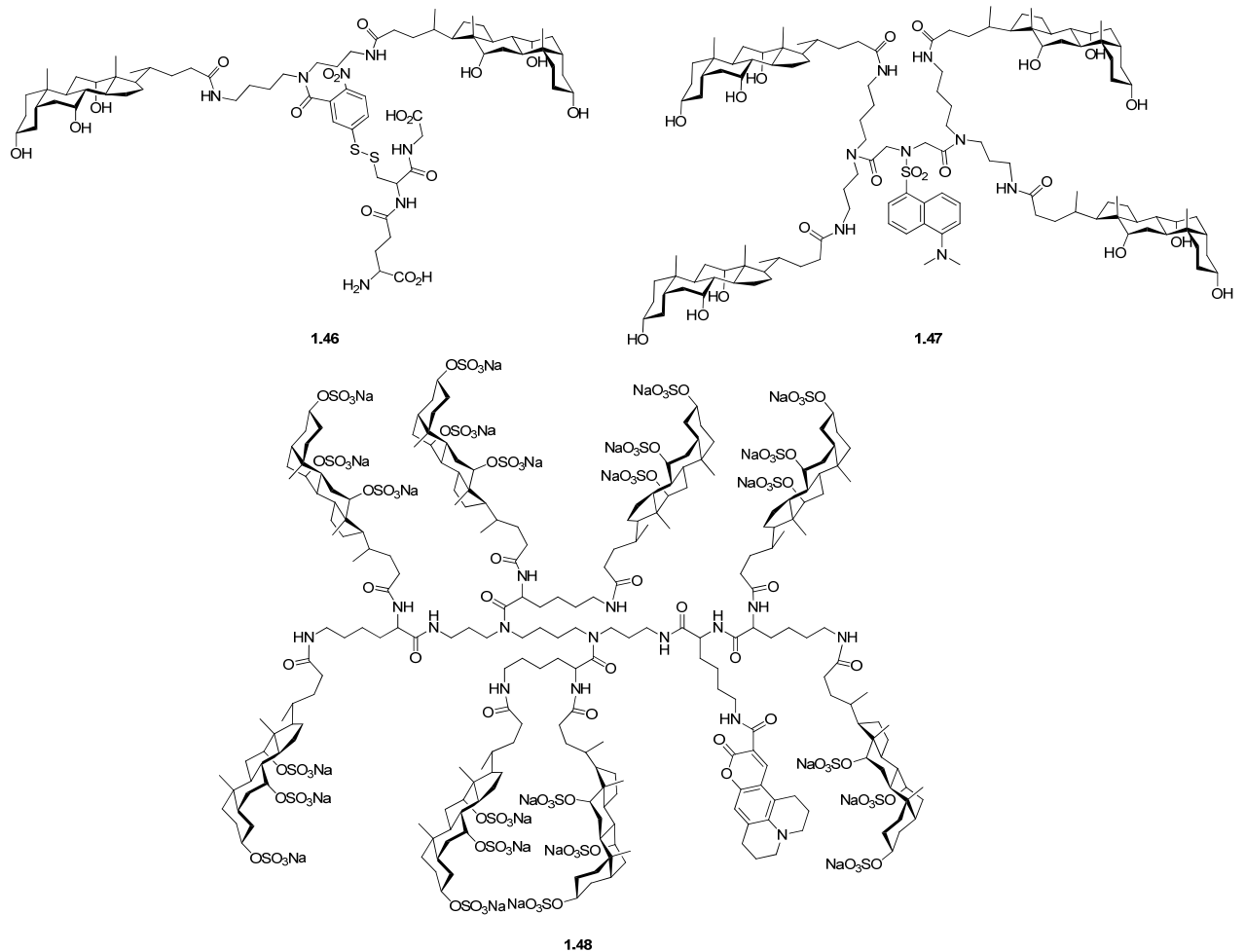


Figure 1.21. Exemples de parapluies moléculaires.^{69, 63, 66}

1.2.2.1.2. Mécanisme de transport

De nombreuses expériences appuient l'efficacité du transport des parapluies moléculaires. En effet, les agents à transporter, de différentes polarités et tailles, ont été dérivés en thiol et sont liés au parapluie par un pont disulfure. Leur entrée dans les liposomes a été mise en évidence par l'échange entre l'agent transporté et le glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) présente à l'intérieur du liposome (Figure 1.22).^{69, 70, 71}

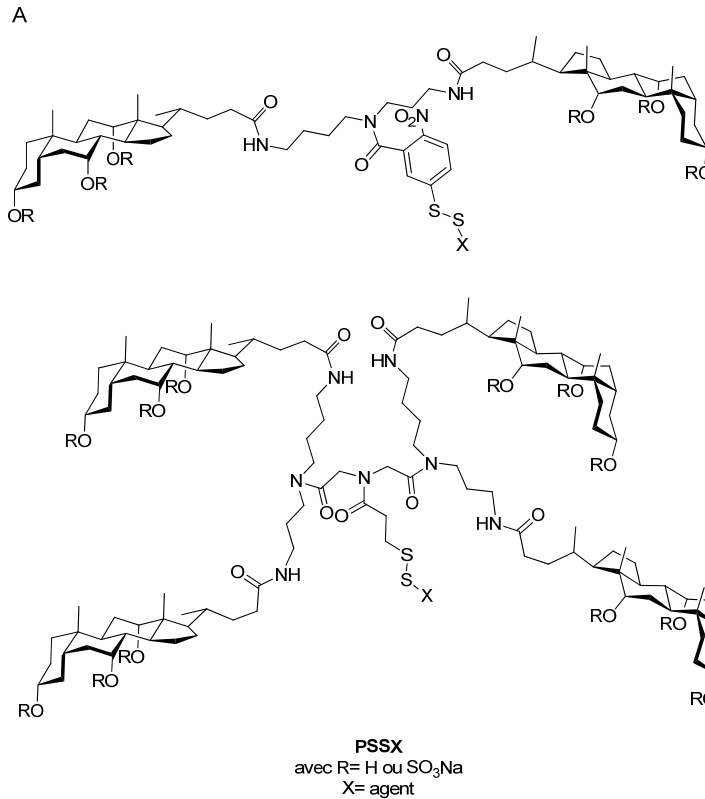


Figure 1.22. A) Parapluies moléculaires contenant un pont disulfure. B) Équation de la réaction d'échange entre le parapluie moléculaire et le glutathion (GSH).⁷²

Le transport transmembranaire se fait par diffusion passive. Cependant le mécanisme de transport est encore à clarifier. Le mécanisme, que Regen *et al.* proposent, a lieu en six étapes (Figure 1.23)⁷² :

- A. Approche de la bicouche lipidique en conformation exposée. L'exposition des faces hydrophobes au milieu polaire est ainsi minimisée tandis que l'agent hydrophile est complètement à découvert.
- B. Adsorption sur la surface de la bicouche favorisée par les forces hydrophobes entre les faces hydrophobes du parapluie et l'intérieur hydrophobe de la bicouche. Les faces hydrophiles, quant à elles, restent en contact avec les têtes hydrophiles de la surface.

- C. Absorption à l'intérieur de la membrane favorisée par les forces hydrophobes avec la bicouche et, les interactions dipôle-dipôle et les liens hydrogène intramoléculaires entre les faces hydrophiles du parapluie et l'agent polaire.
- D. Translocation vers le feuillet interne de la bicouche et rotation du parapluie moléculaire de 180° . L'environnement reste le même, le parapluie est toujours en conformation renfermée.
- E. Ouverture du parapluie à la surface de la membrane avec l'agent exposé et le parapluie à plat sur la bicouche.
- F. Désorption du parapluie moléculaire et libération du parapluie moléculaire de l'autre côté de la membrane. Le parapluie se retrouve dans une conformation totalement exposée avec des interactions intramoléculaires entre les deux faces hydrophobes du parapluie.

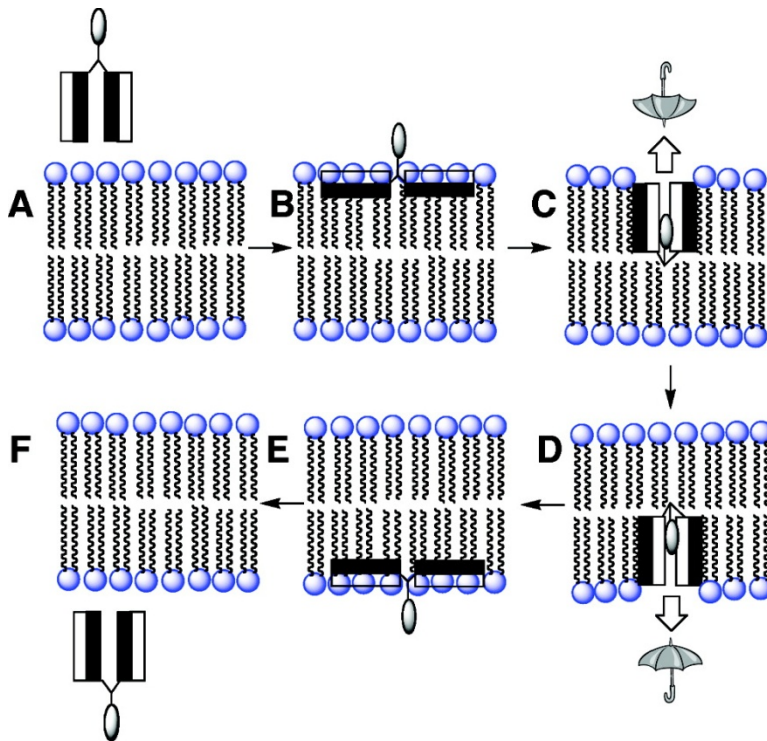


Figure 1.23. Mécanisme proposé pour le transport transmembranaire des parapluies moléculaires.⁷²

Le mouvement de repliement et changement de conformation a été mis en évidence par fluorescence, en variant la polarité des solvants (mélange DME/eau) montrant la

formation d'une cavité hydrophobe lorsqu'un agent hydrophobe (le groupement dansyle) est mis en contact avec un environnement hautement polaire.⁶²

D'une autre part, la capacité du parapluie d'accélérer le transport à travers la bicouche a été démontrée. La réaction d'échange entre le pont disulfure du parapluie moléculaire et le glutathion est de pseudo-premier ordre ce qui implique que le transport est rapide comparativement à la réaction d'échange. Le temps de demi-vie du transport à travers des membranes phosphatidylglycérol est de 15 min et 2,5 h respectivement pour **PSSX** avec deux et quatre acides choliques.⁷³ Ces vitesses sont nettement supérieures à celles du mouvement transmembranaire du phosphoglycérol seul (temps de demi-vie de huit jours)⁷⁴ ce qui souligne l'action du parapluie.

Pour mieux comprendre où se situent les parapluies moléculaires dans le processus de transport dans la bicouche phospholipidique, ils ont mené une étude par analyse Parallax, consistant en l'utilisation de phospholipides fonctionnalisés à diverses positions (sur la tête hydrophile, au milieu ou en queue de la chaîne hydrophobe) par un groupement capable de quencher la fluorescence du parapluie. Par étude de fluorescence, la désactivation du fluorophore porté par le parapluie moléculaire indique la position de celui-ci.⁷⁵ Leur étude les a conduits à déduire les positions favorisées dans la bicouche :

- la plus favorisée correspond à une position en surface de la bicouche, le parapluie à plat sur la surface, cette structure étant optimale pour entraîner l'agent à l'intérieur de la bicouche (Figure 1.24.A)
- une sous-population présente un peu plus à l'intérieur de la membrane existe également (Figure 1.24.B ou C).

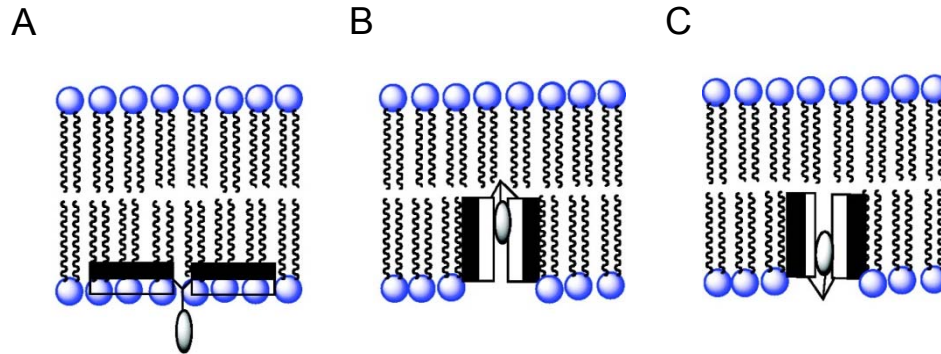


Figure 1.24. Conformations possibles favorisées lors du transport transmembranaire.⁷⁵

Par ailleurs des tests dans l'eau ont confirmé la conformation totalement exposée lorsqu'en milieu aqueux.

Toujours dans le but d'appuyer le mécanisme multiétapes, Regen *et al.* ont étudié la cinétique du phénomène. Ils ont remarqué que les parapluies sulfate, présentant une plus grande hydrophilie, montraient peu d'affinité pour la bicouche et étaient libérés rapidement des liposomes avec une loi de vitesse du premier ordre. Quant aux parapluies hydroxylés, liés plus fortement à la membrane, la libération des parapluies a lieu en deux temps : tout d'abord une phase rapide puis une phase plus lente. La première correspond à la désorption des parapluies de la surface externe des liposomes alors que la deuxième plus lente correspond à la translocation réversible des parapluies de l'intérieur vers l'extérieur des liposomes.⁶⁶ Cela soutient les différentes étapes du mécanisme : adsorption, déshydratation, diffusion, réhydratation et désorption.

Pour aller plus loin dans l'étude mécanistique, les tests *in vitro* dans les cellules HeLa ont aussi permis de confirmer le mécanisme d'intégration. La distribution est diffuse dans le cytoplasme et se concentre en certains points dans le noyau, ce qui indique une diffusion passive.⁶⁸ Par ailleurs, des études plus poussées par Ren *et al.* ont permis de constater qu'en fait plusieurs modes d'internalisation des parapluies moléculaires sont impliqués : la diffusion passive, l'endocytose dépendante de la clathrine (formation de vésicules de 120 nm couvertes par la clathrine) et l'endocytose par formation de cavéoles

(vésicules en forme d'oméga de 50 à 80 nm recouvertes par la cavéoline) ou de rafts (microdomaines lipidiques concentrant certaines protéines).^{76, 77}

1.2.2.2. Entités transportées

À l'aide de ces transporteurs directement greffés sur la molécule à transporter, de nombreux exemples de transport transmembranaire ont démontré la polyvalence de ces parapluies moléculaires.

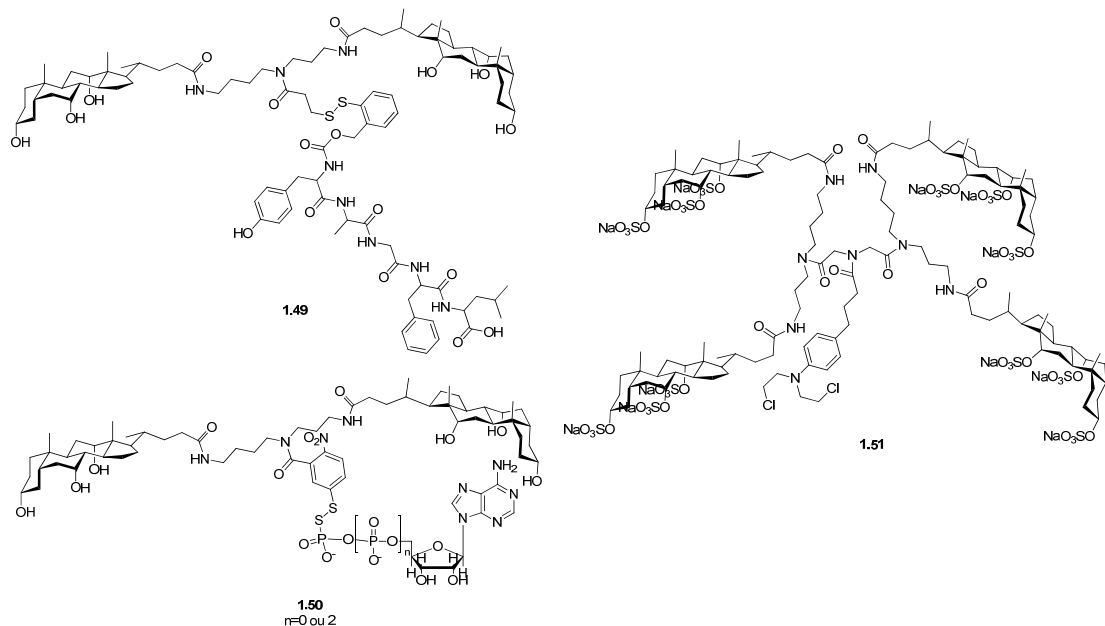


Figure 1.25. Exemples de composés dérivés par un parapluie moléculaire et transportés.^{71, 70, 64}

Après la mise au point du concept, les premiers travaux de Regen *et al.* décrivent l'interaction entre leurs parapluies moléculaires et de l'ADN.⁷⁸ Ils parviennent à extraire de l'ADN vers un solvant hydrophobe (octanol). Ces observations les amènent à envisager leurs parapluies moléculaires comme agents de transfert de gènes.

Le premier véritable test de transport est mené avec un peptide, le glutathion, qui est un antioxydant protégeant les cellules. Un dysfonctionnement de son transport transmembranaire au niveau des poumons entraîne un des symptômes de la fibrose

kystique.⁷⁹ Le parapluie moléculaire dérivé avec un glutathion **1.46** est transporté dans des vésicules de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC) contenant du glutathion.⁶⁹ La réaction d'échange entre le glutathion intravésiculaire et le parapluie moléculaire libère ainsi la forme oxydée (Figure 1.22.B), mettant en évidence la présence des dérivés parapluie à l'intérieur des vésicules. Un autre peptide, le DADLE (H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-OH), a été transporté à l'aide d'un parapluie moléculaire **1.49**. Le DADLE a une action intracellulaire dans certains cas et peut provoquer la prolifération des cellules.⁸⁰ Le design de ce parapluie moléculaire permet de relarguer le pentapeptide à l'intérieur des cellules en présence de glutathion sans aucune modification du peptide.⁷¹

Par le même procédé, le transport de dérivés thiol de l'ATP et l'AMP a été prouvé.⁷⁰ Les parapluies moléculaires **1.50** pourraient alors être exploités comme des prodrogues d'oligonucléotides antisens dans les thérapies géniques contre des maladies inflammatoires, virales ou cancers.⁸¹

Des études préliminaires ont été menées avec un anticancéreux, peu soluble dans l'eau, le chlorambucil.⁶⁴ La dérivation avec des acides choliques sulfate a permis de diminuer son hydrolyse en milieu aqueux et d'augmenter sa solubilité, le chlorambucil étant ainsi protégé de son environnement. Mais ces dérivés **1.51** présentent une activité anticancéreuse plus modeste. La répartition de ces dérivés dans les cellules devrait être différente de celle du composé initial et éventuellement entraîner une meilleure efficacité.

1.2.3. Conclusion

Le transport de grosses molécules est aussi important que le transport d'ions. Il s'agit d'un défi clé pour le monde pharmaceutique. Tout principe actif doit pouvoir accéder à sa cible sans être stoppé par la membrane cellulaire.

Le concept de parapluie moléculaire a été développé et étudié extensivement lors des dernières années. Sa capacité à se replier et protéger l'entité à transporter, ainsi que sa capacité à s'adapter à l'environnement qui l'entoure, en fait un outil de transport transmembranaire prometteur. Il est d'autant plus puissant qu'il a démontré son efficacité et sa polyvalence.

1.3. Rotaxane

1.3.1. Molécules enchevêtrées

Les [n]-rotaxanes, n indiquant le nombre d'éléments entrelacés, font partie de la famille des molécules mécaniquement bloquées. En effet, ces architectures contiennent plusieurs molécules enchevêtrées entre elles sans lien covalent. Les autres membres de cette famille sont les [n]-caténanes, les suit[n]anes et autres nœuds moléculaires.^{82, 83} Les premiers exemples synthétiques sont apparus dans les années 60⁸⁴ et leur développement n'a cessé de s'accroître depuis. L'essor de ce domaine peut être expliqué par l'avantage de ces liens mécaniques : « *Mechanical bonds present chemists with the best of both worlds – that is, the molecular and 'supramolecular' ones – since they come with the robustness provided by covalent bonding throughout, yet contain therein all the intricacies and subtleties associated with coordinative and noncovalent bonding [...]* » (J.F. Stoddart).⁸³

Il existe différents modes d'assemblage de ces entités avec des approches thermodynamiques ou cinétiques, mais l'élément essentiel à leur assemblage est la présence de site(s) de reconnaissance. Il est nécessaire au rapprochement des différents éléments du système avant le blocage mécanique. Toutes les synthèses de ces molécules entrelacées demandent la présence d'un gabarit, qu'il soit intégré à une des molécules ou extérieur. Les interactions supramoléculaires mises en jeu par ce gabarit peuvent être de différentes natures: ponts hydrogène, métal-ligand, empilement π - π , interactions hydrophobes (Figure 1.26). Évidemment, le solvant doit aussi être choisi avec soin pour éviter toute compétition.

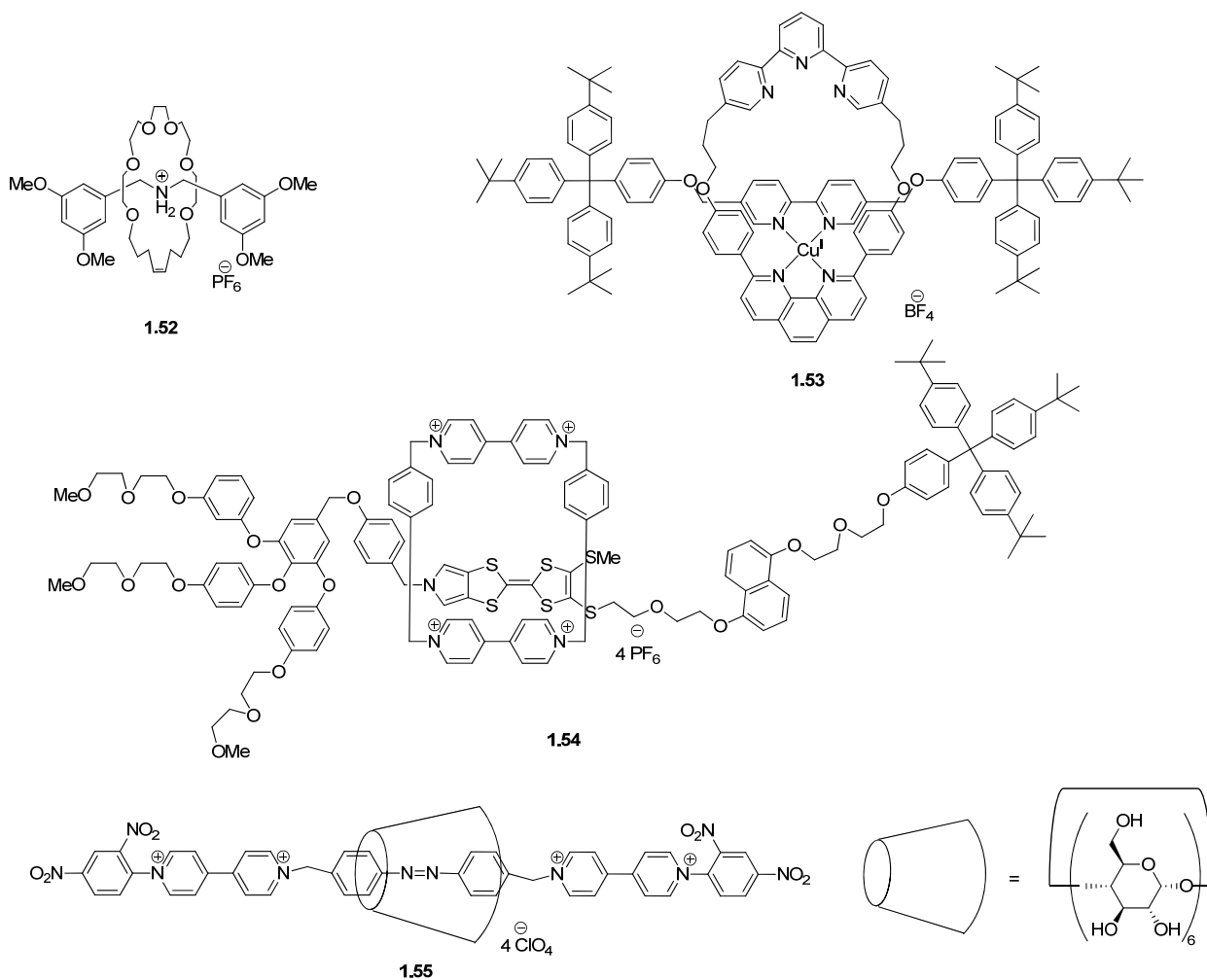


Figure 1.26. Exemples de rotaxanes mettant en jeu différents types d'interactions.^{85, 86, 87, 88}

1.3.2. Assemblage de rotaxanes

Les [2]-rotaxanes sont des molécules sous forme d'haltère sur laquelle se situe un macrocycle. La roue, entourant l'axe, est bloquée mécaniquement par les deux groupements bloquants de part et d'autre de l'axe (Figure 1.27).

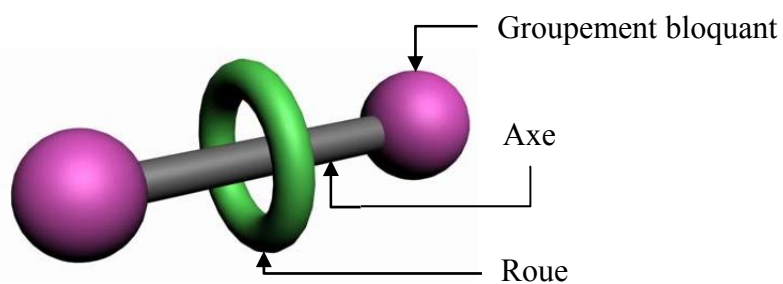


Figure 1.27. Représentation schématique d'un [2]-rotaxane.

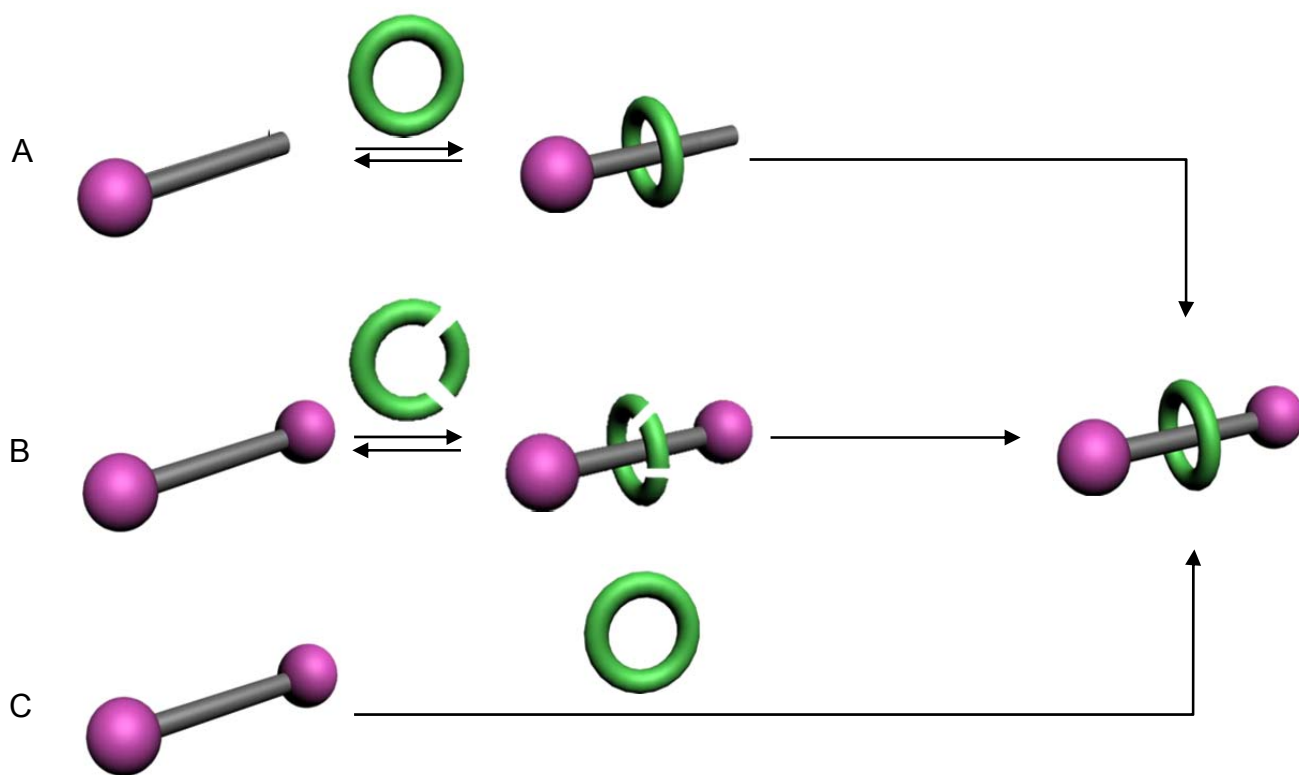


Figure 1.28. Représentation schématique de l'assemblage d'un [2]-rotaxane. A) Enfilage et encapage. B) Clipage. C) Glissement.

Différentes méthodes sont utilisées pour l'assemblage des différentes parties d'un rotaxane : l'enfilage suivi par l'encapage (« threading », « end-capping »), le clipage (« clipping ») et le glissement (« slippage ») (Figure 1.28). La première correspond à l'enfilage de la roue sur l'axe suivi par l'ajout du ou des groupements bloquants sur l'axe;

la deuxième méthode part de l'axe déjà fermé des deux côtés par les groupements encombrants et la roue fragmentée est cyclisée autour; la dernière ne requièrent aucune formation de lien car les deux éléments du rotaxane sont déjà entiers. Par chauffage, la roue est glissée sur l'axe bloquée.

Généralement, l'approche cinétique est adoptée que ce soit par enfilage/encapage ou par clipage. L'axe et la roue sont liés par des interactions non covalentes coopératives et la formation de liens covalents irréversibles entre l'axe et les groupements bloquants ou pour cycliser le clip, fixe le système. Les réactions mises en jeu sont aussi variées que les structures de rotaxane :

- Catalysées par un métal : couplage de Sonogashira,⁸⁹ substitution propargylique,⁹⁰ hydrosilylation,⁹¹ allylation de Tsuji-Trost,⁹² métathèse⁹³
- Cycloaddition : Diels-Alder,⁹⁴ chimie « click »⁹⁵
- Estérification⁹⁶
- Echange de ponts disulfure⁹⁷
- Formation d'imines⁹⁸
- Réaction de Wittig⁹⁹
- O-glycosylation¹⁰⁰
- Coordination par une métalloporphyrine¹⁰¹
- Couplage avec DCC¹⁰²

Or le principal inconvénient de cette méthode réside en la formation de produits secondaires (roue et axe bloqué libres) diminuant considérablement le rendement.

C'est pourquoi l'approche thermodynamique peut être préférée, comme l'assemblage par glissement. La taille de la roue et des groupements bloquants ainsi que le solvant doivent être soigneusement choisis. Le chauffage va permettre de déformer la roue afin de surmonter la barrière d'énergie et lui permettre d'insérer l'axe fermé. Le pseudo-rotaxane est d'abord stabilisé par des interactions supramoléculaires et le système est bloqué après refroidissement. La barrière d'énergie à franchir redevient alors infranchissable et la roue est cinétiquement bloquée. Mais comme l'indique les conditions

utilisées pour cette méthode, les rotaxanes faits de cette façon ne sont stables que sous certaines conditions.

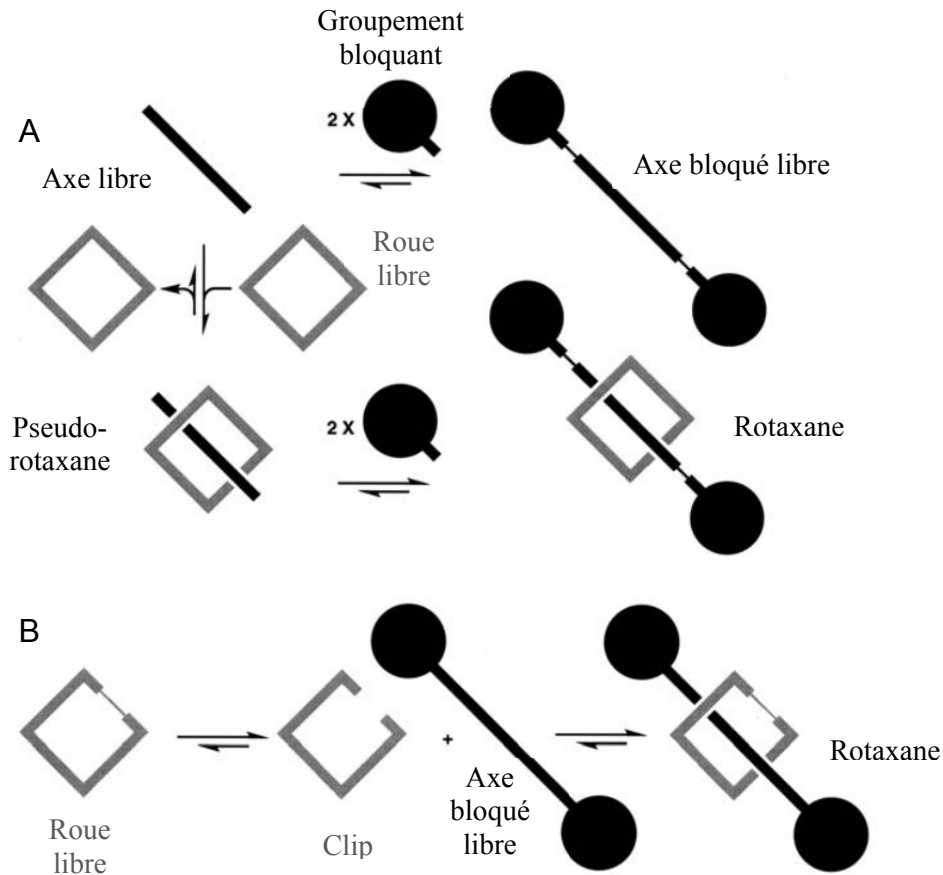


Figure 1.29. Principes de la chimie covalente dynamique pour la formation de rotaxane. A) Enfilage/encapage. B) Clipage. Les traits plus fins représentent des liens covalents réversibles.¹⁰³

La chimie covalente dynamique a été introduite dans ce domaine afin d'améliorer les rendements d'assemblage par enfilage/encapage et clipage qui donnent des rotaxanes stables sur une plus grande gamme de températures. Les réactions réversibles pour la formation des liens covalents sont mises à profit pour déplacer les équilibres vers la formation du rotaxane et minimiser la quantité de sous-produits, c'est-à-dire l'axe bloqué et la roue libres. Dans le cas de l'enfilage suivi par l'encapage (Figure 1.29.A), trois équilibres coexistent : la complexation de la roue sur l'axe libre, la formation des liens entre ce pseudo-rotaxane et les groupements bloquants (menant au rotaxane) et la formation de ces

mêmes liens en l'absence de roue (menant à un sous-produit). Dans le cas du clipage (Figure 1.29.B), deux équilibres coexistent : la cyclisation du clip seul (menant à un sous-produit) et sa cyclisation sur l'axe bloqué (menant au rotaxane). La réversibilité de chacune des étapes de la formation du rotaxane permet ainsi de privilégier la formation du rotaxane. Ce principe a été mis en évidence par les réactions de formation d'imine,⁹⁸ métathèse⁹³ ou échange de ponts disulfure⁹⁷ par lesquelles l'assemblage de rotaxane se fait avec des rendements supérieurs à 80%.

1.3.3. Applications

L'optimisation des méthodes de synthèse a permis d'atteindre des systèmes de plus en plus complexes introduisant la multivalence : plusieurs axes, plusieurs roues, plusieurs sites de reconnaissance. Ainsi sont nées les machines moléculaires dont le mouvement moléculaire est contrôlé. La plupart de ces machines, appelées « molecular switch » ou « molecular shuttle », présente une roue capable de se déplacer d'un site de reconnaissance à l'autre, se comportant ainsi comme un interrupteur. Les stimuli mis en jeu pour le contrôle sont chimiques (changement de pH), électrochimiques (réaction rédox) ou photochimiques (transfert d'énergie). En solution, le mouvement est multidirectionnel. Pour avoir une uniformité dans le déplacement, l'organisation en surface est indispensable.

De telles propriétés sont très intéressantes pour le monde électronique, réduit ici à l'échelle moléculaire. Les [2]-rotaxanes bistables sont un parfait modèle du système binaire. Ancrer ces machines à des électrodes métalliques permet de « voir » le mouvement d'une position ON à une position OFF (Figure 1.30).¹⁰³ La roue migre d'un site à l'autre selon le sens du courant appliqué et le courant relevé indique la position dans laquelle elle se trouve. De tels systèmes permettent de miniaturiser la mémoire à des tailles minimales : il serait ainsi possible de stocker 10 Go sur un centimètre carré.¹⁰⁴

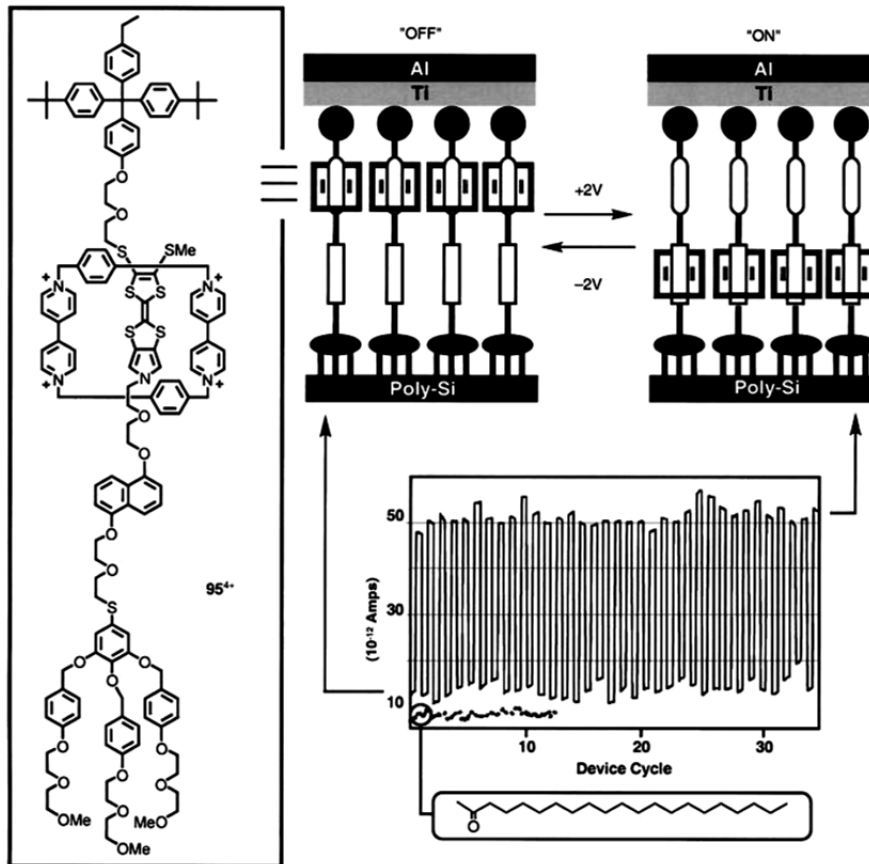


Figure 1.30. Exemple de [2]-rotaxane bistable greffé sur des électrodes.¹⁰³

Mais l'électronique moléculaire n'est pas la seule application de ces machines moléculaires. Certains groupes se sont intéressés à une application biologique, tout particulièrement le transport de médicament. Zink *et al.* ont mis au point des nanovalves à la surface de nanoparticules de silice mésoporeuses.¹⁰⁵ Il est possible de remplir ces nanoparticules avec la molécule à transporter et de relarguer le moment voulu. Ces valves contrôlent alors la libération du médicament emprisonné dans les pores de la nanoparticule (Figure 1.31).

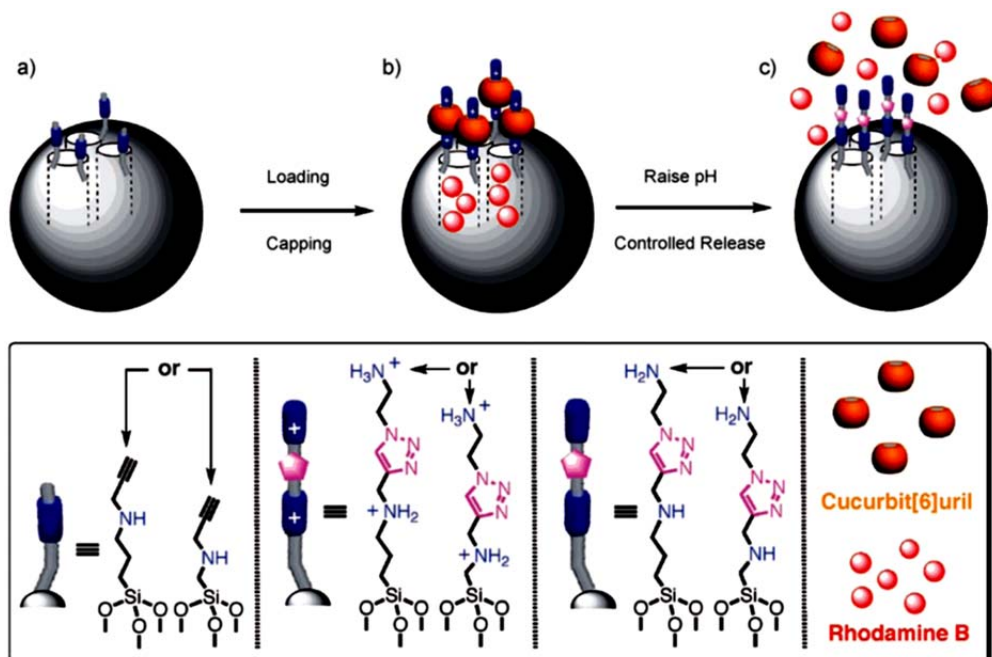


Figure 1.31. Application des nanovalves pour le transport de médicament : principe.¹⁰⁵

D'autres équipes se sont aussi basées sur des rotaxanes pour des applications biologiques. Smithrud *et al.* ont synthétisé un rotaxane **1.56** capable de complexer l'arginine afin de jouer le rôle de récepteur artificiel (Figure 1.32).¹⁰⁶ La même équipe s'est par la suite intéressée au transport de médicaments, plus particulièrement de peptides par le rotaxane **1.57** (Figure 1.32).¹⁰⁷ Ce dernier présente un bon équilibre entre une bonne solubilité dans l'eau et une bonne lipophilie. Une forte affinité existe entre le groupement bloquant en forme de pince et des pentapeptides négativement chargés marqués par la fluorescéine. Un changement de position de la roue en milieu hydrophobe permet de masquer les charges des peptides par celles de l'arginine de la roue. Ce changement de conformation, permettant son insertion dans un milieu hydrophobe, lui confère de très bonnes propriétés de transport transmembranaire. Coutrot *et al.* ont utilisé le glycorotaxane **1.58** (Figure 1.32) dans lequel le pentapeptide à transporter joue lui-même le rôle d'une partie de l'axe, sur laquelle va se complexer la roue, et d'un groupement bloquant.¹⁰⁸ Le second groupement bloquant est un galactose. Le clivage par une enzyme spécifique va engendrer la libération du pentapeptide. Leurs résultats montrent une bonne protection du pentapeptide contre de nombreuses peptidases présentes dans le plasma humain et

constituent le premier pas pour le développement d'une « gaine moléculaire » pour le transport de peptide.

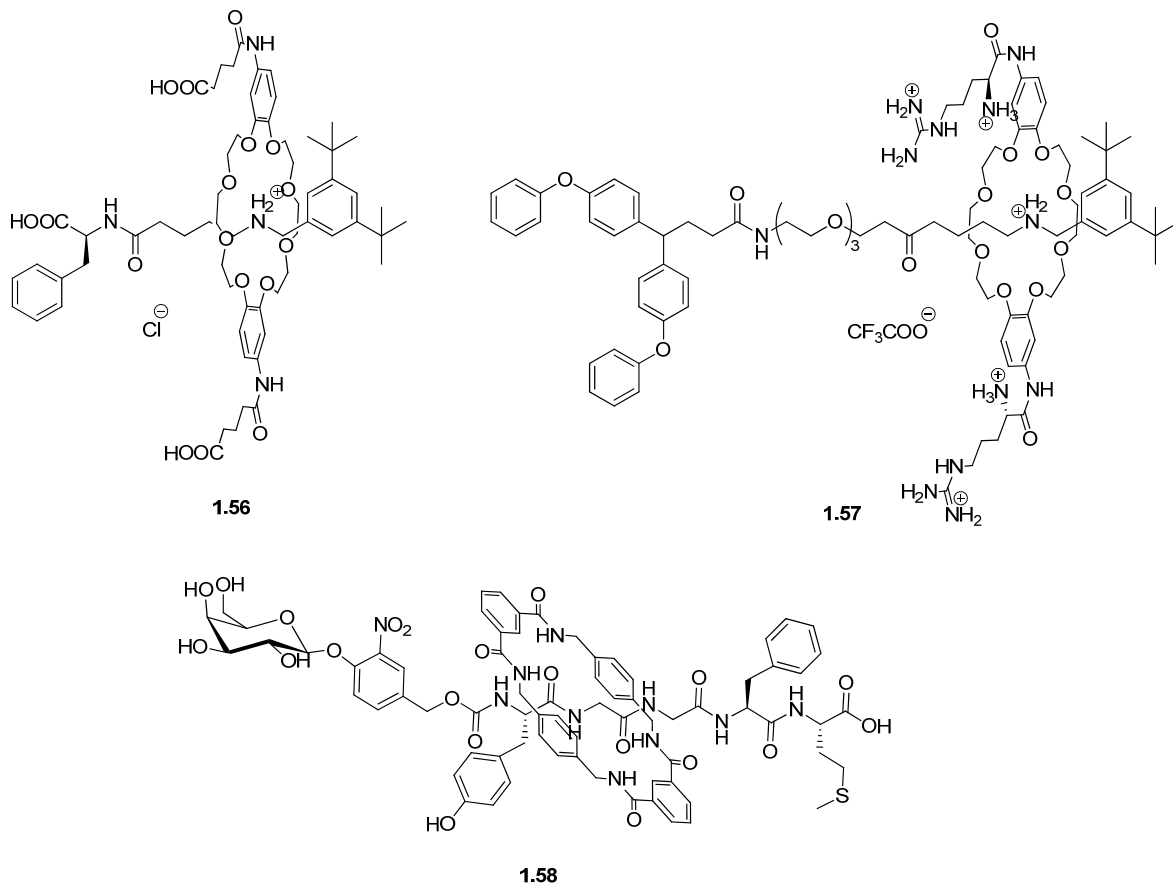


Figure 1.32. Exemples de rotaxane avec application biologique.^{106, 107, 108}

1.3.4. Conclusion

Le rotaxane est une architecture particulière de molécules enchevêtrées qui a d'abord été traitée comme une bête curieuse mais qui depuis a connu un très grand essor. La diversité des squelettes et des champs d'applications est tellement vaste qu'il ne dépend que de l'imagination du créateur. De nombreux exemples ont montré son utilité dans le domaine pharmaceutique pour le transport de médicaments quelle que soit la stratégie envisagée.

1.4. Axe et rotaxane parapluie

1.4.1. Concept

Sur la base des notions abordées plus tôt, nous avons voulu élaborer une entité capable de traverser facilement les membranes cellulaires dans le but de transporter soit un anion, soit un médicament. Sachant que souvent les transporteurs développés jusqu'à présent ne peuvent transporter que l'un ou l'autre, en développer un capable de transporter les deux est devenu un vrai défi.

Les parapluies moléculaires de Regen *et al.*⁶¹ ont montré leur efficacité pour faciliter le passage transmembranaire de différents composés polaires et volumineux, d'où l'intégration d'un parapluie à notre concept. D'un autre côté, le moyen d'y lier un anion ou un médicament est à élaborer. Dans le cas des parapluies moléculaires, les composés à transporter sont liés de façon covalente au parapluie impliquant une fonctionnalisation de chacun de ces composés. La littérature montre que pour lier des anions, la présence de groupements donneurs de ponts hydrogène est nécessaire. Mais la formation de liens hydrogène n'est pas exclusive aux anions. Elle peut se faire à des molécules non chargées possédant des groupements accepteurs de liens hydrogène. Cela pourrait présenter un grand avantage : le médicament n'a pas à être modifié. Cependant, contrairement à un petit anion qui pourra être complexé et facilement encapsulé pour être transporté, une molécule polaire d'une taille plus conséquente ne sera liée assez fortement de cette façon pour être entraînée dans la membrane sans occasionner beaucoup de pertes lors du processus. La solution à ce problème se situe dans les molécules mécaniquement bloquées (rotaxane, caténane...) dans le cas de médicaments cycliques (utilisées comme roue de rotaxane). Le parapluie peut être fixé sur l'axe du rotaxane et l'axe sera ensuite responsable de la complexation du médicament cyclique (en tant que roue) ou de l'anion.

De nombreuses molécules biologiquement actives se trouvent être cycliques. En effet, un intérêt grandissant est porté aux peptides cycliques, plus résistants aux protéases que les peptides linéaires. Ils présentent des propriétés antibiotiques, immunosuppressives, antitumorales et antivirales.¹⁰⁹ Une autre famille de molécules biologiquement actives, les

macrotétrolides, est aussi constituée de composés macrocycliques. Parmi eux, les composés de la famille des nactines, présentant quatre unités tetrahydrofuranyle et quatre liens lactone, possèdent des propriétés antibiotiques, antiparasitaires, insecticides et immunosuppresseives.¹¹⁰ Ce sont des ionophores capables de complexer les cations (K^+ , Na^+ , Rb^+ , NH_4^+). Cette particularité rappelle une autre classe d'ionophores cycliques synthétisée pour la première fois par Pedersen: les éthers couronne.¹¹¹ Comme évoqué plus tôt, les éthers couronne sont très couramment utilisés comme roue de rotaxane. Leur structure similaire, comportant des dipôles capable de lier un cation alcalin, doivent avoir le même comportement vis-à-vis du site de reconnaissance présent sur l'axe d'un rotaxane.

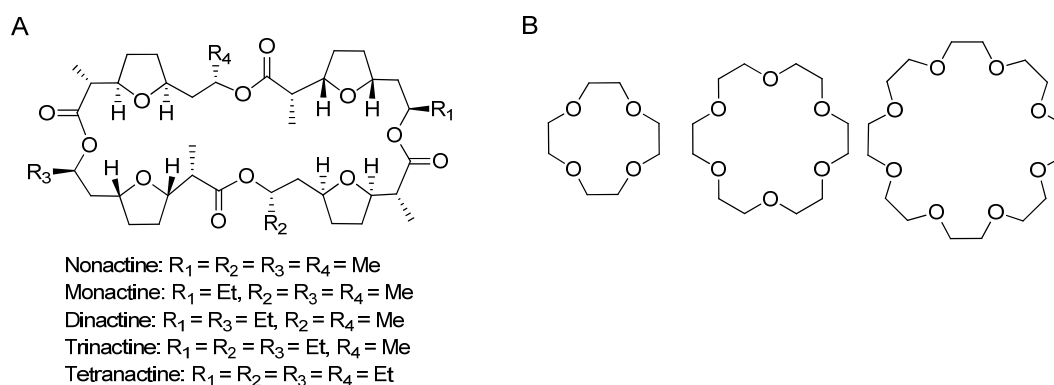


Figure 1.33. Ionophores. A) La famille des nactines. B) Exemples d'éthers couronne.

1.4.2. Mécanisme de transport proposé

Le passage à travers la bicouche lipidique serait rendu possible grâce au parapluie du rotaxane. Celui-ci adopterait différentes conformations selon son affinité avec l'axe et avec l'environnement afin de minimiser les interactions défavorables. Le mécanisme proposé présente quatre étapes (Figure 1.34). Dans un premier temps, le rotaxane pourrait s'approcher de la surface de la membrane dans une conformation ouverte, avec l'axe et la roue exposés dans le milieu, et les faces hydrophiles du parapluie vont adhérer aux têtes hydrophiles des phospholipides. Par la suite, le repliement des bras du parapluie recouvrirait la roue polaire lors de l'insertion du rotaxane dans la partie hydrophobe de la membrane. Dans un troisième temps, un retournement libérerait l'axe du rotaxane de l'autre

côté de la membrane cellulaire et enfin, la roue pourrait être relarguée à l'intérieur de la cellule par clivage d'un groupement bloquant.

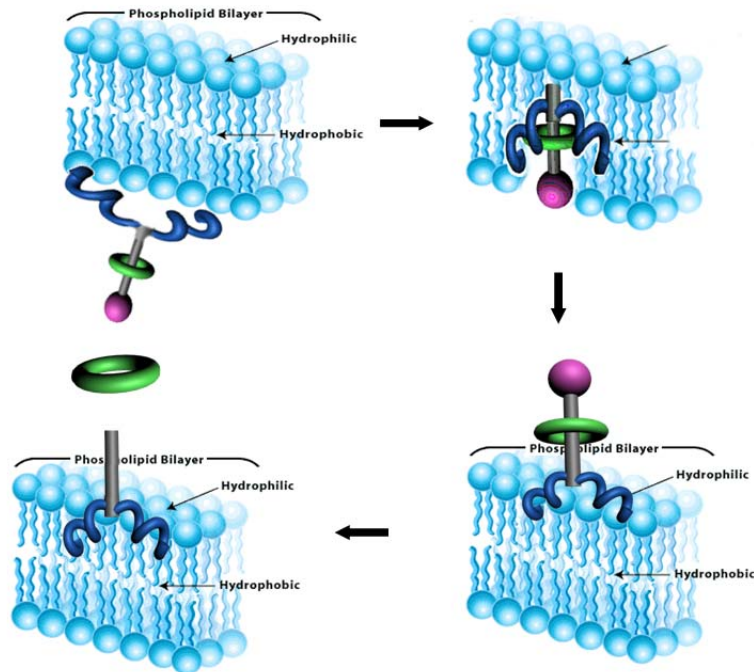


Figure 1.34. Mécanisme hypothétique du transport transmembranaire.

La force motrice de ce phénomène serait liée au gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Selon les travaux effectués sur les parapluies moléculaires, le mécanisme principal du transport pourrait être la diffusion passive et dans une moindre mesure, l'endocytose.⁷⁶

1.4.3. Objectifs

L'objectif des travaux présentés dans cette thèse fut d'élaborer la structure et la synthèse d'un transporteur axe parapluie. Celui-ci pourra véhiculer à la fois des anions ou un médicament cyclique à travers la membrane cellulaire. Dans un premier temps, la synthèse des différents axes parapluie sera présentée. Elle sera suivie des méthodes utilisées pour l'assemblage des rotaxanes parapluie. Puis le repliement et le changement de conformations des axes et rotaxanes parapluie, dépendamment de leur environnement, seront étudiés par RMN et fluorimétrie. Par la suite, leurs propriétés de transport de

chlorures ont été également analysées. Et enfin, l'aptitude des rotaxanes parapluie à traverser une bicouche lipidique et relarguer sa roue à l'intérieur d'une vésicule sera mis en évidence.

Chapitre 2 Les axes parapluie

L'axe parapluie est la clé de voûte de notre système de transport. Il doit présenter certaines caractéristiques primordiales pour le transport transmembranaire (faculté à s'insérer dans une bicouche phospholipidique) et pour le transport d'anion ou de macrocycle (présence d'un site de reconnaissance adapté). Mais son élaboration laisse aussi des libertés sur certains aspects de sa structure.

2.1. Design

La structure des axes parapluie a été conçue de sorte à faciliter son passage à travers une bicouche lipidique et de permettre le transport d'une roue. Pour cela, la conception des différents fragments (Figure 2.1) fut, en partie, inspirée de travaux effectués dans la littérature.

Pour modéliser notre médicament-roue, nous nous sommes basés sur un éther couronne commercial capable de complexer le même type de cations que les nactines (Na^+ , K^+ , NH_4^+). Tout d'abord, l'axe du rotaxane doit être capable de complexer une roue de type éther couronne. Le site de reconnaissance le plus utilisé pour ce type de roue est le dialkylammonium secondaire, notamment le dibenzylammonium. Les interactions dipôle-charge et dipôle-dipôle permettent d'atteindre des constantes d'association allant jusqu'à $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ dépendamment du solvant.¹¹²

De plus, en utilisant un éther couronne de type dibenzo-24-crown-8 (DB24C8), des interactions empilement π - π viennent renforcer l'association. Cette forte association permet d'assembler un pseudo-rotaxane assez stable pour en faire un rotaxane par encapage. Par ailleurs, le site ammonium est aussi un bon groupement pour lier un anion, étant un bon donneur de liaisons hydrogène.

Dans un second temps, le parapluie doit être attaché à l'axe par une articulation flexible, permettant le changement de conformation et un repliement efficace. Les travaux de Regen *et al.* ont montré que seuls deux acides choliques reliés par une triamine flexible sont nécessaires pour masquer des composés parfois volumineux.⁶² Pour les parapluies

moléculaires, la spermidine a été utilisée comme articulation, étant un produit naturel et représentant moins de risque de toxicité. Cependant, pour nos études préliminaires, nous avons choisi la bis(3-aminopropyl)amine, présentant une chaîne de carbones légèrement plus courte, pour son coût bien moindre (0,413 CAD/g contre 21,6 CAD/g pour la spermidine).¹¹³

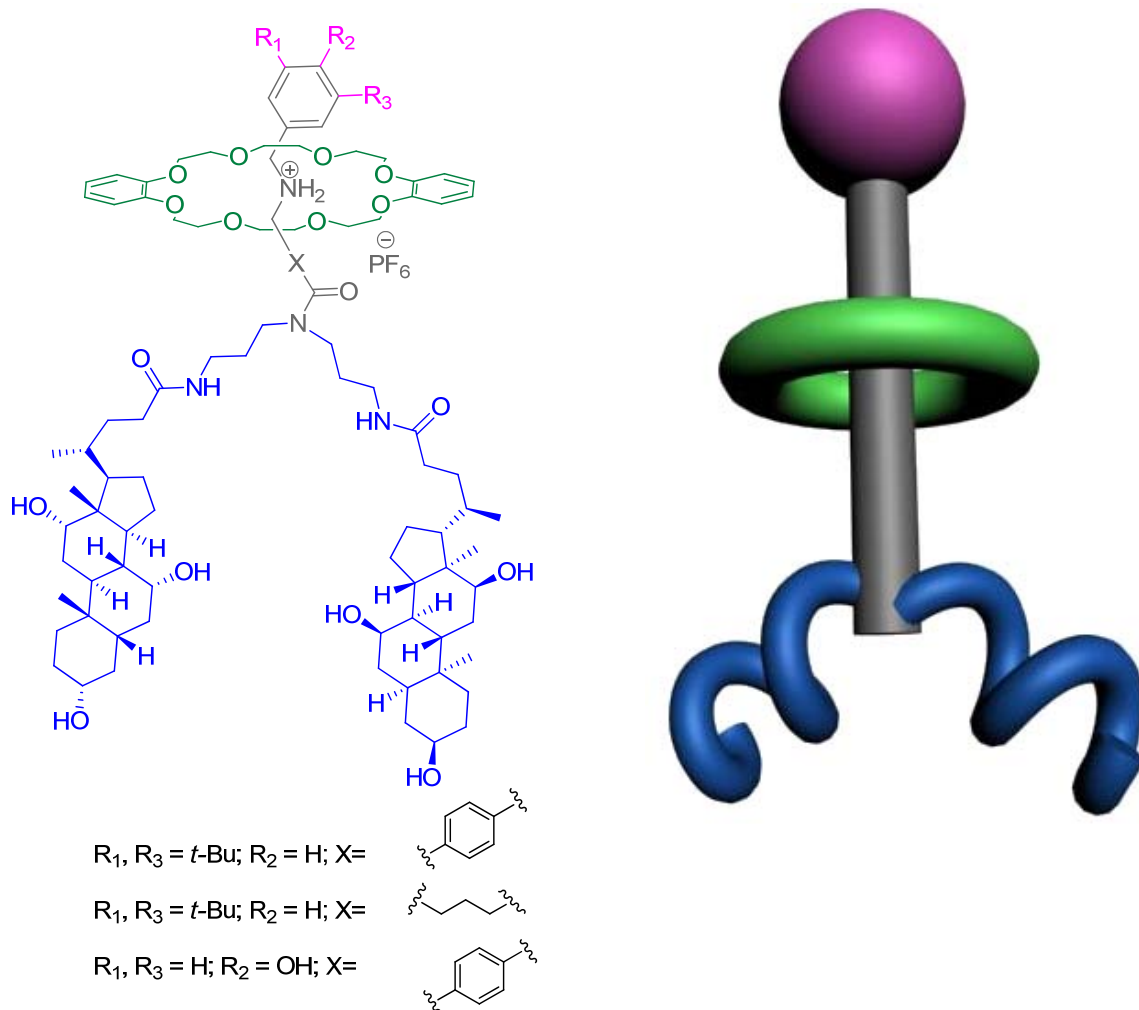


Figure 2.1 Structure générale du rotaxane-parapluie et sa représentation schématique.

Étant assez encombrant, le parapluie constitue le premier groupe bloquant du rotaxane. Le deuxième pourra être solutionné selon le mode de relargage choisi (enzymes, réarrangement d'un groupement fulgide¹¹⁴).

Différents motifs ont été choisis pour l'axe (X) et pour le groupement bloquant (R_1 , R_2 , R_3). La variation au niveau de l'axe peut jouer sur différents facteurs : complexation de la roue, flexibilité pour des changements de conformations plus aisés du parapluie et éventuellement toxicité. En intégrant un groupement 1,4-phénylène, on a alors un noyau aromatique supplémentaire capable de créer des interactions π - π avec la roue, cependant, de cette manière, on introduit une rigidité proche du parapluie pouvant influencer son repliement. D'un autre côté, si on insère une chaîne linéaire alkyle (du type *n*-butyle), la flexibilité est améliorée mais l'association avec la roue est moindre. En ce qui concerne le groupement bloquant, l'utilisation d'un groupement phénol rend la fonctionnalisation de l'axe plus aisée pour l'introduction d'un groupement bloquant. Mais un groupement bloquant préalablement intégré à l'axe peut aussi être envisagé pour simplifier au maximum la structure du système. Le groupement 3,5-di-*tert*-butyle est connu pour bloquer un macrocycle aussi grand que l'éther couronne 24C8.¹¹⁵ Dans ce cas, la fermeture du rotaxane pourra se faire du côté du parapluie.

La toxicité de nos axes et rotaxanes parapluie n'est pour l'instant pas prise en compte, le but étant d'abord de vérifier la faisabilité de notre concept. Mais par la suite, les différentes parties pourront être modifiées à cette fin.

2.2. Synthèse des axes parapluie dibenzylammonium

2.2.1. Première voie de synthèse

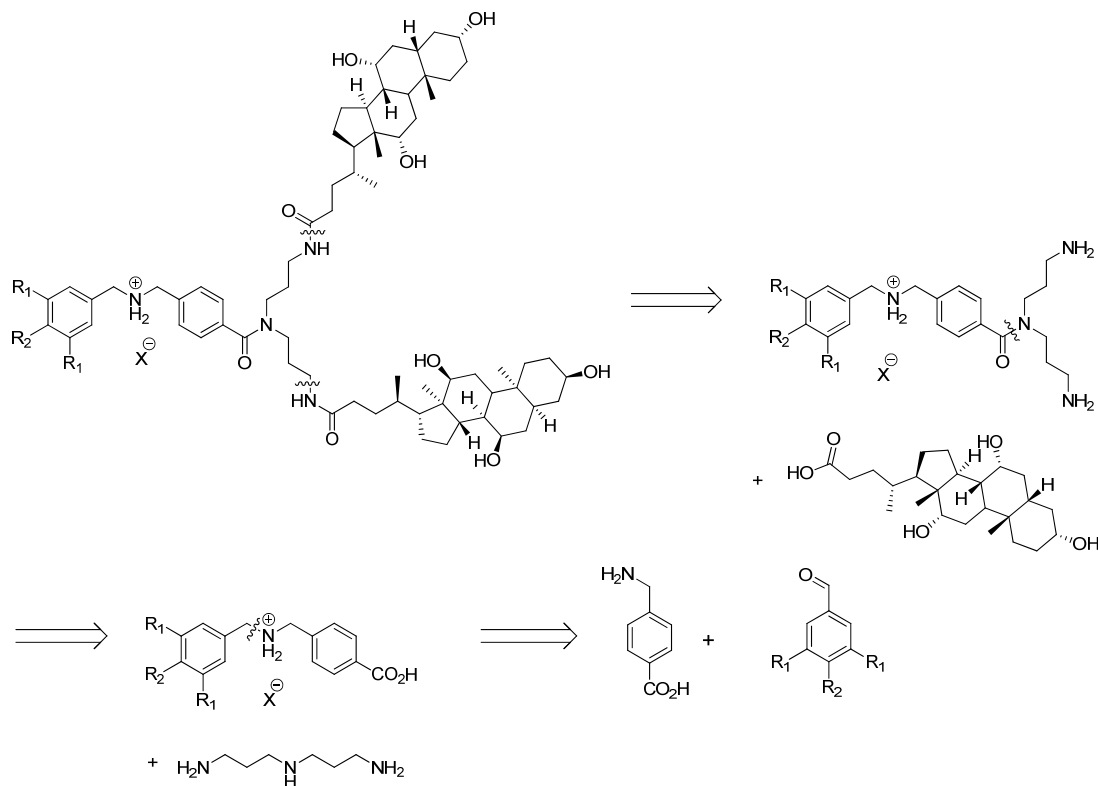


Schéma 2.1. Première voie de rétrosynthèse générale des axes parapluie dibenzylammonium.

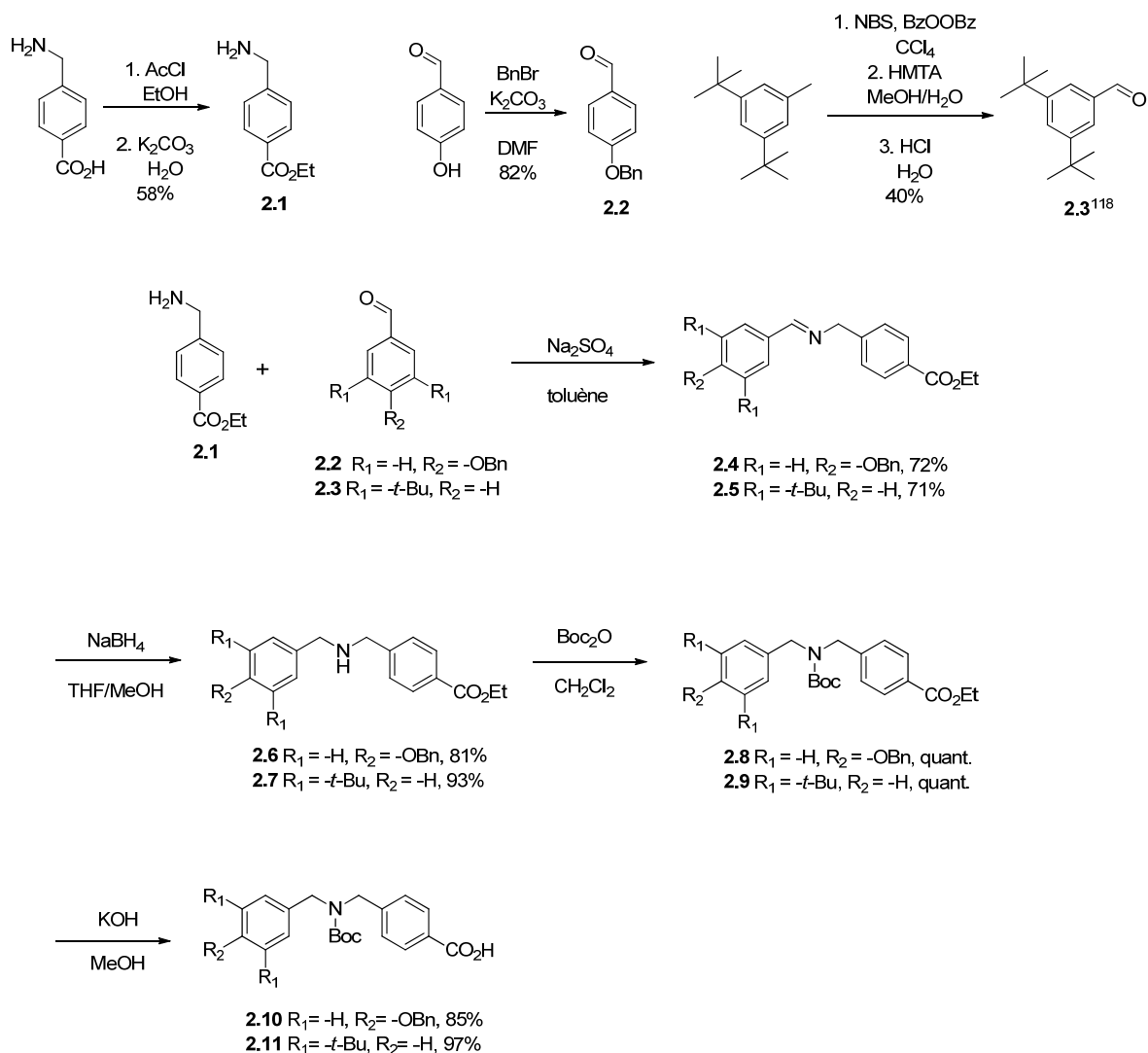
À partir de la structure désirée, le schéma rétrosynthétique décrit ci-dessus (Schéma 2.1) permet de visualiser les composés de départ : le 3,5-bis(*tert*-butyl)benzaldéhyde ou 4-hydroxybenzaldéhyde, l'acide 4-aminométhylbenzoïque, la bis(3-aminopropyl)amine et l'acide cholique. En commençant la synthèse par l'axe puis en continuant jusqu'au parapluie, les composés intermédiaires restent simples et de masses moléculaires assez faibles. Des étapes de protection et déprotection ainsi que des étapes d'activation seront nécessaires lors de cette synthèse.

Pour la synthèse des axes (Schéma 2.2), les premières étapes ont été des réactions de protection. L'acide 4-aminométhylbenzoïque fut activé en présence de chlorure

d'acétylène en anhydride avant d'être estérifié formant un sel. Après déprotonation de l'ammonium formé, l'intermédiaire **2.1**¹¹⁶ fut obtenu avec un rendement de 58%. D'une autre part, l'hydroxybenzaldéhyde fut protégé en benzyle, groupement capable de supporter des milieux fortement acides ou basiques, en présence d'une base et de bromure de benzyle par substitution nucléophile S_N2. Le composé **2.2**¹¹⁶ fut obtenu avec un rendement de 82%. En ce qui concerne le deuxième aldéhyde, il a été formé à partir du 3,5-di-*tert*-butyltoluène. Celui-ci a d'abord subi une bromation radicalaire en présence de *N*-bromosuccinimide suivi par une réaction de Sommelet¹¹⁷ en présence d'hexaméthylènetétramine et d'une solution d'acide chlorhydrique pour former le produit **2.3**¹¹⁸ avec 40% de rendement.

Par la suite, les étapes de synthèse des deux différents axes furent identiques, seuls les substrats de départ étaient différents. Le squelette dibenzylammonium a été construit par condensation entre une amine benzylique (**2.1**) et un aldéhyde aromatique (**2.2** ou **2.3**) en présence d'un piège à eau (sulfate de sodium) avec des rendements de l'ordre de 70%.¹¹⁹ Les imines ainsi formées (**2.4** et **2.5**) ont alors été réduites en amines par du borohydrure de sodium avec des rendements de 81 et 93% respectivement.¹¹⁹

Les amines ne sont protonnées en sel qu'à la fin pour éviter toute interaction non désirée lors de la synthèse du parapluie. De ce fait, elles furent protégées en *tert*-butyl carbamate (Boc), résistant aux conditions basiques, de façon quantitative.¹²⁰ Et enfin il ne restait alors qu'à saponifier l'ester afin d'avoir l'acide carboxylique disponible pour la formation du parapluie. Les deux axes **2.10** et **2.11** furent obtenus en milieu basique avec, respectivement, 85 et 97% de rendement.

Schéma 2.2. Synthèse des deux axes dibenzylammonium protégé.^{116, 118}

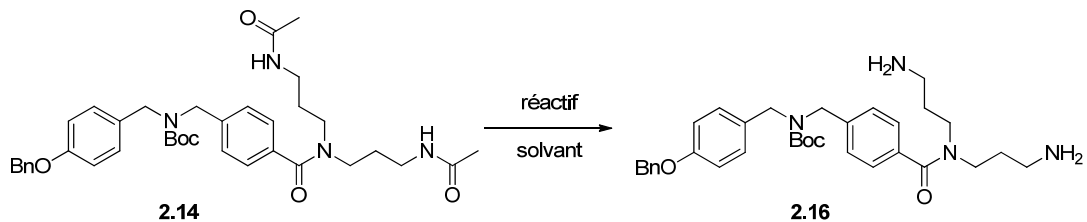
Le parapluie a été greffé sur l'axe en deux temps, tout d'abord le couplage de l'articulation puis le couplage des deux acides choliques. Pour le couplage de la bis(3-aminopropyl)amine, les deux amines primaires, plus réactives, ont d'abord été sélectivement protégées. Ainsi le couplage de l'axe sur l'amine secondaire centrale fut favorisé. Une protection orthogonale en acétyle a été choisie. Différents agents acétylants ont pu être utilisés à cette fin : le *N*-acétylsuccinimide,¹²¹ la (2-trifluorométhyl)diacétylaniline¹²² ou la *N*-méthoxydiacétamide.¹²³ La synthèse du *N*-

acétylsuccinimide à partir du succinimide a été tentée sans résultat concluant, menant à des rendements faibles.

En parallèle la synthèse du (2-trifluorométhyl)diacétylaniline **2.12**¹²² a été faite de façon quantitative à partir de la 2-trifluorométhylaniline (Schéma 2.3). Cet agent acétylant nous a permis de protéger la bis(3-aminopropyl)amine aux deux extrémités avec un très bon rendement de 93%.

Par la suite, le couplage peptidique de la triamine diprotégée **2.13** avec les axes **2.10** ou **2.11** demanda un agent de couplage. Plusieurs ont été testés : le dicyclohexylcarbodiimide (DCC),⁶³ le carbonyldiimidazole (CDI)¹²⁴ mais seul l'hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium (BOP) a permis d'obtenir le produit désiré avec plus de 80% de rendement.¹²⁵

La déprotection des groupements acétyles a demandé plusieurs essais et des conditions rudes (Tableau 2.1). Les conditions acides n'ayant pas été suffisantes pour cela, l'hydrazine,¹²⁶ puis des conditions basiques¹²⁷ ont été utilisées. Cette dernière méthode a permis d'obtenir le produit voulu **2.16** avec un rendement brut de 60%. Ce brut contenait notamment du réactif de départ et du produit monoprotégé. Il en fut de même pour l'autre axe **2.17**. Ces produits furent difficiles à isoler : recristallisation infructueuse, chromatographie difficile quelle que soit la phase stationnaire ou l'échelle (CCM préparative, colonne) ce qui conduisait à de mauvais rendements et une mauvaise séparation. De ce fait, l'intermédiaire a été utilisé tel quel pour l'étape suivante et a été purifié après celle-ci. Le Schéma 2.3 résume les étapes de synthèse effectuées ainsi que les rendements pour le couplage des bras du parapluie.



Réactif	Solvant	Conditions	Résultat
HCl	H ₂ O	Reflux 3 h	0% ^a
HCl	EtOH	Reflux 20 h	0% ^a
N ₂ H ₄ ·H ₂ O	EtOH	75°C 17 h	0% ^a
KOH	H ₂ O/MeOH	Reflux 25 h	60% brut

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 2.1. Conditions testées pour la déprotection des amines.

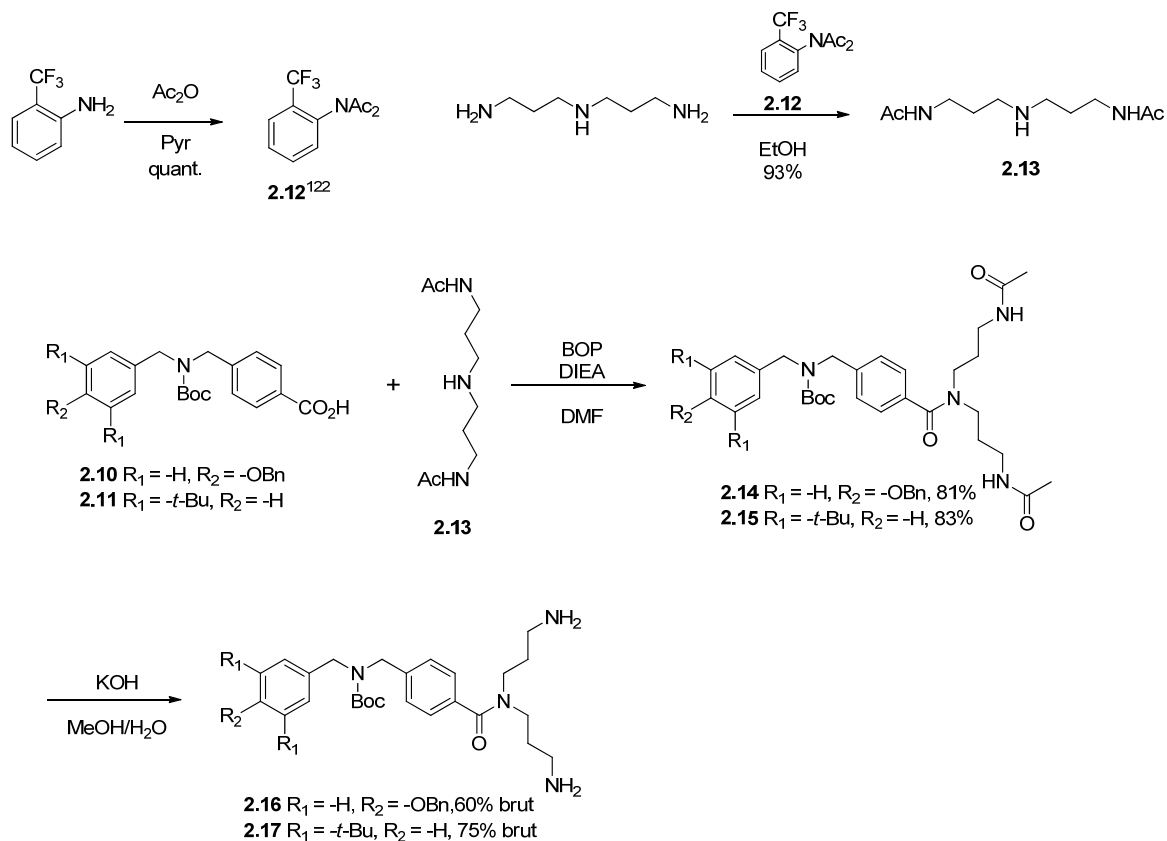


Schéma 2.3. Protection sélective des bras et couplage à l'axe.¹²²

Le couplage entre les amines des bras et l'acide cholique a requis une activation préalable de l'acide carboxylique. La méthode la plus utilisée dans la littérature est l'activation par le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) et DCC.¹²⁸ L'ester hydroxysuccinimide de l'acide cholique fut obtenu avec 98% de rendement (Schéma 2.4). Il a été ensuite mis en présence des composés **2.16** ou **2.17** afin de former les axes parapluies protégés. Les rendements sont restés cependant assez moyens et la séparation difficile. Mais cela nous a permis de passer à la déprotection du groupement Boc, suivi de la métathèse du contre-anion. Ces deux dernières étapes ont été faites avec de bons rendements supérieurs à 70% (Schéma 2.4).

Au final la synthèse de ces deux axes parapluie dibenzylammonium a été faite sur dix étapes linéaires avec un rendement global de 3% et requiert des étapes supplémentaires de protection ou activation de certains réactifs. Malgré que les rendements soient assez bons lors de la synthèse des axes et après la déprotection des axes parapluie, la déprotection des bras ainsi que le couplage des acides choliques posent problème, diminuant le rendement à une étape assez avancée de la synthèse. Une autre voie de synthèse fut alors envisagée afin de remédier à ce problème.

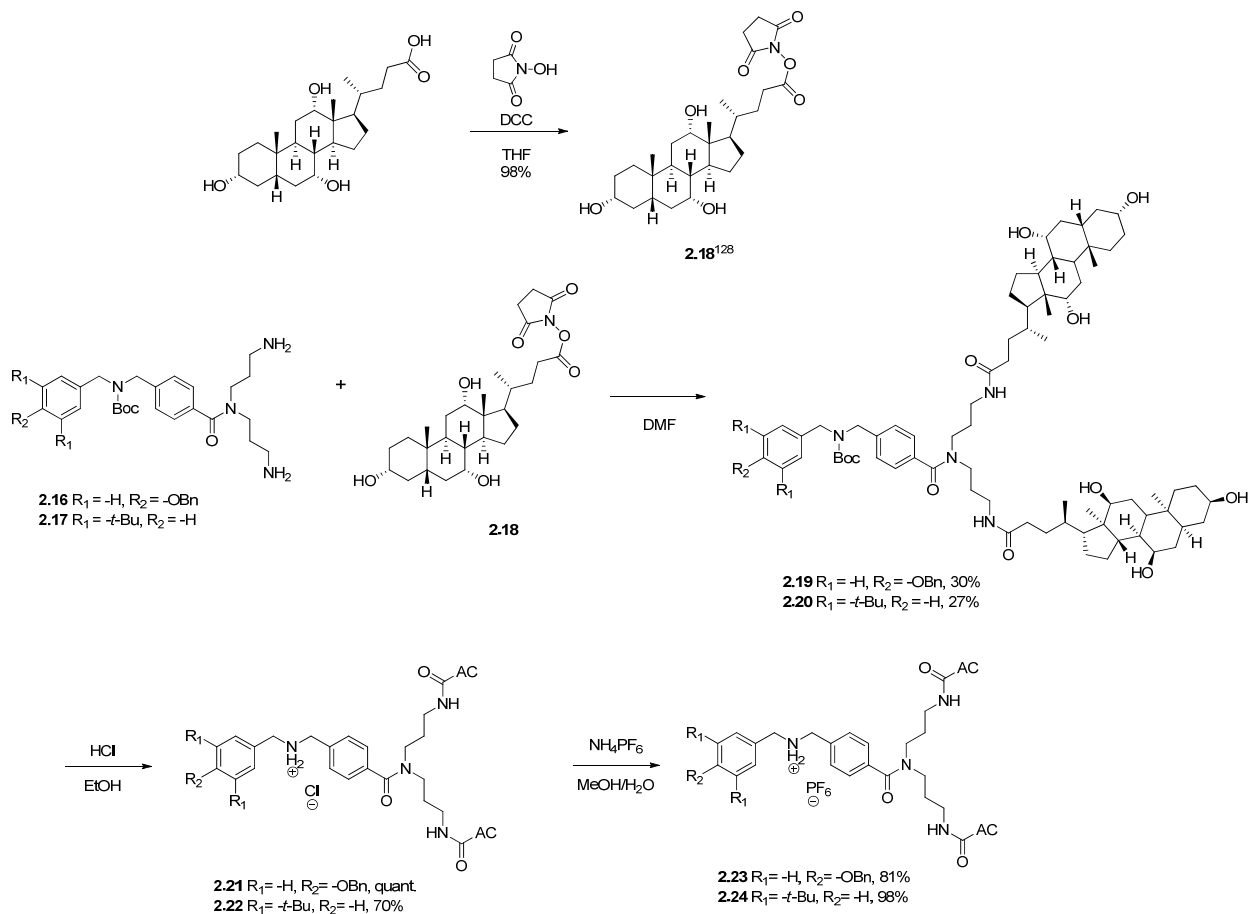


Schéma 2.4. Activation de l'acide cholique et formation des axes parapluie.¹²⁸

2.2.2. Deuxième voie de synthèse

Dans le but de contourner ces étapes de synthèse problématiques, les premières étapes de la rétrosynthèse ont été modifiées (Schéma 2.5). Au lieu de construire petit à petit le parapluie sur l'axe, le parapluie peut être introduit en un seul bloc. De cette façon, les étapes de protection et déprotection des bras ne sont plus nécessaires. Cependant, étant donné la grande gêne stérique engendrée par les deux acides choliques, la réaction risquait d'être plus difficile.

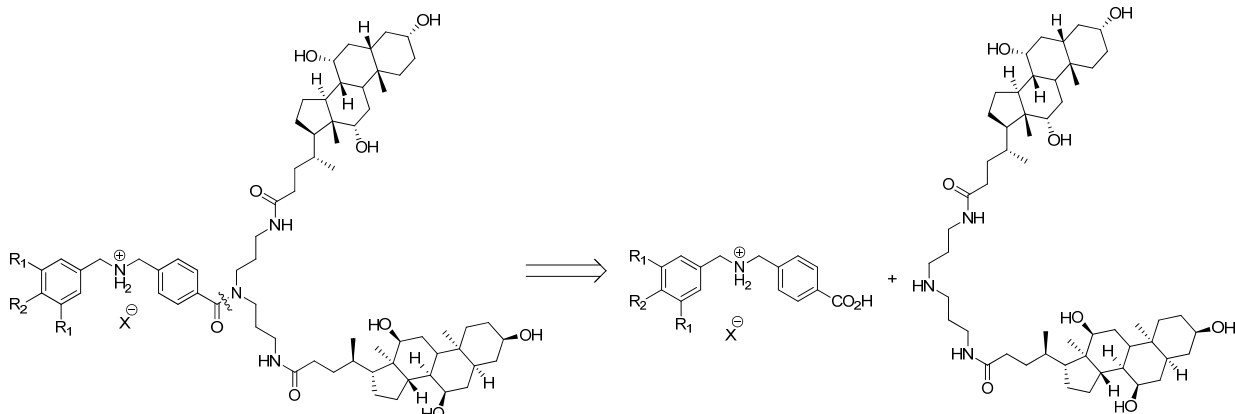
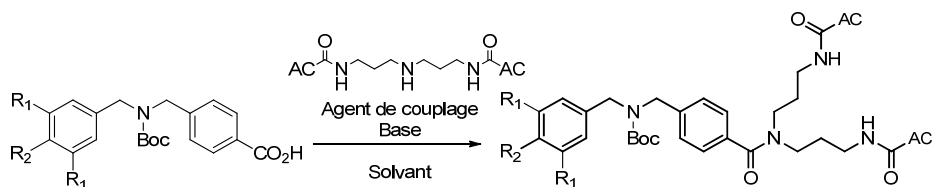


Schéma 2.5. Rétrosynthèse des axes parapluie dibenzyle: deuxième voie.

La synthèse des deux axes **2.10** et **2.11** (Schéma 2.2) se fait de la même manière que la voie précédente. Le deuxième synthon est le parapluie entier. De la même façon qu'auparavant, l'acide cholique a d'abord été activé en ester *N*-hydroxysuccinimide **2.18**. Puis le couplage s'effectua entre celui-ci et la bis(3-aminopropyl)amine avec un rendement de 76%.

Pour la réaction de couplage entre le parapluie et l'axe, un agent de couplage fut nécessaire, d'autant plus qu'il s'agissait d'une amine secondaire extrêmement encombrée. Différentes conditions ont été testées : l'hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium (BOP),¹²⁵ l'hexafluorophosphate de bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium (PyBroP),¹²⁹ l'isobutyl chloroformate (IBCF)¹³⁰ et la 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine (DHBT)⁶⁹ (Tableau 2.2).



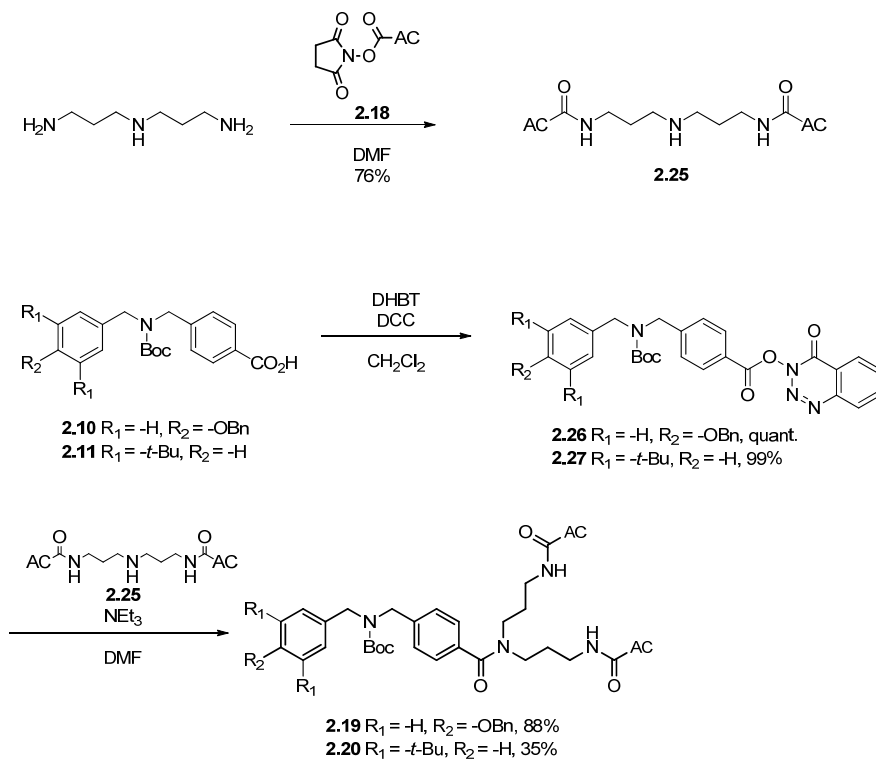
<i>R</i> ₁	<i>R</i> ₂	Agent de couplage	Base	Solvant	Conditions	Résultat
<i>t</i> -Bu	H	BOP	DIEA	DMF	t.a. 40 h	0% ^a
H	BnO	PyBROP	DIEA/ DMAP	CHCl ₃ / CH ₃ CN	t.a. 1 h 30	0% ^a
<i>t</i> -Bu	H	IBCF	NMM	DMF	t.a. 20 h	0% ^a
<i>t</i> -Bu	H	DHBT/DCC	NEt ₃	DMF	En 2étapes : activation t.a. 24 h couplage t.a. 18 h	88%
H	BnO	DHBT/DCC	NEt ₃	DMF	En 2étapes : activation t.a. 22 h couplage t.a. 18 h	35%

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 2.2. Criblage des agents de couplage.

Seule l'utilisation du DHBT a donné des résultats concluants et a donc été retenue (Schéma 2.6). Néanmoins le rendement pour le composé **2.27** fut assez moyen et demande une optimisation au niveau de la purification. Par la suite, la déprotection en milieu acide et le changement d'ion en hexafluorophosphate restèrent les mêmes (Schéma 2.4).

Avec cette deuxième voie, le nombre d'étapes a pu être diminué et des étapes de protection et déprotection ont pu être évitées. Ainsi la synthèse comprend neuf étapes d'affilées avec un rendement global de respectivement 20% et 6% pour **2.23** et **2.24**. Comme mentionné auparavant, le rendement peut être amélioré pour le composé **2.24**.

Schéma 2.6. Synthèse du parapluie et couplage avec les axes **2.10** et **2.11**.¹¹⁶

2.3. Synthèse de l'axe parapluie linéaire

Dans un autre temps la synthèse d'un axe plus flexible a été mise en œuvre comprenant une chaîne butyle à la place du 1,4-phénylène.

2.3.1. Première voie de synthèse

La première voie de rétrosynthèse se fait de la même façon que précédemment (Schéma 2.7). L'axe est synthétisé d'abord, les bras puis les acides choliques y sont ensuite ajoutés. Les réactifs de départ dépendent de la réaction mise en jeu pour la formation de l'axe : une substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}2$ ou une condensation suivie par une réduction.

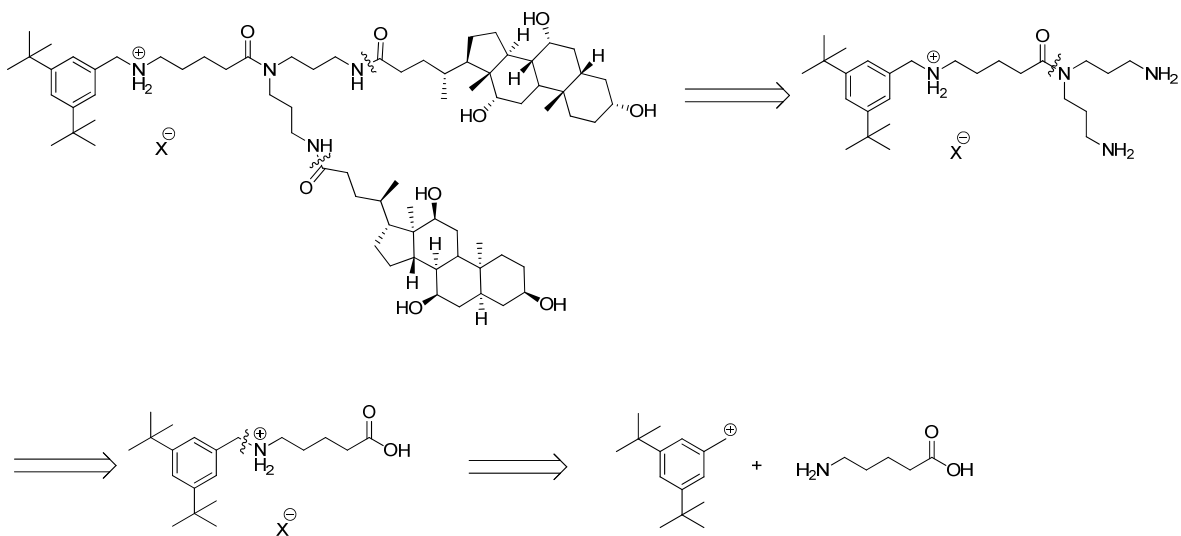


Schéma 2.7. Première voie de rétro-synthèse de l'axe parapluie linéaire.

Dans un premier temps, la réaction S_N2 a été testée entre le dérivé bromé du 3,5-di-*tert*-butyltoluène et le δ -valérolactame. Tout d'abord, le dérivé bromé **2.28**¹³¹ ne fut obtenu qu'avec un rendement de 11% par bromation radicalaire du 3,5-di-*tert*-butyltoluène. Par la suite la substitution nucléophile a eu lieu avec la δ -valérolactame en présence d'une base.¹⁰⁶ Cette réaction n'a pu être reproduite qu'avec 18% de rendement. Finalement l'obtention de l'axe s'est faite par ouverture du cycle et donc hydrolyse du lactame en milieu acide avec un rendement de 38% brut. Malheureusement par cette première méthode, chaque étape donne de mauvais rendements résultant en un rendement inférieur à 1% sur seulement trois étapes (Schéma 2.8). Ceci est clairement inacceptable au début d'une synthèse multi-étapes.

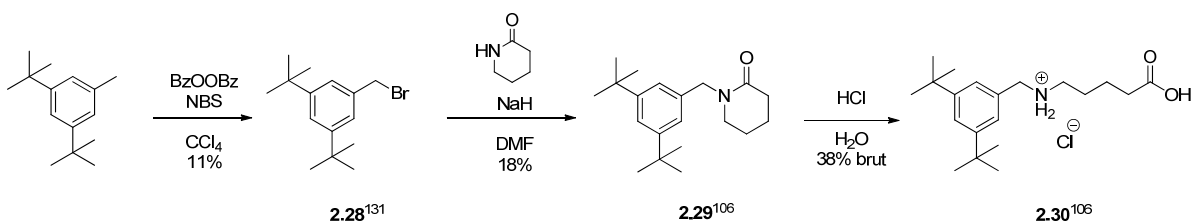


Schéma 2.8. Synthèse de l'axe linéaire par S_N2 .^{131, 106}

De ce fait, la deuxième méthode a été essayée pour la synthèse de l'axe (Schéma 2.9). Le composé **2.3** a été synthétisé de la même manière que pour l'axe

dibenzylammonium. D'une autre part, l'acide valérique fut protégé en ester. Cependant l'estérification en présence de chlorure d'acétyle et éthanol fut inefficace ici. L'estérification a alors eu lieu en présence de chlorure de thionyle et d'éthanol donnant le sel ammonium **2.31** avec un rendement de 70%. La condensation de **2.3** et **2.31** s'est faite ensuite en présence d'une base, la triéthylamine et d'un desséchant, le sulfate de sodium. Malgré que **2.32** soit détecté par spectrométrie de masse dans le brut, il se dégrade lors de la purification et ne peut être isolé. Malgré l'amélioration des rendements, on se retrouva tout de même avec un intermédiaire non isolable ce qui a nous amené à tenter une synthèse monotope.

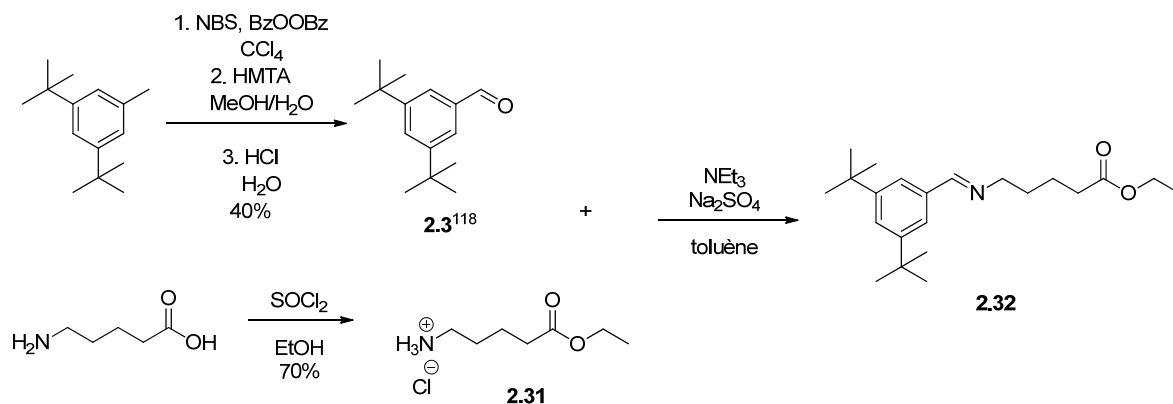
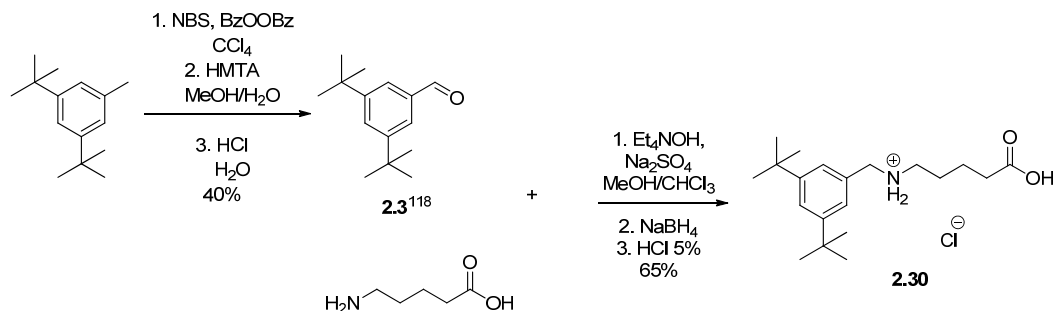


Schéma 2.9. Synthèse de l'axe linéaire par condensation.¹¹⁸

En partant des mêmes réactifs de départ, la condensation fut suivie de la réduction puis de la protonation de l'acide carboxylique (Schéma 2.10).¹⁰² De plus, la purification de **2.30** par concrétisation nous a permis d'avoir facilement un produit propre. Par cette méthode, l'axe a été facilement obtenu avec un rendement global de 23%. L'amine fut ensuite protégée en *tert*-butyl carbamate (Boc) avec un rendement de 67%.

Schéma 2.10. Synthèse monotope de l'axe linéaire.¹¹⁸

Le couplage avec les bras a eu lieu de la même façon en présence de l'agent de couplage BOP avec un rendement de 78%. La déprotection des groupements amine, par contre, n'a pu être accomplie, ni en milieu acide, ni en milieu basique (Tableau 2.3) ce qui remet grandement en cause cette voie de synthèse.

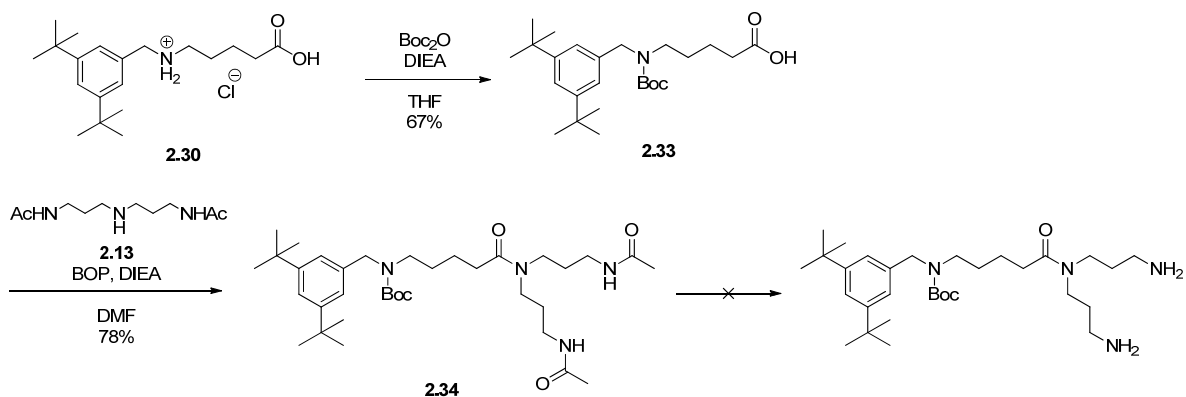
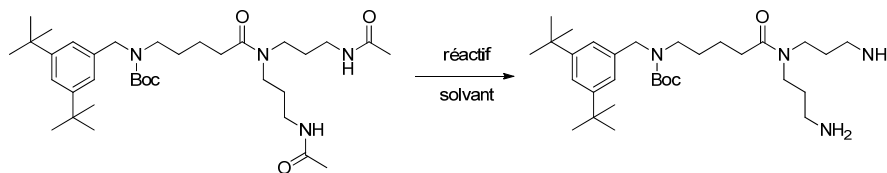


Schéma 2.11. Protection de l'axe et couplage des bras.



Réactif	Solvant	Conditions	Résultat
KOH	MeOH/H ₂ O	Reflux 28 h	0% ^a
HCl	MeOH/H ₂ O	Reflux 42 h	0% ^a

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 2.3. Essais de déprotection.

2.3.2. Deuxième voie de synthèse

Une autre voie de synthèse a été alors pensée dans le but de sortir de l'impasse de la précédente (Schéma 2.12).

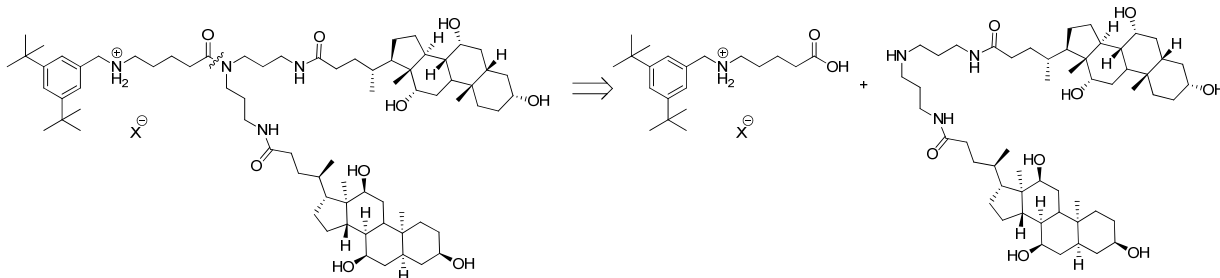


Schéma 2.12. Deuxième voie de rétrosynthèse de l'axe parapluie linéaire.

L'axe protégé **2.33** et le parapluie **2.25** ont été synthétisés comme explicité précédemment (Schéma 2.10, Schéma 2.11 et Schéma 2.6). Le couplage des deux a été fait après activation de l'acide carboxylique par l'isobutyl chloroformate.¹³⁰ L'intermédiaire **2.35** fut obtenu avec un rendement de 60%. La déprotection du groupement Boc en milieu acide suivi par la métathèse d'anions mena à l'axe parapluie linéaire désiré **2.37**.

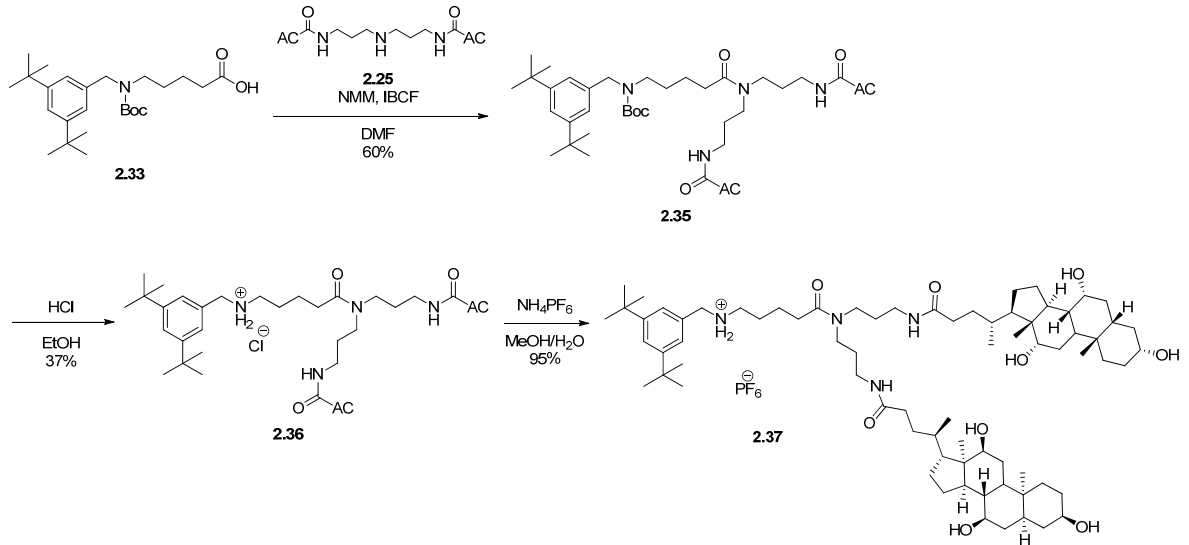


Schéma 2.13. Couplage du parapluie et formation de l'axe parapluie linéaire.

Finalement cette voie de synthèse a permis d'aboutir à l'axe parapluie linéaire en six étapes avec un rendement global de 3%.

2.4. Conclusion

Les axes parapluie ont tous été synthétisés avec d'assez bons rendements en essayant de limiter au maximum le nombre d'étapes. Leur synthèse pourrait être davantage optimisée mais cela ne constitue pas ici l'objectif de ces travaux. Ils seront les premiers modèles pour valider notre concept. Ils jetteront les bases de notre étude de transport transmembranaire d'anion, mais ils mèneront aussi au transport transmembranaire de composés macrocycliques polaires par assemblage des rotaxanes parapluie.

Chapitre 3 Assemblage du rotaxane-parapluie

La synthèse des axes parapluie nous a permis d'avoir un premier aperçu des difficultés et contraintes liées à ces systèmes. La synthèse du rotaxane sera similaire étant donné que ce sont ces mêmes axes qui seront utilisés, cependant l'introduction de la roue va créer une contrainte non négligeable supplémentaire. Comme présenté dans l'introduction (Chapitre 1.3), différentes méthodes d'assemblage de rotaxanes sont connues. Deux d'entre elles ont été testées dans la synthèse des rotaxanes parapluie : l'encapage et le clipage.

3.1. Encapage par le parapluie

Afin d'assembler le rotaxane, les axes prédisposant d'un groupement bloquant ont été utilisés. L'axe alors ouvert d'un côté permet l'entrée de la roue et sa complexation sur le site de reconnaissance. Le blocage se fait grâce au couplage du parapluie qui vient fermer le rotaxane (Figure 3.1).

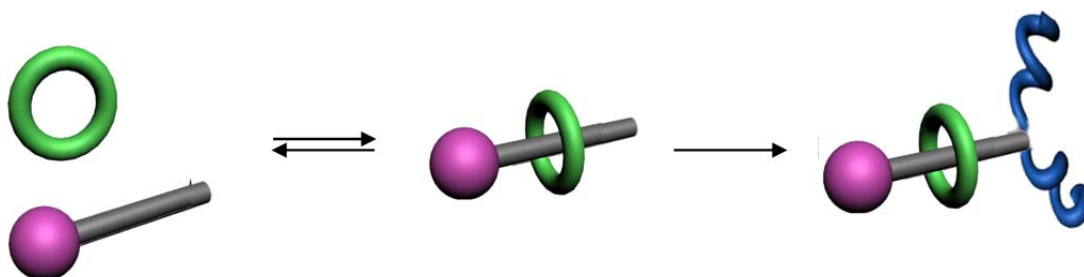


Figure 3.1. Assemblage par encapage du parapluie.

Les axes ont été synthétisés de la même façon qu'auparavant (Schéma 2.2 et Schéma 2.8). Cependant, ici, le site de reconnaissance doit être sous forme hexafluorophosphate d'ammonium. La forme protonnée présente plus d'interactions avec la roue : ponts hydrogène, dipôles-ion. De plus, le contre-anion hexafluorophosphate, large, forme avec l'ammonium une paire d'ions lâches, ce qui donne à la roue la possibilité de se

complexer. L'acide carboxylique doit aussi être déprotégé pour permettre le couplage du parapluie, une fois la roue complexée (Schéma 3.1).

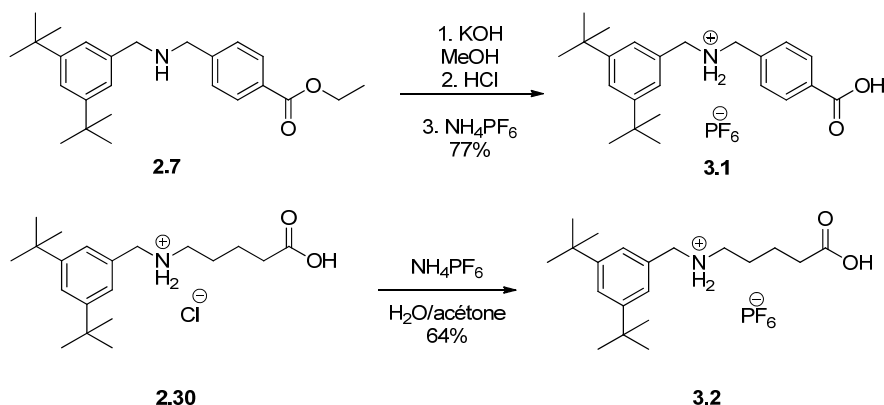


Schéma 3.1. Synthèse des axes hexafluorophosphate.

3.1.1. Mise en évidence de la complexation

Avant toute tentative d'encapage, il fallait s'assurer de la complexation de la roue et donc de la formation du pseudo-rotaxane. Les conditions optimales (solvant et température) furent ainsi déterminées par RMN ^1H . Connaissant les interactions mises en jeu lors de la complexation, on veut éviter au maximum toute compétition avec le solvant. Ici les interactions les plus importantes sont les ponts hydrogène, de ce fait les solvants protiques sont à proscrire. Toutefois il faut tout de même tenir compte de la solubilité des deux composés dans le solvant et les concentrations doivent être les plus élevées possibles pour la formation du rotaxane.

Pour les deux axes (**3.1** et **3.2**), deux éthers couronne (DB18C6 et DB24C8) et différents mélanges de solvants (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ et $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$) ont été expérimentés. Le plus petit macrocycle, DB18C6, présente l'avantage d'être plus proche de l'axe, donc plus facile à recouvrir par le parapluie, néanmoins DB24C8 est connu pour former des rotaxanes avec un axe ammonium avec des constantes d'association fortes.^{106, 132} Afin de favoriser la complexation, dans tous les cas, l'éther couronne a été utilisée en excès (2 éq). Les spectres RMN ^1H ont été pris à différents temps allant de 15 min à 48 h, afin de laisser l'équilibre s'établir.

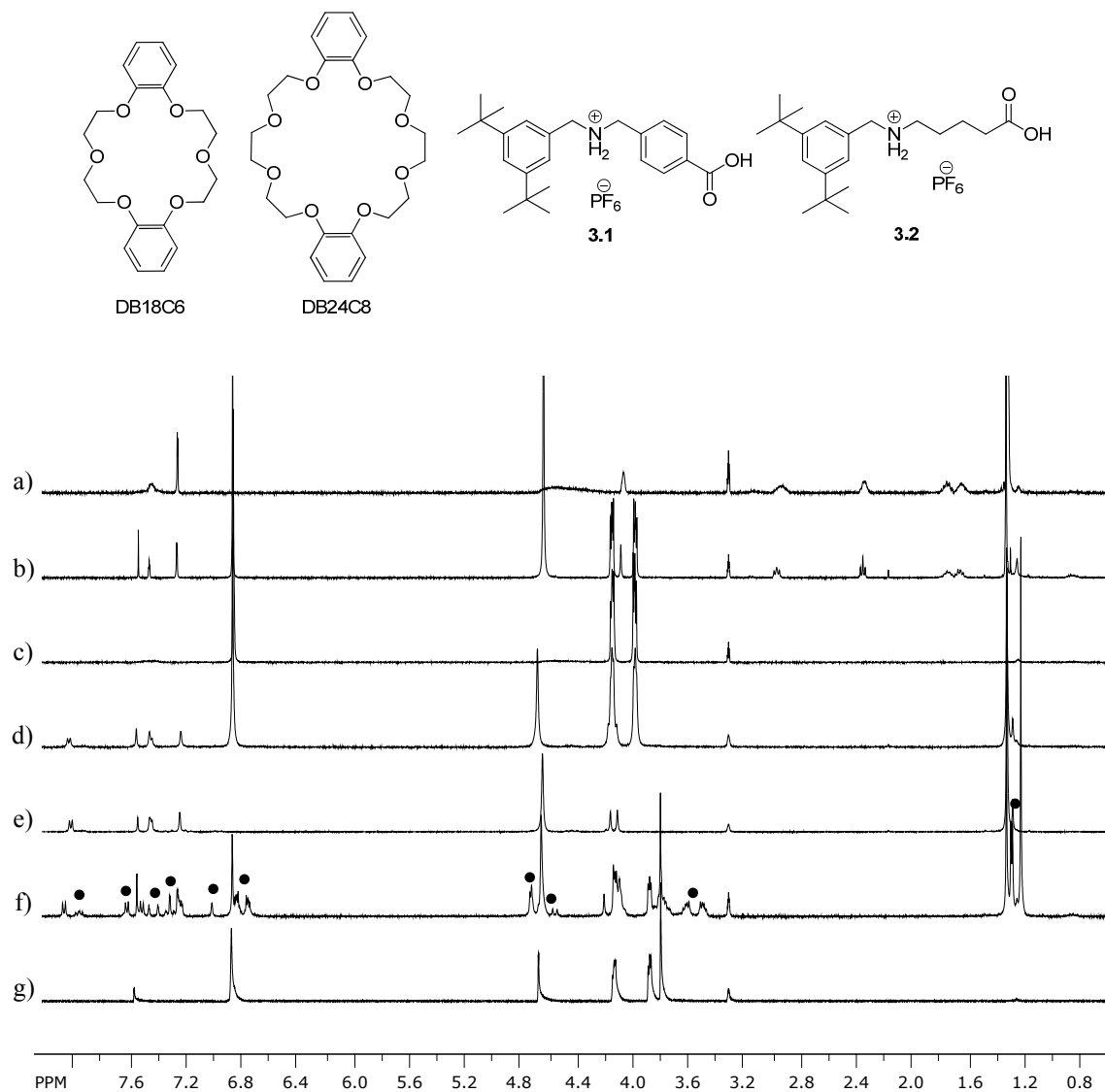


Figure 3.2. Spectres RMN ^1H 400 MHz de a) **3.2** b) **3.2**/DB18C6 après 24 h c) DB18C6 d) **3.1**/DB18C6 après 24 h e) **3.1** f) **3.1**/DB24C8 après 24 h et g) DB24C8 dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ 1/1 à température ambiante. Les solutions de **3.1** et **3.2** sont à 10^{-2} M et le rapport roue/axe est de 2/1. Les signaux issus de la complexation sont marqués par des points noirs.

En utilisant un mélange $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, les spectres furent identiques quelque soient les temps auxquels ils ont été pris (25 min, 24 h ou 48 h). L'équilibre s'établit donc rapidement au bout de 25min, et de plus il s'agit d'un équilibre lent sur l'échelle de la

RMN, étant donné que les signaux de l'axe seul sont encore visibles dans le mélange. A première vue, la complexation avec DB18C6 est beaucoup moins visible que celle de DB24C8. Les signaux restent quasi identiques et aucun nouveau pic n'apparaît (Figure 3.2.b et d). Dans le cas de DB24C8, de nouveaux signaux (marqués par un point noir) sont apparus mettant en évidence la complexation (Figure 3.2.f).

Le mélange CD₃OD/CDCl₃ 1/1 a permis de facilement solubiliser le mélange et de voir la complexation de DB24C8 avec **3.1**, mais le solvant protique entre en compétition dans les interactions entre les deux parties du pseudo-rotaxane. Pour favoriser au maximum la complexation de la roue sur l'axe, le méthanol doit être remplacé idéalement par un solvant non protique.

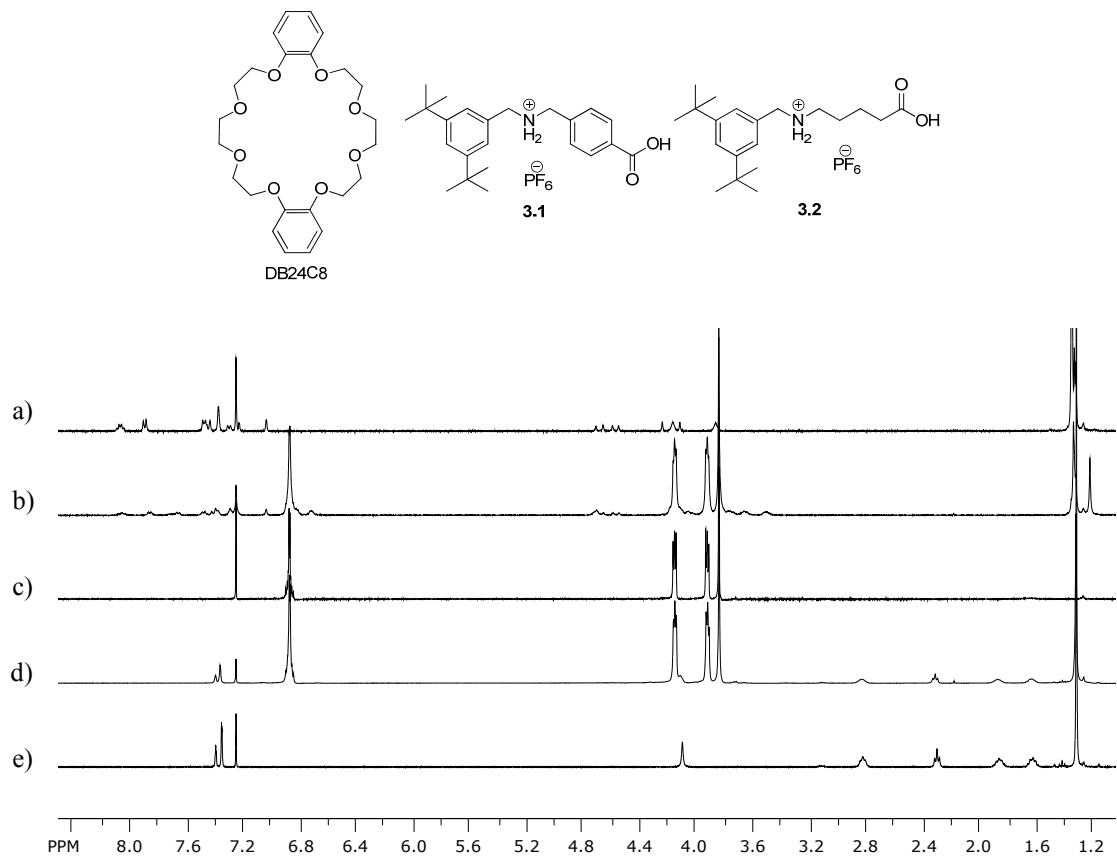


Figure 3.3. Spectres RMN ¹H 400 MHz de a) **3.1** b) **3.1**/DB24C8 après 24 h c) DB24C8 d) **3.2**/DB24C8 après 24 h et e) **3.2** dans CDCl₃ à température ambiante. Les solutions de **3.1** et **3.2** sont à 10⁻² M et le rapport DB24C8/axe est de 2/1.

L'étude dans CDCl_3 a révélé des résultats peu convaincants. Dans ce cas également, l'équilibre est atteint en 30 min et les spectres restent les mêmes jusqu'à 24 h. Tandis que **3.1** présenta un problème de solubilité, expliquant le dédoublement de ses signaux (Figure 3.3.a), **3.2** qui lui fut soluble, ne montre pratiquement aucun changement en présence de deux équivalents de DB24C8 (Figure 3.3.d).

Finalement, la formation du pseudo-rotaxane a été observée dans un mélange $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ 3/1 (Figure 3.4). Comme précédemment, des spectres ont été pris à différents temps (entre 15 min et 24 h). Aussi bien pour **3.1** que **3.2.**, on voit nettement la complexation par le dédoublement des pics, ce qui indique que la vitesse de complexation est lente sur l'échelle de la RMN. Les signaux ont été attribués à l'aide d'un spectre COSY. Le déplacement des signaux a pu être observé. Les spectres à respectivement 15 min et 24 h ont été choisis pour **3.1** et **3.2** pour parvenir à voir la forme complexée et non complexée.

Dans le cas de **3.1** (Figure 3.5), presque tous les protons aromatiques de l'axe subissent un blindage, plus ou moins important. Ce phénomène est cohérent avec l'empilement π - π avec les noyaux aromatiques de DB24C8. De même les protons aromatiques de la roue montrent aussi un blindage. Les signaux correspondant aux CH_2 en position α de l'ammonium secondaire sont fortement déblindés, appuyant la formation de ponts hydrogène entre l'éther couronne et l'ammonium. De plus, les pics des protons de l'éther couronne sont tous blindés et se dédoublent dans la forme complexée. La formation du pseudo-rotaxane va donc modifier la conformation de la roue et induire une différenciation entre des protons chimiquement équivalents. Ceci reste tangible avec la littérature montrant une conformation en « S » de l'éther-couronne lorsque complexée.¹³³ Le singulet des groupements *tert*-butyles est plus blindé, ce qui peut être expliqué par la proximité du cycle aromatique de la roue.

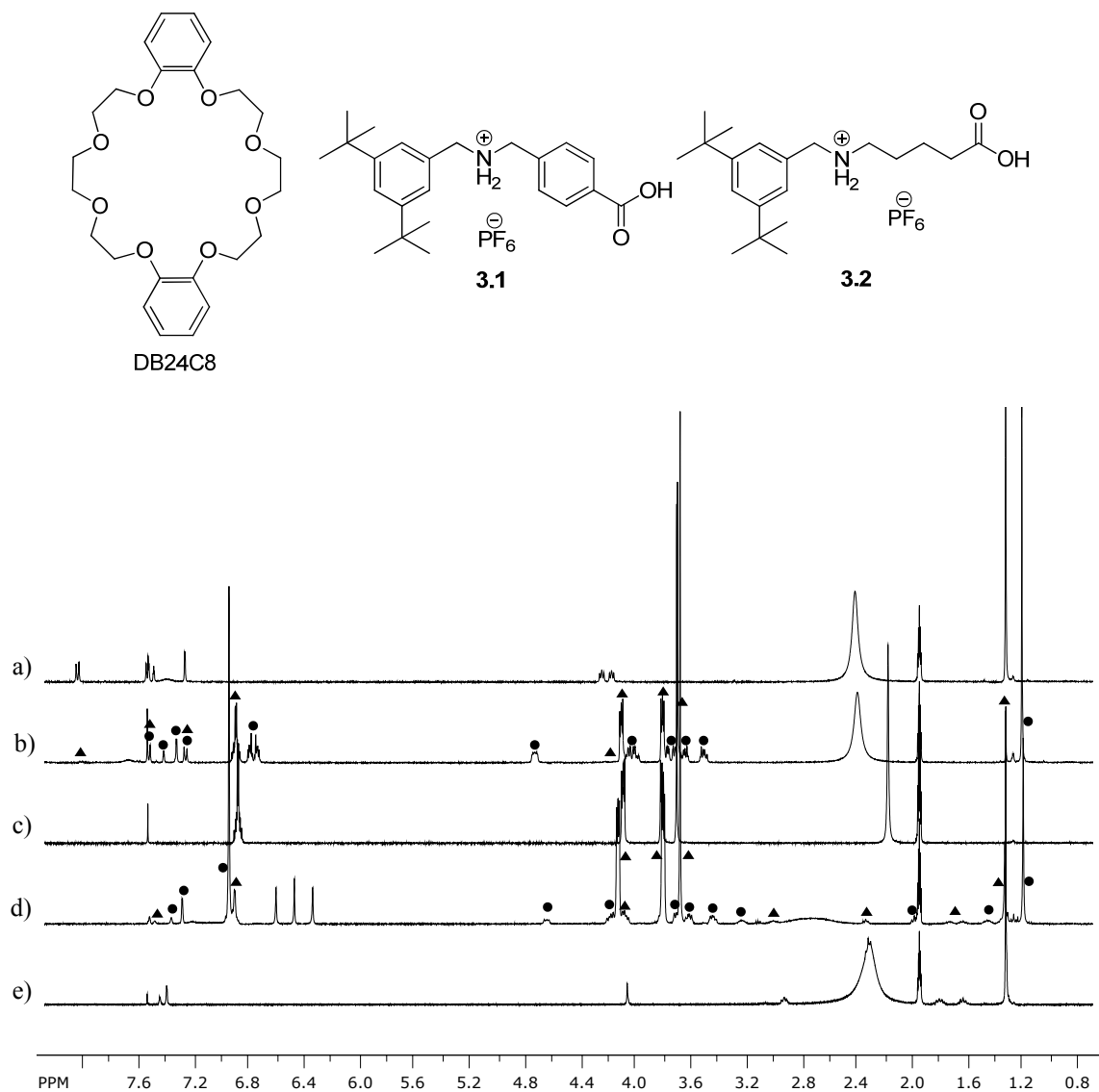


Figure 3.4. Spectres RMN ^1H 400 MHz de a) **3.1** b) **3.1/DB24C8** après 24 h c) **DB24C8** d) **3.2/DB24C8** après 24 h et e) **3.2** dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ 3/1 à température ambiante. Les solutions de **3.1** et **3.2** sont à 10^{-2} M et le rapport **DB24C8/axe** est de 2/1. Les triangles noirs indiquent les signaux de la forme non complexée et les points noirs représentent les signaux de la forme complexée.

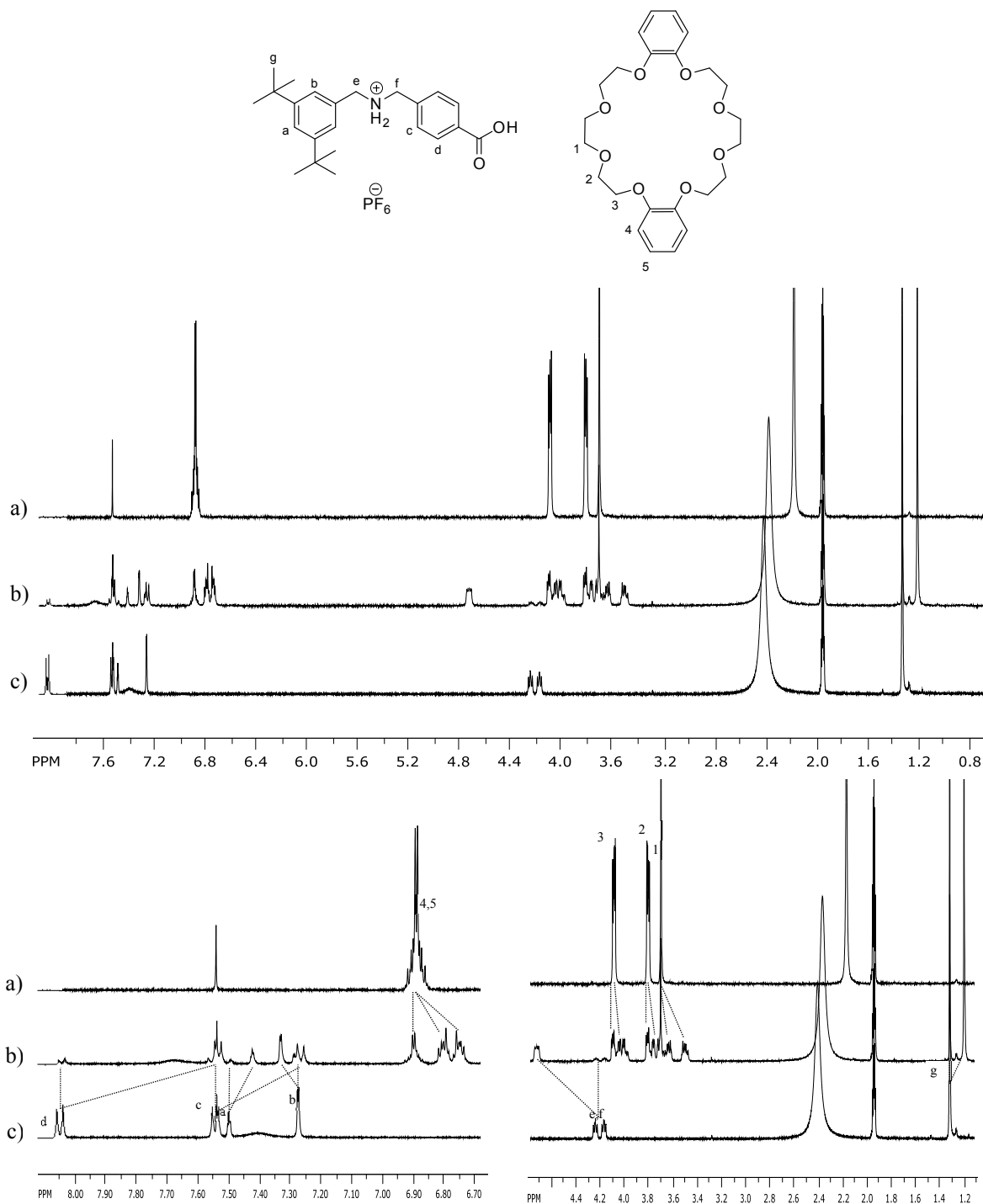


Figure 3.5. Spectres RMN ^1H 400 MHz et agrandissements de a) DB24C8 b) **3.1**/DB24C8 1/2 après 15 min et c) **3.1** dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ 3/1 à température ambiante. La solution de **3.1** est à 10^{-2} M.

Dans le cas de **3.2** (Figure 3.6), le très léger blindage des protons aromatiques de l'axe et de la roue est aussi observé. Ici, l'axe ne présente qu'un cycle aromatique capable d'établir des interactions π - π . Par ailleurs, les multiplets des CH₂ en α de l'ammonium présentent aussi un fort déblindage, ce qui indique la formation des ponts hydrogène. Le plus fort déblindage du CH₂ en α de l'aromatique semble indiquer une plus grande insertion à l'intérieur de la roue. Les autres CH₂ présentent, eux, un blindage dans la forme complexée, tout comme les groupements *tert*-butyles, ce qui est conforme avec la proximité du deuxième noyau aromatique de DB24C8.

En suivant l'équilibre avec le temps, la durée optimale pour avoir le maximum de forme complexée a pu être déterminé. En effet, pour chaque temps, le ratio entre la forme complexée et non complexée a été calculé et le pourcentage de complexation en a été déduit (Tableau 3.1). Pour l'axe **3.1**, le meilleur taux de complexation a été atteint au bout 24 h à température ambiante. Le temps a pu être diminué en chauffant légèrement le mélange à 40°C pour seulement 15 min, donnant un taux de complexation tout autant satisfaisant. En ce qui concerne l'axe **3.2**, le meilleur pourcentage de complexe a été obtenu rapidement (après 20 min) à température ambiante, et par la suite, ce taux de complexation n'a fait que baisser.

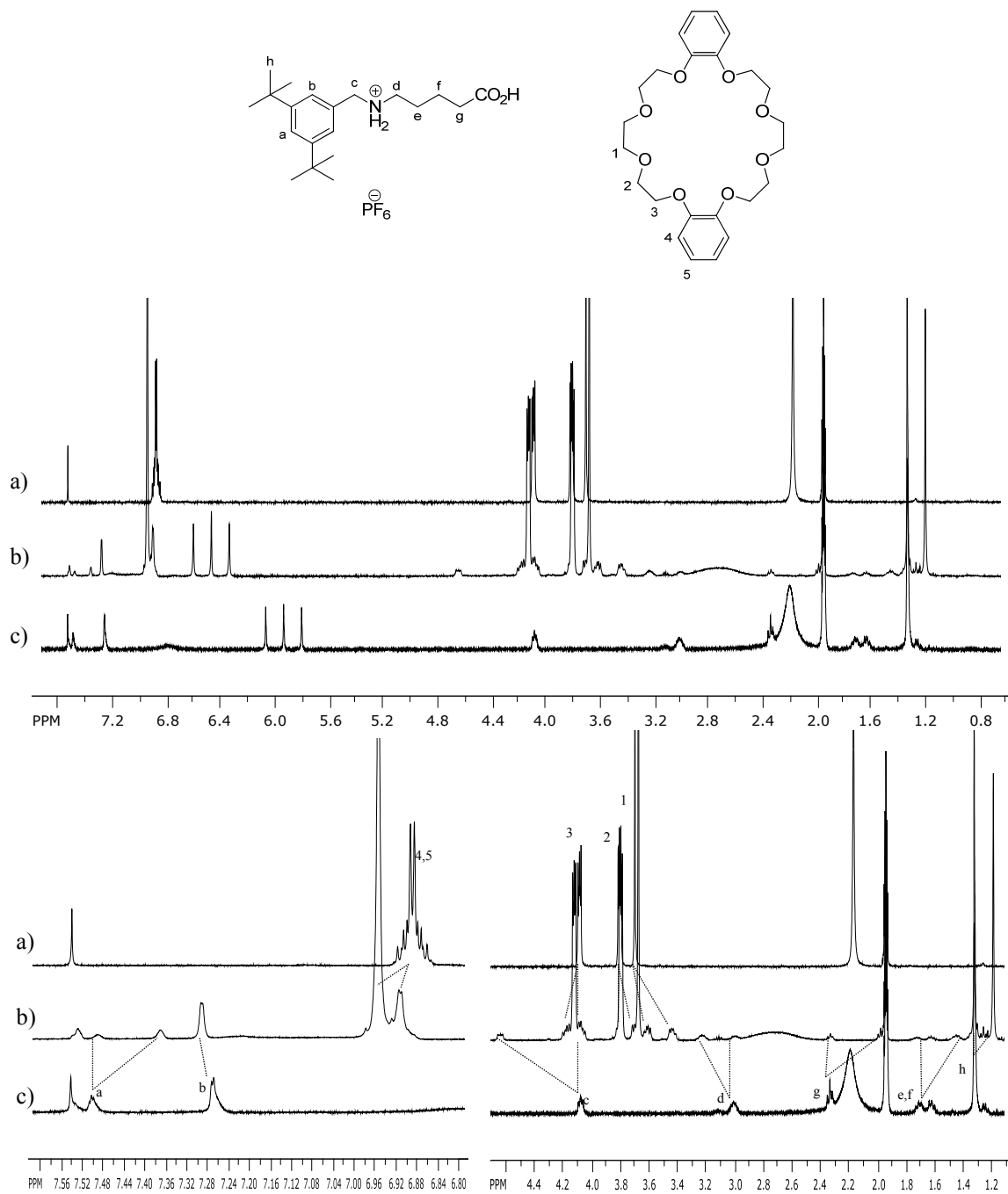


Figure 3.6. Spectres RMN ^1H 400 MHz et agrandissements de a) DB24C8 b) **3.2**/DB24C8 1/2 après 24 h et c) **3.2** dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{CDCl}_3$ 3/1 à température ambiante. La solution de **3.2** est à 10^{-2} M.

<i>Temps</i>	<i>Forme complexée de 3.1^a</i>	<i>Forme complexée de 3.2^a</i>
15 min	76%	N.D.
20 min	N.D.	80%
1 h 30	80%	N.D.
5 h	N.D.	64%
24 h	90%	54%
15 min à 40°C	85%	N.D.

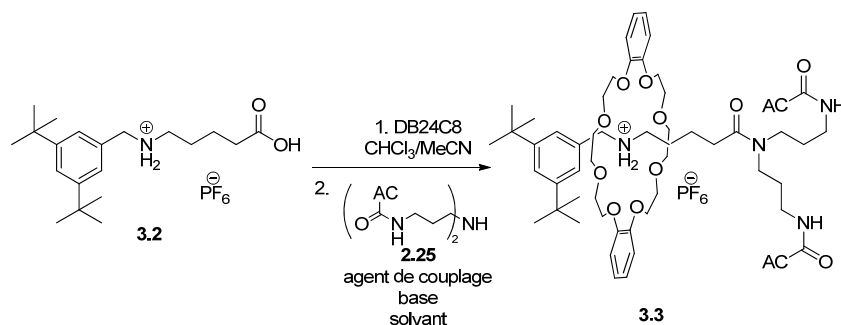
^a calculée par comparaison entre les intégrations des formes complexées et non-complexées des spectres RMN ¹H.

Tableau 3.1. Pourcentage de pseudo-rotaxane formé à différents temps à température ambiante.

Ces travaux préliminaires nous ont permis d'optimiser nos conditions pour l'assemblage du rotaxane par encapage. Il s'avère que la roue de plus grand diamètre (DB24C8) a montré nettement une meilleure complexation. Le meilleur mélange de solvants solubilisant facilement les réactifs et favorisant la formation du pseudo-rotaxane était un mélange acétonitrile/chloroforme 3/1. De plus, la durée et température optimales pour la complexation étaient de 15 min à 40°C pour **3.1** et 20 min à température ambiante pour **3.2**.

3.1.2. Essais avec différents agents de couplage

La principale difficulté de l'assemblage réside en la réunion des conditions favorables pour la formation du pseudo-rotaxane et celles favorables à la réaction de couplage. Les conditions optimales pour la complexation du DB24C8 ont été déterminées plus haut, mais elles peuvent poser un problème de solubilité en particulier pour le parapluie **2.25**. Les premiers tests ont été menés avec l'axe linéaire **3.2** (Tableau 3.2). La formation du pseudo-rotaxane se fait dans un premier temps puis le parapluie est ajouté. Les résultats montraient principalement les réactifs de départ. Le principal défaut de cette méthode est que le solvant est imposé et que malheureusement ce solvant dissout peu l'un des réactifs (**2.25**) et n'est peut-être pas optimal pour le couplage.



<i>Axe</i>	<i>Agent de couplage</i>	<i>Base</i>	<i>Solvant</i>	<i>Conditions</i>	<i>Résultat</i>
3.2	PyBroP	DIEA, DMAP	CHCl ₃ /MeCN 1/3	4 h à t.a	0% ^a
3.2	IBCF	NMM	CHCl ₃ /MeCN 1/3 puis ajout DMF	30 min à -5°C puis 18 h à t.a.	0% ^a
3.2	HATU	DIEA	CHCl ₃ /MeCN 1/3 puis ajout DMF	24 h à t.a.	0% ^a

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 3.2. Tentatives de fermeture de rotaxane à l'aide d'un agent de couplage.

Pour surmonter cette difficulté, des rotaxanes-DCC ont été synthétisés (Schéma 3.2).¹⁰² De cette façon, l'éther couronne est déjà bloquée sur l'axe par le groupement DCC et l'acide carboxylique est activé pour procéder au couplage. Il s'agit alors d'un rotaxane et non d'un pseudo-rotaxane ce qui signifie que les conditions expérimentales sont beaucoup moins restreintes. Le couplage entre le parapluie **2.25** et le rotaxane-DCC **3.4** a été testé dans différentes conditions expérimentales (Tableau 3.3). Malheureusement, ces premiers résultats ont été négatifs et n'ont pas abouti au produit désiré. Les tests dans le CHCl₃ et le CH₂Cl₂ ont montré la très basse solubilité du parapluie dans ces solvants. L'ajout d'une base afin de rendre l'amine secondaire encore plus nucléophile n'a pas porté ses fruits non plus. Enfin, un autre agent de couplage, DHBT, a été utilisé. En effet, on a vu que ce

dernier permettait le couplage du parapluie et de l'axe protégé (Schéma 2.6).⁶⁹ Cependant cela a aussi abouti par un échec.

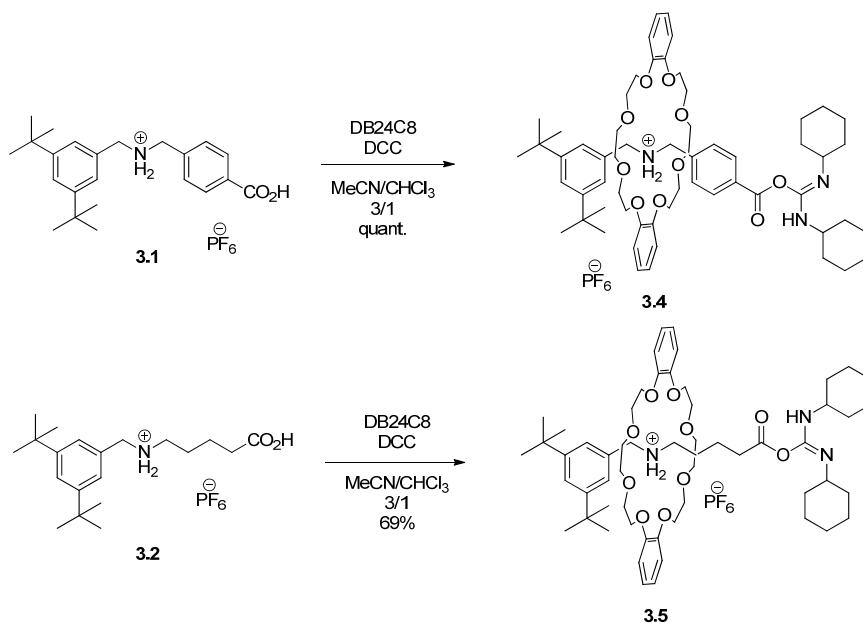
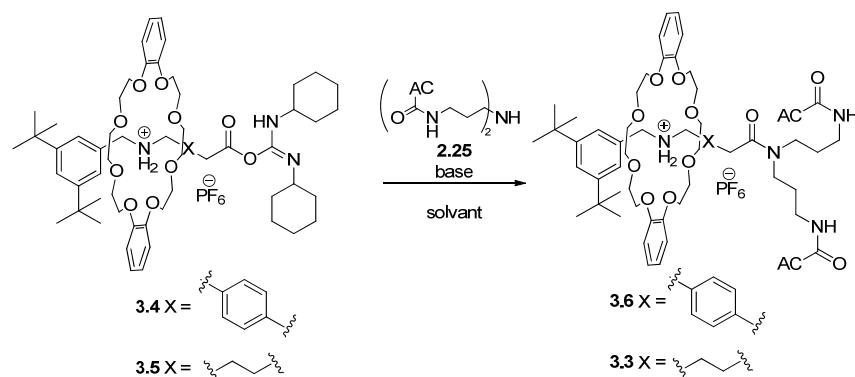


Schéma 3.2. Synthèse des rotaxanes-DCC.

Cet échec est compréhensible étant donné la très grosse gêne stérique aussi bien du côté du rotaxane que du parapluie rendant le couplage très difficile. Effectivement, le rotaxane-DCC contient la roue plus ou moins proche de l'acide activé, rendant l'accès difficile. Mais en plus, le nucléophile est une amine secondaire extrêmement encombrée et malgré son activation par une base, celui-ci ne parvient pas à s'ajouter à l'acide carboxylique. Dans les travaux de Smithrud *et al.*, ils se sont cantonnés à des amines primaires au bout d'une chaîne alkyle.^{106, 134} De ce fait, une dérivation du parapluie afin d'obtenir une amine primaire un peu plus dégagée a été mise en œuvre.



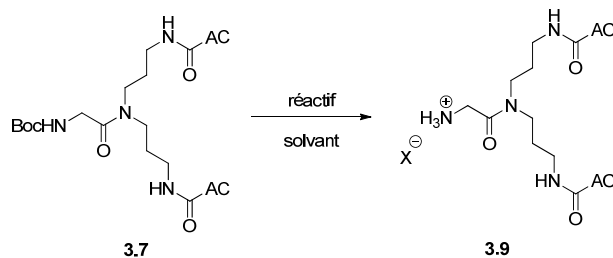
<i>Rotaxane-DCC</i>	<i>Base</i>	<i>Solvant</i>	<i>Conditions</i>	<i>Résultats</i>
3.4	aucune	CHCl ₃ /MeOH	43 h à t.a.	0% ^a
3.4	aucune	CHCl ₃	22 h à t.a.	0% ^a
3.4	DMAP	CH ₂ Cl ₂	65 h à t.a.	0% ^a
3.4	DMAP	DMF	20 h à t.a.	0% ^a
3.4	NEt ₃	DMF	20 h à t.a.	0% ^a
3.5	NEt ₃ , DHBT	DMF	5,5 j à t.a	0% ^a

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 3.3. Couplage du parapluie sur le rotaxane-DCC.

3.1.3. Dérivation du parapluie

Le parapluie fut dérivé en amine primaire avec la chaîne la plus courte possible afin de dégager un peu l'amine, mais pas trop car il y avait un risque d'allonger trop la distance entre le parapluie et la roue et de diminuer ainsi son recouvrement. Pour ce faire, un acide aminé, la glycine, a été ajouté au parapluie. Le Boc-Gly-OH commercial et du parapluie **2.25** ont été couplés à l'aide de l'isobutyl chloroformate en présence de *N*-méthylmorpholine avec un bon rendement de 74%.¹³⁰ Par la suite, le groupement protecteur Boc fut déprotégé en milieu acide. Différentes conditions ont été essayées avant d'obtenir l'amine déprotégée **3.9** (Tableau 3.4) de façon quantitative (Schéma 3.3).



Réactif	Solvant	Conditions expérimentales	Résultat
HCl	MeOH	2 h à 0°C puis 42 h à t.a.	0% ^a
TFA	CH ₂ Cl ₂	71 h à t.a.	0% ^a
HCl	MeOH/dioxane	22 h à t.a.	0% ^a
HCl	dioxane	3 h à t.a.	quant.

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 3.4. Déprotection du parapluie-Gly-Boc en milieu acide.

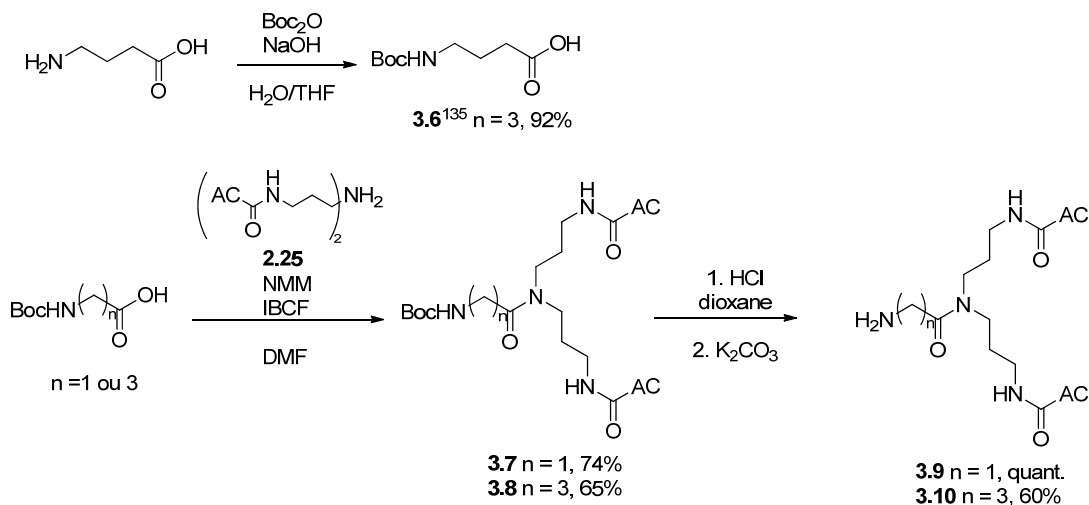
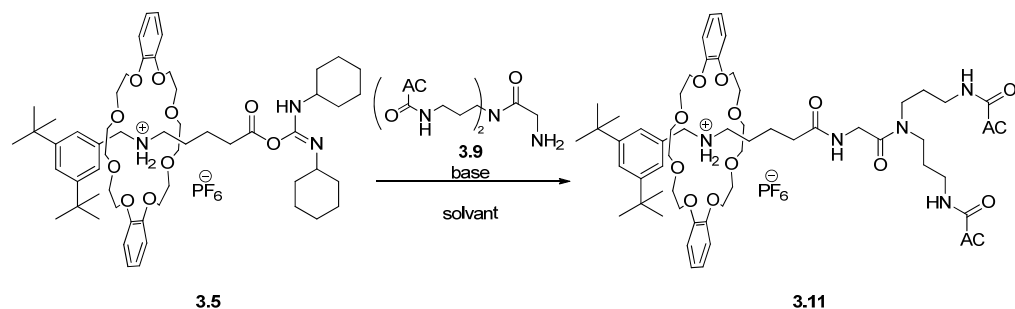


Schéma 3.3. Dérivations du parapluie.¹³⁵



<i>Rotaxane-DCC</i>	<i>Base</i>	<i>Solvant</i>	<i>Conditions</i>	<i>Résultat</i>
3.5	aucune	THF	43 h à t.a.	0% ^a
3.5	aucune	CHCl ₃	15 min à 0°C puis 41 h à t.a	0% ^a
3.5	NEt ₃	CHCl ₃	21 h à t.a.	0% ^a
3.5	aucune	DMF	70 h à t.a.	0% ^a
3.5	DMAP	DMF	70 h à t.a.	0% ^a
3.5	NEt ₃	DMF	48 h à t.a.	0% ^a
3.5	NMM	DMF	42 h à t.a.	0% ^a
3.5	aucune	DMF	10 min à 0°C, 92 h à t.a., 24 h à 40°C et 24 h à 70°C	0% ^a

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 3.5. Tentatives de couplage du rotaxane-DCC **3.5** avec le parapluie-Gly **3.9**.

Par la suite, la réaction de couplage a été de nouveau essayée en présence du rotaxane-DCC **3.5** (Tableau 3.5). En utilisant le THF, aucune réaction n'a eu lieu, en effet le parapluie-Gly fut seulement mis en suspension dans le milieu. En utilisant le CHCl₃, aucune réaction n'a lieu. En essayant d'augmenter la nucléophilie du dérivé parapluie glycine par l'ajout d'une base, nous avons observé cette fois une dégradation du rotaxane-DCC : l'axe se cyclisait pour former le *N*-(di-3,5-*tert*-butylbenzyl)- γ -valérolactame avec libération du DB24C8. La réaction est probablement difficile à cause du manque de solubilité du dérivé parapluie-Gly dans le CHCl₃.

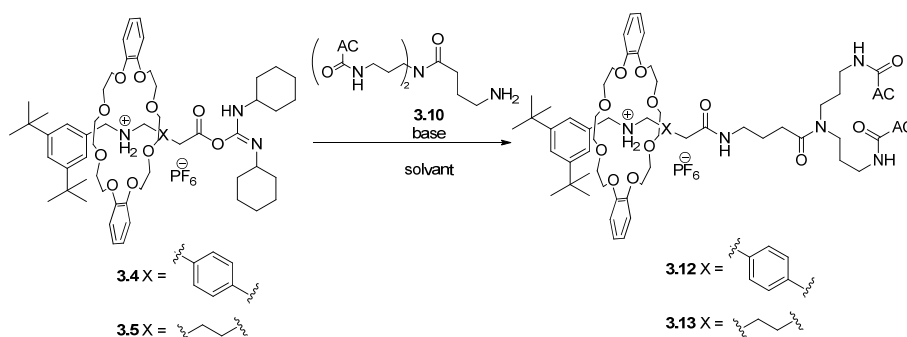
En utilisant le DMF, le problème de solubilité fut alors évité, cependant, ici non plus, aucune réaction n'a eu lieu et nous y retrouvons seulement les réactifs de départ.

Différentes bases (DMAP, TEA, NMM) ont été testées pour activer l'amine primaire. La base fut préalablement mélangée en quantité stœchiométrique avec **3.9** avant l'ajout du rotaxane-DCC pour éviter la cyclisation de l'axe. Mais un peu de *N*-(di-3,5-*tert*-butylbenzyl)- γ -valérolactame et DB24C8 se sont tout de même formés en plus des réactifs de départ. Afin de s'assurer que le temps de réaction et les conditions soient bons, un test a été lancé dans le DMF et suivi par spectrométrie de masse. Au bout de 92 h à température ambiante, aucune évolution n'a été observée et le milieu fut alors chauffé à 40°C. Là aussi, après 24 h, on retrouvait seulement les réactifs de départ; le milieu fut alors chauffé à 70°C. Après 24 h, il restait encore du rotaxane-DCC et le parapluie-Gly s'était dégradé.

Malgré les différentes conditions essayées, le couplage ne s'effectue pas entre le parapluie dérivé par une glycine et le rotaxane-DCC. Finalement il se peut que l'amine primaire reste toujours trop encombrée. C'est pourquoi le parapluie a été dérivé avec une chaîne plus longue afin d'éloigner au maximum l'amine des deux acides choliques. La synthèse est partie de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et s'est faite de la même façon que précédemment pour le parapluie-Gly **3.9**. Le parapluie-GABA **3.10** fut obtenu avec un rendement global de 36% (Schéma 3.3).

De nouveaux essais ont été lancés à partir des rotaxanes-DCC **3.4** et **3.5** et le parapluie-GABA **3.10**. Différents solvants ont été testés afin de favoriser le couplage (Tableau 3.6). Tout d'abord le couplage fut tenté dans le CHCl₃ puis dans le CH₃CN. Contrairement à ce qu'on observait avec le parapluie-Gly, le rotaxane-DCC est complètement consommé. Toutefois, il reste encore beaucoup de parapluie-GABA et nous observons un peu de formation du *N*-(di-3,5-*tert*-butylbenzyl)- γ -valérolactame. Mais avec ce parapluie aussi, il y avait un problème de solubilité dans le CHCl₃ et le MeCN. Le couplage fut alors essayé dans le DMF. Avec le rotaxane-DCC linéaire **3.5**, il restait encore du parapluie-GABA, mais **3.5** avait disparu et on observait toujours la cyclisation de l'axe. En refaisant le même essai avec le rotaxane-DCC **3.4**, on retrouvait les réactifs de départ, aucune réaction n'avait eu lieu. En utilisant un mélange CHCl₃/DMF, les mêmes résultats furent obtenus. Le site ammonium du rotaxane-DCC doit pouvoir se faire déprotonner par l'amine primaire du parapluie-GABA. Dans le cas de **3.5**, cela entraîne la cyclisation et

pour **3.4**, trop rigide, le rotaxane-DCC reste intact. Etant donné que **3.4** ne peut pas former de produit secondaire, un essai de couplage en présence de base (DMAP) fut lancé. Celui-ci échouant et laissant les réactifs initiaux, un autre agent de couplage capable de coupler une amine encombrée, DHBT, fut testé en présence d'une base.⁶⁹ Malheureusement, ce dernier essai a aussi abouti à un échec.



<i>Rotaxane-DCC</i>	<i>Base</i>	<i>Solvant</i>	<i>Conditions</i>	<i>Résultat</i>
3.5	aucune	CHCl ₃	3,5 j à t.a.	0% ^a
3.5	aucune	CH ₃ CN	21 h à t.a.	0% ^a
3.5	aucune	DMF	43 h à t.a.	0% ^a
3.4	aucune	DMF	7 j à t.a.	0% ^a
3.5	aucune	CHCl ₃ /DMF	21 h à t.a.	0% ^a
3.4	aucune	CHCl ₃ /DMF	4,5 j à t.a.	0% ^a
3.4	DMAP	DMF	4,5 j à t.a.	0% ^a
3.4	NEt ₃ , DHBT	DMF	4,5 j à t.a.	0% ^a

^a non détecté par ESI-MS.

Tableau 3.6. Tentatives de couplage des rotaxanes-DCC avec le parapluie-GABA **3.10**.

Malgré les nombreuses conditions expérimentées et la dérivation du parapluie pour obtenir une amine moins encombrée, la réaction de couplage qui permettrait d'obtenir le rotaxane parapluie n'a pas eu lieu. Une réaction de couplage entre un acide carboxylique simple (l'acide 4-(*tert*-butoxycarbonyl)aminobutyrique) et ces parapluies dérivés dans le DMF en présence de DCC, montre que le couplage fonctionne dans ces conditions. De

toute évidence, la plus grande contrainte provient de la grande gêne stérique entre le parapluie et la roue. Mais un facteur n'a pas été pris en compte lors des différentes dérivations du parapluie : la conformation du parapluie et son repliement. Car, si en ajoutant des chaînes de plus en plus longues, l'amine est plus loin du parapluie, toutes ces chaînes restent flexibles. L'effort pour diminuer l'encombrement stérique peut alors être facilement annihilé si la conformation favorisée du parapluie est de se refermer sur l'amine primaire.

Pour s'assurer que cette conformation repliée ne soit pas plus favorisée que les autres, les propriétés d'amphiphilie faciale des acides choliques doivent être masquées.

3.1.4. Protection du parapluie

Les faces hydrophiles des acides choliques ont été rendues moins hydrophiles en protégeant tous les groupements hydroxyles. La synthèse du parapluie protégé, puis de sa dérivatisation avec une glycine est présentée au Schéma 3.4. La protection des alcools en acétyle s'est faite avec un excellent rendement de 95%.¹³⁶ Par la suite, la voie de synthèse reste identique à celle utilisée pour le parapluie : l'acide cholique protégé a été activé à l'aide du *N*-hydroxysuccinimide¹²⁸ avec un rendement de 88% puis couplé à la bis(3-aminopropyl)amine. Le couplage avec la glycine protégée en présence d'isobutyl chloroformate et *N*-méthylmorpholine n'a pas fonctionné dans ce cas. De ce fait, le DHBT a été utilisé comme agent de couplage et nous a permis d'avoir un bon rendement. Et enfin la déprotection du groupement Boc s'est faite en milieu acide dans le dioxane, comme précédemment.

Mais il s'est avéré que deux groupements acétyles ont aussi été déprotégés dans cette dernière étape, ce qui est compréhensible. Néanmoins un test de couplage fut tout de même lancé avec ce parapluie **3.19**. En effet, même s'il reste un groupement hydroxyle sur chaque acide cholique, la face est nettement moins hydrophile et le repliement pourrait être différent.

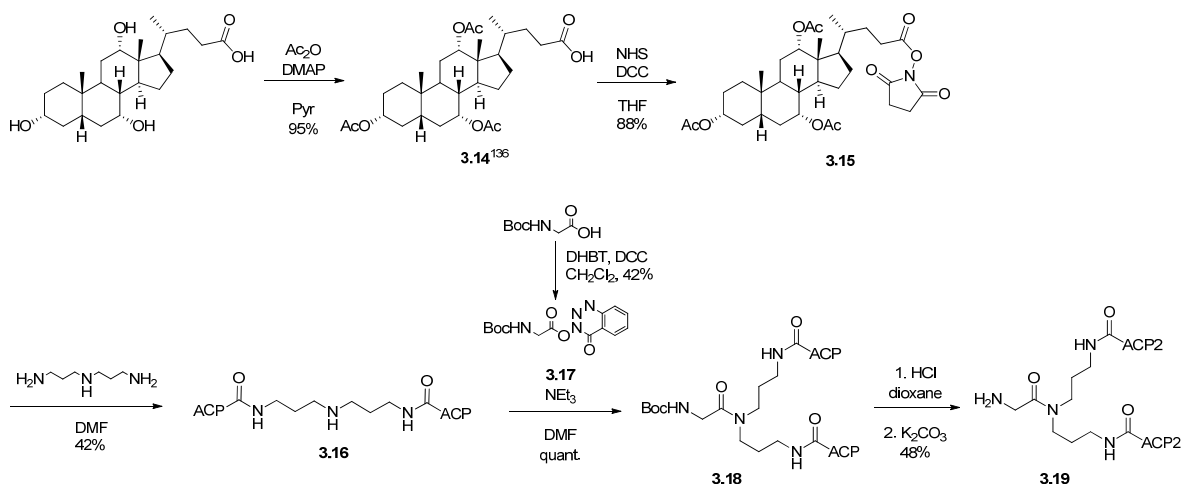


Schéma 3.4. Synthèse du dérivé parapluie-Gly acétylé **3.19**.¹³⁶

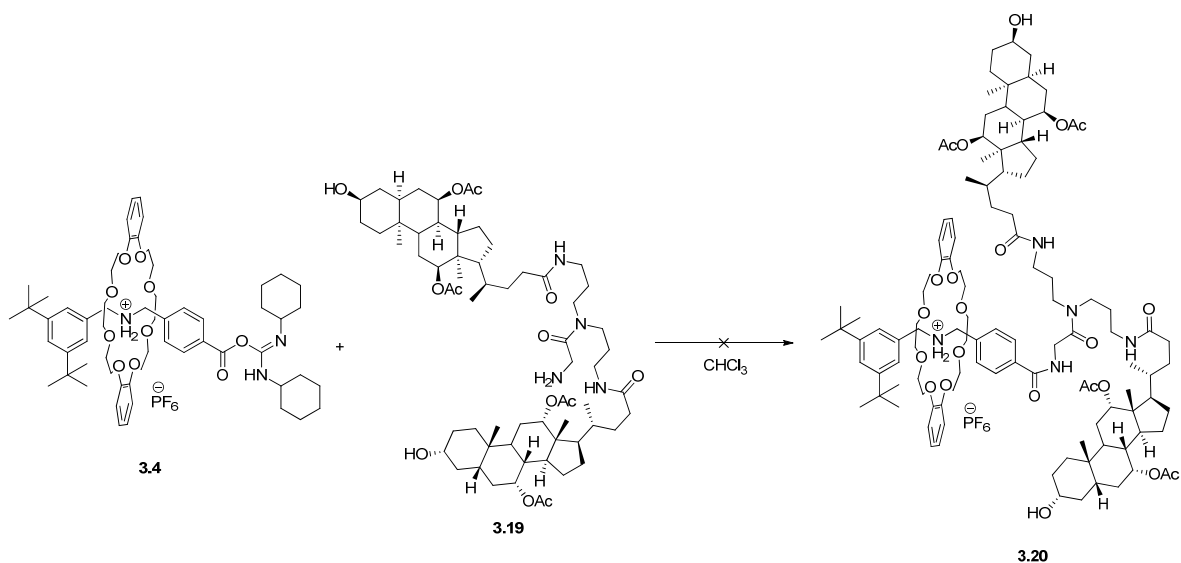


Schéma 3.5. Couplage du rotaxane-DCC **3.4** et le parapluie-Gly tétraprotégé **3.19**.

Le parapluie **3.19** fut mis en présence du rotaxane-DCC **3.4** dans le CHCl_3 . Grâce à la protection des groupements hydroxyle le problème de solubilité du parapluie ici n'a pas été rencontré. Cependant, après sept jours à température ambiante, aucune réaction n'a eu lieu et on y retrouvait seulement les réactifs de départ.

Après les différents moyens mis en œuvre pour l'assemblage du rotaxane par encapage par le parapluie, la formation d'un rotaxane parapluie n'a pas pu être achevée. Une autre méthode a été entreprise pour parvenir au rotaxane parapluie : le clipage.

3.2. Clipage

Comme mentionné dans l'introduction (Chapitre 1.3.2), le clipage consiste en l'assemblage de la roue sur l'axe déjà fermé à partir de deux fragments de la roue. Ayant déjà synthétisé les différents axes parapluie (Chapitre 2), il reste à synthétiser les deux parties de la roue à clipper.

3.2.1. Synthèse des clips

Etant donné le site de reconnaissance choisi, un dialkylammonium secondaire, le clip devra être capable de former des ponts hydrogène. Le plus simple reste de synthétiser un clip similaire à un éther couronne. Le travail effectué par Stoddart *et al.* leur a permis d'obtenir des rotaxanes par clipage sur des axes ammonium avec de bons rendements de l'ordre de 70%.^{98, 137} La synthèse, relativement simple et directe, est présentée ci-dessous (Schéma 3.6).

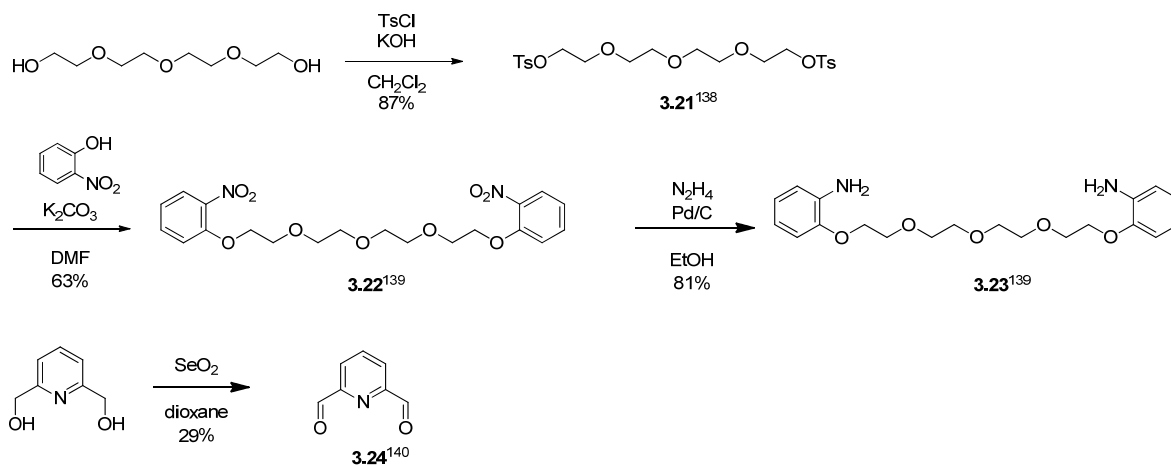


Schéma 3.6. Synthèse du clip.^{138, 139, 140}

Le tétra(éthylène glycol) est utilisé de manière à obtenir un macrocycle de taille similaire à celle du DB24C8. Les deux extrémités ont été activées en tosylate¹³⁸ afin d'y substituer deux 2-nitrophénol.¹⁴¹ Finalement les groupements nitro ont été réduits en amine primaire à l'aide d'hydrazine en présence de palladium sur charbon activé.¹⁴² La première partie du clip **3.23** fut obtenue en trois étapes avec 44% de rendement. L'autre fragment

3.24, qui servira à refermer le clip, fut synthétisé par oxydation de la 2,6-diméthanolpyridine par l'oxyde de sélénium.¹⁴⁰

Une version fluorescente de ce clip fut aussi synthétisée (Schéma 3.7). De cette façon, le rotaxane parapluie possède un marqueur fluorescent qui nous facilitera son étude ultérieure. Les étapes sont similaires au début mais la fonctionnalisation du clip d'un seul côté oblige à la dissymétrisation lors de la synthèse. Elle a débuté par la monotosylation du tétra(éthylène glycol)¹⁴³ suivie par la substitution par le 2-nitrophénol.¹⁴¹ Puis le second alcool a été à son tour activé en tosylé¹⁴⁴ et substitué par le 4-amino-2-nitrophénol dont l'amine a été préalablement protégée en *tert*-butyl carbamate.¹⁴⁵ Après déprotection du groupement Boc, le groupement dansyle fut introduit à l'aide du chlorure de dansyle en présence de pyridine.¹⁴⁶ Et finalement, les deux groupements nitro ont été réduits en amine de la même façon que pour **3.22**.¹⁴² Le clip fluorescent **3.32** a été obtenu sur huit étapes avec un rendement global de 24%. Pour refermer ce clip, **3.24** a été utilisé de la même façon.

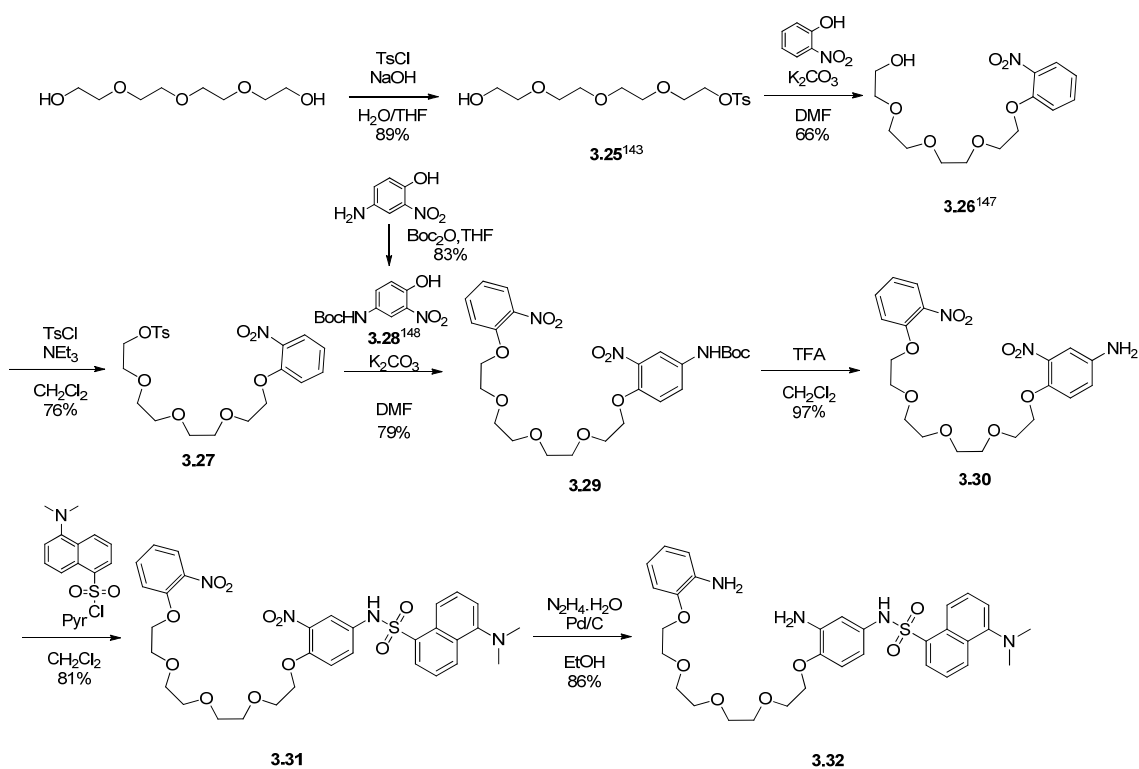


Schéma 3.7. Synthèse du clip fluorescent.^{143, 147, 148}

Chaque fragment de roue est capable de former des liens hydrogène, ce qui va leur permettre de complexer le site de reconnaissance (ammonium secondaire). Ainsi, l'axe va jouer le rôle de gabarit et rapprocher les deux parties de la roue pour les aider à cycliser et non polymériser. Les deux fonctions amine réagissent avec les deux aldéhydes pour d'abord former des liens imines réversibles. La structure est figée par réduction de ces liaisons par $\text{BH}_3\text{-THF}$ (Schéma 3.8). Cette méthode nous a permis de synthétiser la roue avec de bons rendements, respectivement 81% et de façon quantitative, pour le clip **3.23** et le clip fluorescent **3.32**.

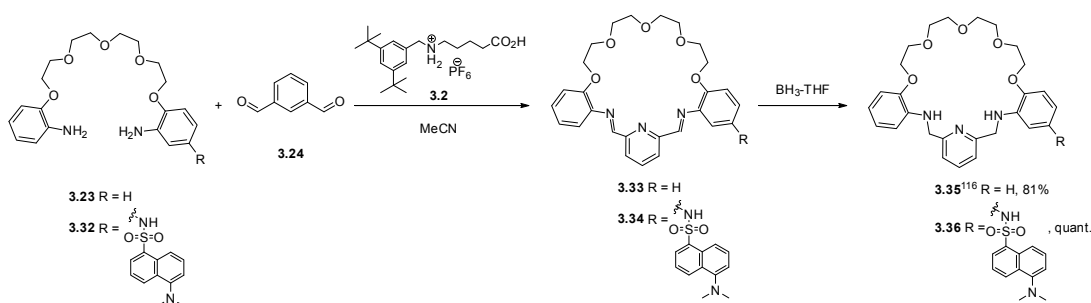


Schéma 3.8. Cyclisation des clips.¹¹⁶

3.2.2. Assemblage par clipage

Les résultats précédents montrent la capacité des clips **3.23** et **3.32** à se placer autour d'un axe gabarit afin de former la roue. La question est de savoir si les axes parapluie, beaucoup plus encombrés permettent le même processus.

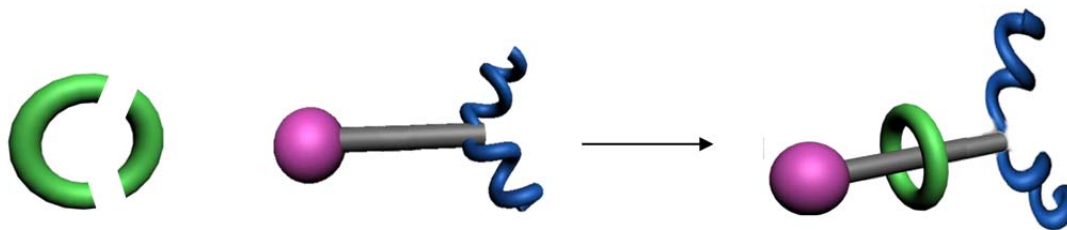


Figure 3.7. Assemblage par clipage de la roue.

Les conditions expérimentales ont été basées sur des travaux antérieurs de clipage similaires^{149,150} puis ont été optimisées pour nos systèmes. Dans un premier temps, les deux

parties du clip se complexent autour de l'axe parapluie et la roue se forme par la création des deux liens imines. Par la suite, l'ajout du $\text{BH}_3\text{-THF}$ fixe la roue qui est à présent bloquée sur l'axe parapluie.

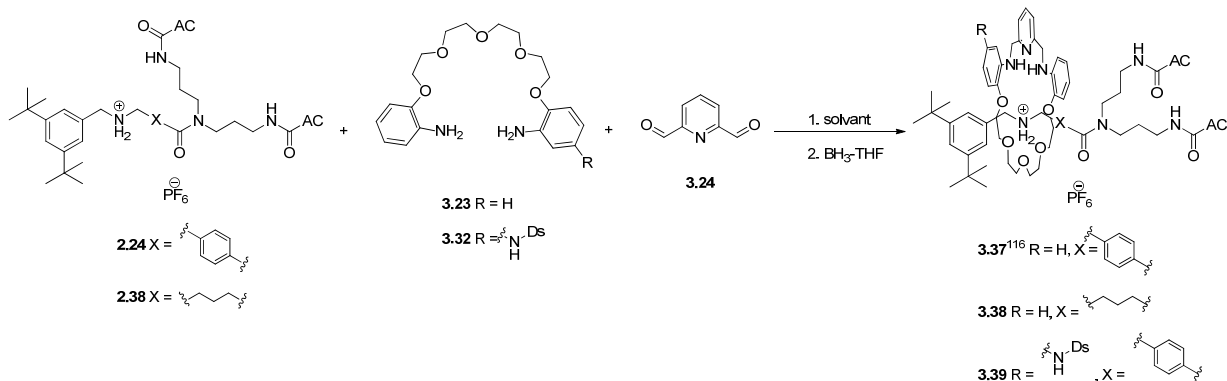


Schéma 3.9. Assemblage des rotaxanes parapluie.¹¹⁶

Différentes conditions (solvant, durée, nombres d'équivalents) ont été testées en vue d'optimiser l'assemblage du rotaxane par clipage. De plus, les différents axes parapluie synthétisés et les différents clips ont été essayés (Schéma 3.9). Dans un premier temps, nous avons utilisé le MeNO_2 et l'assemblage a été étudié avec l'axe parapluie **2.24** en présence du clip **3.23** en quantité équimolaire. La durée de chaque étape a été variée. Le meilleur résultat (18% de rendement) fut obtenu après avoir attendu 4 h avant l'ajout de cinq équivalents de $\text{BH}_3\text{-THF}$ et laissé la réduction se faire pendant 19 h. Étonnamment, de la roue libre a été observée, impliquant qu'elle peut se former en l'absence de gabarit. Il doit alors y avoir un équilibre entre la forme cyclisée libre, la forme non cyclisée et la forme cyclisée autour de l'axe. L'isolation du rotaxane restait très difficile. La conversion fut faible et il restait toujours beaucoup d'axe après la réaction. Les tentatives de recristallisation furent infructueuses à cause des très nombreux produits secondaires, obligeant à plusieurs purifications par chromatographie flash. C'est pourquoi les rendements restent très faibles. L'utilisation de conditions anhydres n'a pas simplifié la purification. Toutes les autres tentatives dans le MeNO_2 , avec les différents axes et clips, n'ont pas abouti en l'obtention d'un rotaxane.

Etant donné les résultats peu satisfaisants obtenus dans le MeNO₂, le solvant a été changé pour du MeCN. L'assemblage de l'axe **2.24** avec le clip **3.23**, dans les mêmes conditions que précédemment, a été réussi avec un rendement de 21%. En utilisant un excès de clip **3.23** et de **3.34**, la formation du rotaxane ne fut pas favorisée et plus particulièrement, l'isolation du rotaxane devint encore plus difficile dû à la présence d'encore plus de produits secondaires (probablement des oligomères). Par contre, en ajoutant un plus grand excès de BH₃-THF, le nombre de produits secondaires fut moindre et la séparation facilitée.

Contrairement au rotaxane non fluorescent **3.37**, l'assemblage du rotaxane fluorescent **3.39**, avec quatre équivalents de clip **3.32** et de **3.34** et cinq équivalents de BH₃-THF, conduit à l'obtention du meilleur résultat (51% de rendement). Dans le cas de l'axe linéaire **2.38**, aucun rotaxane n'a pu être isolé. Seule une très faible quantité fut détectée par spectrométrie de masse.

Ces différentes expériences ont permis d'entrevoir où reposaient les difficultés de cette méthode. Elle ne nécessite pas de conditions particulières (atmosphère inerte), mais différents paramètres influencent l'efficacité de la réaction. Il est clair que le MeCN présente de meilleurs résultats que le MeNO₂ alors que ce dernier solubilise plus facilement tous les réactifs. Car même si le MeCN ne dissout pas complètement les axes parapluie, il dissout le rotaxane formé, créant ainsi un déplacement d'équilibre. Ces deux solvants, aprotiques, sont les plus couramment utilisés pour ce type d'assemblage,^{98, 137} mais ont surtout présenté la capacité à dissoudre partiellement ou totalement les différents axes parapluie.

Le plus souvent, le rendement est diminué par les nombreux produits secondaires formés qui, en plus, rendent la séparation très difficile. Dans le cas du rotaxane **3.39**, l'excès de clip amène un meilleur rendement tandis que pour le rotaxane **3.37**, ceci n'apporte que plus de produits secondaires rendant la purification plus ardue. Dans le premier cas, le clip est substitué d'un groupement encombrant (dansyle). La complexation du clip est vraisemblablement rendue difficile par les gênes stériques entre le parapluie de l'axe et le marqueur fluorescent du clip. Elle est alors favorisée par l'excès de clip. Tandis

que dans le second cas, l'excès ne favorise pas plus la complexation qui se fait plus facilement et amène juste plus de réactions secondaires dans le milieu. Un des principaux facteurs influents est la qualité du $\text{BH}_3\text{-THF}$. Les expériences lancées avec une bouteille neuve résultent en des mélanges plus faciles à séparer. En effet, si la réduction des liens imines n'est pas totale, le clip peut s'ouvrir et mener à la formation de roue libre ou d'oligomères. Ceci explique l'amélioration de la séparation par l'utilisation d'un excès de $\text{BH}_3\text{-THF}$.

Dans le cas de l'axe parapluie linéaire **2.38**, trop peu de rotaxane a pu être formé. Ceci aurait pu être prévisible : l'axe parapluie dibenzyle **2.24** est capable de créer plus d'interactions (notamment des interactions $\pi\text{-}\pi$) entre le second noyau aromatique et le clip. Cela était clairement visible dans l'étude de complexation des axes **3.1** et **3.2** avec DB24C8 (Chapitre 3.1.1) et concorde avec la littérature.¹⁵⁰ Si le rotaxane **3.37** est formé avec un rendement de 21%, le rotaxane **3.38** doit se former avec un rendement bien moindre.

Les rotaxanes parapluie **3.37** et **3.39** ont pu être synthétisés par clipage avec des rendements relativement bons, respectivement 21% et 51%.

3.3. Encapage sur l'axe parapluie : études préliminaires

Malgré le succès de l'assemblage par clipage, l'encapage demeure la méthode de prédilection pour permettre la complexation d'un plus large éventail de molécules macrocycliques. Au vu des difficultés rencontrées plus tôt (Chapitre 3.1), la fermeture devra se faire de l'autre côté sur l'axe parapluie par l'introduction d'un groupement bloquant. Des études préliminaires ont été menées pour montrer la possible complexation d'une roue sur l'axe parapluie **2.23**.

Le titrage par RMN ^1H d'une solution de l'axe parapluie **2.23** avec l'ajout de quantités croissantes de roue **3.35** (Figure 3.8) a montré le blindage des protons en position α de l'ammonium, mettant en évidence la complexation.¹¹⁶

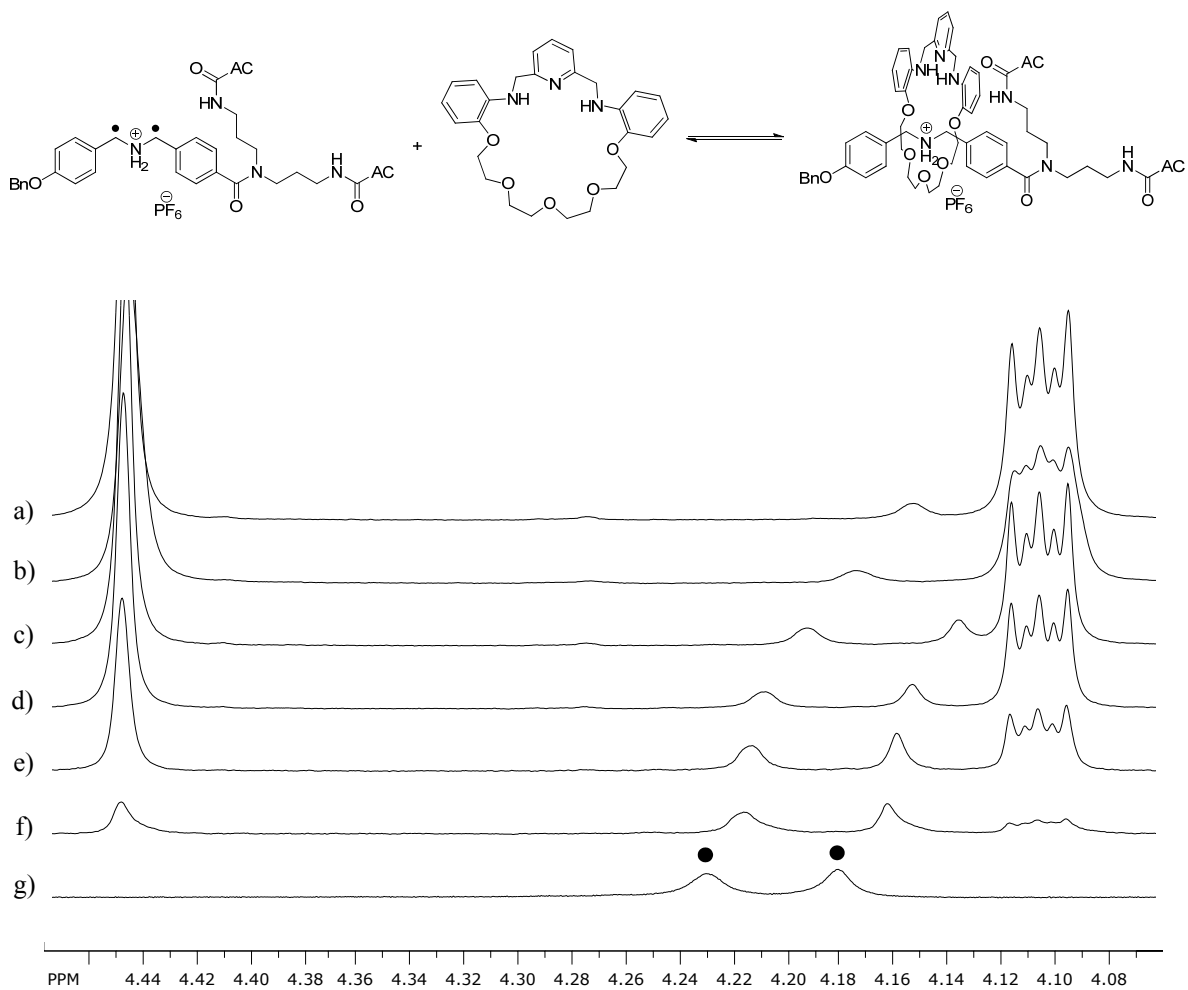


Figure 3.8. Agrandissement des spectres RMN ¹H 400 MHz d'une solution d'axe parapluie **2.23** à 1 mM dans CD₃OD/ CD₃CN 1/9 avec a) 6 éq b) 5 éq c) 4 éq d) 3 éq e) 2 éq f) 1 éq et g) 0 éq de roue **3.35** à température ambiante. Les points noirs correspondent aux signaux des CH₂ en α de l'ammonium.

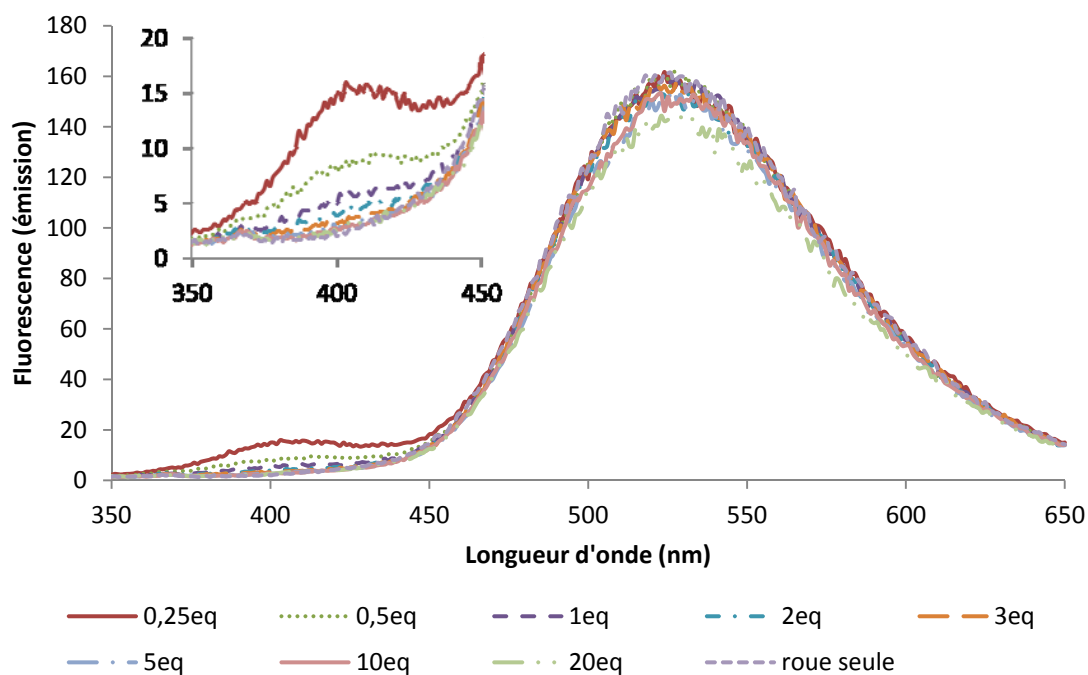


Figure 3.9. Spectres d'émission d'une solution de **2.23** avec différents nombres d'équivalents de roue **3.36** à température ambiante. Excitation à 330 nm. La solution de **3.36** est à 0,2 mM dans MeOH/MeCN 1/9.

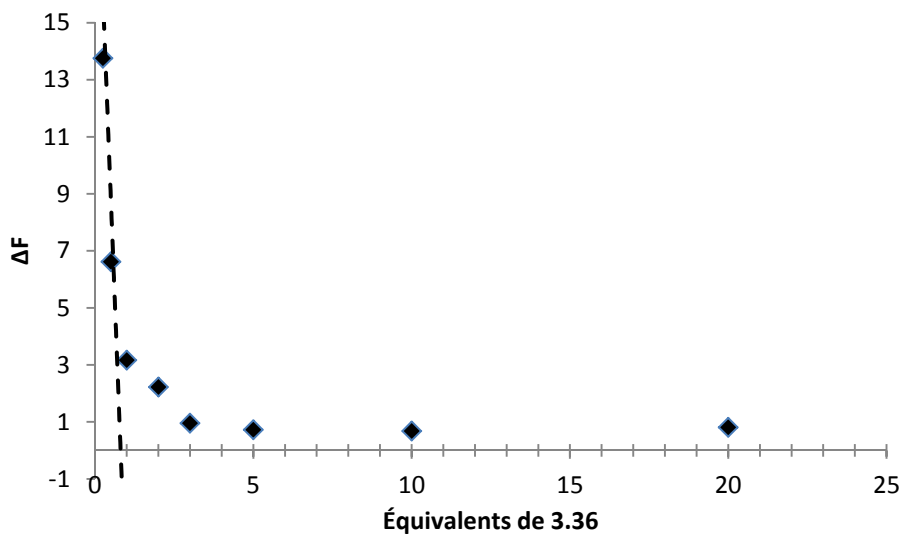


Figure 3.10. Courbe de titrage de l'axe parapluie **2.23** avec la roue fluorescente **3.36**.

En utilisant la version fluorescente de la roue **3.36**, la complexation sur l'axe parapluie **2.23** a pu être confirmée par fluorimétrie dans un mélange MeOH/MeCN 1/9 (Figure 3.9). L'effet hypochromique, lors de l'ajout de roue, démontre une complexation. De plus, ces spectres ont permis de déduire une courbe de titrage (Figure 3.10). La stoechiométrie 1 :1 du complexe et donc la formation d'un [2]-pseudo-rotaxane parapluie a été confirmée.

Le même titrage effectué par spectroscopie UV-visible (Figure 3.11) n'a pas permis de tirer de conclusion dû aux concentrations trop élevées utilisées. De plus, la linéarité de la loi de Beer-Lambert pourrait être également compromise à cause du caractère fluorescent du composé. L'énergie d'émission pourrait fausser la mesure de l'intensité de la lumière transmise.

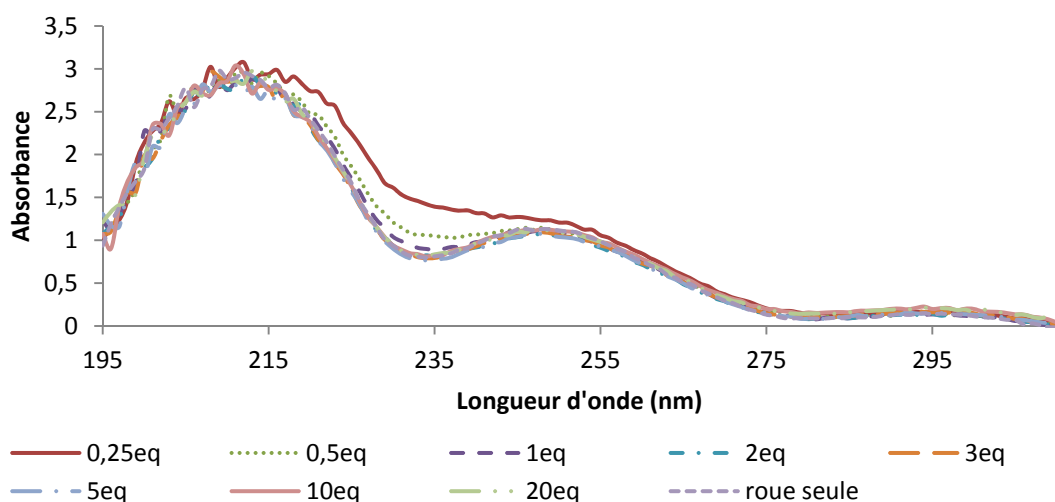


Figure 3.11 Spectres UV d'une solution de **2.23** avec différents nombres d'équivalents de roue **3.36** à température ambiante. La solution de **3.36** est à 0,2 mM dans MeOH/MeCN 1/9.

Ces premières études ont établi la possibilité d'assembler le rotaxane parapluie par encapage. Cependant, le groupement bloquant, ainsi que les conditions dans lesquelles l'introduire sont encore à déterminer. Par ailleurs, une dérivation de l'axe parapluie est toujours envisageable dans le but de faciliter l'introduction d'un groupement bloquant.

3.4. Conclusion

Les nombreuses tentatives en vue d'assembler le rotaxane par enfilement puis encapage par le parapluie n'ont pas rencontré de résultat positif. De toute évidence, l'encombrement causé à la fois par la roue et le parapluie est un obstacle trop important pour permettre le blocage du rotaxane par une réaction de couplage peptidique entre l'axe et le parapluie. Cependant, les rotaxanes parapluie ont pu être synthétisés par clipage avec des rendements relativement bons. Malheureusement, cette méthode a été appliquée sans succès pour l'axe parapluie linéaire **2.38**. Ces premiers spécimens permettront de déterminer la faisabilité de notre projet, tout d'abord la capacité de nos rotaxanes parapluie à traverser une bicouche lipidique, puis le relargage de la roue.

Si le transport transmembranaire de ces entités est confirmé, le mode d'assemblage par encapage sur l'axe parapluie devra être développé pour permettre le transport du plus grand nombre de roues possible.

Chapitre 4 Repliement et changement de conformation

La synthèse des différents axes et rotaxanes parapluie achevée, l'amphomorphisme de ces composés et le mouvement du parapluie est à mettre en évidence dans différents milieux. En effet, pour que ces molécules soient capables de transporter à travers une bicouche phospholipidique, elles doivent s'adapter selon que le milieu soit hydrophile (extérieur de la bicouche, milieu aqueux) ou hydrophobe (intérieur de la bicouche). Plusieurs études ont été menées pour mieux comprendre et observer le repliement ou l'ouverture du parapluie sur l'axe ou rotaxane dibenzylammonium parapluie. Dans un premier temps l'axe parapluie, plus simple que le rotaxane, a été étudié par RMN ^1H 1D puis 2D (ROESY).

4.1. Etude RMN de l'axe parapluie

Lors de la synthèse multiétapes, l'axe parapluie protégé par un groupement Boc **2.20** était l'un des intermédiaires. Celui-ci présente un axe plus hydrophobe que le dérivé ammonium **2.22**. De ce fait, un environnement hydrophobe devrait favoriser une conformation exposée, où l'axe protégé Boc serait complètement dévoilé tandis que les faces hydrophiles des deux acides choliques seraient face à face pour minimiser le contact avec l'environnement défavorable. Alors qu'un environnement hydrophile devrait entraîner une conformation complètement renfermée, les deux bras du parapluie protégeant l'axe du milieu. Les faces hydrophiles des acides choliques feraient face au milieu extérieur augmentant les interactions hydrophiles-hydrophiles.

Les spectres RMN ^1H de l'axe parapluie protégé **2.20** ont été enregistrés dans deux solvants de polarités différentes : le CD_3OD et le CDCl_3 (ce dernier, peu polaire, constitue un bon modèle pour l'intérieur de bicouche phospholipidique⁴) (Figure 4.1). À cause de la complexité du composé, tous les signaux n'ont pu être attribués. Cependant, certains pics ont pu être identifiés grâce au spectre COSY et à la littérature pour les protons des acides choliques.^{151, 152} Malgré une attribution incomplète, tous les protons de l'axe ont été

assignés et quelques protons des acides choliques ont été identifiés. Le déplacement de ces pics pourrait déjà révéler le changement de conformation. Certains pics mineurs apparaissent dans la zone aromatique dans le CDCl_3 . Ils sont dûs à la limite de solubilité du composé dans ce solvant.

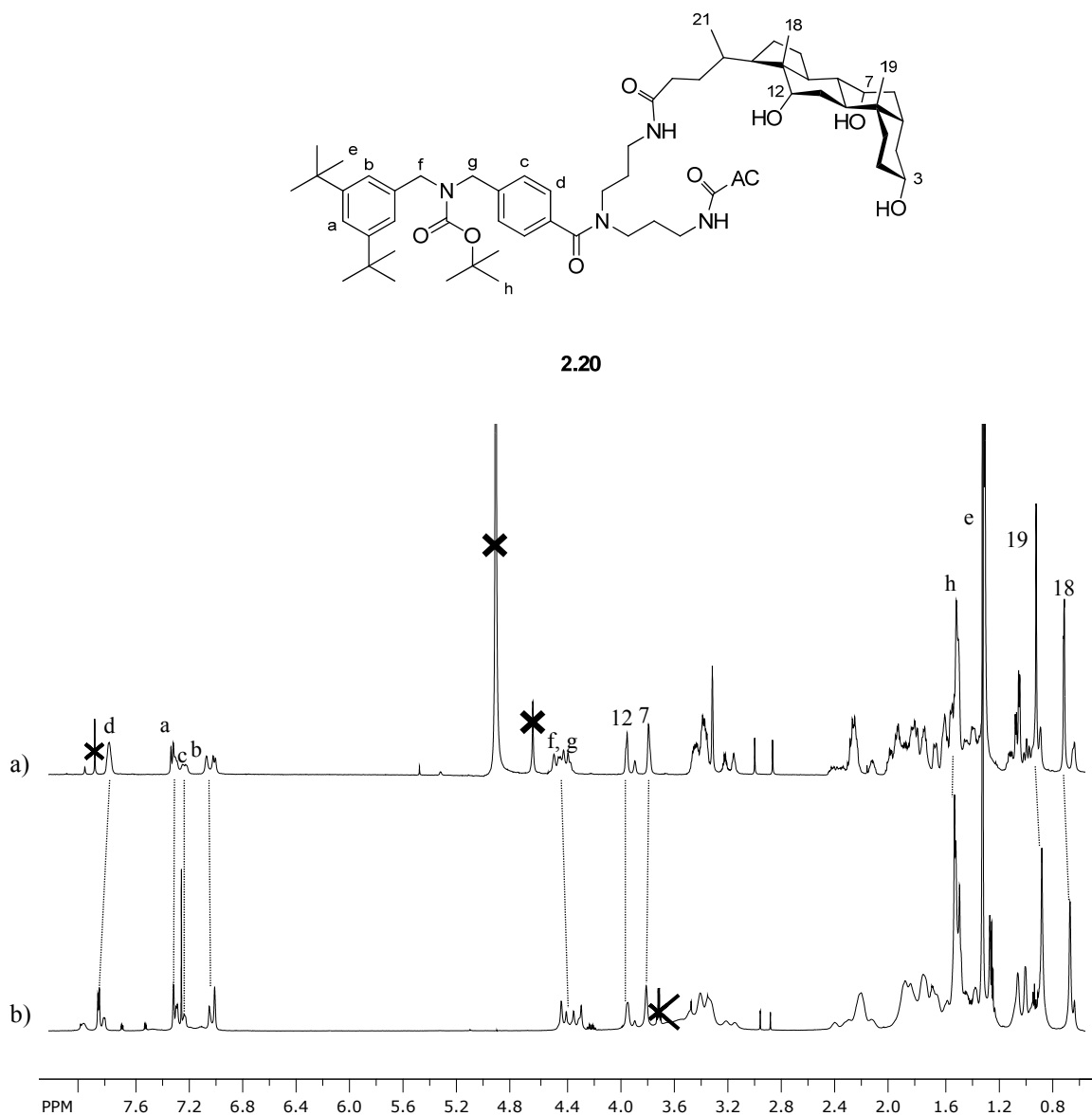


Figure 4.1. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapneumococcal protégé **2.20** à 5×10^{-2} M dans a) CD_3OD et b) CDCl_3 à température ambiante.

A première vue, les déplacements des signaux assignés ($\Delta\delta$) sont faibles, voire inexistant. Les protons e et h ne connaissent aucune variation : les protons e étant éloignés du parapluie, il se peut que le repliement du parapluie ne permet pas de rapprocher suffisamment les acides choliques pour influencer leur environnement. Quant aux protons h du Boc, le signal est large et noyé dans le multiplet et le $\Delta\delta$ est faible. Les protons 12 et 7 des acides choliques n'ont aucune variation non plus. Le détail des autres signaux est rassemblé dans le Tableau 4.1. Pour les signaux attribués, les déplacements sont trop faibles pour être significatifs. De ce fait, une étude 2D a été faite pour essayer d'apporter plus d'informations.

δ (CDCl ₃) ppm	δ (CD ₃ OD) ppm	$\Delta\delta$ ppm	Attribution
0.653	0.692	-0.039	C ₁₈ H ₃
0.863	0.901	-0.038	C ₁₉ H ₃
4.364	4.436	-0.072	C _f H ₂ et C _g H ₂
7.885	7.797	0.088	2C _a H
7.269	7.236	0.033	2C _b H
7.037	7.039	-0.002	2C _c H
7.323	7.335	-0.012	2C _d H

Tableau 4.1. Différences de déplacement chimique des pics entre les spectres RMN ¹H de **2.20** enregistrés dans le CDCl₃ et le CD₃OD.

Une étude ROESY a été entreprise pour parvenir à visualiser le rapprochement dans l'espace des acides choliques sur l'axe, et donc le repliement du parapluie. Les spectres ROESY permettent, comme les spectres NOESY, d'observer la proximité des protons (<5Å) dans l'espace grâce à l'effet nucléaire Overhauser. Le ROESY fut préféré pour les molécules étudiées, ayant des masses moléculaires intermédiaires (entre 1000 et 3000). Cette méthode évite ainsi l'annulation du NOE qui a parfois lieu avec ce type de composés.

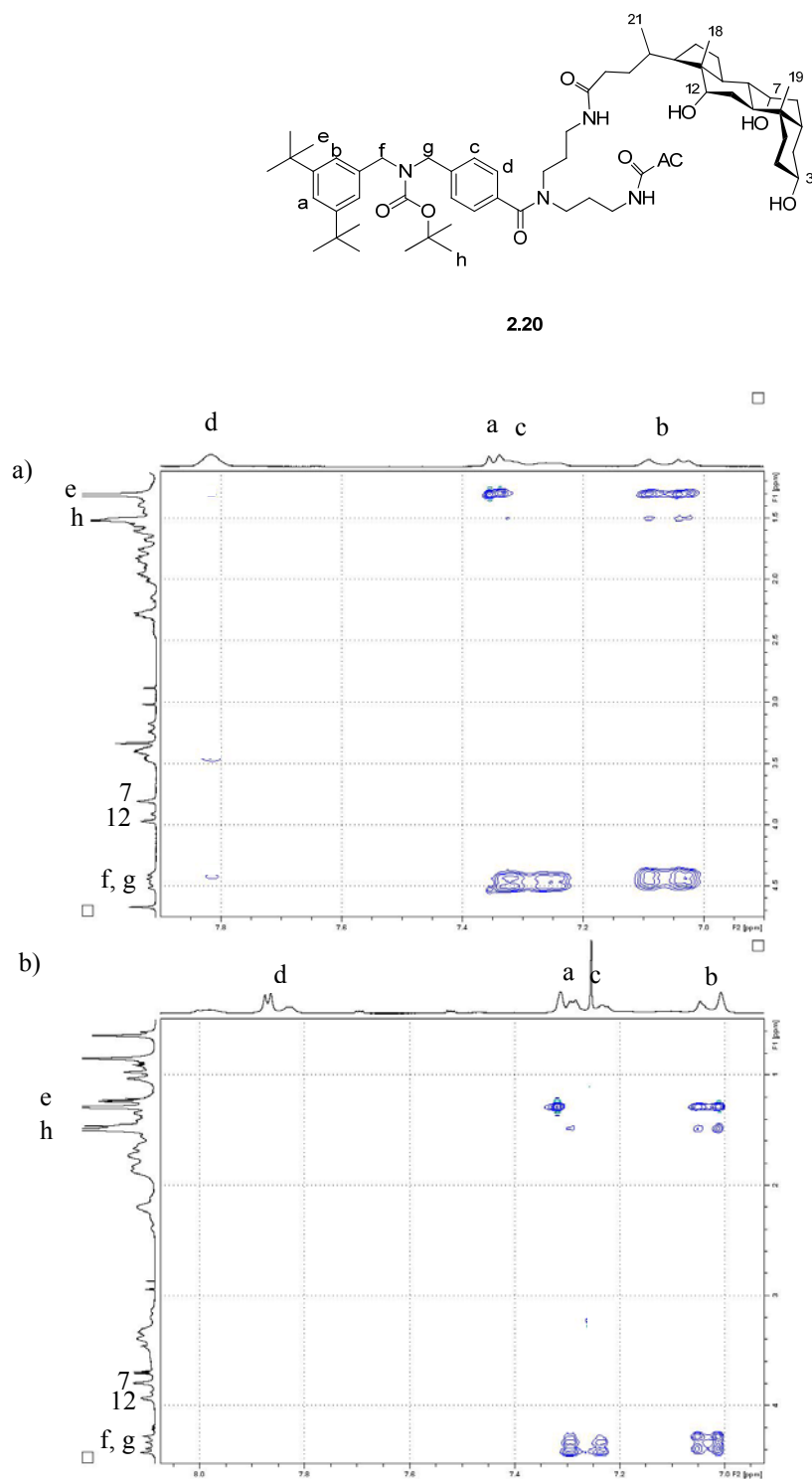


Figure 4.2. Agrandissement du spectre ROESY 700 MHz de l'axe parapluie protégé **2.20** dans a) CD₃OD et b) CDCl₃ à 5×10^{-2} M.

Les spectres ROESY (Figure 4.2) ont été enregistrés dans les mêmes conditions qu'auparavant afin de pouvoir comparer les différences entre le solvant polaire (CD₃OD) et le solvant moins polaire (CDCl₃). L'objectif était d'observer des tâches de corrélation entre les protons des acides choliques et ceux de l'axe dans le cas de la fermeture du parapluie sur l'axe (dans le CD₃OD) et que ces tâches disparaissent lorsque l'axe était exposé (dans le CDCl₃). Les deux spectres 2D sont identiques. Les premières tâches en haut des spectres correspondent à la proximité entre les protons a et b et les groupements *tert*-butyles (e) de l'axe. Les tâches plus claires en dessous indiquent la proximité entre les CH₂ (f et g) et les protons h du Boc. Finalement, en bas des spectres, les deux tâches foncées correspondent à la proximité entre les protons CH₂ f et g et les protons aromatiques b et c. L'encombrement stérique du groupement Boc pourrait empêcher une proximité suffisante des acides choliques avec les protons de l'axe pour être observée. Malheureusement, même si l'approche des acides choliques avec le groupement Boc pourrait lui être observée, le singulet du Boc est superposé à tellement d'autres signaux de protons des acides choliques qu'il est impossible de voir clairement à quels protons sont attribués les tâches de corrélation. Dans tous les cas, aucune tâche ne permet d'observer une corrélation entre le parapluie et l'axe, et donc de visualiser un repliement du parapluie.

Malgré la différence de valeurs de logP (coefficient de partage entre l'eau et l'octanol d'un composé, indiquant son hydrophilie),¹⁵³ qui est de 1,97 pour le CDCl₃¹⁵⁴ et de -0,74 pour le CD₃OD,¹⁵⁵ aucun déplacement ne permet d'affirmer un changement de conformation lorsque le rotaxane se retrouve dans un autre solvant.

Pour remédier au possible problème stérique, la même étude a été faite sur l'axe parapluie déprotégé **2.22**. Avec ce composé, des problèmes de solubilité ont été rencontrés. Il ne fut soluble que dans le CD₃OD et un mélange CD₃OD/CD₃CN 1/1. En comparant les spectres RMN ¹H dans ces deux solvants (Figure 4.3), très peu de différence est observée. Le déplacement des différents signaux $\Delta\delta$ est de l'ordre 0,05 ppm, ce qui est trop faible pour être significatif. L'étude ROESY a tout de même été faite dans l'espoir d'obtenir plus d'informations. Cependant, la résolution des spectres ROESY n'a pas permis de voir de différence entre les deux cas. Effectivement, la différence des polarités est sans doute

insuffisante pour observer clairement un changement de conformation du rotaxane parapluie.

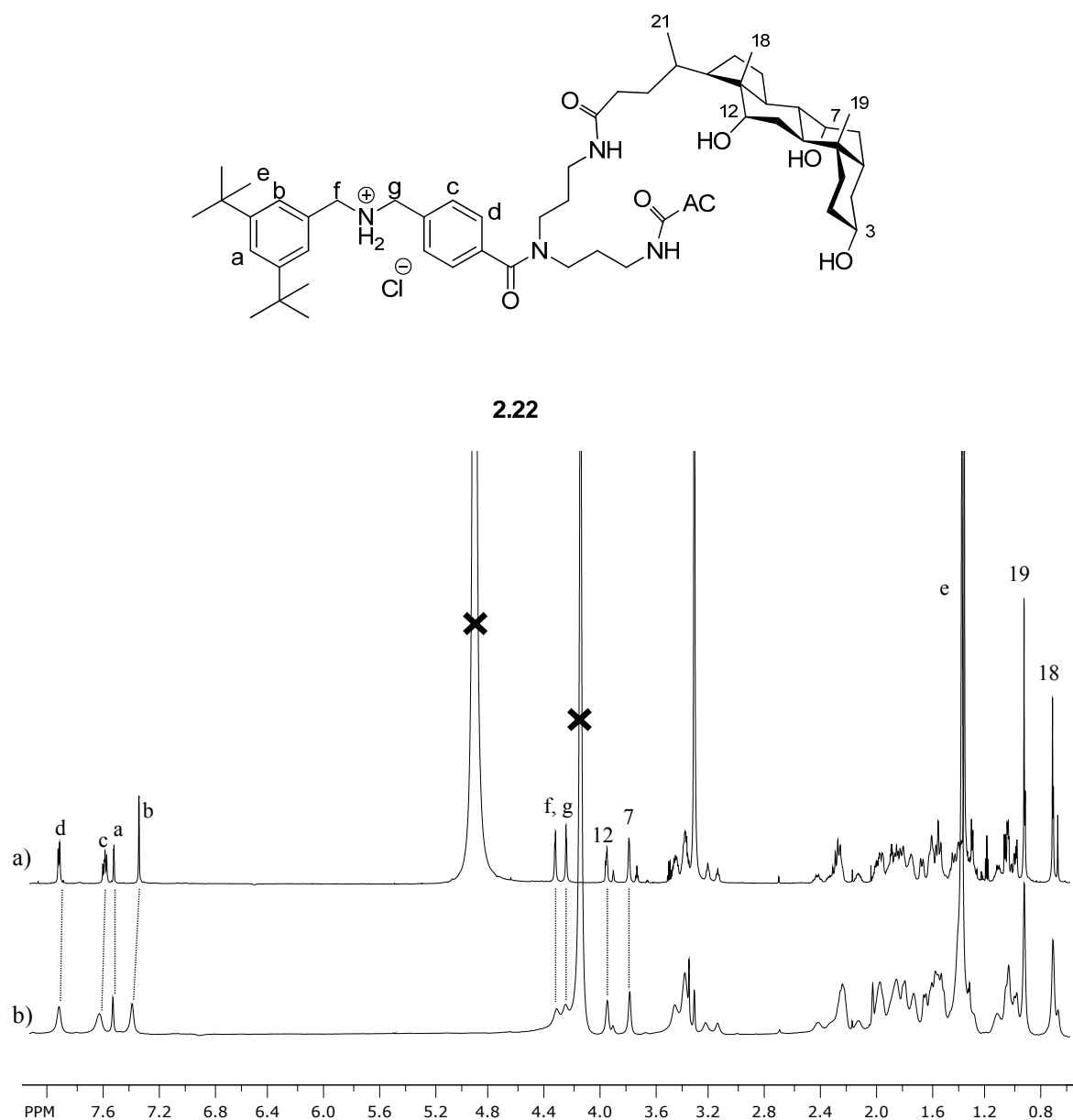


Figure 4.3. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapluie déprotégé **2.22** à 5×10^{-2} M dans a) CD_3OD et b) $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{CN}$ 1/1 à température ambiante.

Même en utilisant un spectromètre aussi puissant (700 MHz), les spectres observés restent insuffisamment résolus et montrent des signaux relativement larges. Ce phénomène

pourrait être causé par la flexibilité des composés et leurs constants changements de conformations. Dans le but de vérifier cette théorie et surtout d'améliorer la résolution des spectres, des spectres RMN ^1H ont été pris à différentes températures. En effet, la variation de température devrait jouer sur la vitesse de rotation des liens.¹⁵⁶

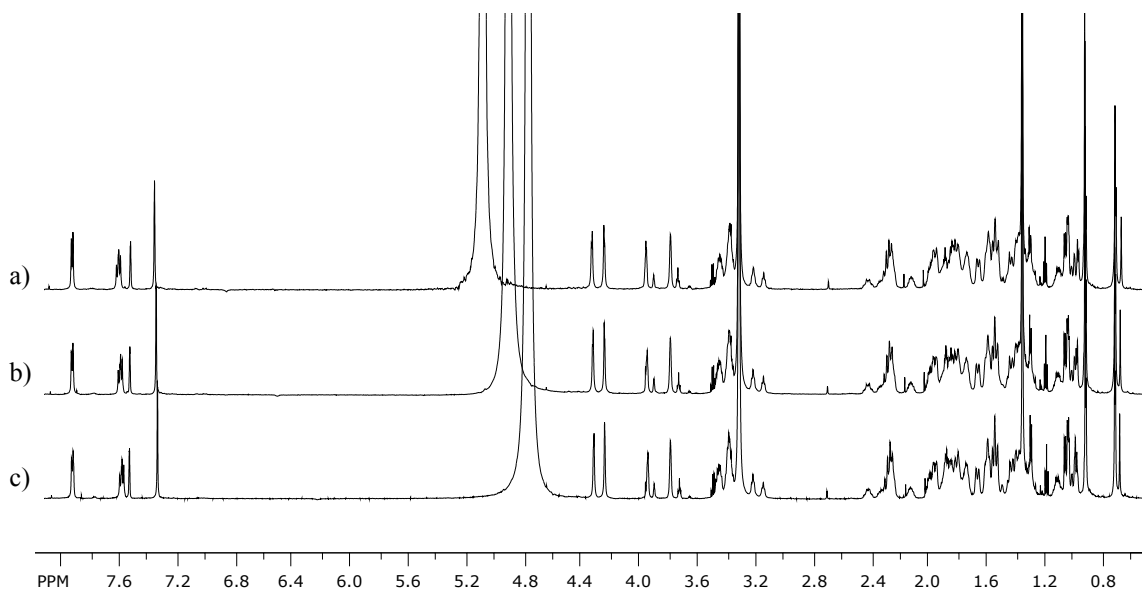


Figure 4.4. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapluie déprotégé **2.22** à 5×10^{-2} M dans CD_3OD à a) 5°C , b) température ambiante et c) 40°C .

Des séries de spectres RMN ^1H ont été prises à 5°C , température ambiante et 40°C pour l'axe parapluie déprotégé **2.22** dans le CD_3OD (Figure 4.4) et dans un mélange $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{CN}$ 1/1 (Figure 4.5). Malheureusement, dans ces deux séries, aucune amélioration de la résolution du spectre n'est observée en variant la température. Les spectres restent identiques, seul le pic de l'eau varie. Il n'est donc pas possible d'obtenir une meilleure résolution des spectres afin de les déchiffrer plus clairement.

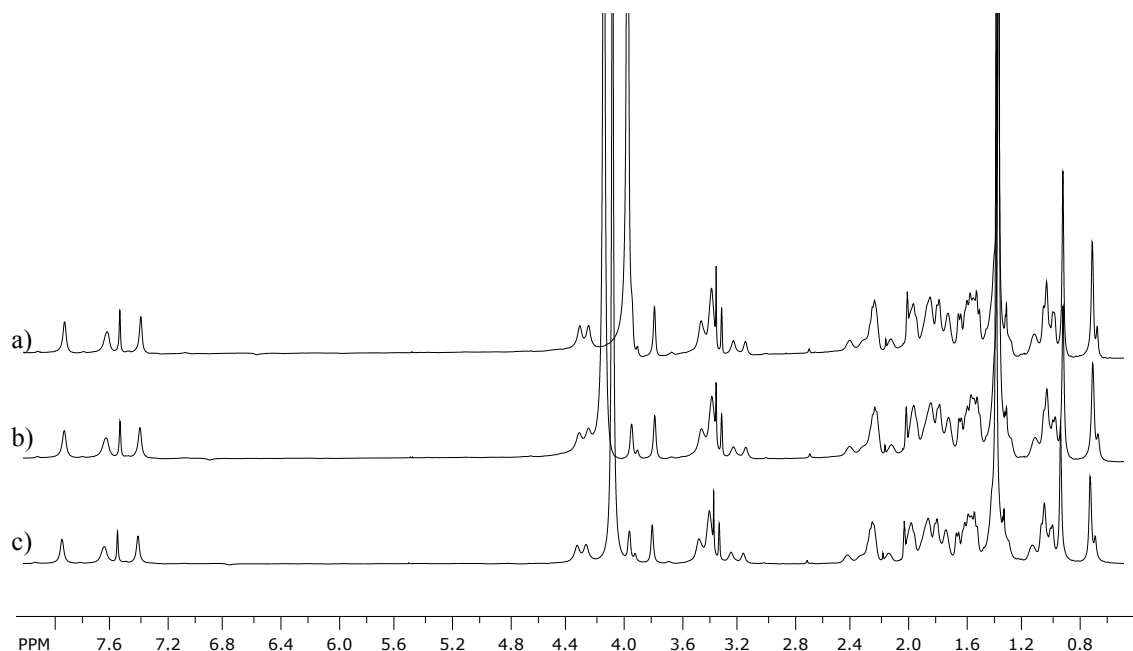


Figure 4.5. Spectres RMN ^1H 700 MHz de l'axe parapluie déprotégé **2.22** à 5×10^{-2} M dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{CN}$ 1/1 à a) 5°C , b) température ambiante et c) 40°C .

4.2. Etude RMN du rotaxane

Avant d'entreprendre toute étude de changement de conformation avec le rotaxane parapluie **3.37** synthétisé, la mise en évidence de sa formation a été faite par RMN ^1H en comparant son spectre avec ceux de l'axe parapluie **2.24** et de la roue **3.35** seule (Figure 4.6). L'attribution partielle des signaux a été faite grâce à des spectres COSY et ROESY. La zone entre 0,6 et 2,5 ppm reste similaire à l'axe parapluie. En effet, il y a majoritairement les protons des acides choliques. Néanmoins, on remarque nettement le blindage des protons e des deux groupements *tert*-butyles, vraisemblablement dû à la proximité d'un noyau aromatique de la roue. Entre 3 et 5 ppm, il y a superposition de nombreux signaux. Seuls les protons f et g en α de l'ammonium ont été facilement assignés. Ils subissent un fort déblindage dû à la complexation de la roue. Finalement, dans la zone aromatique, tous les protons de l'axe parapluie connaissent un fort blindage, plus ou moins important, tandis que les protons de la roue subissent des blindages (pour D, E, F et G) et déblindages (A et B) plus faibles. L'important blindage des protons c et d laisse penser à

des interactions π - π . De plus, le blindage des protons D, E, F et G suggère que ce sont les noyaux benzéniques qui s'empileraient. Cette hypothèse concorderait avec les structures cristallines de composés similaires publiées dans la littérature⁹⁸ où la roue prend une forme en esse avec les cycles aminophénol en empilement π - π sur les cycles aromatiques de l'axe dibenzylammonium. Cependant, la présence des groupements *tert*-butyles très volumineux pourrait empêcher tout empilement π - π de ce côté,¹⁵⁷ expliquant le plus faible blindage des protons a et b. Mais il reste raisonnable d'envisager une conformation en esse de la roue sur l'axe.

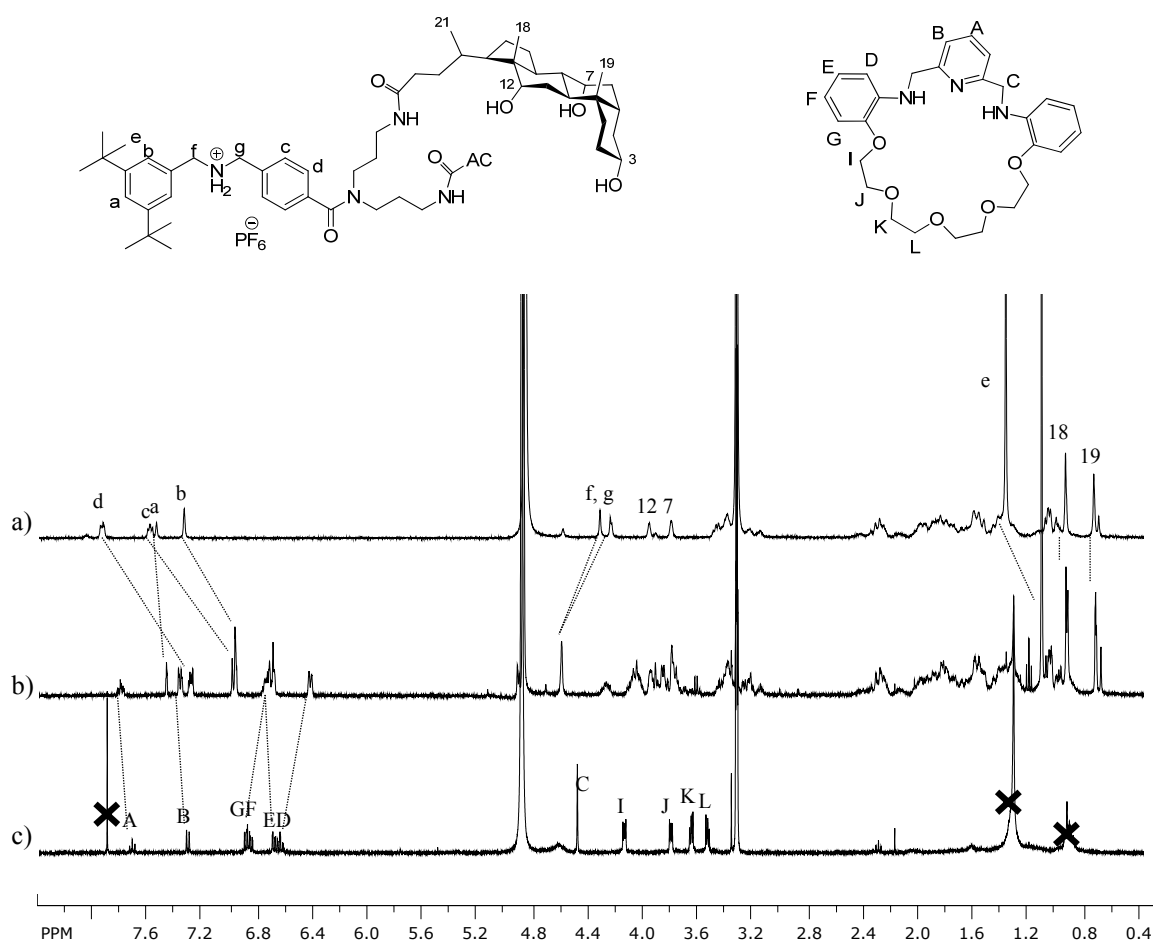


Figure 4.6. Spectres RMN ¹H 400 MHz de a) l'axe parapluie **2.24**, b) le rotaxane parapluie **3.37** et c) la roue **3.35** dans le CD₃OD à température ambiante.

Des études similaires à celles entreprises ci-dessus (Chapitre 4.1) ont été faites avec le rotaxane parapluie **3.37** obtenu pour observer des changements de conformations en variant l'hydrophilie du milieu. Dans un premier temps, le rotaxane parapluie a été dissous dans des solvants plus ou moins polaires. Tout comme pour l'axe parapluie déprotégé, des problèmes de solubilité ont été rencontrés dans certains solvants. Finalement, seuls le CD_3OD , le CD_3CN , le CD_3NO_2 et le $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ 1/1 ont été retenus. Cependant, le nitrométhane a été abandonné à cause de son $\log P$ ($-0,33^{154}$) proche de celui de l'acétonitrile ($-0,34^{154}$) n'apportant alors pas de grand changement. Par comparaison, des spectres obtenus dans le CD_3CN , le CD_3OD et le mélange $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1 (Figure 4.7), des différences flagrantes ont pu être observées.

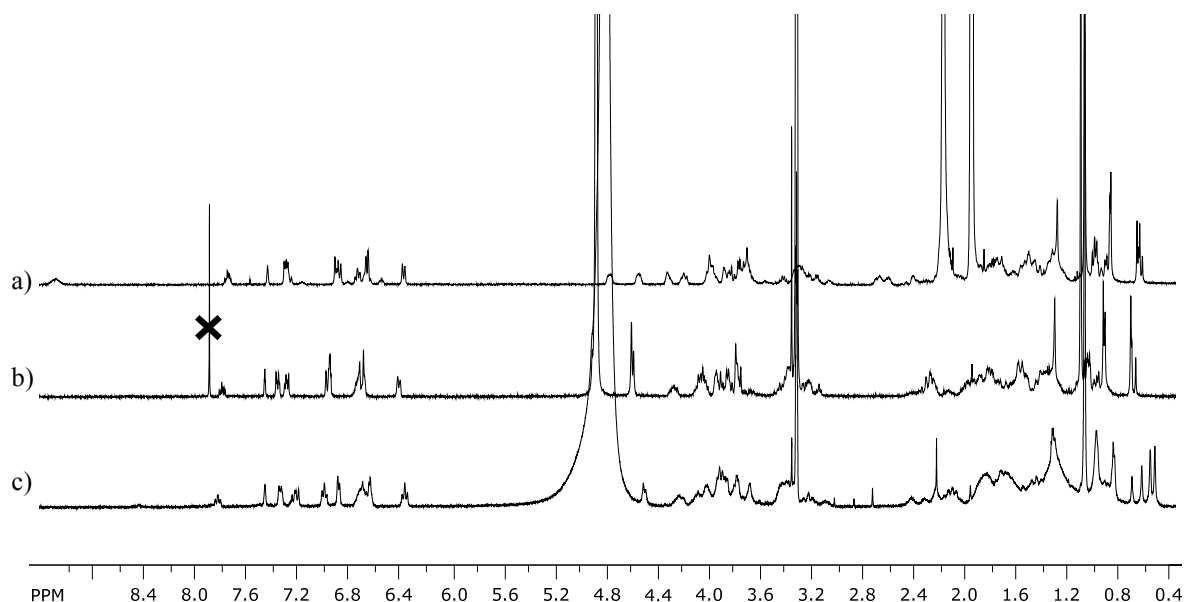


Figure 4.7. Spectres RMN ^1H 400 MHz du rotaxane parapluie **3.37** dans a) CD_3CN b) CD_3OD et c) $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1 à température ambiante.

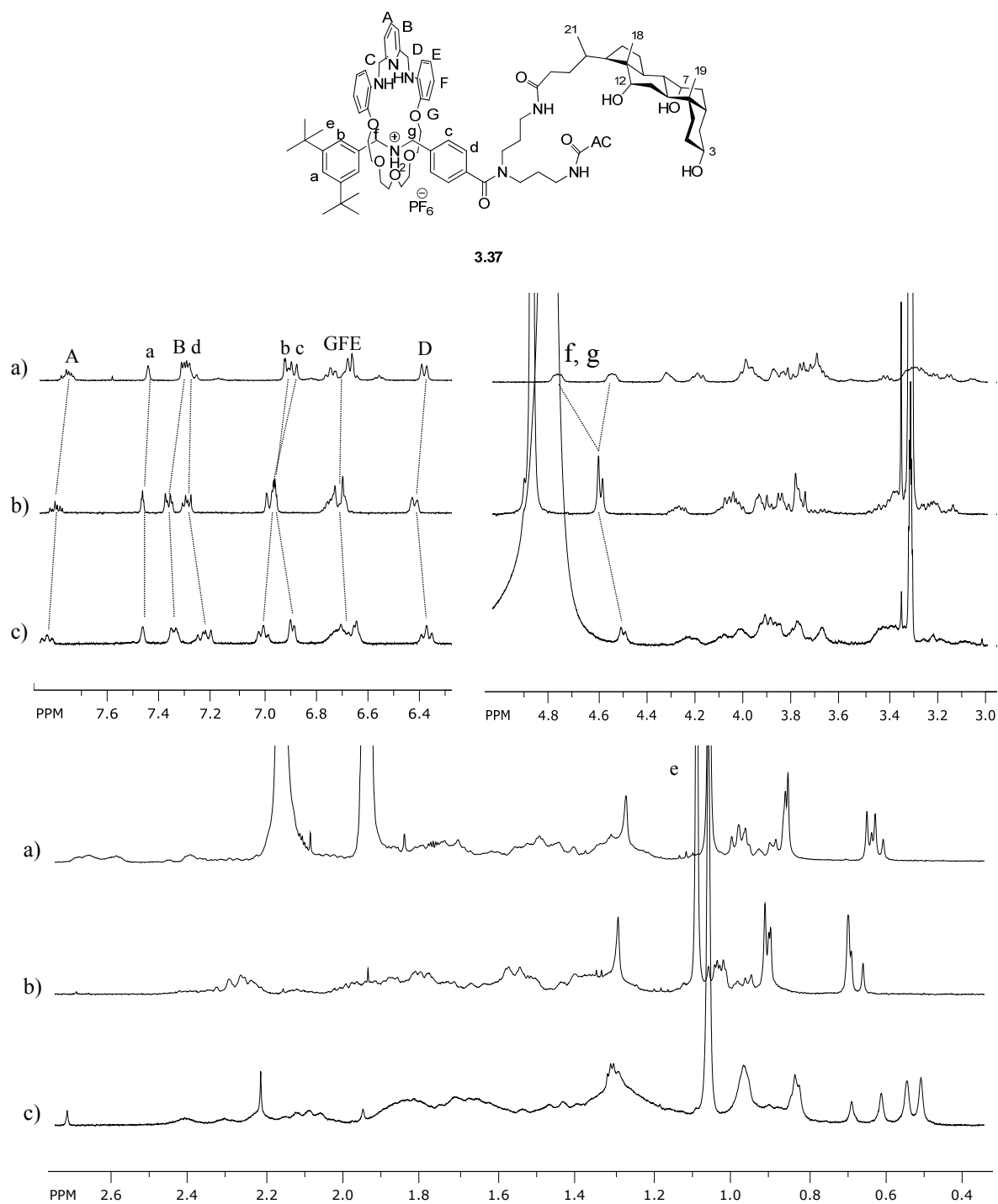
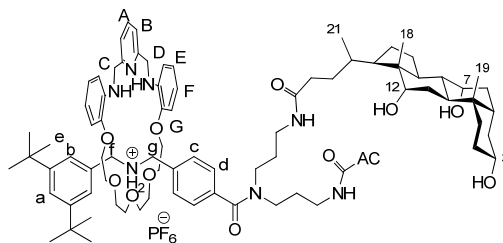


Figure 4.8. Agrandissements des spectres RMN ^1H 400 MHz du rotaxane parapluie **3.37** dans a) CD_3CN b) CD_3OD et c) $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1 à température ambiante.

En allant vers des milieux de plus en plus hydrophiles (du CD_3CN vers $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1) (Figure 4.8), le déblindage des protons A, a et c a été observé tandis que les protons d, b et GFE connaissent un blindage. Dans le cas des protons b, B et D, les signaux subissent d'abord un déblindage en passant du MeCN au CD_3OD puis un blindage en passant du CD_3OD au $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ 1/1. Ces déplacements, dans un sens puis dans l'autre, pourraient être expliqués par le passage à des solvants protiques pouvant entrer en compétition pour la formation de ponts hydrogène. La complexation de la roue pourrait ainsi être affectée par le passage d'un solvant aprotique à un solvant protique.

En ne tenant compte que du passage du CD_3OD vers le $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, les déplacements les plus importants ont été observés pour les protons b, d, D, E, F et G. Les protons d, proches du parapluie, devraient être les premiers à subir un changement d'environnement en cas de changement de conformation du parapluie. Il en devrait en être de même pour les protons D, E, F et G, eux aussi supposés proches du parapluie. La zone entre 3 et 5 ppm est dense en pics. On y retrouve les signaux des protons 12, 7 et 3 des acides choliques, la partie tétra(éthylène glycol) de la roue, mais aussi quelques protons des bras du parapluie. Seuls les signaux des CH_2 en α de l'ammonium ont pu être attribués, n'apportant aucune information quant au repliement du parapluie. Finalement, dans les champs les plus forts, les grands singulets des groupements *tert*-butyles bougent à peine. Mais l'allure des signaux en dessous de 1 ppm varie grandement. En allant dans des solvants plus polaires, le nombre de pics augmentent et il semble y avoir un dédoublement des pics dans le $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$.

Toutes ces observations laissent supposer un changement de conformation, mais les spectres ROESY pourraient permettre d'observer plus clairement les différences dans les différents solvants. Malheureusement, la mauvaise qualité du spectre obtenu dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ 1/1 n'a pas permis son exploitation. Etant donné la complexité des spectres, les corrélations des signaux à des déplacements inférieurs à 3 ppm n'ont pas été analysées.



3.37

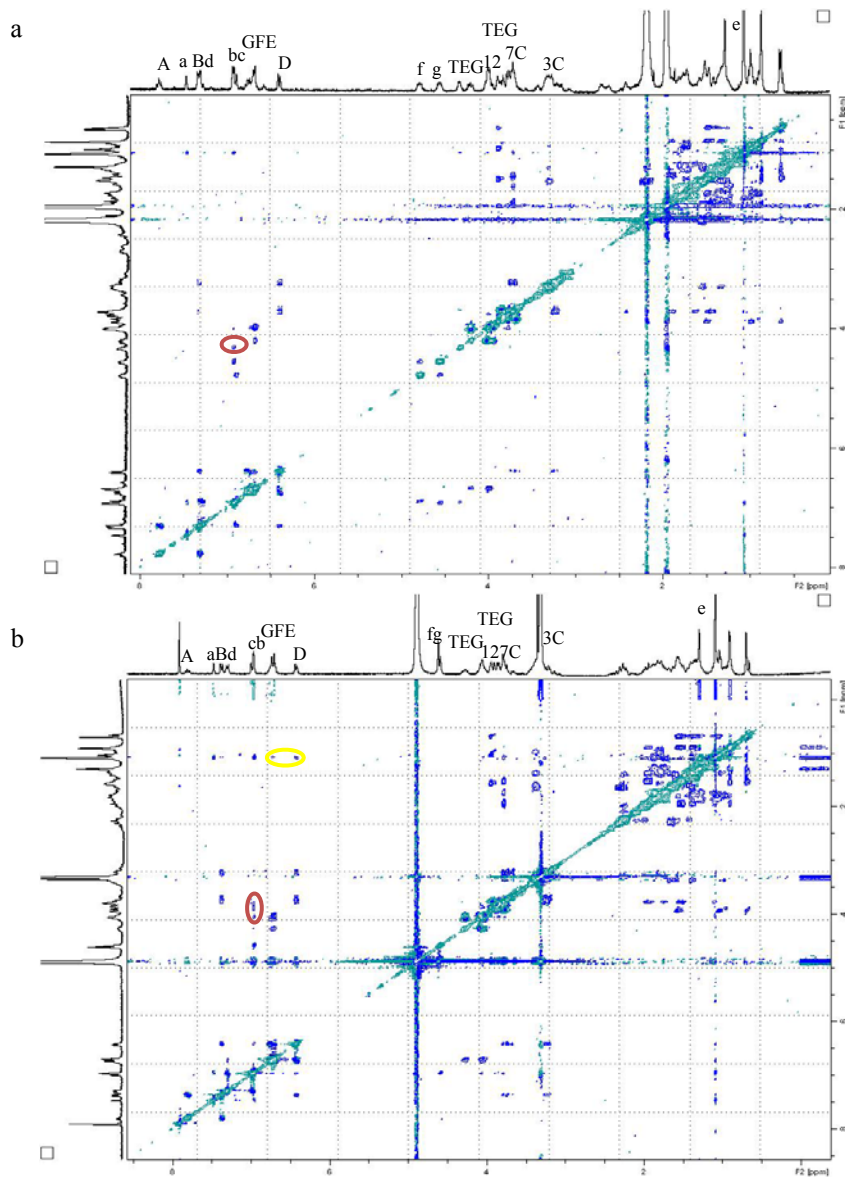


Figure 4.9. Spectres RMN ROESY 300 MHz du rotaxane parapluie **3.37** dans a) CD_3CN et b) CD_3OD à température ambiante.

Les corrélations dans la région aromatique ont permis l'attribution rigoureuse des pics de cette zone. Les corrélations des signaux entre 3 et 5 ppm ont permis la localisation des protons 12, 7 et 3, mais aussi C dans ces multiplets et d'en déduire ceux de la partie tétra(éthylène glycol) (TEG). De plus, dans les deux solvants, la proximité entre les protons c et les CH₂ de la partie tétra(éthylène glycol) de la roue (encerclé en rouge sur la Figure 4.9) a pu être observée. Finalement, les corrélations des signaux en dessous de 3 ppm ont permis de confirmer, dans le CD₃OD (encerclé en jaune sur la Figure 4.9.B), la proximité d'un cycle aminophénol des groupements *tert*-butyles, mais aucune corrélation entre les protons d'acide cholique et les protons de la roue ou de l'axe. De plus, aucune différence n'apparaît dans cette région entre les deux solvants. Il y a donc bien confirmation de l'orientation de la roue sur l'axe dans le CD₃OD.

Malheureusement, rien n'a permis d'appuyer le repliement du parapluie sur la roue. La différence de polarité entre les deux solvants pourrait ne pas être suffisante pour induire une inversion du parapluie, ou le repliement n'approcherait pas assez le parapluie de la roue pour permettre d'observer des corrélations par ROESY.

4.3. Etude par fluorimétrie du rotaxane

Grâce à la version fluorescente du rotaxane parapluie, une méthode plus sensible, la fluorimétrie, a pu être utilisée pour mettre en évidence une variation de conformation en fonction de la polarité. En effet, la fluorescence du composé **3.39** sera influencée par la conformation du parapluie. La fluorescence de certains marqueurs (dérivés d'1-anilidonaphtalène sulfonate¹⁵⁸, *N*-phényl-1-naphtylamine¹⁵⁹, dialkylaminobenzonitrile¹⁶⁰) peut être influencée par leur environnement (polarité et viscosité du solvant, température).¹⁶¹ Ces marqueurs possèdent la particularité de connaître une augmentation de leur moment dipolaire lorsqu'ils passent à l'état excité ($\Delta\mu = 19$ D dans le cas du dansyle).¹⁵⁸ Les molécules de solvants polaires peuvent alors s'organiser autour et relaxer (relaxation du solvant) afin de stabiliser davantage l'état excité, comme indiqué dans le diagramme de Jablonski (Figure 4.10). Un solvant présentant un moment dipolaire plus grand amplifie encore plus ce phénomène entraînant finalement une baisse de l'énergie

émise.¹⁶¹ De ce fait, le passage d'un solvant non polaire à un solvant polaire, ou plus généralement d'un environnement non polaire à polaire devrait entraîner un effet bathochromique.

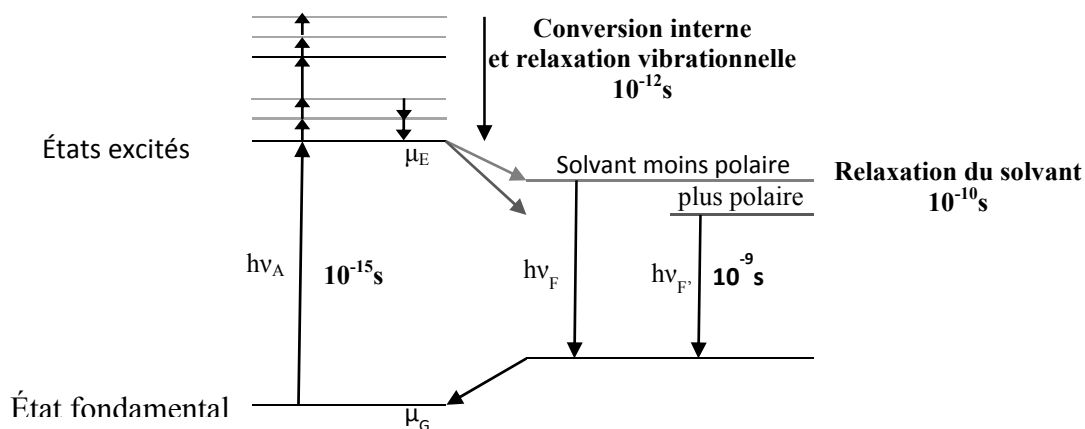


Figure 4.10. Diagramme de Jablonski : relaxation du solvant.¹⁶¹

L'étude pour le rotaxane parapluie dérivé par un groupement dansyle **3.38** a été effectuée dans deux mélanges de deux solvants : MeOH/H₂O et MeOH/CCl₄. Ces solvants ont été choisis afin de couvrir une plus large gamme de polarité. De plus, le CCl₄, qui est non polaire, est un bon modèle pour l'intérieur d'une bicouche phospholipidique.

La Figure 4.11.A montre l'effet bathochromique lorsque la polarité du milieu augmente dans le mélange MeOH/CCl₄, le λ_{\max} d'émission passe de 430 nm à 530 nm. Cependant dans les mélanges MeOH/H₂O (Figure 4.11.B), un autre phénomène est visible. En augmentant la polarité du milieu, un effet bathochromique est d'abord observé en passant au mélange MeOH/H₂O 1/1 (en rouge) (λ_{\max} passe de 530 nm à 540 nm) puis en passant dans des mélanges plus riches en eau, l'effet contraire (hypsochromique) est observé (λ_{\max} redescend à 495 nm). Pour la roue seule, dans les mélanges de MeOH/CCl₄, le même effet bathochromique est observé que pour le rotaxane. Par contre, dans les mélanges MeOH/H₂O, l'effet bathochromique est plus prononcé et λ_{\max} passe de 530 nm à 550 nm (dans un mélange MeOH/H₂O 1/10). Au dessus de cette proportion en eau, le composé commence à précipiter dans la cellule.

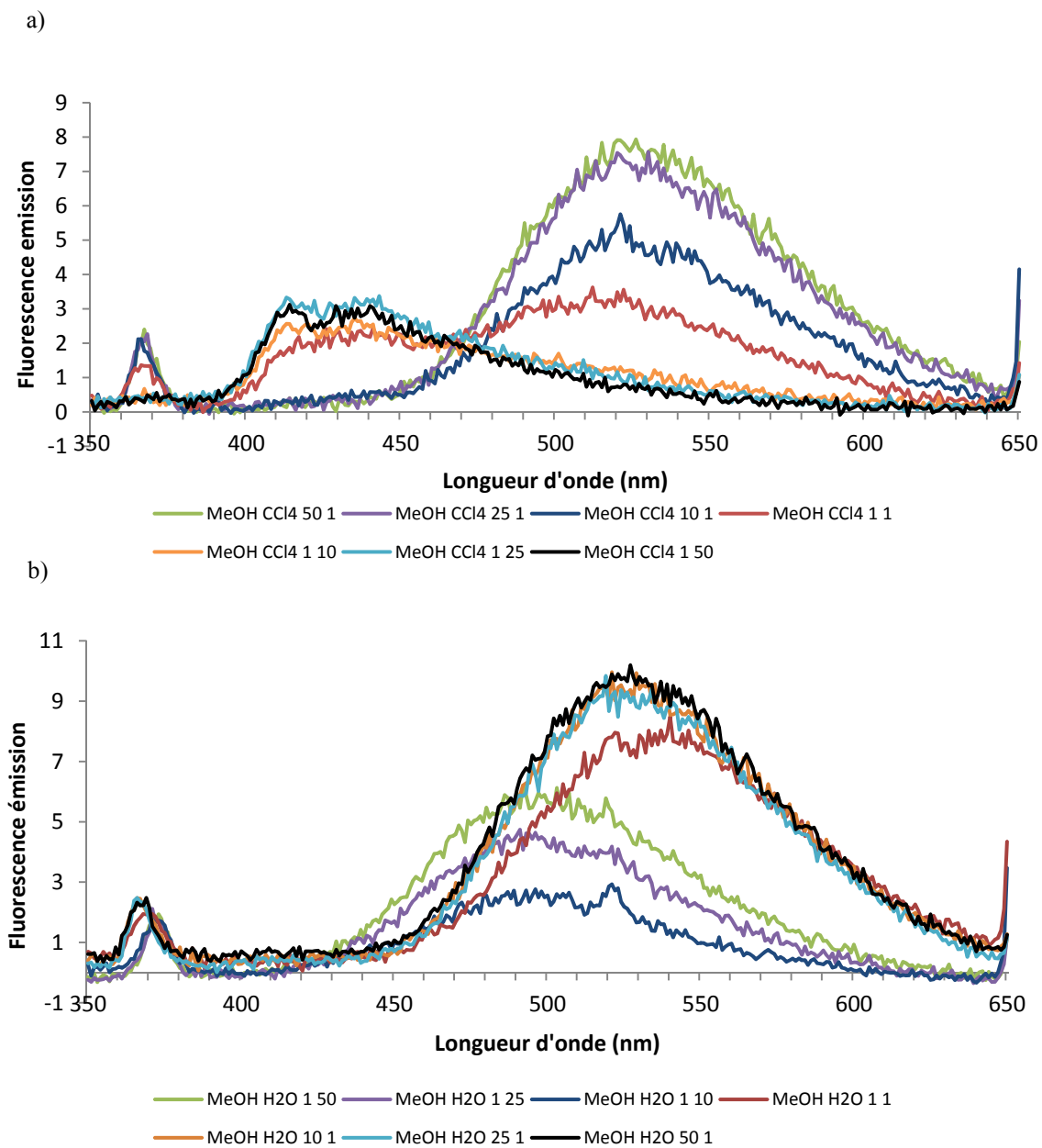


Figure 4.11. Spectres d'émission d'une solution du rotaxane parapluie fluorescent **3.38** dans différents mélanges a) MeOH/CCl₄ et b) MeOH/H₂O (50/1, 10/1, 1/1, 1/10 et 1/50) à 2 μM. Excitation à 330 nm.

Ces observations nous ont permis de déduire les changements de conformations subis par le rotaxane parapluie. Dans un premier temps, dans les mélanges MeOH/CCl₄,

l'effet bathochromique associé à l'augmentation de polarité du milieu est clairement visible, impliquant que le fluorophore subit directement la variation de polarité du solvant. Le même phénomène étant observé pour la roue seule, on peut déduire que le dansyle, et donc la roue, est exposé au milieu. Le rotaxane adopterait donc une conformation partiellement ou complètement exposée. Dans un second temps, lorsqu'on continue à augmenter la polarité du milieu par des mélanges MeOH/H₂O, l'effet bathochromique est observé seulement jusqu'à un certain point, puis un large effet hypsochromique est visible. Ceci signifierait un changement de polarité de l'environnement autour du dansyle alors que la polarité du solvant augmente (Figure 4.12). Le dansyle subirait dans un premier temps le milieu, devenant de plus en plus polaire (conformation exposée), puis le repliement du parapluie, rapprochant les faces hydrophobes du parapluie de la roue, créerait un espace hydrophobe autour de la roue. Un phénomène similaire avait été observé par Regen *et al.* pour leur parapluie moléculaire.⁶²

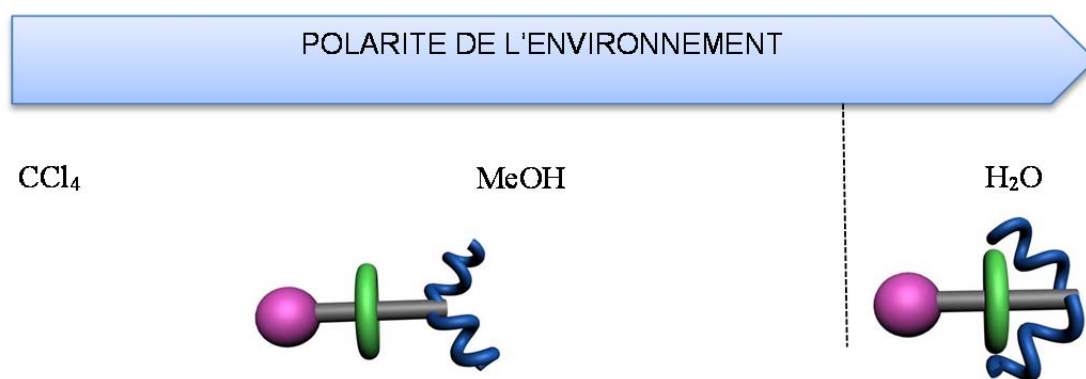


Figure 4.12. Conformation favorisée selon la polarité du milieu.

4.4. Conclusion

Les études RMN n'ont pas permis d'observer un repliement du parapluie. La variation de polarité des solvants choisis pourrait être insuffisante pour induire le repliement du parapluie. Il se peut aussi que, malgré un changement de conformation, le parapluie resterait toujours trop éloigné de l'axe (dans le cas de l'axe parapluie) ou de la roue (pour le rotaxane) pour être visible par cette méthode. Par contre, l'étude par

fluorimétrie du rotaxane parapluie fluorescent **3.38** a permis d'observer le changement de conformations. Le rotaxane parapluie fluorescent adopterait une conformation exposée ou semi-exposée dans un milieu relativement hydrophobe. Mais en augmentant la polarité du milieu (plus de 50% d'eau dans du méthanol), la conformation s'inverse (Figure 4.12). Cette observation est contraire à notre hypothèse, qui considèrerait la roue comme plus hydrophile. Finalement celle-ci préfèrerait rester dans un milieu hydrophobe lorsque complexée sur l'axe. Cependant, cette approche ne pourrait être vraie que pour la roue dansylée, le fluorophore de taille non négligeable pouvant jouer sur l'hydrophobie de la roue.

Chapitre 5 Étude du transport de chlorures

5.1. Méthodes

Afin d'étudier les propriétés de transport de nos axes parapluie, des études de transport d'ions chlorure ont été effectuées. L'efficacité du transporteur est déterminée par la cinétique du transport.

5.1.1. Liposome : modèle de membrane cellulaire

Afin de modéliser la membrane cellulaire et simplifier l'étude du transport transmembranaire, les liposomes sont couramment utilisés.¹⁶² Ces entités sont des vésicules formées d'une bicouche phospholipidique. Les phospholipides, comprenant une tête hydrophile et une ou plusieurs queues hydrophobes, s'organisent dans les milieux aqueux afin de minimiser le contact des parties hydrophobes avec l'eau. L'utilisation de phospholipides ayant deux chaînes hydrophobes favorise la formation de vésicules (ou liposomes) par rapport à celle de micelles (Figure 5.1).¹⁶³ Ainsi, les queues hydrophobes interagissent entre elles tandis que les têtes hydrophiles font face au milieu aqueux aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de la vésicule.

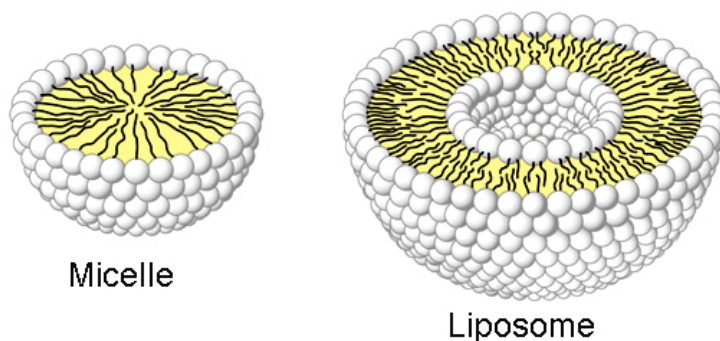


Figure 5.1. Représentation schématique d'organisations sphériques de phospholipides.

Plusieurs types de phospholipides peuvent être utilisés pour la formation de liposomes, dépendamment de leur température de transition, longueur de chaîne ou charge.^{164, 165, 49} Tout un panel est disponible commercialement. De plus, l'association de

plusieurs phospholipides ou l'ajout d'additif (cholestérol) peut faire varier les propriétés de la bicouche.^{166, 167}

Dans notre cas, seule la *L-α*-phosphatidylcholine issue du jaune d'œuf a été utilisée pour la formation de liposomes dans le cadre de l'étude de transport de chlorures. Ce phospholipide neutre est le constituant principal des membranes cellulaires. La préparation des liposomes se fait par hydratation d'un film de phospholipides aboutissant à des liposomes multilamellaires (MLV Multilamellar Vesicles). Puis, plusieurs traitements physiques sont nécessaires pour obtenir des liposomes unilamellaires de taille homogène (SUV Small Unilamellar Vesicles lorsque leur diamètre est inférieur à 100 nm sinon LUV Large Unilamellar Vesicles) (Figure 5.2).¹⁶² Les méthodes utilisées seront décrites plus en détails dans la partie expérimentale.

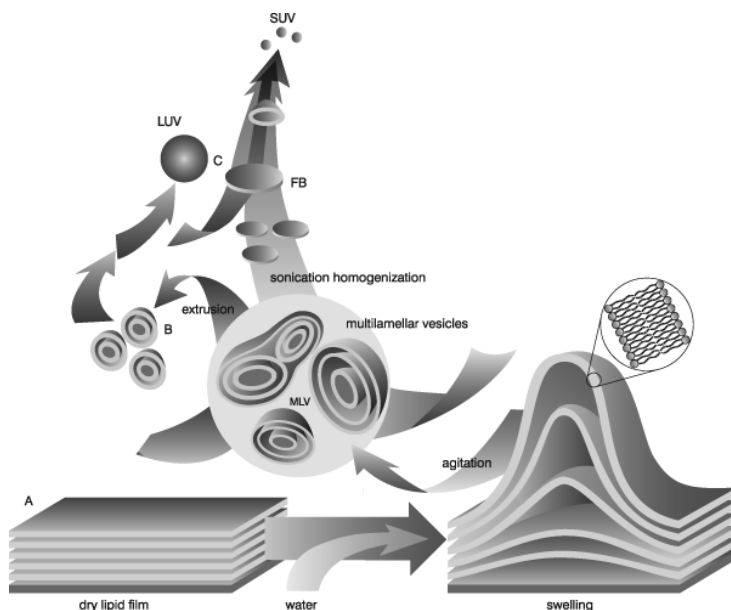


Figure 5.2. Formation de liposomes.¹⁶⁸

5.1.2. Détection des ions chlorure

Dans la majorité des expériences présentées dans la littérature, les ions chlorure sont incorporés à l'intérieur des liposomes lors de leur préparation et leur flux vers l'extérieur est mesuré. Plusieurs méthodes sont couramment utilisées afin de visualiser aisément l'efflux d'ions à travers une bicouche phospholipidique¹⁶⁹ :

- Voltamétrie avec une électrode sélective du chlorure^{164, 170, 171}
- RMN ³⁵Cl^{164, 170}
- Marqueur fluorescent : HPTS (8 - hydroxypyrrène - 1,3,6 - trisulfonate de trisodium),^{172, 22} SPQ (6-méthoxy-*N*-(3-sulfopropyl)quinolinium,^{173, 174, 175} lucigénine.^{22, 176}

Parmi les plus utilisées se trouvent les méthodes fluorimétriques. Elles impliquent des fluorophores sensibles aux chlorures. En effet, les ions chlorure ou plus généralement les ions halogénure, sont capables de quencher leur fluorescence.¹⁷⁷ Ce phénomène peut être dû à différents évènements selon le fluorophore.¹⁷⁸ Ces méthodes indiquent donc la présence et concentration de chlorures en continu et en temps réel (phénomène de quench rapide < 1 ms).¹⁷³

Nous avons choisi la lucigénine, commercialement disponible, comme indicateur de la quantité d'ions chlorure. Elle présente une très grande sensibilité pour les chlorures¹⁷⁸ et aucune pour les phosphates ou nitrates.¹⁷⁹ Dans ce cas, le quench de la fluorescence se fait par un transfert de charge.¹⁸⁰ Après absorption d'un photon, la lucigénine se retrouve dans un état excité, avec un électron qui se retrouve dans une orbitale de plus haute énergie (Figure 5.3.A). Le chlorure va alors profiter de la lacune laissée par cet électron (Figure 5.3.B). Par la suite, l'électron excité retourne à la lacune créée sur l'orbitale du Cl⁻ (Figure 5.3.C).

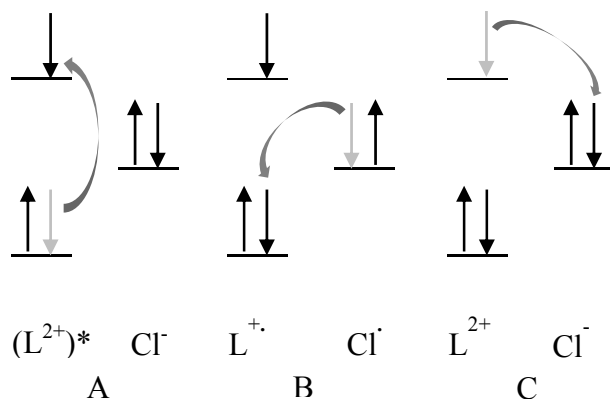


Figure 5.3. Diagramme des niveaux d'énergie. A) Après excitation de la lucigénine. B) Lors de la formation du complexe de transfert de charge. C) Au retour à l'état fondamental.

5.1.3. Méthodes utilisées

Des liposomes ont été préparés à partir de *L*- α -phosphatidylcholine avec une solution de lucigénine et NaCl dans un tampon phosphate. La lucigénine extravésiculaire a été ôtée par chromatographie d'exclusion stérique. Cette suspension de liposomes a alors été mise en présence d'une solution extravésiculaire d'un autre anion (NO_3^- , SO_4^{2-} ou HCO_3^-) dans le tampon phosphate (Figure 5.4).

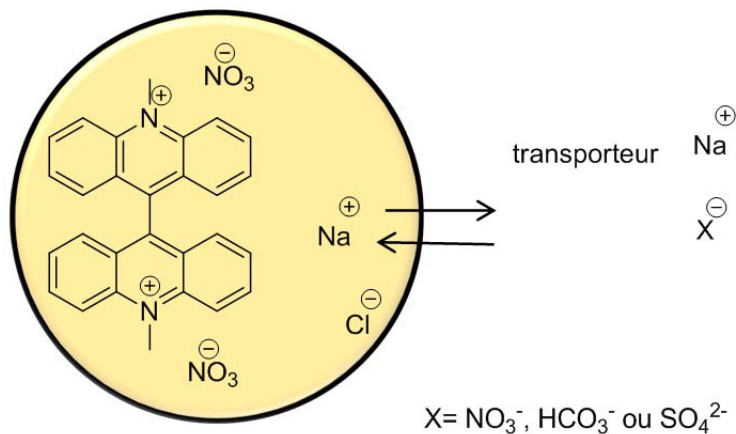


Figure 5.4. Schéma des tests de transport avec la lucigénine. Excitation à 369 nm, émission à 503 nm.

La présence des ions chlorure à l'intérieur des liposomes désactive en partie l'émission de fluorescence de la lucigénine, ceci expliquant le fait que l'intensité de fluorescence des liposomes seuls ne soit pas nulle (Figure 5.5.A). Cependant, si un transporteur d'anion est ajouté et que les chlorures peuvent sortir librement des liposomes, leur concentration intravésiculaire diminue. L'intensité de fluorescence de la lucigénine subit alors une augmentation plus ou moins rapide jusqu'à atteindre un plateau (Figure 5.5.B). Cette courbe indique alors la vitesse de transport du transporteur.

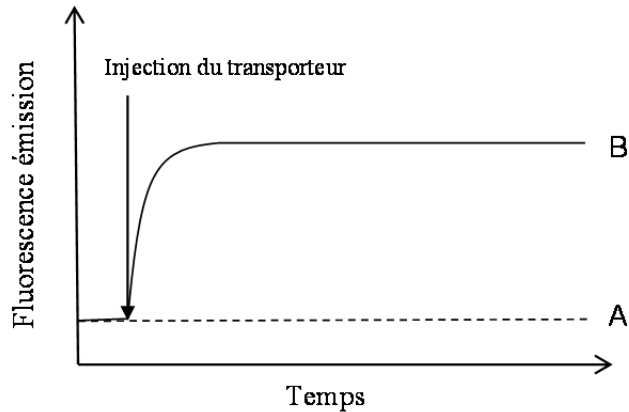


Figure 5.5. Suivi par fluorescence A) en l'absence de transporteur et B) en présence de transporteur.

Cette méthode reste l'une des plus utilisées. Cependant elle pourrait ne pas laisser entrevoir certains phénomènes tels que le quench de la lucigénine par le transporteur ou la destruction des liposomes. Des tests utilisant un autre marqueur fluorescent, la HPTS, ont également été faits. Cette dernière ne détecte pas les ions chlorure, mais détecte leur transport de façon indirecte. En effet, la HPTS, de $pK_a \sim 7,3$, a une forme protonnée et une forme déprotonnée (Figure 5.6) qui sont excitées à différentes longueurs d'onde, respectivement 403 et 460 nm, mais qui émettent toutes deux à 510 nm.¹⁶⁹ En mesurant en simultané les deux intensités de fluorescence et en faisant le ratio entre la forme déprotonnée et la forme protonnée I_0/I_1 , on peut suivre la variation de concentration de H^+ et donc celle des ions Cl^- .

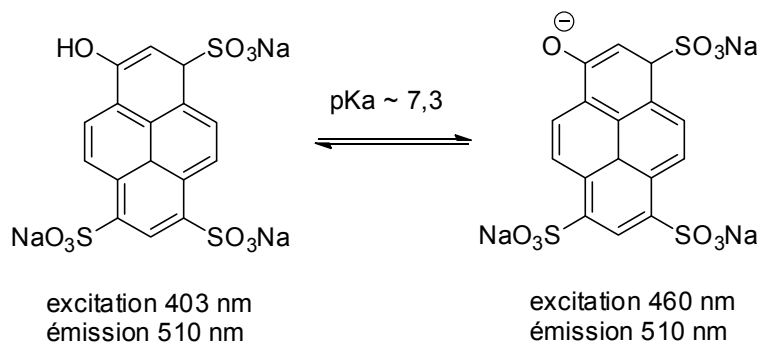


Figure 5.6. HPTS : forme protonnée et déprotonnée.

5.2. Cinétique de transport de chlorures

5.2.1. Axes parapluie

Tout un panel de molécules a été testé pour leurs propriétés de transport de Cl^- à l'aide des essais à la lucigénine (Figure 5.7). Toutes les molécules testées n'ont montré aucune influence sur la fluorescence de la lucigénine.

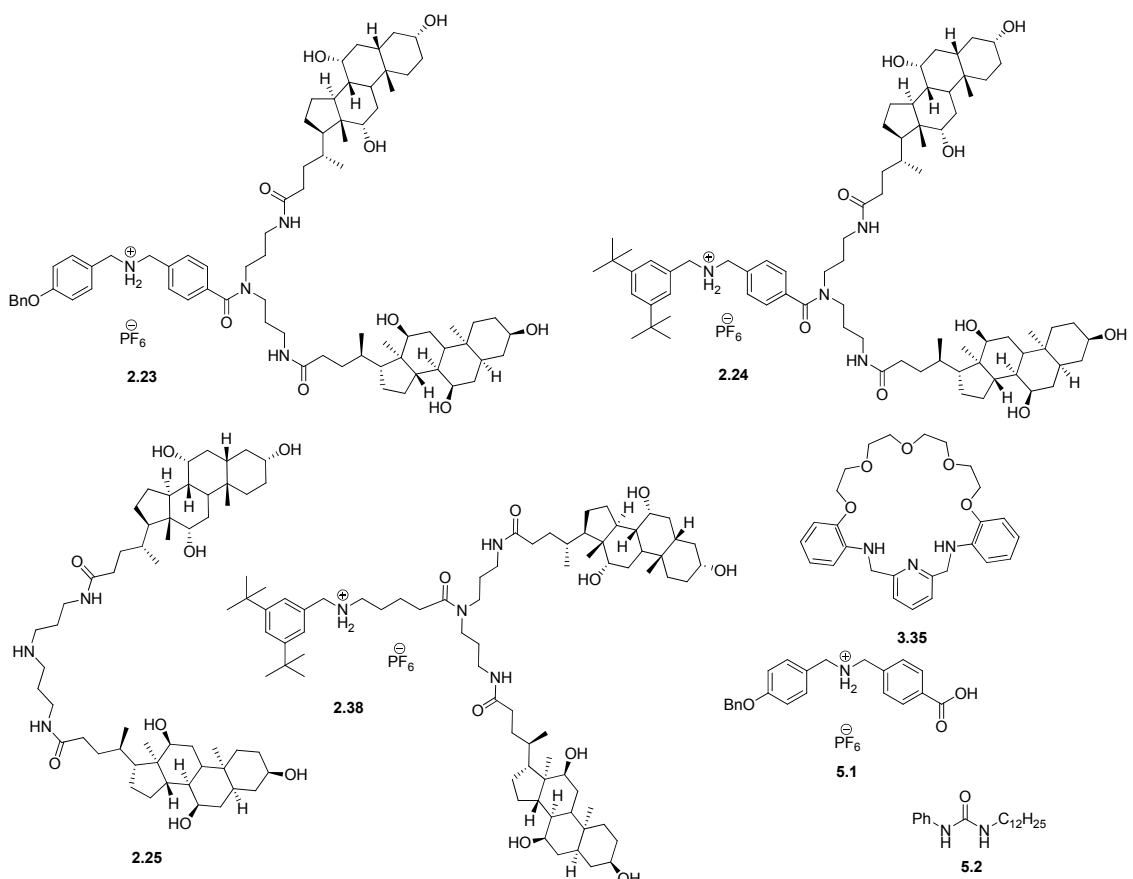


Figure 5.7. Molécules testées dans les études de transport.¹¹⁶

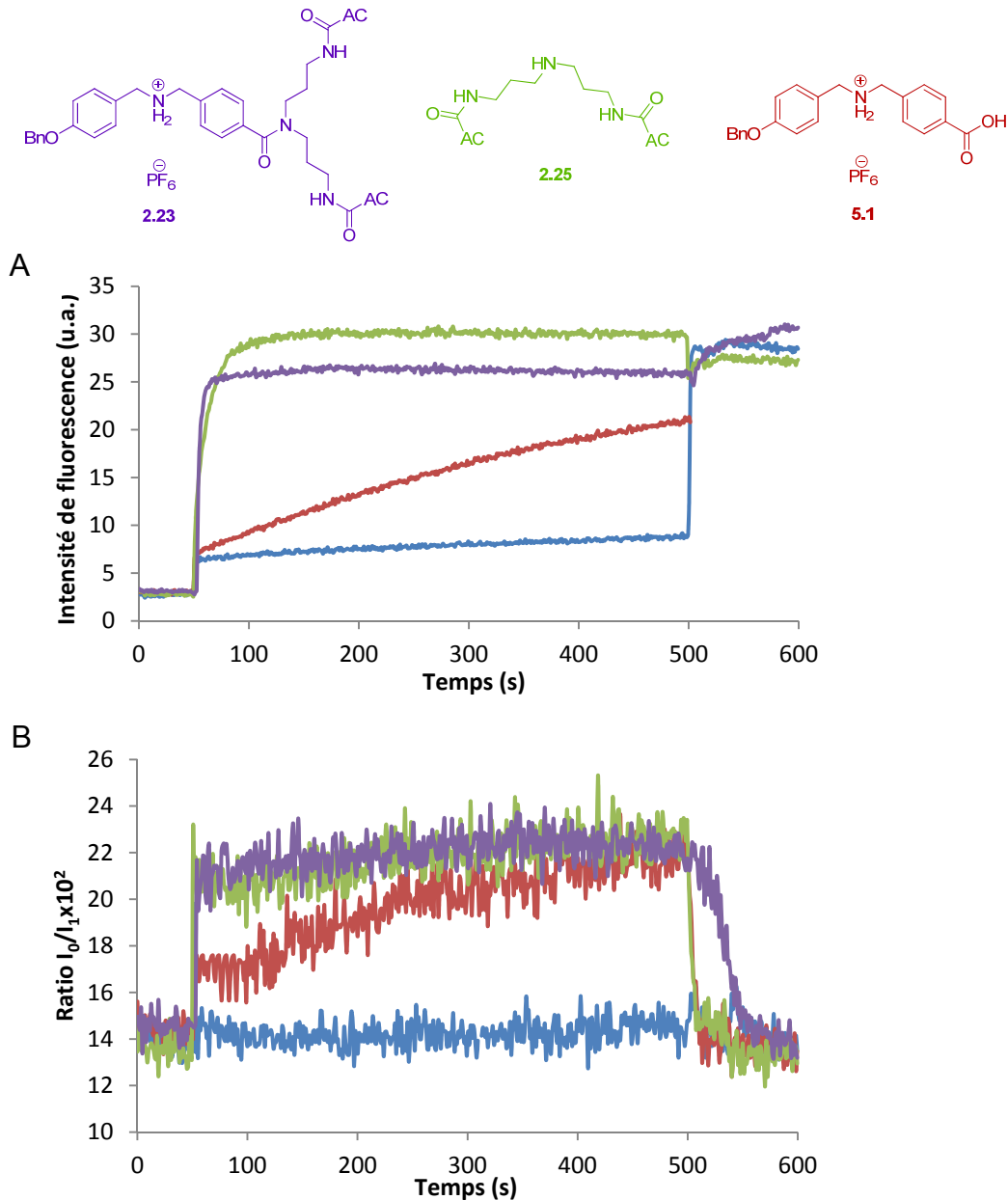


Figure 5.8. Tests de transports avec des liposomes d' α -phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de A) lucigénine 2 mM, NaCl 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4) ou B) HPTS 0,1 mM, NaCl 100mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). La solution extravésiculaire est composée de NaNO₃ à 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). L'injection d'une solution de transporteur 0,1 mM dans du MeOH a lieu à 50 s et une solution Triton X-100 10% est ajoutée à 500 s pour lyser les vésicules. La courbe bleue représente le blanc.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'axe parapluie **2.23**, qui a montré un transport efficace et rapide, le plateau étant atteint rapidement (Figure 5.8.A). En testant les fragments de **2.23**, l'axe **5.1**¹¹⁶ et le parapluie **2.25**, on a voulu voir quelle partie de l'axe **2.23** jouait un rôle important pour le transport de Cl⁻. Le fragment **5.1**, qui représente la partie rigide contenant le site ammonium, a montré un transport, certes plus faible et moins rapide mais non négligeable, tandis que le parapluie **2.25** a affiché une courbe encore plus abrupte, et un plateau plus haut. Le parapluie est donc le principal fragment responsable pour le transport. Néanmoins, dans ce dernier essai, une baisse de fluorescence a été observée lors de l'ajout du Triton X-100 (tensio-actif détruisant les vésicules), indiquant une déstabilisation de la membrane par le parapluie **2.25**. L'équilibre obtenu par la combinaison de l'axe **5.1** et le parapluie **2.25** permet donc d'obtenir un bon transporteur sans perturber la membrane. Étant donné que le maximum atteint pour l'axe parapluie **2.23** était relativement proche de la fluorescence mesurée après lyse des liposomes, les mêmes composés ont aussi été testés avec des liposomes renfermant de la HPTS (Figure 5.8.B). Cette méthode ratiométrique permet de voir plus clairement s'il y a eu destruction des liposomes en présence des différents transporteurs. Les trois molécules ont toutes montré un transport de Cl⁻, et le retour à la ligne de base après l'injection de Triton X-100 a été observé, prouvant que notre axe parapluie **2.23** provoque bien un transport de Cl⁻ et non la lyse des vésicules.¹¹⁶

Les essais avec la HPTS ont montré une variation du pH liée au transport des chlorures, ce qui laisse présumer un co-transport de H⁺. Dans le but de déterminer le mécanisme de co-transport (symport ou antiport), des tests de transport de l'axe parapluie **2.23** ont été faits en présence de différents anions en solution extravésiculaire (Figure 5.9.A). Ces différents anions présentent différentes hydrophobies suivant la série d'Hofmeister (NO₃⁻ > HCO₃⁻ > SO₄²⁻).¹⁸¹ Les courbes obtenues sont similaires. Les trois courbes ont montré des transports semblables pour les trois différents anions (Figure 5.9).

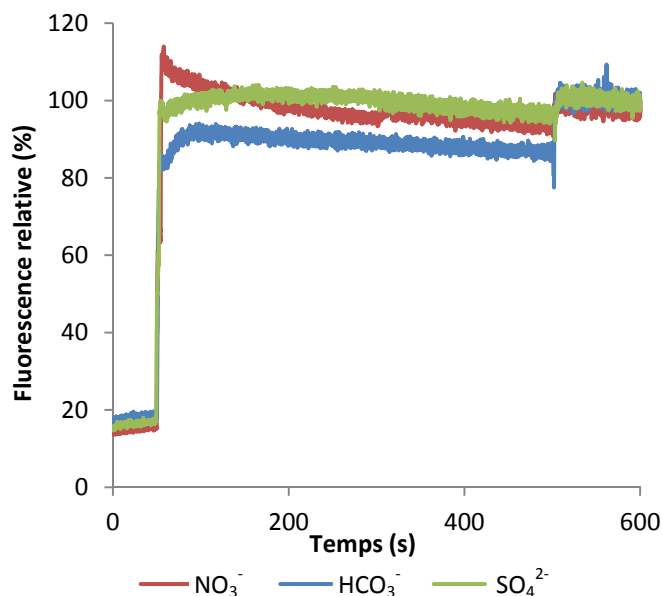


Figure 5.9. Tests de transports avec des liposomes d' α -phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de lucigénine 2 mM, NaCl 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). La solution extravésiculaire est composée de NaNO₃, NaHCO₃ ou Na₂SO₄ à 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). L'injection d'une solution d'axe parapluie **2.23** 0,1 mM dans du MeOH a lieu à 50 s et une injection de Triton X-100 est effectuée à 500 s.

Les ions sulfate, les plus hydrophiles avec leur double charge, ne sont pas capables de traverser une bicouche phospholipidique. Ceci signifie donc que les anions extravésiculaires ne jouent aucun rôle dans le processus, il s'agit donc d'un mécanisme de symport.

Les propriétés de transporteur de Cl⁻ des autres axes parapluie synthétisés ont aussi été étudiées et comparées avec la *N*-dodécyl-*N'*-nitrophényl urée **5.2** (Figure 5.10) décrite dans la littérature comme étant un bon transporteur.¹⁸² Un transport de Cl⁻ relativement similaire a été observé pour les trois axes parapluie. Nous pouvons remarquer que l'augmentation de l'intensité de fluorescence de la lucigénine est plus importante pour les axes parapluie **2.23**, **2.24** et **2.38**, indiquant un transport de Cl⁻ plus efficace que dans le cas de **5.2**. De même, l'allure des courbes indique des cinétiques différentes. Elle indique à la

fois les propriétés de transport de chlorures (intensité de fluorescence) et la vitesse à laquelle le processus de transport se met en place (courbure de la courbe) afin d'obtenir le palier de transport.

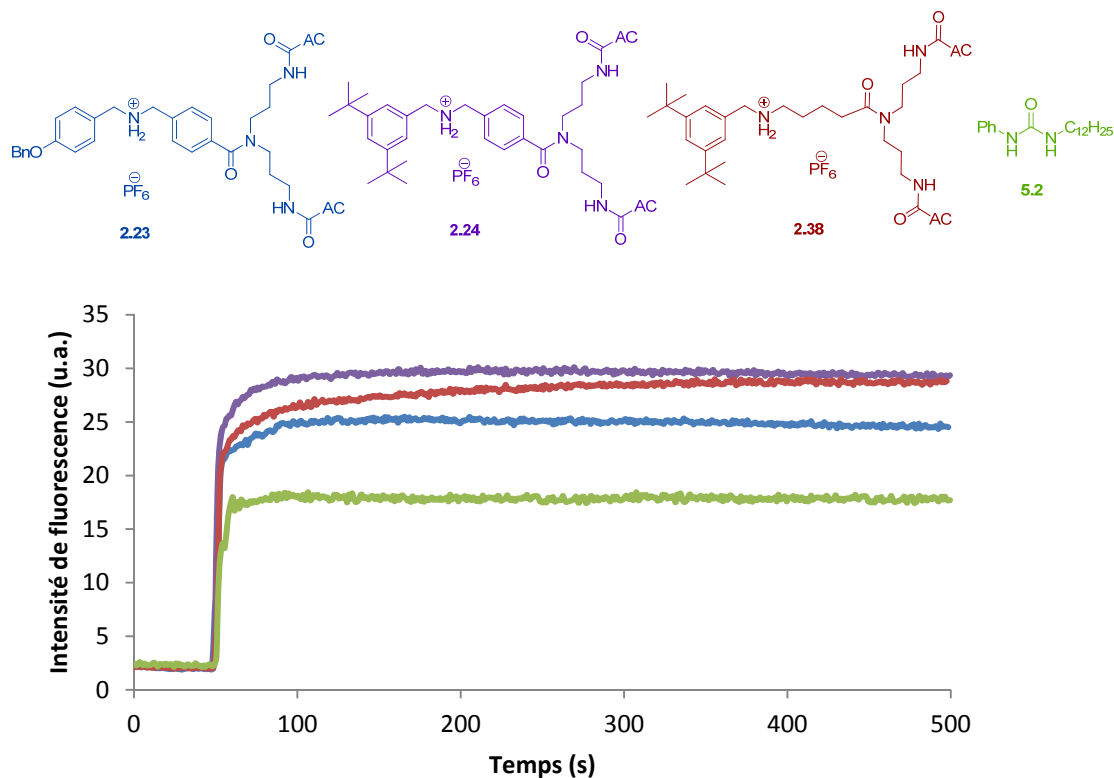


Figure 5.10. Tests de transports avec des liposomes d' α -phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de lucigénine 2 mM, NaCl 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). La solution extravésiculaire est composée de NaNO₃ à 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). L'injection d'une solution de transporteur 0,1 mM dans du MeOH a lieu à 50 s.

Comme illustré dans la Figure 5.10, la présence des deux groupements *tert*-butyles sur les axes **2.24** et **2.38** conduit à un transport plus lent de Cl⁻ sur les premières secondes du processus. Le pallier est atteint sur une plus longue période de temps, ceci montre une certaine influence de ces groupements encombrants sur le mécanisme de transport.

Afin d'étudier les propriétés de transport des pseudo-rotaxanes et rotaxanes parapluie, et surtout l'influence de la présence d'une roue complexant le site ammonium,

nous nous sommes intéressés aux systèmes plus complexes qui peuvent être assemblés avec ces axes parapluie.

5.2.2. Pseudo-rotaxane parapluie et rotaxanes parapluie

Les axes parapluie étant donc de bons transporteurs de chlorures, nous avons voulu voir, par la suite, si la complexation d'une roue sur l'axe impliquerait des changements de leurs propriétés de transport de chlorures. Seul l'axe parapluie **2.23**, non bloqué, permettant l'enfilement d'une roue **3.35** lors de la formation d'un pseudo-rotaxane, a été étudié (Figure 5.11).

Dans un premier temps, il est à noter que la roue **3.35** seule est aussi capable de lentement transporter des Cl^- . Sa structure permet la formation de ponts hydrogène entre les $-\text{NH}$ et les ions chlorure. De plus, la Figure 5.11.B (courbe rouge) montre que son comportement est différent de celui des axes ou rotaxane parapluie : deux changements de pH ont lieu et l'augmentation du ratio des intensités de fluorescence est suivie par une diminution. Ce phénomène peut être interprété comme un retour des protons vers l'intérieur des liposomes après le premier transport, la roue étant donc capable de facilement retraverser la bicouche en transportant H^+/Cl^- .¹¹⁶

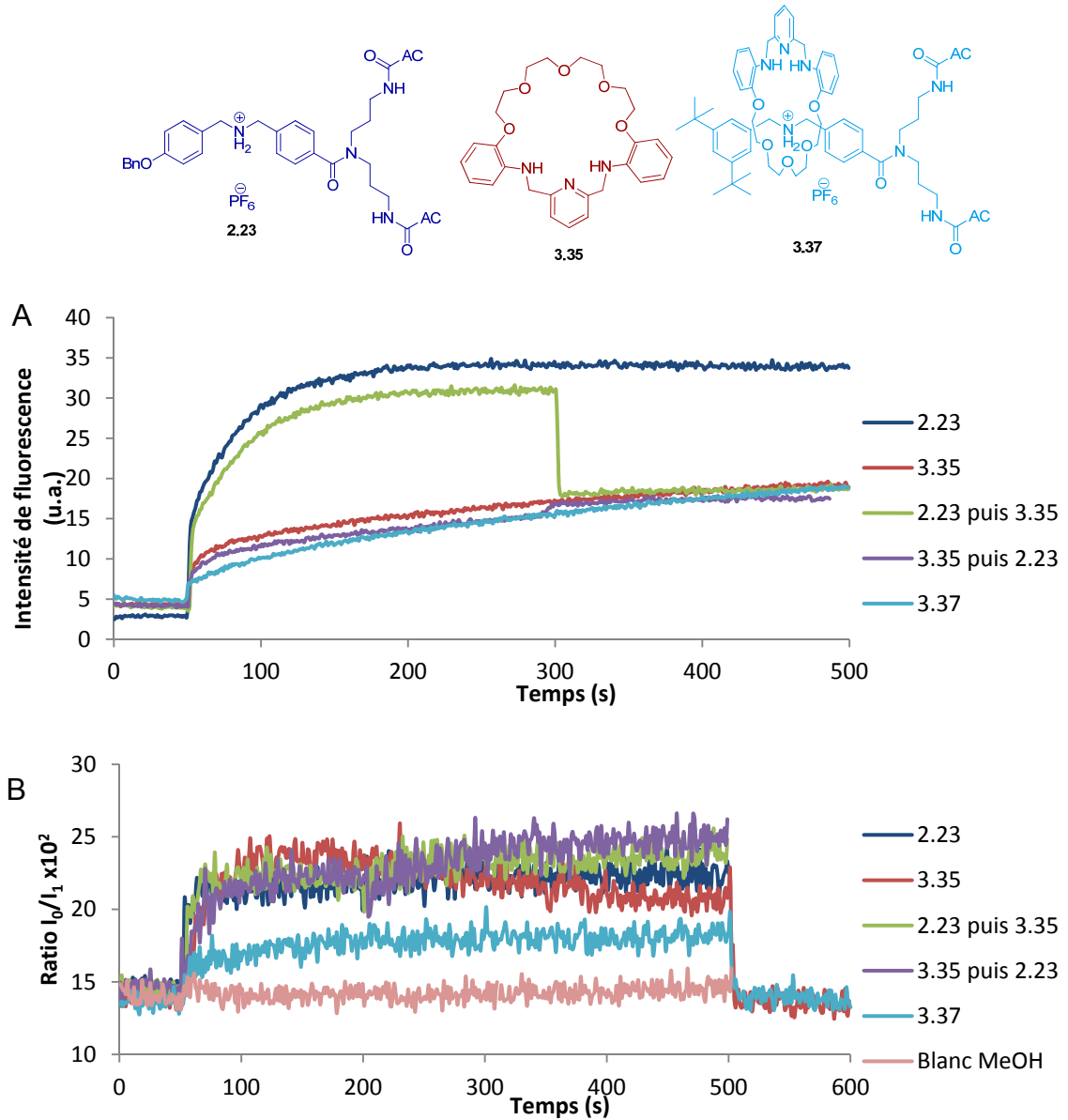


Figure 5.11. Tests de transports avec des liposomes d' α -phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de A) lucigénine 2 mM, NaCl 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4) ou B) HPTS 0,1 mM, NaCl 100mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). La solution extravésiculaire est composée de NaNO_3 à 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). L'injection d'une solution de transporteur 0,1 mM dans du MeOH a lieu à 50 s et, s'il y a lieu, l'ajout de la deuxième solution est faite à 300 s et 200 s pour la lucigénine et la HPTS respectivement. Une solution Triton X-100 10% est ajoutée à 500 s pour lyser les vésicules.

Par la suite, nous avons étudié le processus de transport lorsque la roue est ajoutée à l'axe parapluie **2.23**, lors de la formation du pseudo-rotaxane parapluie, comme démontrée dans le Chapitre 3. Tout d'abord, l'axe parapluie **2.23** est injecté et le même transport de Cl^- est observé que précédemment. Lorsque la roue **3.35** est ajoutée, ceci provoque une chute de l'intensité de fluorescence (Figure 5.11.A courbe verte). Le composé **3.35** n'ayant aucune influence sur la fluorescence de la lucigénine, ce phénomène implique donc un retour des Cl^- à l'intérieur des vésicules. En effet, la roue seule peut transporter facilement H^+/Cl^- avant d'aller complexer l'axe et former le pseudo-rotaxane. Le transport de Cl^- observé est probablement dû au transport du pseudo-rotaxane. En ajoutant les deux composés dans l'ordre inverse (Figure 5.11.A courbe violette), le même niveau de fluorescence a été atteint. Le transport du pseudo-rotaxane reste inférieur à celui de l'axe parapluie seul. Le site ammonium, complexé par la roue **3.35**, est moins disponible pour la complexation d'ions Cl^- . Cependant, le transport peut avoir lieu grâce à la roue capable de complexer un Cl^- avec sa partie pyridinium. De plus, la courbe de fluorescence du pseudo-rotaxane reste similaire à celle de la roue, indiquant que le transport du pseudo-rotaxane est dû probablement à la présence de la roue **3.35** dans le système.

Pour s'assurer que le pseudo-rotaxane est bien l'espèce responsable du transport de Cl^- , le rotaxane parapluie **3.37** a été testé dans les mêmes conditions. Les deux étant semblables en structure, leur mode d'action devrait être similaire. Le rotaxane parapluie **3.37** montre des propriétés proches de celles du pseudo-rotaxane en tant que transporteur de Cl^- . Afin de déterminer de façon plus précise l'efficacité de transport, l' EC_{50} (concentration effective à laquelle la moitié de la réponse maximale est atteinte) a été déterminée aussi bien pour le rotaxane parapluie **3.37** que pour sa version fluorescente **3.39** (Figure 5.12). Les tests de transport ont été faits avec différentes concentrations de rotaxane et pour chaque courbe, la réponse à 200 s a été retenue. Pour les deux rotaxanes parapluie, une diminution d'intensité de fluorescence est à noter pour la concentration la plus élevée, expliquant l'allure des courbes dose-réponse. En effet, à ces concentrations, la solution est devenue opaque indiquant la limite de solubilité.

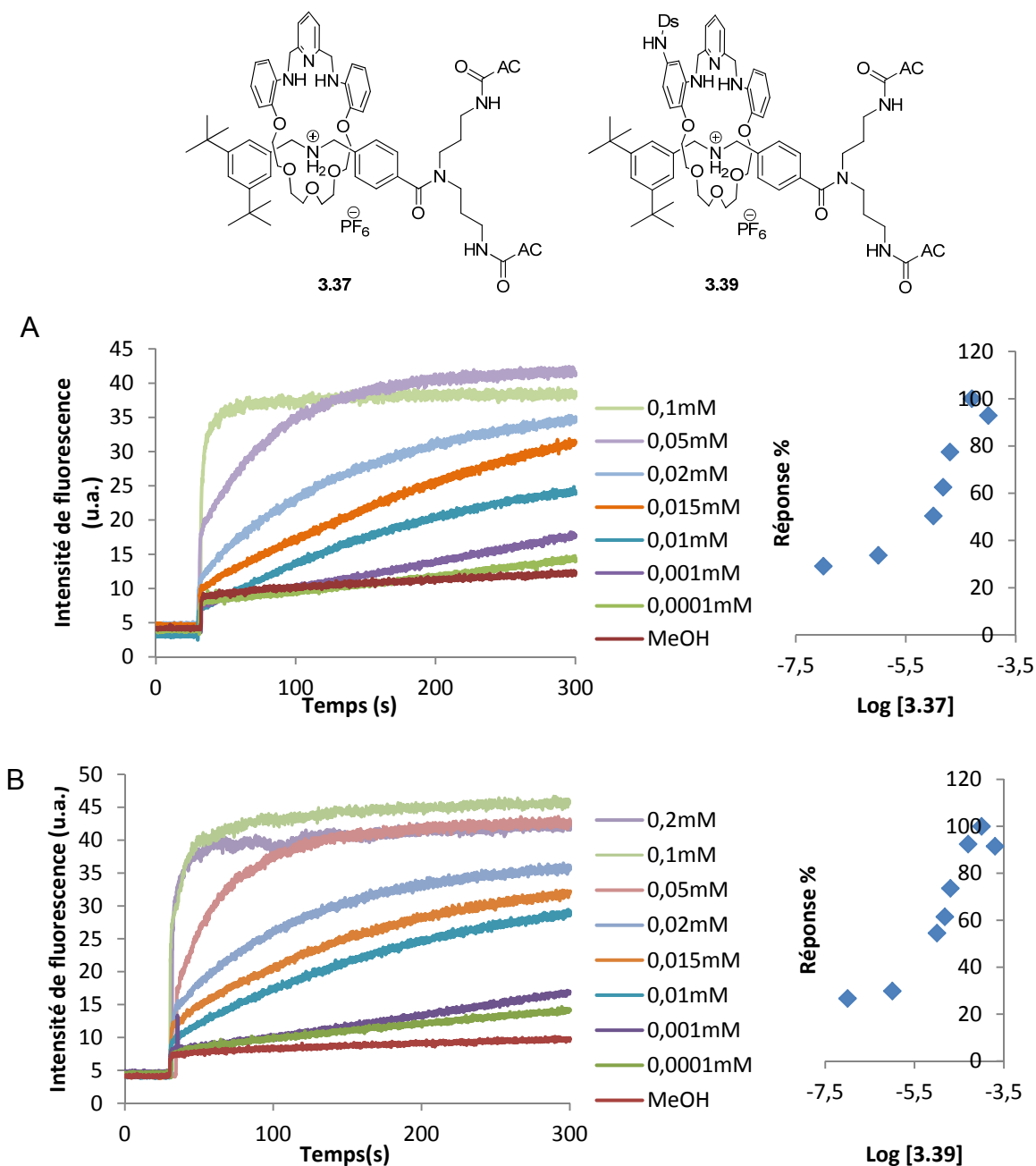


Figure 5.12. Tests de transports avec des liposomes d' α -phosphatidylcholine (EYPC) contenant une solution de lucigénine 2 mM, NaCl 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4) et courbes dose-réponse pour A) le rotaxane parapluie **3.37** et B) le rotaxane parapluie fluorescent **3.39**. La solution extravésiculaire est composée de NaNO₃ à 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). L'injection d'une solution de transporteur à différentes concentrations dans du MeOH a lieu à 30 s.

L' EC_{50} a été calculé à partir des courbes dose-réponse et a une valeur de $1,6 \times 10^{-5}$ M et $1,7 \times 10^{-5}$ M pour **3.37** et **3.39** respectivement. Ces valeurs de EC_{50} sont du même ordre de grandeur ce qui sous-entend des comportements comparables dans le processus de transport.

5.3. Mécanisme de transport

Les résultats décrits ci-dessous ont montré l'efficacité des axes parapluie comme symporteur et que les rotaxanes parapluie sont eux aussi capables de transporter des anions chlorure. La question qui se pose à présent est de savoir quel est le mécanisme du transport.

Dans le cas de l'axe parapluie **2.23**, la présence d'un site chargé positivement doit jouer un rôle non négligeable dans le processus, et les acides choliques du parapluie vont être ceux qui jouent le rôle le plus important pour l'insertion dans la membrane (comme observé précédemment Chapitre 5.2.1). Nous avons voulu mieux comprendre ce qui se passait en modélisant cet axe s'insérant dans une bicouche phospholipidique.

A cet effet, une dynamique moléculaire sur 200 ps a été réalisée en présence d'une bicouche lipidique. Dans un premier temps, l'axe parapluie a été modélisé seul dans une boîte d'eau par mécanique moléculaire, en utilisant le champ de force AMBER.¹⁸³ Cette conformation de minimum d'énergie a ensuite été optimisée par calcul semi-empirique (PM6)¹⁸⁴ dans l'eau. Elle a été utilisée comme point de départ de la dynamique moléculaire en présence de la bicouche lipidique. Le comportement de l'axe parapluie **2.23**, placé à l'extérieur de la bicouche lipidique au début de la dynamique, fut alors observé à différents temps de la simulation.

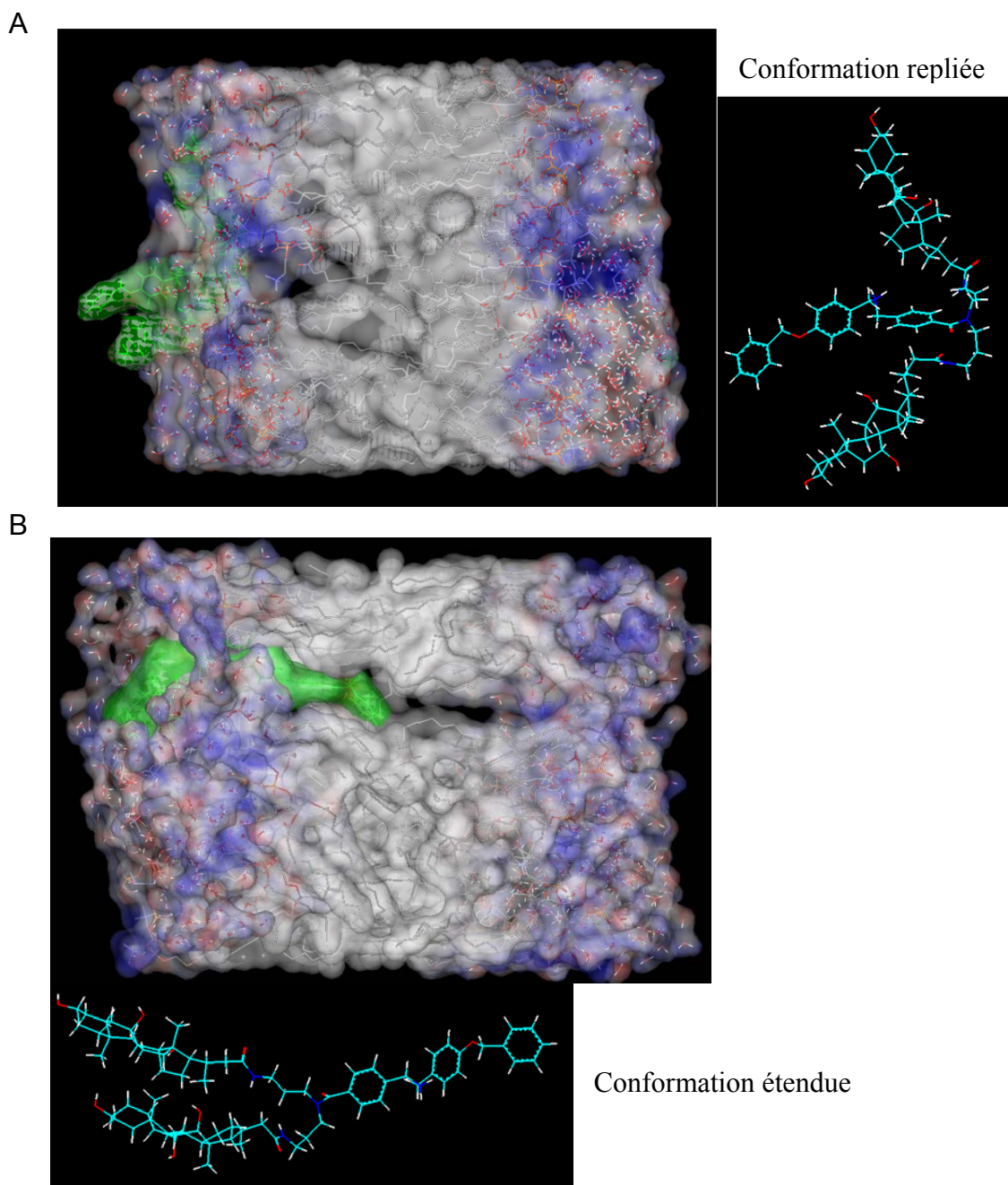


Figure 5.13. Modélisation moléculaire. Simulation par dynamique moléculaire de l'axe parapluie **2.23** dans une bicouche de phosphatidylcholines entourée de couches de 15 Å d'eau à A) 19 ps et B) 50 ps. Représentation en surface de Van der Waals selon l'hydrophilie. (gris = hydrophobe, bleu = hydrophile). Représentation en vert du composé **2.23** dans la bicouche et représentation en bâtonnets à côté pour des raisons de clarté.

À 19 ps, l'axe parapluie s'approche de la bicouche et s'adsorbe à sa surface (Figure 5.13.A). Sa conformation est plus fermée avec les faces hydrophiles des acides choliques faisant face aux têtes hydrophiles des phosphatidylcholines, et les faces hydrophobes du parapluie faisant face à l'axe (structure en bâtonnets Figure 5.13.A). À 50 ps, l'axe parapluie s'insère dans la bicouche mais, contrairement à nos attentes, la conformation se retrouve complètement exposée au lieu d'être complètement refermée (Figure 5.13.B). La charge positive du site ammonium ne devrait pas être complètement exposée dans l'intérieur hydrophobe de la membrane. Une organisation pouvant expliquer ce phénomène serait une aggrégation en milieu hydrophobe (Figure 5.14) favorisée par l'affinité des parties hydrophiles des acides choliques pour les surfaces externes de la bicouche et l'affinité des axes principalement hydrophobes pour l'intérieur de la bicouche. Ce type de dimère (Figure 5.14) a été obtenu par modélisation dans le vide lorsque l'énergie de deux molécules ensemble a été minimisée dans des conditions périodiques (PBC) en utilisant la méthode semi-empirique PM6. Cette hypothèse impliquerait un empilement π des deux axes pour créer comme une sorte de canal pouvant acheminer les Cl^- . Les ions chlorure passeraient donc entre les deux faces hydrophiles du parapluie, interagissant avec les groupements -OH avant de traverser entre les deux axes et finalement, passer à nouveaux entre les deux acides choliques pour ressortir une fois de l'autre côté. Ce processus serait assez similaire à celui proposé par Kobuke *et al.*,¹⁸⁵ impliquant la formation de canaux transmembranaires qui permettent le passage des Cl^- .

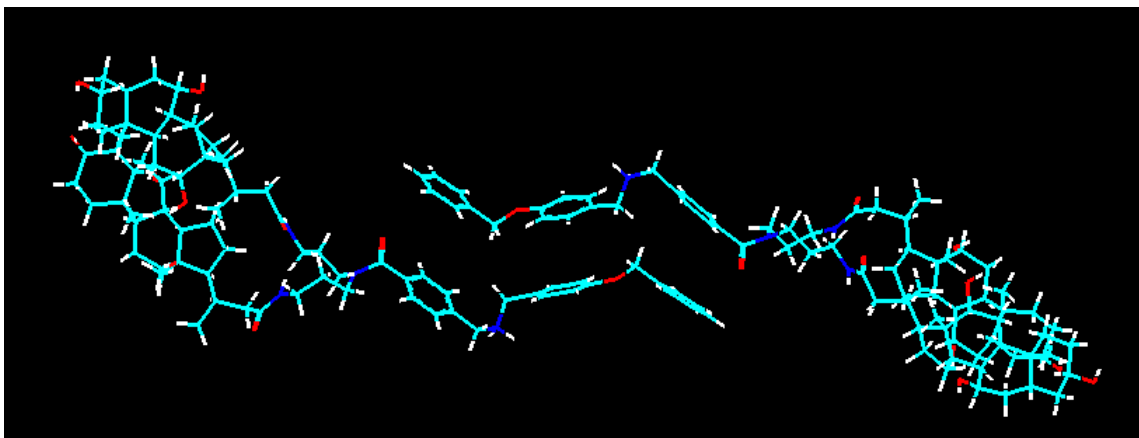


Figure 5.14. Modélisation moléculaire. Auto-assemblage de l'axe parapluie **2.23** dans le vide par calcul PM6/SCF-MO dans des conditions périodiques.

Cette hypothèse concorderait avec les cinétiques de transport plus lentes observées pour les axes parapluie avec deux groupements *tert*-butyles (**2.24** et **2.38**) (Figure 5.10 courbes rouge et violette). En effet, si ce type d'agrégats est également l'espèce active responsable du transport de Cl⁻ pour ces deux axes parapluies, il est concevable que l'auto-organisation dans la bicouche soit plus difficile avec des groupements plus encombrants.

En ce qui concerne le pseudo-rotaxane, le mécanisme de transport devrait différer de celui de l'axe parapluie. Le site ammonium n'est plus disponible pour le transport de chlorures et l'empilement π est gêné par la roue. Étant donné leurs similitudes de structure, le rotaxane parapluie **3.37** devrait avoir le même procédé de transport que le pseudo-rotaxane, ce qui est appuyé par l'allure identique de leur courbe de transport de chlorures (Figure 5.11.A).

Cependant, rien n'indique s'il s'agit d'un assemblage dans la bicouche ou d'un transporteur mobile. Afin d'obtenir plus d'indices sur le mode de transport, les interactions entre le rotaxane parapluie fluorescent **3.39** et des liposomes de *L*- α -phosphatidylcholine ont été étudiées par fluorescence en fonction du temps. Aucune variation dans le temps n'a permis de constater le passage d'un milieu hydrophile à hydrophobe puis à nouveau hydrophile, c'est-à-dire la traversée de la bicouche.

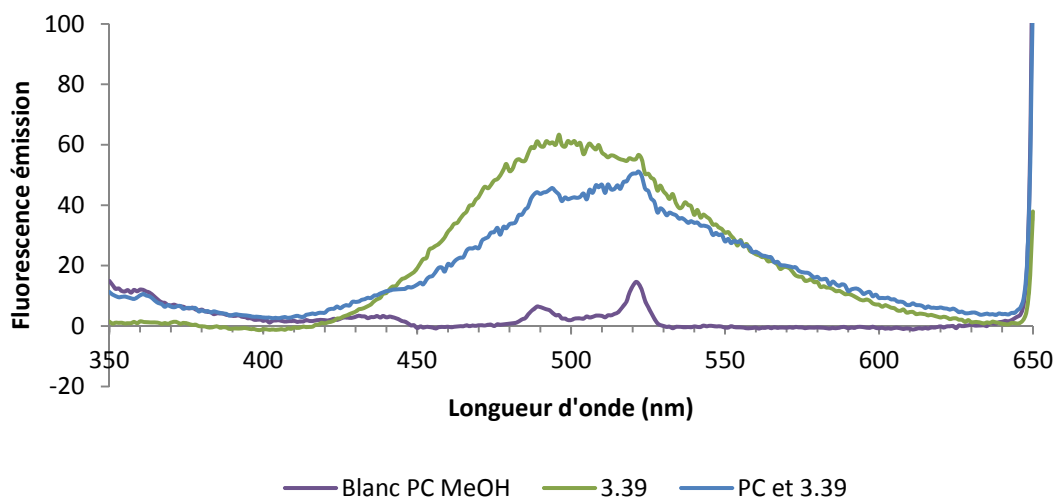


Figure 5.15. Spectres d'émission du rotaxane parapluie fluorescent **3.39** (250 μ L d'une solution 0,1 mM dans MeOH) dans 1 mL d'une solution tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4) et NaNO_3 100 mM en présence et en absence de liposomes (10 μ L EYPC contenant une solution de tampon phosphate 10 mM et NaCl 100 mM).

Par contre, un effet bathochromique fut à noter lorsque la solution de rotaxane a été mise en présence de liposomes (Figure 5.15). Ceci indique un changement de polarité de l'environnement du fluorophore. En l'absence de liposomes, le λ_{max} à 500 nm est similaire à celui observé précédemment (Chapitre 4.3). Il avait été déduit que dans de telles conditions, en solution majoritairement aqueuse, le rotaxane parapluie favorisait une conformation fermée. En présence de liposomes, le λ_{max} passe à 510 nm. Cette variation peut indiquer une ouverture du parapluie provoquée par formation de liens hydrogène des faces hydrophiles des acides choliques sur la surface hydrophile de la bicouche. Ainsi, la roue se retrouverait exposée vers le solvant (Figure 5.16.A). Cette conformation et localisation du rotaxane parapluie **3.39** coïnciderait avec les études de Regen *et al.*, où leurs parapluies moléculaires favorisaient une conformation ouverte et une position en surface de la bicouche lipidique (Figure 1.22.A).⁷⁵ Une autre hypothèse serait de considérer le rotaxane parapluie inséré dans la bicouche. Plus tôt, il a été démontré que le rotaxane parapluie fluorescent **3.39** préférait une conformation exposée en milieu hydrophobe (Chapitre 4.3), ce qui correspond à l'intérieur d'une bicouche. Or, le groupement dansyle a

un comportement similaire à celui dans un environnement plus polaire. Donc la seule possibilité d'avoir une conformation exposée à l'intérieur de la membrane, tout en exposant la roue à un milieu hydrophile serait d'avoir une conformation complètement exposée avec la roue au niveau des têtes polaires des phospholipides. Dans ce cas, les faces hydrophiles du parapluie devraient faire face l'une à l'autre de façon intra- ou intermoléculaire (Figure 5.16.B et C).

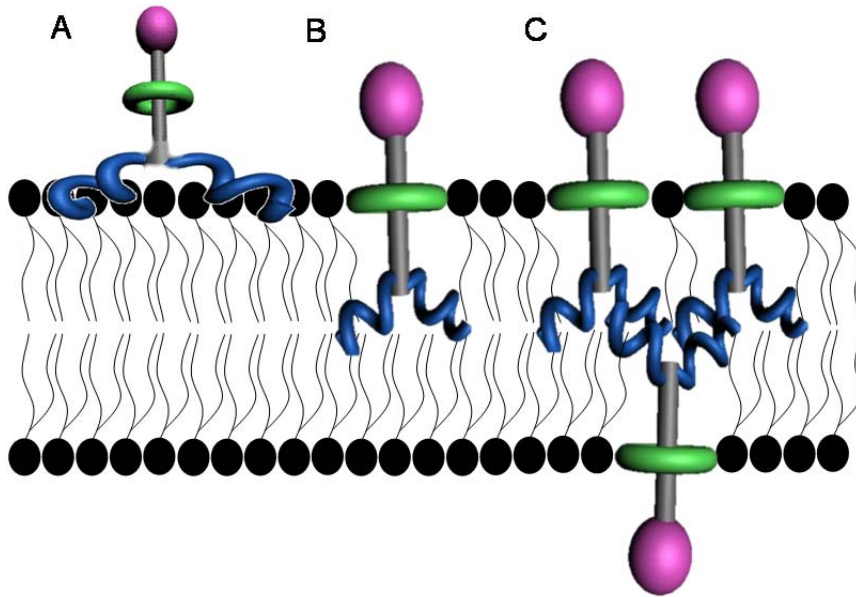


Figure 5.16. Positionnements possibles du rotaxane parapluie dans la bicouche.

5.4. Conclusion

Les tests de transport de chlorures en utilisant soit la lucigénine, soit la HPTS, ont montré l'efficacité des axes parapluie en tant que transporteur de chlorures tout en ne perturbant pas la bicouche phospholipidique. La partie parapluie leur confère de telles propriétés. Nous avons pu émettre l'hypothèse de la formation d'agrégats d'axe parapluie **2.23** au sein de la bicouche grâce à des modélisations moléculaires favorisant des empilements π entre les axes. Ces agrégats agiraient alors comme des canaux laissant passer les Cl^- .

En ce qui concerne les rotaxanes parapluie, leur étude a permis également d'observer le transport de Cl^- . Cependant, leurs propriétés de transport restent bien en deçà de ceux des axes parapluie. L'étude du rotaxane parapluie fluorescent **3.39** par fluorimétrie a permis de formuler différentes théories quant à son positionnement dans la bicouche, mais n'a pu aboutir à la détermination de son mode de transport (canaux ou transporteur mobile). Même si l'étude n'a pu être faite qu'avec le rotaxane dansylé, il est fortement probable que le rotaxane parapluie **3.37** fonctionne de la même manière étant donné leur EC_{50} très proches.

Malgré que le mécanisme ne soit pas clairement établi pour nos rotaxanes parapluie, ils sont, de toute évidence, capables de s'insérer dans une bicouche lipidique. La question est de savoir s'ils peuvent se retrouver de l'autre côté de la membrane afin d'y relarguer la roue et ainsi être un nouveau moyen de transport transmembranaire de macrocycles (médicament cyclique).

Chapitre 6 Transport de macrocycle et relargage

L'un des deux principaux objectifs de ces travaux était de développer un véhicule transmembranaire pour le transport de médicaments cycliques. Les deux chapitres précédents ont permis de démontrer que les rotaxanes parapluie étaient capables de s'ajuster à différents milieux, hydrophobes ou hydrophiles, en changeant de conformations. Cette flexibilité et adaptabilité leur confèrent la capacité de s'insérer dans la bicouche lipidique, notamment dans le but de transporter des Cl⁻. Cependant, malgré le flou entourant le mécanisme de transport, il est tout à fait raisonnable de supposer que les rotaxanes parapluie soient capables de la traverser s'ils sont capables de s'insérer dans la bicouche. En effet, même dans le cas où les rotaxanes parapluie resteraient préférentiellement dans la membrane, il s'agit d'un équilibre. L'équilibre entre les rotaxanes dans la bicouche et les rotaxanes libres en solution peut aussi bien se faire à l'intérieur qu'à l'extérieur de la vésicule. Pour tous les essais qui suivent, seul le rotaxane parapluie fluorescent **3.38** a été testé.

6.1. Essai de passage transmembranaire

Le but de cette étude est d'observer le passage transmembranaire du rotaxane parapluie. Pour cela le rotaxane parapluie doit être placé d'un côté de la bicouche et on doit parvenir à le détecter de l'autre côté. Le système que nous avons envisagé, dans un premier temps, consiste à encapsuler le rotaxane dans les liposomes et à suivre sa présence à l'extérieur des liposomes par spectrométrie de masse.

Des liposomes contenant une solution de rotaxane parapluie fluorescent dans un tampon phosphate ont été préparés. L'évolution de la concentration extravésiculaire a été suivie par LC-MS. Étant donné que le rotaxane parapluie est probablement capable de sortir des liposomes, la préparation de liposomes ne contenait pas l'étape de séparation par chromatographie d'exclusion, afin d'éviter de déclencher l'efflux de rotaxane parapluie des liposomes dans la colonne même. Ainsi, pour provoquer le passage des rotaxanes, un

gradient de concentrations du rotaxane parapluie a été créé. Afin de ne prélever que la solution surnageante pour l'analyse LC-MS, la solution a été passée à la centrifugeuse avant chaque prélèvement afin de faire tomber les liposomes au fond du tube. Le même procédé est fait à différents temps afin de voir l'évolution de la quantité de rotaxane parapluie à l'extérieur des liposomes. La Figure 6.1 résume la méthode utilisée et la procédure est détaillée dans la Partie expérimentale.

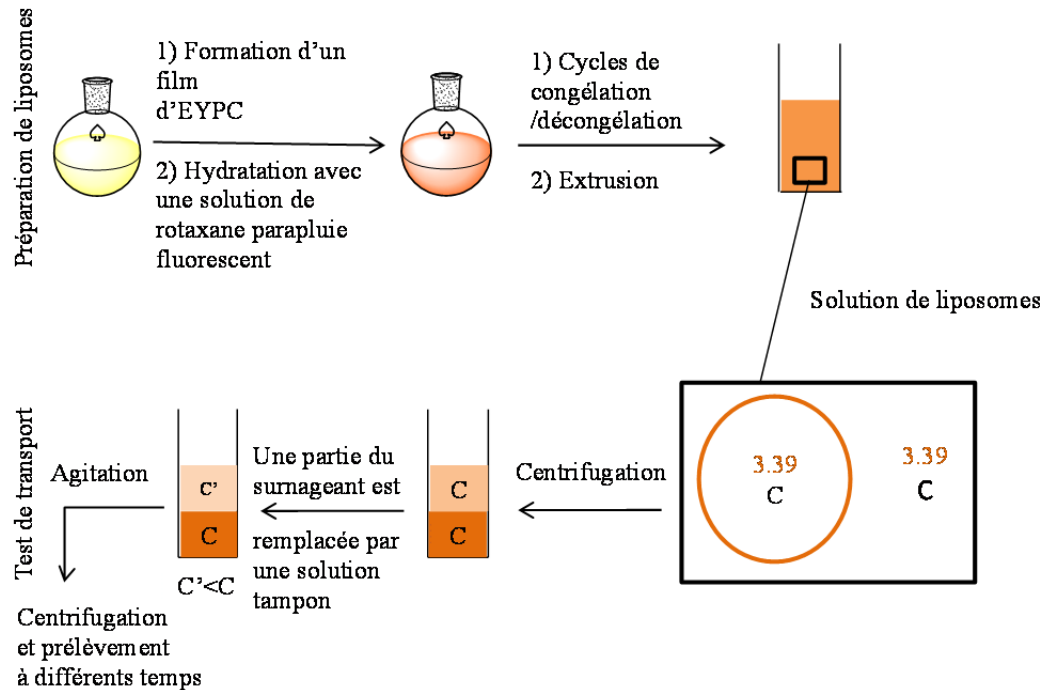


Figure 6.1. Procédure de suivi du passage du rotaxane parapluie fluorescent **3.39**.

Aucune variation n'est à noter au cours du temps. Cependant, le premier échantillon n'a pu être prélevé qu'à 6 min à cause du temps de centrifugation. Il se peut qu'aucune variation n'ait été observée car :

- Il ne s'est rien passé et le rotaxane parapluie est resté dans les liposomes (intérieure ou dans la membrane).
- La quantité de rotaxanes parapluie initialement encapsulée dans les liposomes fut trop faible pour induire une variation visible de la concentration de **3.39** extravésiculaire.

- L'équilibre a été atteint en moins de 6 min, ainsi le gradient fut nul dès le premier point et donc aucune variation n'a eu lieu après.

Malheureusement, aucune conclusion n'a pu être déduite de cette expérience. Il fut donc nécessaire de mettre au point une méthode de clivage du rotaxane afin de prouver son passage à travers la membrane. Nous nous sommes inspirés du procédé utilisé pour les parapluies moléculaires; où des réactions d'échanges de ponts disulfures entre le parapluie moléculaire et le glutathion intravésiculaire permettaient de détecter l'entrée des parapluies moléculaires dans les liposomes.¹⁸⁶

De par la fonction que doit avoir le rotaxane parapluie, il était très intéressant et utile de développer une réaction permettant le relargage de la roue par clivage d'une des parties du rotaxane.

6.2. Relargage : tests préliminaires

La méthode envisagée pour le relargage fut la digestion par une enzyme. Les nombreux liens amide présents sur l'axe parapluie mais pas sur la roue sont des candidats potentiels pour la reconnaissance d'une enzyme. Le clivage d'un ou plusieurs de ces liaisons, par une enzyme capable de couper les liens amide, serait suffisant pour laisser échapper la roue. De plus, ce processus est biologiquement compatible.

6.2.1. Choix de l'enzyme

L'étape la plus ardue fut de trouver une enzyme capable de reconnaître et digérer le rotaxane parapluie. Car, malgré les nombreux liens amides, ce système complètement synthétique ne contient aucun acide aminé, motif reconnaissable par l'enzyme. Les enzymes sont des protéines très puissantes et efficaces, mais aussi très spécifiques. C'est pour cela, que pour cette tâche, des enzymes à large spectre ont été choisies : l' α -chymotrypsine et la trypsine. Ces deux enzymes font partie de la famille des protéases à sérine issues du pancréas. Elles sont capables d'hydrolyser les liens impliquant un groupement carboxyl (ester>amide>peptide).¹⁸⁷ Leur site actif est constitué par une triade catalytique : Asp102-His57-Ser95. La Ser95 et l'His57 jouent toutes deux un rôle

important, respectivement de base générale et de nucléophile, tandis que l'Asp102 ne joue pas de rôle direct dans le mécanisme mais contribue à orienter l'His57.¹⁸⁸

Elles clivent les liens peptidiques par une réaction d'hydrolyse. Le mécanisme de l' α -chymotrypsine est décrit dans la Figure 6.2. Dans un premier temps, l'approche du substrat est favorisée par les interactions avec le sous-site puis la Ser195 déprotonnée par l'His57 attaque le carbonyle. Par élimination, l'amine est libérée et une molécule d'eau entre en jeu. Par addition-élimination, elle prend la place de la Ser 195. Ainsi l'acide carboxylique formé est libéré et laisse la place à une autre molécule de substrat.

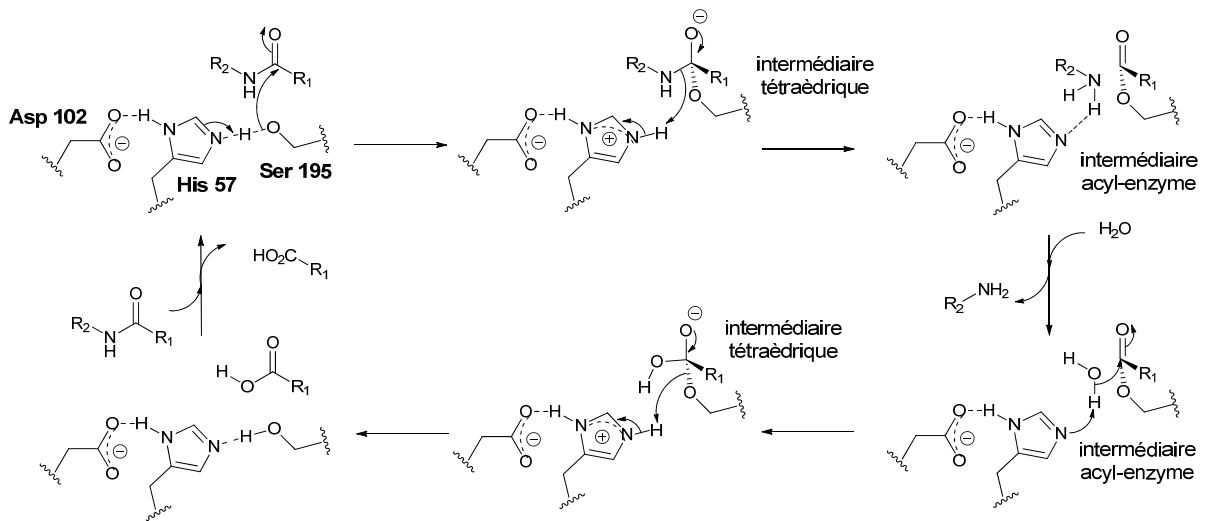


Figure 6.2. Mécanisme d'hydrolyse de la triade catalytique de l' α -chymotrypsine.¹⁸⁹

La principale différence entre ces deux enzymes se situe au niveau du sous-site voisin de la triade catalytique. Celui-ci présente des caractéristiques différentes qui vont être la clé de la spécificité de l'enzyme. Alors que la trypsine présente un sous-site profond et négativement chargé, l' α -chymotrypsine a un sous-site profond et hydrophobe.¹⁸⁸ De ce fait, les chaînes latérales du lien amide vont jouer un rôle important dans la reconnaissance par l'enzyme. Habituellement l' α -chymotrypsine va préférer cliver des liaisons d'acides aminés Trp, Tyr ou Phe, et plus faiblement Leu, Ile et Met, pendant que la trypsine préférera les liaisons des Lys ou Arg.¹⁸⁷ En inspectant la structure de notre rotaxane, les trois liens amides sont situés soit à côté de chaînes hydrophobes (chaîne alkyl ou noyau

aromatique). De plus, une charge positive est aussi présente même si elle reste loin et surtout encombrée par la roue.

6.2.2. Essais expérimentaux et résultats

Des essais de digestion ont été mis en œuvre. Le rotaxane parapluie **3.39** a été mis en présence de l'une des enzymes et la solution fut ensuite analysée par LC-MS. Chaque partie du rotaxane, l'axe parapluie **2.24** et la roue **3.36**, ont aussi été testées dans les mêmes conditions afin de vérifier qu'elle ne fut pas digérée par l'enzyme (la roue) ou déterminer quels étaient les fragments qui en résultèrent (l'axe parapluie).

En premier lieu, l'utilisation d'enzymes ancrées sur des billes de polymères a été préférée pour faciliter la séparation de l'enzyme et donc l'analyse LC-MS par la suite. Ainsi, seule la solution surnageante fut analysée pendant que l'enzyme resta attachée aux billes. L' α -chymotrypsine attachée à des billes de carboxyméthyl cellulose fut testée avec **3.39**, **2.24** et **3.36** à 1 μmol par unité d' α -chymotrypsine à température ambiante pendant 30 min. Les résultats de LC-MS n'ont pas permis d'observer de relargage par digestion. Le rotaxane et l'axe parapluie ont été retrouvés majoritairement dans leur solution respective. En refaisant la même expérience en chauffant à 37°C pendant 30 min pour favoriser le mouvement moléculaire et favoriser la reconnaissance par l'enzyme, les résultats sont restés identiques. Ceci peut être expliqué par le manque d'espace autour des enzymes attachées à une surface. Vu la taille des rotaxanes et axe parapluie, il est compréhensible qu'ils n'aient pas eu accès au site actif de l'enzyme immobilisée. De surcroît, un autre problème est survenu pour ces séries d'expériences. Les échantillons des solutions contenant initialement la roue **3.36**, révélaient une faible quantité de roue. Ce résultat peut être justifié par la faible solubilité de la roue dans cette solution principalement aqueuse. La séparation des billes se faisant par centrifugation, les particules solides de roue ont aussi pu se déposer au fond.

Pour remédier à ces problèmes, des enzymes solubilisées dans une solution tampon ont été finalement choisies. Des conditions standards ont été mises en œuvre pour les tests avec l' α -chymotrypsine¹⁹⁰ et la trypsine¹⁹¹. L'axe parapluie **2.24**, la roue **3.36** et le rotaxane

parapluie **3.39** ont été à nouveau testés à 2,8 μmol par unité d' α -chymotrypsine et à 6,5 nmol par unité de trypsine à température ambiante. La durée de digestion a été augmentée à 2 h. Avec les deux enzymes, les chromatogrammes sont comparables pour chacun des composés. Dans tous les cas, les composés initiaux sont les produits majoritaires. Très peu de produit a été digéré, s'il y a eu digestion. En regardant de plus près les chromatogrammes du rotaxane parapluie **3.39**, la roue **3.36** fut détectée dans un des pics minoritaires. Le rapport de surface des pics roue libre/rotaxane est de 2,4% et de 1,7% pour l' α -chymotrypsine et la trypsine respectivement. Les deux résultats sont proches, mais la α -chymotrypsine, donnant un rapport légèrement supérieur et surtout étant moins coûteuse, a été choisie.

Un contrôle a été fait dans les mêmes conditions avec dix fois plus de solution d'enzyme pour vérifier le relargage, amenant à 0,28 μmol par unité d' α -chymotrypsine. Malheureusement, cet échantillon a présenté encore moins de roue, à peine détectée. Un des problèmes ayant pu subvenir est le manque de solubilité du rotaxane parapluie. En augmentant la proportion de solution aqueuse en augmentant le volume de solution d'enzyme, la solution est devenue légèrement opaque, probable signe de précipitation du rotaxane parapluie. Pour remédier à ce problème, la solution d' α -chymotrypsine a été concentrée afin de garder les mêmes proportions eau/méthanol. Pour s'assurer que la roue était bien issue d'un relargage et non d'une certaine quantité de roue libre initialement présente dans l'échantillon, un contrôle a été fait en absence d'enzyme. En extrayant la masse de la roue des deux chromatogrammes obtenus, et par comparaison, on a noté quasiment vingt fois plus de roue en présence d'enzyme, validant le relargage de la roue par digestion enzymatique.

Le mécanisme d'action enzymatique sur le rotaxane parapluie est à éclaircir. L'analyse des chromatogrammes LC-MS n'a pas permis l'identification sans équivoque de fragments précis du rotaxane afin d'identifier les sites de clivage. Ceci dit, cela ne peut être qu'un des liens amides étant donné l'enzyme choisie. Le lien benzylique est le plus probable compte tenu de la spécificité de l' α -chymotrypsine.

6.3. Relargage in situ

Finalement, afin de démontrer le principe même du rotaxane parapluie, comme transporteur transmembranaire de macrocycles, le relargage à l'intérieur d'un liposome a été testé (Figure 6.3). En plus de mettre en évidence la possibilité d'utiliser une enzyme comme méthode de relargage, le relargage de roue à l'intérieur du liposome est une preuve du passage du rotaxane parapluie à travers la bicouche phospholipidique.

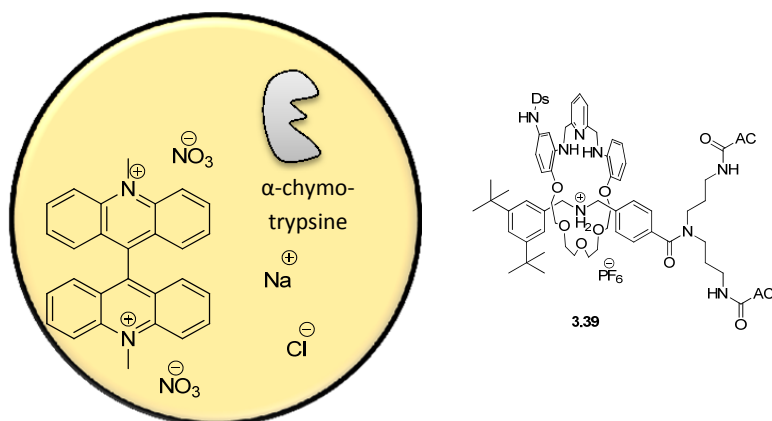


Figure 6.3. Représentation du test de relargage de la roue dans un liposome.

Des liposomes ont été préparés avec une solution d' α -chymotrypsine dans sa solution tampon et de la lucigénine. La lucigénine a été encapsulée pour marquer les liposomes. Elle a permis de suivre les liposomes lors de la chromatographie d'exclusion stérique destinée à éliminer l' α -chymotrypsine extravésiculaire. Ces liposomes ont été mis en présence d'une solution de rotaxane parapluie fluorescent **3.39** à température ambiante pendant 4 h, puis l'enzyme a été dénaturée et les liposomes ont été endommagés en chauffant à 60°C pendant 5 min. Un contrôle a également été fait en ajoutant le rotaxane parapluie après avoir dénaturé l'enzyme pour différencier la roue relarguée d'une quelconque trace de roue dans l'échantillon de départ. Les deux échantillons ont été analysés par LC-MS et comparés. Le rotaxane parapluie **3.39** reste le composé majoritaire de l'échantillon. Celui-ci représente aussi bien la quantité de rotaxane qui n'a pas traversé

la bicouche que celle qui n'a pas été digérée. La roue n'étant pas visible sur les chromatogrammes, la masse de la roue **3.36** y a été extraite. Le rapport roue libre/rotaxane parapluie est quarante fois plus grand pour le test de digestion que pour le contrôle. Ces résultats montrent le relargage d'une partie des roues transportées par les rotaxanes et donc leur passage à l'intérieur du liposome.

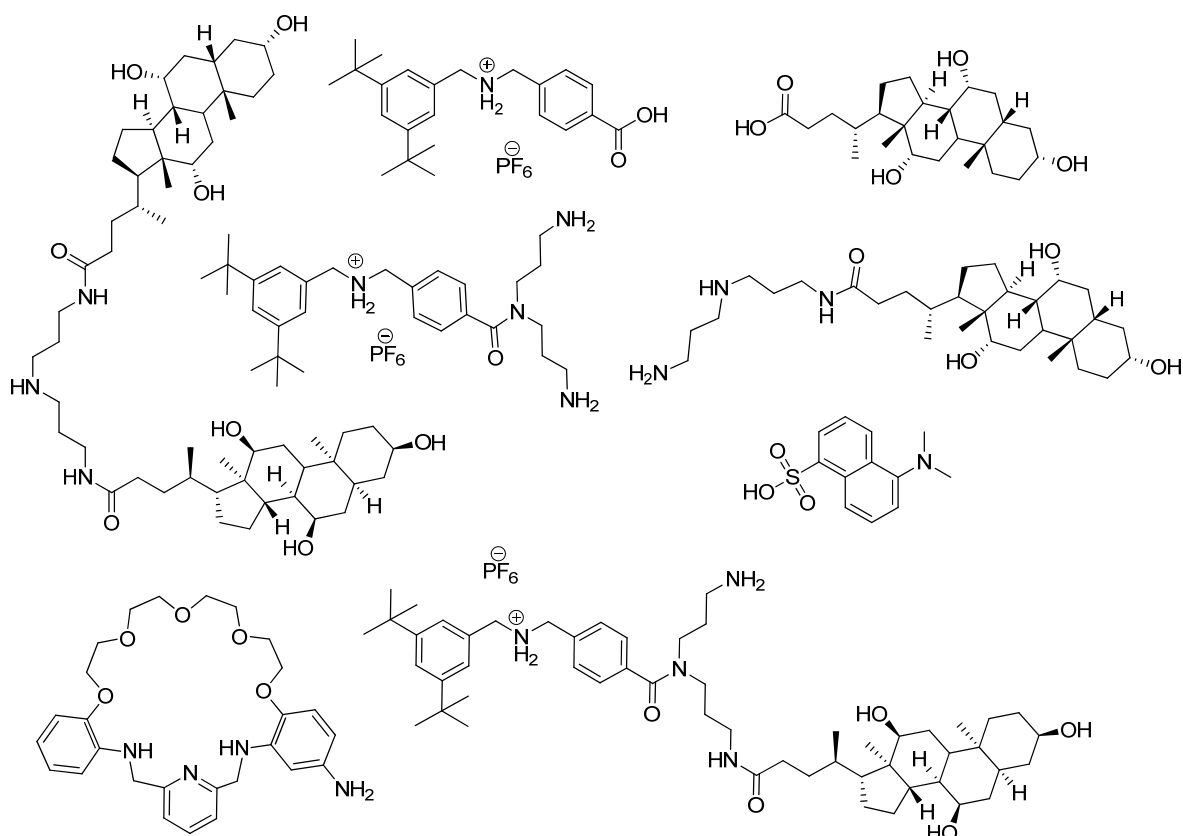


Figure 6.4. Fragments possibles issus de l'hydrolyse d'un ou plusieurs liens amide.

Jusqu'à présent, nous n'avons suivi que la roue pour quantifier la digestion du rotaxane. Or, il se peut la digestion du rotaxane parapluie aboutisse également à d'autres fragments. Aucune masse de fragments possibles (Figure 6.4) n'a pu être extraite du chromatogramme, ne laissant aucun indice sur comment a (ont) lieu le(s) clivage(s) enzymatique(s). En sachant que les mêmes quantités de rotaxane parapluie ont été utilisées pour les deux échantillons, on peut calculer la quantité de rotaxane intact restant et la

quantité digérée. Il reste 83% de rotaxane parapluie, donc jusqu'à 17% pourrait avoir été digéré.

En sachant que l' α -chymotrypsine digérait peu de rotaxane parapluie lors des tests préliminaires, ce résultat montre un bon passage du rotaxane parapluie à travers la bicouche lipidique.

6.4. Conclusion

Ces derniers travaux ont permis de prouver le concept de véhicule de transport pour une roue. La digestion par l' α -chymotrypsine a validé une voie de relargage du macrocycle (roue). Malgré le fait que le mécanisme ne soit pas éclairci, il a été montré que notre rotaxane parapluie est capable de traverser la bicouche et relarguer la roue à l'intérieur du liposome. Dans le cas où il y aurait un équilibre entre le rotaxane parapluie agrégé dans la bicouche et en solution, la « consommation » du rotaxane par l'enzyme à l'intérieur de la vésicule entraînerait un déplacement de l'équilibre pour induire le passage du rotaxane parapluie à l'intérieur du liposome. Ces premiers résultats ont encore besoin d'optimisation (conditions, enzyme, design du rotaxane pour une meilleure reconnaissance par l'enzyme) mais sont prometteurs pour la suite du développement de ce projet.

Chapitre 7 Conclusion générale et perspectives

7.1. Retour sur les résultats obtenus et discussion

Inspirés par les parapluies moléculaires de Regen *et al.* (Chapitre 1.2.2), nous avons élaborés et mis en place le concept novateur des axes et rotaxanes parapluie capables de transporter des anions ou des médicaments cycliques. Les travaux effectués lors de cette thèse ont permis d'introduire et d'appuyer ce concept de transporteur transmembranaire qui se situe à l'intersection de deux thèmes : le transport transmembranaire et les molécules enchevêtrées.

L'exploitation des molécules enchevêtrées pour le transport transmembranaire n'est qu'à ses débuts. Une des plus grandes forces du concept de rotaxane parapluie est d'intégrer la molécule à transporter directement sans dérivation préalable. Il s'agit du premier exemple à ce jour où la molécule à transporter est la roue du rotaxane. Ainsi, cela laisse une diversité de molécules transportées envisageables.

Dans un premier temps, le design des axes parapluie a montré les points essentiels de la structure : groupement bloquant, site de reconnaissance et parapluie. Les deux premiers sont nécessaires pour la formation du rotaxane, le dernier est fondamental pour l'insertion dans la bicouche lipidique. Cependant, malgré que ces éléments soient primordiaux, leur motif est modulable. L'introduction d'un site de reconnaissance positivement chargé et capable d'établir des ponts hydrogène en a fait des récepteurs de chlorures. Les différents axes parapluie ont été obtenus par des synthèses de six à neuf étapes relativement efficaces même s'il reste toujours des possibilités d'amélioration et d'optimisation de certaines.

Ces différents axes parapluie ont montré de bonnes propriétés de symporteurs de chlorures par des essais à la lucigénine ou HPTS. Ces expériences ont confirmé l'importance du parapluie pour l'insertion dans la bicouche. De plus, la grande vitesse de transport associée à une modélisation moléculaire de l'axe parapluie **2.23** a permis de

proposer un mécanisme de transport jusque-là non envisagé : l'agrégation par empilement π - π des axes à l'intérieur de la bicouche et le passage des chlorures par des canaux.

L'ajout d'une roue a montré que notre axe parapluie formait bien le pseudo-rotaxane, mais aussi que l'inaccessibilité de l'ammonium réduisait énormément le transport de Cl⁻. Ainsi, un axe parapluie favoriserait plus le transport d'anions qu'un rotaxane parapluie.

L'assemblage des rotaxanes parapluie a été accompli par clipage. Etant donné leur forme et courbe de transport de chlorures, leur mécanisme d'insertion dans la bicouche pourrait grandement différer de celui des axes parapluie. Les études par fluorimétrie du rotaxane parapluie fluorescent **3.39** dans des solvants de différente polarité a permis d'observer les conformations exposée et renfermée (faces hydrophobes des acides choliques vers l'intérieur) suggérées, la seconde étant favorisée dans un environnement hautement hydrophile. Or, en présence de liposomes dans un milieu principalement aqueux, l'ouverture du parapluie est observée, exposant la roue à un environnement plus polaire (soit le milieu aqueux ou la surface externe des bicouches). Cette observation aboutit à un positionnement complètement différent de celui de l'axe parapluie **2.23**.

Malgré l'incertitude du mécanisme employé par le rotaxane parapluie, il est clair que celui-ci interagit avec la bicouche et qu'il est capable de faire passer des chlorures. Ainsi, sa capacité à traverser de part et d'autre de la bicouche a été mise en évidence en parallèle avec la possibilité d'utiliser une enzyme (α -chymotrypsine) pour relarguer la roue.

Les axes parapluie imaginés, synthétisés et testés ont jeté les bases d'un nouveau moyen de transport transmembranaire. Ces rotaxanes parapluie pourraient jouer un rôle considérable dans l'industrie pharmaceutique, où la membrane cellulaire représente un des principaux challenges. L'action et l'efficacité des principes actifs qu'elle développe dépendant fortement de l'insertion dans la cellule, la capacité de ces axes parapluie à transporter des éléments hydrophiles (ion chlorure ou roue de type éther couronne), qui seuls n'auraient pu traverser la membrane, en font un outil puissant.

7.2. Perspectives

Bien entendu, ces résultats sont préliminaires et de nombreux aspects sont à étudier et optimiser avant d'avoir un système fonctionnel et efficace en restant inoffensif.

D'un point de vue purement synthétique, la synthèse pourrait être optimisée et même éventuellement raccourcie, si certaines étapes de protection et déprotection peuvent être évitées en adaptant les conditions (e.g. estérification et saponification des axes), ou si plusieurs étapes peuvent être combinées dans une synthèse monotope. Mais de façon plus importante, le mode d'assemblage des rotaxanes parapluie est à revoir étant donné l'intérêt de ces molécules. L'assemblage par encapage est nécessaire pour intégrer divers macrocycles biologiquement actifs sans avoir à les altérer. Étant donné le peu de succès rencontré en intégrant le groupement bloquant à l'axe et refermer avec le parapluie, l'inverse est à privilégier. L'axe parapluie **2.23** avec son phénol protégé pourrait malheureusement ne pas être assez réactif pour intégrer facilement un groupement bloquant simple. L'ajout d'un carbone supplémentaire pourrait aisément remédier au problème (projet sur lequel travaille actuellement Josée Richard Daniel) (Figure 7.1).

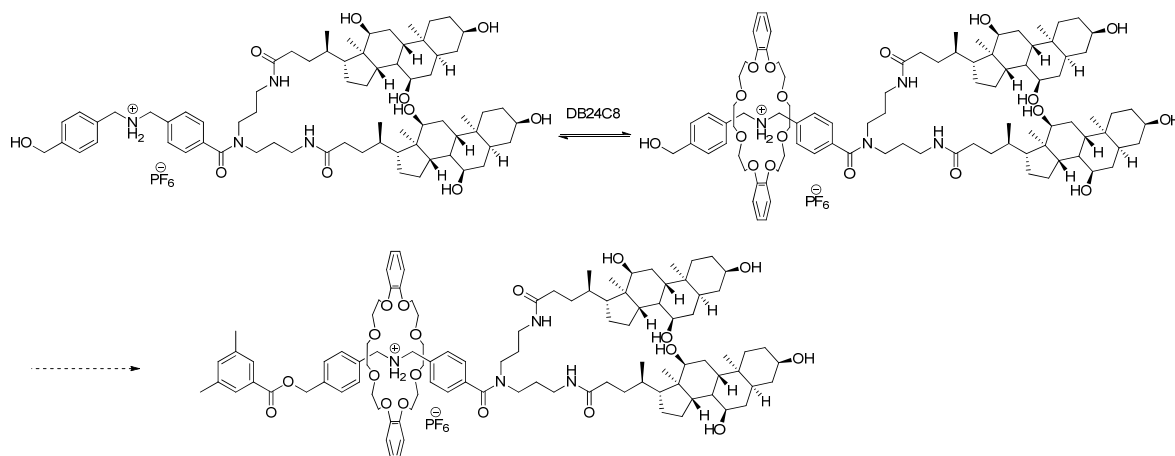


Figure 7.1. Design d'un nouvel axe parapluie et assemblage du rotaxane parapluie par encapage.¹⁹²

Il serait évidemment essentiel de travailler avec des roues biologiquement actives (e.g. nactines) et valider leur complexation sur un axe parapluie.

Outre l'amélioration du système existant et de son efficacité, de nombreuses caractéristiques pour sa compatibilité biologique pourraient grandement affecter le design des axes parapluie. Il est naturellement indispensable qu'ils soient solubles dans l'eau et non toxiques. La reconnaissance plus aisée par une enzyme pourrait privilégier ce mode de relargage. D'un autre côté, leur spécificité est aussi à déterminer, à savoir si certaines cellules seulement seraient favorisées.

L'application à des systèmes biologiques complexes est encore loin mais ces résultats positifs présentés dans cette thèse sont les premiers pas vers le développement et l'optimisation des axes et rotaxanes parapluie.

Partie expérimentale

Généralités

L'acide cholique, la diisopropyléthylamine et l'oxyde de sélénium furent fournis par Alfa Aesar, l'hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino) phosphonium par Novachem et le chlorure d'acétyle par EMD. Tous les autres réactifs chimiques furent fournis par Sigma-Aldrich. Ils ont été tous utilisés directement sans purification préalable. Les solvants utilisés furent fournis par Fisher Scientific, Anachemia ou EMD et sont de qualité ACS ou HPLC.

Toutes les réactions en conditions anhydres furent conduites sous atmosphère d'azote dans de la verrerie préalablement séchée une nuit à l'étuve ou à la flamme. Les solvants anhydres utilisés furent séchés et désoxygénés par le système de solvants GlassContour. Les rendements reportés sont issus de l'isolation du produit par recristallisation, concrétisation ou chromatographie sur colonne ou couche mince, sauf avis contraire.

Les CCM furent effectués sur des plaques en verre recouvertes de silice imprégnée d'un indicateur fluorescent F₂₅₄ (Silicycle SIL57157 250 µm ou TLG R10011B341 1000 µm pour les CCM préparatives). Toutes les réactions furent suivies par CCM et les révélateurs utilisés furent : lampe UV, solution de molybdate d'ammonium et de sulfate cérique, solution de ninhydrine ou solution de KMnO₄. Les purifications par chromatographie sur colonne furent entreprises avec un gel de silice fourni par Silicycle (SiliaFlash F₆₀ 40-63 µm, 230-400 mesh, diamètre des pores 60 Å) ou d'alumine fourni par J.T.Baker (50-200 µm, diamètre des pores 60 Å) par la méthode de Still¹⁹³ en utilisant un flux continu d'air comprimé.

Les solvants deutérés furent fournis par Sigma-Aldrich ou CDN. Les spectres RMN furent enregistrés sur des appareils Bruker : AMX-300 (300 MHz et 75 MHz), ARX-400 (400 MHz et 100 MHz), AV-300 (300 MHz et 75 MHz) ou AV-400 (400 MHz et 100 MHz). Tous les spectres furent calibrés sur le pic de solvant non deutéré résiduel.¹⁹⁴

Les spectres de masse haute et basse resolution furent enregistrés sur un TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific) avec une ESI (*Electron Spray Ionization*) comme source d'ionisation par le Centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal.

Les spectres UV-Vis furent enregistrés sur un spectrophotomètre Varian Cary-100.

La *L-α*-phosphatidylcholine fut fourni par Avanti Polar Lipids. Les liposomes furent extrudés à l'aide d'un extrudeur manuel Avanti High Pressure Mini-Extruder ou Avestin LiposoFast-Basic. Tous les essais fluorimétriques furent enregistrés par un spectrophotomètre Varian Cary Eclipse Fluorescence.

Protocoles expérimentaux

Synthèse

Tous les protocoles de synthèse, ainsi que la caractérisation des molécules synthétisées sont présentés en annexe. Cette partie sera entièrement rédigée en anglais.

Préparation des liposomes

Une solution d'*L-α*-phosphatidylcholine issue de jaune d'oeuf (EYPC) dans CHCl_3 (100 mg dans 2 mL) fut évaporée sous pression réduite dans un bain d'eau à t.a. afin de former un film fin et homogène. Celui-ci fut séché sous vide pendant 2 h. Le film fut hydraté par une solution de phosphate de sodium 10 mM (pH = 6,4), NaCl 100 mM (1 mL). Des cycles de congélation et décongélation furent répétés environ trente fois jusqu'à obtenir un mélange homogène. La solution a été refroidie à -78°C puis chauffée à 35°C . Le mélange a été passé sur le vortex six à huit fois pendant 1 min pour faciliter l'hydratation. La solution jaune fut extrudée à travers une membrane en polycarbonate 100 nm au moins vingt fois. La solution de liposomes fut stockée à 4°C et a été utilisée dans les deux prochains jours.

Pour les tests à la lucigénine

Une solution d'*L*- α -phosphatidylcholine issue de jaune d'oeuf (EYPC) dans CHCl₃ (100 ou 50 mg dans 2 mL) fut évaporée sous pression réduite dans un bain d'eau à t.a. afin de former un film fin et homogène. Celui-ci fut séché sous vide pendant 2 h. Le film fut hydraté par une solution de phosphate de sodium 10 mM (pH = 6,4), NaCl 100 mM et lucigénine 2 mM (1 mL). Des cycles de congélation et décongélation furent répétés environ trente fois jusqu'à obtenir un mélange homogène. La solution a été refroidie à -78°C puis chauffée à 35°C. Le mélange a été passé sur le vortex six à huit fois pendant 1 min pour faciliter l'hydratation. La solution jaune fut extrudée à travers une membrane en polycarbonate 100 nm au moins vingt fois. Enfin la solution fut passée sur une colonne Sephadex G-25 (18 cm x 1 cm) avec une solution de phosphate de sodium 10 mM (pH = 6,4) et NaCl 100 mM afin d'ôter la lucigénine extravésiculaire. Chaque solution de liposomes fut stockée à 4°C et a été utilisée dans les deux prochains jours.

Pour les tests à la HPTS

Une solution d'*L*- α -phosphatidylcholine issue de jaune d'oeuf (EYPC) dans CHCl₃ (50 mg dans 2 mL) fut évaporée sous pression réduite dans un bain d'eau à t.a. afin de former un film fin et homogène. Celui-ci fut séché sous vide pendant 2 h. Le film fut hydraté par une solution de phosphate de sodium 10 mM (pH = 6,4), NaCl 100 mM et HPTS 0,1 mM (1 mL). Des cycles de congélation et décongélation furent répétés environ trente fois jusqu'à obtenir un mélange homogène. La solution a été refroidie à -78°C puis chauffée à 35°C. Le mélange a été passé sur le vortex six à huit fois pendant 1 min pour faciliter l'hydratation. La solution blanche fut extrudée à travers une membrane en polycarbonate 100 nm au moins vingt fois. Enfin la solution fut passée sur une colonne Sephadex G-25 (18 cm x 1 cm) avec une solution de phosphate de sodium 10 mM (pH = 6,4) et NaCl 100 mM afin d'ôter la HPTS extravésiculaire. Chaque solution de liposomes fut stockée à 4°C et a été utilisée dans les deux prochains jours.

Pour les tests de transport

Une solution d'*L*- α -phosphatidylcholine issue de jaune d'oeuf (EYPC) dans CHCl_3 (50 mg dans 2 mL) fut évaporée sous pression réduite dans un bain d'eau à t.a. afin de former un film fin et homogène. Celui-ci fut séché sous vide pendant 2 h. Le film fut hydraté par une solution de rotaxane parapluie **3.39** 0.4 mM dans du tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4)/MeOH 19/1 (1 mL). Des cycles de congélation et décongélation furent répétés environ trente fois jusqu'à obtenir un mélange homogène. La solution a été refroidie à -78°C puis chauffée à 35°C . Le mélange a été passé sur le vortex six à huit fois pendant 1 min pour faciliter l'hydratation. La solution jaune fut extrudée à travers une membrane en polycarbonate 100 nm au moins vingt fois. La solution de liposomes fut utilisée de suite.

Pour les tests de transport et digestion par l' α -chymotrypsine

Une solution d'*L*- α -phosphatidylcholine issue de jaune d'oeuf (EYPC) dans CHCl_3 (50 mg dans 2 mL) fut évaporée sous pression réduite dans un bain d'eau à t.a. afin de former un film fin et homogène. Celui-ci fut séché sous vide pendant 2 h. Le film fut hydraté par une solution de tampon TrisHCl 80 mM (pH = 7,8) et NaCl 100 mM (355 μL), une solution de CaCl_2 2 M (20 μL), une solution de lucigénine 2 mM (350 μL) et une solution d' α -chymotrypsine (1000 unités/mL) dans HCl 1 mM (25 μL). Des cycles de congélation et décongélation furent répétés environ trente fois jusqu'à obtenir un mélange homogène. La solution a été refroidie à -78°C puis chauffée à 35°C . Le mélange a été passé sur le vortex six à huit fois pendant 1 min pour faciliter l'hydratation. La solution blanche fut extrudée à travers une membrane en polycarbonate 100 nm au moins vingt fois. Enfin la solution fut passée sur une colonne Sephadex G-25 (18 cm x 1 cm) avec une solution de phosphate de sodium 10 mM (pH = 6,4) et NaCl 100 mM afin d'ôter la lucigénine et la α -chymotrypsine extravésiculaire. La solution de liposomes fut utilisée de suite.

Etude de repliement par fluorescence

Dans un mélange de solvants

25 μL d'une solution de rotaxane parapluie fluorescent **3.39** 0,1 mM fut ajoutée à 1,225 mL d'un mélange de solvants (MeOH/H₂O ou MeOH/CCl₄) dans différentes proportions. Le spectre d'émission entre 350 et 650 nm fut enregistré après excitation à 330 nm. Chaque essai fut effectué en triplicata.

En présence de liposomes

Un aliquot de 10 μL de la solution de liposomes EYPC a été ajoutée dans une cuvette contenant 1 mL d'une solution de NaNO₃ 100 mM et tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4) et 250 μL d'une solution de rotaxane parapluie **3.39** à 0,1 mM dans MeOH. Le spectre d'émission entre 350 et 650 nm fut enregistré après excitation à 330 nm. La température fut fixée à 35°C. Chaque essai fut effectué en triplicata.

Cinétiques de transport de chlorures

Essais avec les liposomes contenant la lucigénine

Un aliquot de 20 μL de la solution de liposomes EYPC a été ajoutée dans une cuvette contenant 2 mL d'une solution de NaNO₃ 100 mM et tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). La fluorescence de la lucigénine intravésiculaire fut suivie à une excitation de 369 nm et l'émission à 503 nm fut enregistrée. Un aliquot de 500 μL d'une solution de transporteur à 0,1 mM (sauf si indiqué autrement) dans MeOH fut injecté à 50 s. Quand indiqué, une solution aqueuse de Triton X-100 10% fut injectée pour lyser les liposomes. La température fut fixée à 35°C. Chaque essai fut effectué en triplicata.

Essais avec les liposomes contenant la HPTS

Un aliquot de 20 μL de la solution de liposomes EYPC a été ajoutée dans une cuvette contenant 2 mL d'une solution de NaNO₃ 100 mM et tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). La fluorescence de la HPTS intravésiculaire fut suivie à une excitation de 369

nm et de 460 nm, et l'émission à 510 nm fut enregistrée. Un aliquot de 500 μ L d'une solution de transporteur à 0,1 mM dans MeOH fut injecté à 50 s. Quand indiqué, une solution aqueuse de Triton X-100 10% fut injectée pour lyser les liposomes. La température fut fixée à 35°C. Chaque essai fut effectué en triplicata.

Test de transport du rotaxane parapluie 3.39

La solution de liposomes contenant le rotaxane parapluie **3.39** a été centrifugée 5 min à 10 000 rpm et 350 μ L du surnageant ont été prélevés et remplacés par le même volume de tampon phosphate 10 mM (pH = 6,4). Après une légère agitation, le mélange est à nouveau centrifugé 5 min à 10 000 rpm et 30 μ L de surnageant est prélevé. Cette dernière opération fut répétée à différents temps (14, 23, 36 et 66 min). Tous les aliquots prélevés furent analysés par LC-MS.

Test de digestion par l' α -chymotrypsine

Test préliminaire

Différentes solutions furent préparées :

- Solution de rotaxane parapluie **3.39** à 1 mM dans MeOH/H₂O 1/9
- Solution tampon TrisHCl 80 mM (pH = 7,8)
- Solution de CaCl₂ 2 M
- Solution d'HCl 1 mM
- Solution d' α -chymotrypsine (issue de pancréas bovins type II) à 50 unités/mL dans HCl 1 mM froid.

Pour le test de digestion, 140 μ L de solution de rotaxane, 142 μ L de tampon, 8 μ L de CaCl₂ et 10 μ L de chymotrypsine furent agitées à t.a. pendant 2 h. Un blanc a été également été fait dans les mêmes conditions, mais la solution de chymotrypsine a été remplacée par la solution d'HCl. Les deux essais furent analysés par LC-MS.

Test in situ

Un aliquot de 250 μL de solution de liposomes EYPC contenant l' α -chymotrypsine fut ajoutée à 250 μL de solution de NaNO_3 100 mM dans un tampon phosphate 10 mM (pH = 7,8) et 10 μL d'une solution de rotaxane parapluie **3.39** à 1 mM dans MeOH. Le mélange fut laissé à t.a. pendant 4 h en agitant de temps en temps. L'enzyme fut tuée en chauffant le mélange à 60°C pendant 5 min. Un blanc a aussi été fait en ajoutant le rotaxane parapluie après avoir tué l'enzyme. Les échantillons furent rapidement analysés par LC-MS.

Modélisation Moléculaire

Les calculs furent effectués sur Windows® XP avec le logiciel HyperChem 7.5. La configuration initiale de **2.23** a été obtenue à partir de calculs semi-empiriques PM6/SCF-MO. Un modèle de bicouche fut généré en utilisant deux cents molécules de phosphatidylcholine, avec différentes conformations et des couches de 15 Å de molécules d'eau de chaque côté, après une simulation de dynamique moléculaire (DM) de 500 ps à 1000 K, tel que décrit dans la littérature.¹⁹⁵ Afin d'étudier la flexibilité conformationnelle de **2.23**, nous avons effectué une simulation DM de 200 ps avec des conditions limites périodiques (PBC) à 300 K. La limite pour les interactions non-liantes fut fixée à 12 Å pour toutes les simulations. Au début de la dynamique moléculaire, nous avons effectué des recuits simulés à partir de 1000 K (2 ps) à 0 K (10 ps). Le chauffage à 1000 K était nécessaire pour permettre aux molécules de surmonter les barrières énergétiques entre les différentes conformations et empêcher le système de rester bloqué dans une région de l'espace conformationnel. Des simulations à des températures moindres ont donné des conformations très similaires. Les simulations en solution aqueuse furent relaxées en utilisant la méthode du gradient conjugué (steepest descent) jusqu'à atteindre une différence de gradient de 0.01 kcal/mol. Après avoir minimisé l'énergie du système à 0 K, la simulation DM fut initialisée avec un intervalle de temps de 1 fs pour 200 ps. La température a été maintenue constante à 300 K résultant à un ensemble canonique (NVT).

Bibliographie

- ¹ B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson (1983). *Molecular Biology of the Cell* (3rd edition). New York : Garland Publishing Inc.
- ² M. Simon. 2011, 15 mai. *Les Membranes Cellulaires*. In *Biologie Cellulaire*. En ligne. <<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/les-membranes-cellulaires.html>>. Consulté le 19 décembre 2011.
- ³ 2006. *The Cell Surface*. En ligne. <<http://kc.njnu.edu.cn/swxbx/shuangyu/2.htm>>. Consulté le 19 décembre 2011.
- ⁴ P. R. Brotherhood, A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 3633-3647.
- ⁵ F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **1888**, *24*, 247-260.
- ⁶ E. Gouaux, R. MacKinnon, *Science*, **2005**, *310*, 1461-1465.
- ⁷ J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer (2002). *Biochemistry* (5th edition). New York: W H Freeman.
- ⁸ A. Yamashita, S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, E. Gouaux, *Nature*, **2005**, *437*, 215-223.
- ⁹ R. H. Garrett, C. M. Grisham (1999). *Biochimie* (2^e edition). Paris: De Boeck Université.
- ¹⁰ C. Toyoshima, G. Inesi, *Annu. Rev. Biochem.*, **2004**, *73*, 269-292.
- ¹¹ D. A. Doyle, J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science*, **1998**, *280*, 69-77.
- ¹² A. Accardi, C. Miller, *Nature*, **2004**, *427*, 803-807.
- ¹³ M. A. Gray, J. P. Winpenny, B. Verdon, H. McAlroy, B. E. Argent, *Biosci. Rep.*, **1995**, *15*, 531-541.
- ¹⁴ T. J. Jentsch, C. A. Hübner, J. C. Fuhrmann, *Nature Cell Biol.*, **2004**, *6*, 1039-1047.
- ¹⁵ J. R. Casey, *Biochem. Cell Biol.*, **2006**, *84*, 930-939.
- ¹⁶ B. A. McNally, W. M. Leevy, B. D. Smith, *Supramol. Chem.*, **2007**, *19*, 29-37.
- ¹⁷ H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell (2000). *Molecular Cell Biology* (4th edition). New York: W. H. Freeman.
- ¹⁸ S. Kondo, K. Yasui, M. Natsume, M. Katayama, S. Marumo, *J. Antibiot.*, **1988**, *41*, 1196-1204.

-
- ¹⁹ T. R. Sheth, R. M. Henderson, S. B. Hladky, A. W. Cuthber, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1992**, *1107*, 179-185.
- ²⁰ A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 3582-3603.
- ²¹ S. Ohkuma, T. Sato, M. Okamoto, H. Matsuya, K. Arai, T. Katoka, K. Nagai., H. H. Wasserman, *Biochem. J.*, **1998**, *334*, 731-741.
- ²² J. L. Seganish, J. T. Davis, *Chem. Commun.*, **2005**, 5781-5783.
- ²³ A. Fredenhagen, G. Fendrich, F. Marki, W. Marki, J. Gruner, F. Raschdorf, H. H. Peter, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1403-1412.
- ²⁴ S. D. Whitmarsh, A. P. Redmond, V. Sgarlata, A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2008**, 3669-3671.
- ²⁵ N. Sakai, S. Matile, *Tet. Lett.*, **1997**, *Vol. 38*, No. 15, 2613-2616.
- ²⁶ J. Mareda, S. Matile, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 28-37.
- ²⁷ C.-R. Elie, N. Noujeim, C. Pardin, A. R. Schmitzer, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 1788-1790.
- ²⁸ P. A. Gale, *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, *213*, 79-128.
- ²⁹ J. L. Sessler, P. A. Gale, W.-S. Cho (**2006**), *Anion receptor chemistry*. Royal Society of Chemistry.
- ³⁰ N. Busschaert, P. A. Gale, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell, Jr, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 6252-6254.
- ³¹ C. C. Tong, R. Quesada, J. L. Sessler, P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2008**, 6321-6323.
- ³² A. L. Sisson, J. P. Clare, L. H. Taylor, J. P. H. Charmant, A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2003**, 2246-2247.
- ³³ B. A. McNally, A. V. Koulov, T. N. Lambert, B. D. Smith, J.-B. Joos, A. L. Sisson, J. P. Clare, V. Sgarlata, L. W. Judd, G. Magro, A. P. Davis, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 9599 -9606.
- ³⁴ L. W. Judd, A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 2227-2229.
- ³⁵ A. P. Davis, J. J. Perry, R. S. Wareham, *Tet. Lett.*, **1998**, *39*, 4569-4572.
- ³⁶ S. Ghosh, A. R. Choudhury, T. N. Guru Row, U. Maitra, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 1441-1444.

-
- ³⁷ K. M. Bhattarai, V. Del Amo, G. Magro, A. L. Sisson, J.-B. Joos, J. P. H. Charmant, A. Kantacha, A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2006**, 2335-2337.
- ³⁸ P. A. Gale, M. E. Light, B. A. McNally, K. Navakhun, K. E. Sliwinskia, B. D. Smith, *Chem. Commun.*, **2005**, 3773-3775.
- ³⁹ J. L. Sessler, L. R. Eller, W.-S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. Tae Lee, V. M. Lynch, D. J. Magda, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 5989-5992.
- ⁴⁰ P. A. Gale, J. L. Sessler, V. Král, *Chem. Commun.*, **1998**, 1-8.
- ⁴¹ M. G. Fisher, P. A. Gale, J. R. Hiscock, M. B. Hursthouse, M. E. Light, F. P. Schmidtchen, C. C. Tong, *Chem. Commun.*, **2009**, 3017-3019.
- ⁴² M. Yano, C. C. Tong, M. E. Light, F. P. Schmidtchen, P. A. Gale, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 4356-4363.
- ⁴³ K. J. Winstanley, S. J. Allen, D. K. Smith, *Chem. Commun.*, **2009**, 4299-4301.
- ⁴⁴ N. Madhavan, M. S. Gin, *ChemBioChem*, **2007**, *8*, 1834-1840.
- ⁴⁵ K. E. Mitchell, T. Iwamoto, J. Tomich, L. C. Freeman, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1466*, 47-60.
- ⁴⁶ N. Djedovic, R. Ferdani, E. Harder, J. Pajewska, R. Pajewski, M. E. Weber, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *New J. Chem.*, **2005**, *29*, 291-305.
- ⁴⁷ V. Sidorov, F. W. Kotch, G. Abdrakhmanova, R. Mizani, J. C. Fettinger, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2267-2278.
- ⁴⁸ J. L. Seganish, P. V. Santacroce, K. J. Salimian, J. C. Fettinger, P. Zavalij, J. T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 3334-3338.
- ⁴⁹ M. Merritt, M. Lanier, G. Deng, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8494-8501.
- ⁵⁰ A. Hennig, L. Fischer, G. Guichard, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16889-16895
- ⁵¹ S. Kostina Berezin, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2458-2459.
- ⁵² G. A. Cook, O. Prakash, K. Zhang, L. P. Shank, W. A. Takeguchi, A. Robbins, Y.-X. Gong, T. Iwamoto, B. D. Schultz, J. M. Tomich, *Biophys. J.*, **2004**, *86*, 1424-1435.
- ⁵³ Revues : J. M. Boon, B. D. Smith, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, *6*, 749-756; A. P. Davis, D. N. Sheppard, B. D. Smith, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 348-357; C. R.

-
- Yamnitz, G. W. Gokel, *Chem. Biodiv.*, **2007**, *4*, 1395-1412; B. A. McNally, W. M. Leevy, B. D. Smith, *Supramol. Chem.*, **2007**, *19*, 29-37; G. W. Gokel, N. Barkey, *New J. Chem.*, **2009**, *33*, 947-963; P. R. Brotherhood, A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3633-47; S. Matile, A. Vargas Jentsch, J. Montenegro, A. Fin, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 2453-2474; C. J. E. Haynes, P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 8203-8209.
- ⁵⁴ R. J. Jones, N. Bischofberger, *Antiviral Res.*, **1995**, *27*, 1-17.
- ⁵⁵ A. Kreimeyer, F. Andre, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2853-2855.
- ⁵⁶ P. Newsholme, J. Procopio, M. M. Ramos Lima, T. C. Pithon-Curi, R. Curi, *Cell. Biochem. Funct.*, **2003**, *21*, 1-9.
- ⁵⁷ C. Moon, Y. M. Kwon, W. K. Lee, Y. J. Park, V. C. Yang, *J. Control. Release*, **2007**, *124*, 43-50.
- ⁵⁸ A. Kichler, A. J. Mason, B. Bechinger, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1758*, 301-307.
- ⁵⁹ T.-I. Kim, J.-Un Baek, C. Z. Bai, J.-S. Park, *Biomaterials*, **2007**, *28*, 2061-2067.
- ⁶⁰ S. Srinivasachari, K. M. Fichter, T. M. Reineke, *J. Am. Soc. Chem.*, **2008**, *130*, 4618-4627.
- ⁶¹ V. Janout, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 183-192.
- ⁶² V. Janout, M. Lanier, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1573-1574.
- ⁶³ V. Janout, M. Lanier, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 640-647.
- ⁶⁴ S. Vijayaraghavan, B. Jing, T. Vrablik, T.-C. Chou, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 667-671.
- ⁶⁵ V. Janout, B. Jing, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15862-15870.
- ⁶⁶ M. Mehiri, W.-H. Chen, V. Janout, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1338-1339.
- ⁶⁷ G. O. Gey, W. D. Coffman, M. T. Kubicek, *Cancer Res.*, **1952**, *12*, 264-265.
- ⁶⁸ M. Mehiri, B. Jing, D. Ringhoff, V. Janout, L. Cassimeris, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1510-1513.

-
- ⁶⁹ V. Janout, L.-H. Zhang, I. V. Staina, C. Di Giorgio, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5401-5406.
- ⁷⁰ V. Janout, B. Jing, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 351-356.
- ⁷¹ B. Jing, V. Janout, S.L. Regen, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1191-1196.
- ⁷² V. Janout, S.L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 183-192.
- ⁷³ S. Shawaphun, V. Janout, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121* (25), 5860-5864.
- ⁷⁴ B. R. Ganong, R. M. Bell, *Biochemistry*, **1984**, *23*, 4977-4983.
- ⁷⁵ M. Kondo, M. Mehiri, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 13771-13777.
- ⁷⁶ D. Ge, D. Wu, Z. Wang, W. Shi, T. Wu, A. Zhang, S. Hong, J. Wang, Y. Zhang, L. Ren, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2311-2316.
- ⁷⁷ A. Benmerah, C. Lamaze, *Med. Sci.*, **2002**, *18*, 1126-1136.
- ⁷⁸ V. Janout, M. Lanier, G. Deng, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **1997**, *8*, 891-895.
- ⁷⁹ L. Gao, K. J. Kim, J. R. Yankaskas, H. J. Forman, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **1999**, *277*, 113-118.
- ⁸⁰ S. Ananth, S. V. Thakkar, J. P. Gnana-prakasam, P. M. Martin, P. S. Ganapathy, S. B. Smith, V. Ganapathy, *J. Pharm. Sci.*, **2011** Sep 8.
- ⁸¹ P. Guinot, J. Tamsamani, *Path. Biol.*, **1998**, *46*, 347-354.
- ⁸² Revues: C. Dietrich-Buchecker, B. X. Colasson, J.-P. Sauvage, *Top Curr Chem*, **2005**, *249*, 261-283; A. R. Williams, B. H. Northrop, T. Chang, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6665-6669; M. Fujita, K. Ogura, *Supromolecular Science*, **1996**, *3*, 37-44; C. A. Schalley, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4399-4401; C. D. Meyer, R. S. Forgan, K. S. Chichak, A. J. Peters, N. Tangchaivang, G. W. V. Cave, S. I. Khan, S. J. Cantrill, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 12570-12581.
- ⁸³ J. F. Stoddart, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1802-1820.
- ⁸⁴ E. Wasserman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 4433-4434; G. Schill, H. Zollenkopf, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1969**, *721*, 53-74.
- ⁸⁵ A. F. M. Kilbinger, S. J. Cantrill, A. W. Waltman, M. W. Day, R. H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 3281-3285.

-
- ⁸⁶ I. Poleschak, J.-M. Kern, J.-P. Sauvage, *Chem. Commun*, **2004**, 474-476.
- ⁸⁷ J. O. Jeppesen, K. A. Nielsen, J. Perkins, S. A. Vignon, A. Di Fabio, R. Ballardini, M. T. Gandolfi, M. Venturi, V. Balzani, J. Becher, J. F. Stoddart, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 2982-3007.
- ⁸⁸ H. Murakami, A. Kawabuchi, R. Matsumoto, T. Ido, N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15891-15899.
- ⁸⁹ J.-B. Giguère, D. Thibeault, F. Cronier, J.-S. Marois, M. Auger, J.-F. Morin, *Tet. Lett.*, **2009**, *50*, 5497-5500.
- ⁹⁰ Y. Tokunaga, N. Kawai, Y. Shimomura, *Tet. Lett.*, **2007**, *48*, 4995-4998.
- ⁹¹ H. Sasabe, N. Kihara, K. Mizuno, K. Ogawa, T. Takata, *Tet. Lett.*, **2005**, *46*, 3851-3853.
- ⁹² N. Kihara, S. Motoda, T. Yokozawa, T. Takata, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 1199-1202.
- ⁹³ J. S. Hannam, T. J. Kidd, D. A. Leigh, A. J. Wilson, *Org. Lett.*, **2003**, *Vol. 5*, No. 11, 1907-1910.
- ⁹⁴ H. Sasabe, N. Kihara, Y. Furusho, K. Mizuno, A. Ogawa, T. Takata, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 3957-3960.
- ⁹⁵ F. Coutrot, E. Busseron, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 5186-5190.
- ⁹⁶ H. Kawasaki, N. Kihara, T. Takata, *Chem. Lett.*, **1999**, 1015-1016.
- ⁹⁷ Y. Furusho, T. Oku, T. Hasegawa, A. Tsuboi, N. Kihara, T. Takata, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 2895-2903.
- ⁹⁸ P. T. Glink, A. I. Oliva, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1870-1875.
- ⁹⁹ T. Chang, A. M. Heiss, S. J. Cantrill, M. C. T. Fyfe, A. R. Pease, S. J. Rowan, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2947-2950.
- ¹⁰⁰ F. Coutrot, E. Busseron, J.-L. Montero, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 753-756.
- ¹⁰¹ M. Asakawa, T. Ikeda, N. Yui, T. Shimizu, *Chem. Lett.*, **2002**, 174-175.
- ¹⁰² D. W. Zehnder II, D. B. Smithrud, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 2485-2487.
- ¹⁰³ F. Aricó, J. D. Badjic, S. J. Cantrill, A. H. Flood, K. C.-F. Leung, Y. Liu, J. F. Stoddart, *Top Curr. Chem.*, **2005**, *249*, 203-259.

-
- ¹⁰⁴ S. Wolpert, 24 Janvier 2007. *UCLA, Caltech Chemists Report the Creation of Large-Scale Molecular Memory, an Important Step Toward Building Molecular Computers*. En ligne. <<http://newsroom.ucla.edu/portal/ucla/UCLA-Caltech-Chemists-Report-the-7666.aspx?RelNum=7666>>. Consulté le 26 octobre 2011.
- ¹⁰⁵ S. Angelos, Y.-W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2222-2226.
- ¹⁰⁶ I. Smukste, D. B. Smithrud, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2547-2558.
- ¹⁰⁷ J. Zhu, M. McFarland-Mancini, A. F. Drew, D. B. Smithrud, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 520-523.
- ¹⁰⁸ A. Fernandes, A. Viterisi, F. Coutrot, S. Potok, D. A. Leigh, V. Aucagne, S. Papot, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6443-6447.
- ¹⁰⁹ R. M. Kohli, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Nature*, **2002**, *418*, 658-661; S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.*, **2003**, 7036-7043; D. A. Horton, G. T. Bourne, M. L. Smythe, *Mol. Divers.*, **2000**, *5*, 289-304.
- ¹¹⁰ Z. Zizka, *Folia Microbiol.*, **1998**, *43*, 7-14.
- ¹¹¹ C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 7017-7036.
- ¹¹² S. J. Cantrill, A. R. Pease, J. F. Stoddart, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**, 3715-3734.
- ¹¹³ Sigma-Aldrich. 2011. En ligne <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Consulté le 21 septembre 2011.
- ¹¹⁴ Y. Yokoyama, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 1717-1739; Y. Yokoyama, M. Kosel, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2004**, *166*, 9-18.
- ¹¹⁵ M.-V. Martinez-Diaz, N. Spencer, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 1904-1907; H. Iwamoto, Y. Yawata, Y. Fukazawa, T. Haino, *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 24-25.
- ¹¹⁶ C. Chhun, A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Commun.*, **2011**, *2*, 987-990.
- ¹¹⁷ M. Sommelet, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **1913**, *157*, 852-854.
- ¹¹⁸ J. R. Sommer, A. H. Shelton, A. Parthasarathy, I. Ghiviriga, J. R. Reynolds, K. S. Schanze, *Chem. Mater.*, **2011**, *23*, 5296-5304.

-
- ¹¹⁹ P. R. Ashton, M. C. T. Fyfe, S. K. Hickingbottom, S. Menzer, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 577-589.
- ¹²⁰ C. Alonso-Alija, Bayer AG, *EP 1216225 A2*, 26 Jun **2002**.
- ¹²¹ H. Boyd, I. C. Calder, S. J. Leach, B. Millean, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1972**, *4*, 109-115.
- ¹²² Y. Murakami, K. Kondo, K. Mild, Y. Aldyama, T. Watanabe, Y. Yokoyama, *Tet. Lett.*, **1997**, *38*, 3751-3754.
- ¹²³ Y. Kikugawa, K. Mitsui, T. Sakamoto, M. Kawase, H. Tamiya, *Tet. Lett.*, **1990**, *31*, 243-246.
- ¹²⁴ T. Mineno, T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5963-5966.
- ¹²⁵ Y. Tong, A. Claiborne, K. D. Stewart, C. Park, P. Kovar, Z. Chen, R. B. Credo, W.-Z. Gu, S. L. Gwaltney II, R. A. Judge, H. Zhang, S. H. Rosenberg, H. L. Sham, T. J. Sowin, N.-H. Lin, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 2759-2767.
- ¹²⁶ D. D. Keith, J. A. Tortora, R. Yang, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 3711-3713.
- ¹²⁷ L. Peterlin-Mašič, A. Jurca, P. Marinko, A. Jančar, D. Kikelj, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 1557-1563.
- ¹²⁸ G. Ronsin, A. J. Kirby, S. Rittenhouse, G. Woodnutt, P. Camilleri, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2002**, 1302-1306.
- ¹²⁹ G. Magoulas, D. Papaioannou, *Arkivoc*, **2003**, *vi*, 213-227.
- ¹³⁰ M. Gredičak, A. Kolonić, I. Jerić, *Amino Acids*, **2008**, *35*, 185-194.
- ¹³¹ M. J. Plater, S. Aiken, G. Bourhill, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 2405-2413.
- ¹³² K. Nakazono, S. Kuwata, T. Takata, *Tet. Lett.*, **2008**, *49*, 2397-2401.
- ¹³³ S. J. Cantrill, D. A. Fulton, A. M. Heiss, A. R. Pease, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 2262-2273.
- ¹³⁴ I. Smukste, B. E. House, D. B. Smithrud, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2559-2571.
- ¹³⁵ S. Buchini, A. Buschiazzo, S. G. Withers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2700-2703.
- ¹³⁶ H. Gao, J. R. Dias, *Synth. Comm.*, **1997**, *27(5)*, 757-776.
- ¹³⁷ J. Wu, K. Cham-Fai Leung, J. F. Stoddart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 17266-17271.

-
- ¹³⁸ K. M. Bongers, R. J. B. H. N. Van den Berg, L. H. Heitman, A. P. IJzerman, J. Oosterom, C. M. Timmers, H. S. Overkleeft, G. A. Van der Marel, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 4841-4856.
- ¹³⁹ J. Kim, T. Morozumi, H. Hiraga, H. Nakamura, *Anal. Sci.*, **2009**, *29*, 1319-1325.
- ¹⁴⁰ X. Zhang, Penn State Res. Found., *AU 5777300 A*, 04 Jan **2001**.
- ¹⁴¹ J.-P. Dutasta, J.-P. Declercq, C. Esteban-Calderon, B. Tinanti, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 7136-7144.
- ¹⁴² H. Sharghi, M. A. Nasser, K. Niknam, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 7287-7293.
- ¹⁴³ P. S. Shirude, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 5207-5215.
- ¹⁴⁴ S. Kohmoto, E. Mori, K. Kishikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13364-13365.
- ¹⁴⁵ S. J. Pastine, S. W. Youn, D. Sames, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 1055-1058.
- ¹⁴⁶ E. A. Wydysh, S. M. Medghalchi, A. Vadlamudi, C. A. Townsend, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 3317-3327.
- ¹⁴⁷ M. Kimura, K. Kajita, N. Onoda, S. Morosawa, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4887-4892.
- ¹⁴⁸ M. E. Duggan, M. S. Egbertson, G. D. Hartman, S. D. Young, N. C. Ihle, Merck and Co. Inc., *US 5854245*, Jun. 26 **1997**.
- ¹⁴⁹ W. Zhou, J. Li, X. He, C. Li, J. Lv, Y. Li, S. Wang, H. Liu, D. Zhu, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 754-763.
- ¹⁵⁰ J. Yin, S. Dasgupta, J. Wu, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 1712-1715.
- ¹⁵¹ D. V. Waterhouse, S. Barnes, D. D. Muccio, *J. Lipid Res.*, **1985**, *26*, 1068-1078.
- ¹⁵² J. Tuma, C. Richert, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 8957-8965.
- ¹⁵³ A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *Chem. Rev.*, **1971**, *71*, 525-616.
- ¹⁵⁴ C. Hansch, S. M. Anderson, *J. Org. Chem.*, **1967**, *32*, 2583-2586.
- ¹⁵⁵ G. M. Grass, S.A. Sweetana, *Pharm. Res.*, **1988**, *5*, 372-376.
- ¹⁵⁶ K. P. C. Vollhart, N.E. Schore (1999). *Traité de chimie organique* (3^e édition). Paris: De Boeck Université.
- ¹⁵⁷ S. J. Cantrill, D. A. Fulton, A. M. Heiss, A. R. Pease, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 2262-2273.
- ¹⁵⁸ L. Brand, J. R. Gohlke, *Annu. Rev. Biochem.*, **1972**, *41*, 843-868.

-
- ¹⁵⁹ M. L. Bhaumik, R. Hardwick, *J. Chem. Phys.*, **1963**, *39*, 1595-1598.
- ¹⁶⁰ G. S. Cox, P. J. Hauptman, N. J. Turro, *Photochem. Photobiol.*, **1984**, *39*, 597-601.
- ¹⁶¹ J. R. Lakowicz (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd edition). Singapore : Springer.
- ¹⁶² A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Brasseur, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2004**, *8*, 163-176.
- ¹⁶³ R. Nagarajan, *Langmuir*, **2002**, *18*, 31-38.
- ¹⁶⁴ A. V. Koulov, T. N. Lambert, R. Shukla, M. Jain, J. M. Boon, B. D. Smith, H. Li, D. N. Sheppard, J.-B. Joos, J. P. Clare, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 4931-4933.
- ¹⁶⁵ I. Izzo, S. Licen, N. Maulucci, G. Autore, S. Marzocco, P. Tecilla, F. De Riccardis, *Chem. Commun.*, **2008**, 2986-2988.
- ¹⁶⁶ N. Djedovic , R. Ferdani, E. Harder, J. Pajewska, R. Pajewski, M. E. Weber, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *New J. Chem .*, **2005**, *29*, 291-305.
- ¹⁶⁷ B. A. McNally, A. V. Koulov, T. N. Lambert, B. D. Smith, J.-B. Joos, A. L. Sisson, J. P. Clare, V. Sgarlata, L. W. Judd, G. Magro, A. P. Davis, *Chemistry*, **2008**, *14*(31), 9599-9606.
- ¹⁶⁸ Avanti Polar Lipids Inc. s.d. *Preparation of Liposomes*. En ligne. <http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372>. Consulté le 29 novembre 2011.
- ¹⁶⁹ J. T. Davis, O. Okunolaa, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 3843-3862.
- ¹⁷⁰ V. Sidorov, F. W. Kotch, J. L. Kuebler, Y.-F. Lam, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 2840-2841.
- ¹⁷¹ J. T. Davis, P. A. Gale, O. A. Okunola, P. Prados, J. C. Iglesias-Sánchez, T. Torroba, R. Quesada, *Nature Chemistry*, **2009**, *1*, 138-144.
- ¹⁷² R. E. Dawson, A. Hennig, D. P. Weimann, D. Emery, V. Ravikumar, J. Montenegro, T. Takeuchi, S. Gabutti, M. Mayor, J. Mareda, C. A. Schalley, S. Matile, *Nature Chemistry*, **2010**, *2*, 533-538.
- ¹⁷³ N. P. Illsley, A. S. Verkman, *Biochemistry*, **1987**, *26*, 1215-1219.

-
- ¹⁷⁴ A. S. Verkman, R. Takla, B. Sefton, C. Basbaum, J. H. Widdicombe, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 4240-4244.
- ¹⁷⁵ X. Li, B. Shen, X.-Q. Yao, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7264-7265.
- ¹⁷⁶ J. L. Seganish, J. C. Fettinger, J. T. Davis, *Supramol. Chem.*, **2006**, *18*, 257-264.
- ¹⁷⁷ T. Werner, K. Fähnrich, C. Huber, O. S. Wolfbeis, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, *70*, 585-589.
- ¹⁷⁸ C. D. Geddes, *Meas. Sci. Technol.*, **2001**, *12*, R53-R88.
- ¹⁷⁹ J. Biwersi, B. Tulk, A. S. Verkman, *Anal. Biochem.*, **1994**, *219*, 139-143.
- ¹⁸⁰ K. D. Legg, D. M. Hercules, *J. Phys. Chem.*, 1970, *74*, 2114-2118.
- ¹⁸¹ F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **1888**, *24*, 247-260.
- ¹⁸² B. A. McNally, A. V. Koulov, T. N. Lambert, B. D. Smith, J.-B. Joos, A. L. Sisson, J. P. Clare, V. Sgarlata, L. W. Judd, G. Magro, A. P. Davis, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 9599-9606.
- ¹⁸³ D. Pearlman, D. Case, J. Cadwell, G. Seibel, U. Singh, P. Weiner, P. Kollman, AMBER 4.1; UC San Francisco, **1995**
- ¹⁸⁴ J. J. P. Stewart, *Stewart Computational Chemistry, Version 7.213W*
- ¹⁸⁵ M. Yoshii, M. Yamamura, A. Satake, Y. Kobuke, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 2619-2623.
- ¹⁸⁶ V. Janout, L.-H. Zhang, I.V. Staina, C. Di Giorgio, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5401-5406; V. Janout, B. Jing, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 351-356; B. Jing, V. Janout, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 1191-1196
- ¹⁸⁷ M. Dixon, E. C. Webb (1964). *Enzymes* (2nd Edition). New York : Academic Press Inc. Publishers
- ¹⁸⁸ J. W. Keillor (2004). *BCM 2504 Partie III, résumé des cours 1, 2 et 3*. Repéré à <<http://www.esi.umontreal.ca/~keillorj/PDF/BCM2504%28mechanism%29/Cours1et2et3.pdf>>
- ¹⁸⁹ C. P. Woodbury Jr (2011). *Biochemistry for the Pharmaceutical Sciences*. Sudbury : Jones & Bartlett Publishers.

-
- ¹⁹⁰ Sigma-Aldrich. 2011. En ligne <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib%20/docs/Sigma/Enzyme_Assay/c4129enz.Par.0001.File.tmp/c4129enz.pdf>. Consulté le 13 décembre 2011.
- ¹⁹¹ Sigma-Aldrich. 2011. En ligne <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-trypsin.html>>. Consulté le 13 décembre 2011.
- ¹⁹² Y. Tachibana, H. Kawasaki, N. Kihara, Toshikazu Takata, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 5093-5104.
- ¹⁹³ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923-2925.
- ¹⁹⁴ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7512-7515.
- ¹⁹⁵ H. Heller, M. Schaefer, K. Schulte, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 8343-8360.

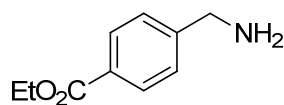
ANNEXE

Synthesis and characterizations

Synthesis of the umbrella threads

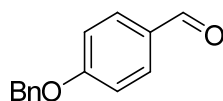
Synthesis of the dibenzylammonium umbrella threads

First route



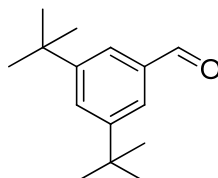
2.1

Ethyl 4-aminobenzoate 2.1 was prepared following the synthetic procedure previously describedⁱ with 58% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ



2.2

4-Benzyloxybenzaldehyde 2.2 was prepared following the synthetic procedure previously reportedⁱ with 82% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ



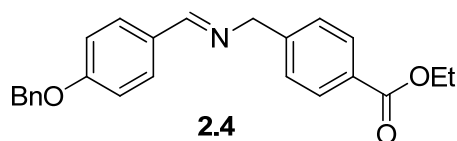
2.3

3,5-Di-tert-butylbenzaldehyde 2.3 was prepared following a modified literature methodⁱⁱ : To a solution of *N*-bromosuccinimide (8.97 g, 50.4 mmol, 1.03 eq) in CCl₄ (85 mL) were

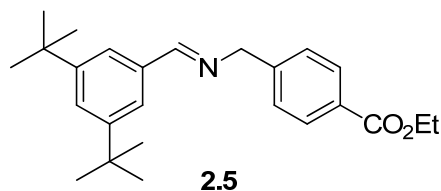
ⁱ C. Chhun, A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Commun.*, **2011**, 2, 987-990.

ⁱⁱ J. R. Sommer, A. H. Shelton, A. Parthasarathy, I. Ghiviriga, J. R. Reynolds, K. S. Schanze, *Chem. Mater.*, **2011**, 23 (24), 5296-5304.

added 3,5-di-*tert*-butyltoluene (12.2 mL, 48.9 mmol, 1 eq) and benzoyl peroxide 70% (1.19 g, 4.89 mmol, 0.10 eq). The media was heated to reflux for 1 h. The solid residue was then filtered off. The filtrate was concentrated under vacuum and dissolved in MeOH/H₂O 1/1 (80 mL). Hexamethylenetetramine (28.8 g, 0.205 mol, 4.20 eq) was added and the solution was heated to reflux for 2 h followed by addition of HCl 37% (20 mL). The mixture was reheated to reflux for 2 h then cooled to room temperature and extracted with CH₂Cl₂ (3x80 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. After purification by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 2/98), a white solid (4.25 g, 39.8%) was isolated. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱⁱⁱ



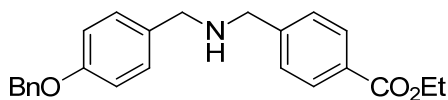
Compound 2.4 was prepared following the synthetic procedure previously reportedⁱ with 72% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ



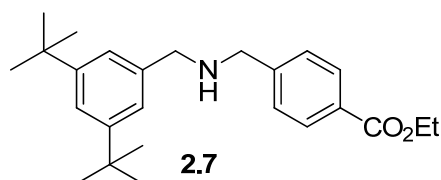
Compound 2.5 In a dry flask under N₂ were dissolved ethyl 4-aminobenzoate **2.1** (1.23 g, 6.84 mmol, 1.00 eq) and 3,5-di-*tert*-butylbenzaldehyde **2.3** (1.49 g, 6.84 mmol, 1.00 eq) in anhydrous toluene (20 mL). Sodium sulfate (1.17 g, 8.21 mmol, 1.20 eq) was added and the suspension heated to reflux under N₂ for 21 h. The white solid was filtered off and the yellow solution was evaporated in vacuo. The yellow solid was recrystallized from hot EtOH giving white crystals (1.83 g, 70.5%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 8.41 (s, 1H); 8.02 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 7.63 (d, ⁴J=2.0 Hz, 2H); 7.53 (t, ⁴J=2.0 Hz, 1H); 7.41 (d,

ⁱⁱⁱ I. Karamé, M. Jahjah, A. Messaoudi, M. L. Tommasino, M. Lemaire, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 1569-1581.

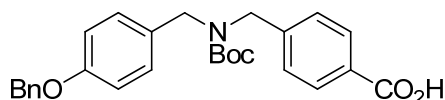
$^3J=8.0$ Hz, 2H); 4.88 (s, 2H); 4.37 (q, $^3J=7.2$ Hz, 2H); 1.39 (t, $^3J=7.2$ Hz, 3H); 1.35 (s, 18H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta(\text{ppm})$ 166.74; 163.99; 151.40; 144.86; 135.47; 129.85; 129.22; 127.89; 125.50; 122.83; 64.80; 61.01; 35.07; 31.56; 14.50; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}}=380.25895$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}}=380.25850$.

**2.6**

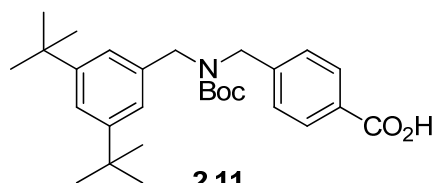
Compound 2.6 was prepared following the synthetic procedure previously described¹ with 81% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.¹

**2.7**

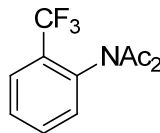
Compound 2.7 To a solution of compound **2.5** (1.61 g, 4.25 mmol, 1.00 eq) in MeOH/THF 1/1 (60 ml) was added sodium borohydride (0.266 g, 7.02 mmol, 1.65 eq). The yellow solution was stirred at room temperature for 2 h. Then a second portion of sodium borohydride (0.266 g, 7.02 mmol, 1.65 eq) was added and the medium stirred for 18 h at room temperature. The mixture was quenched with a solution of HCl 1 M until pH 2 and the solvent was removed under vacuum. The residue was dissolved in a saturated solution of K_2CO_3 (185 mL) then extracted with CH_2Cl_2 (3x175 mL). The organic layers were dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum. A light yellow oil (1.51 g, 93.1%) was obtained from purification by flash chromatography (SiO_2 , AcOEt/Hex: 3/7). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$ 8.07 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H); 7.48 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H); 7.39 (t, $^4J=2.0$ Hz, 1H); 7.23 (d, $^4J=2.0$ Hz, 2H); 4.41 (q, $^3J=7.2$ Hz, 2H); 3.93 (s, 2H); 3.84 (s, 2H); 1.43 (t, $^3J=7.2$ Hz, 3H); 1.39 (s, 18H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta(\text{ppm})$ 166.72; 150.96; 145.89; 139.19; 129.79; 129.29; 128.12; 122.45; 121.22; 60.97; 53.92; 53.03; 34.95; 31.64; 14.48; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}}=382.27406$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}}=382.27498$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}}=404.25600$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}}=404.25529$.

**2.10**

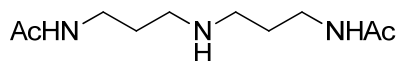
Compound 2.10 was prepared following the synthetic procedure previously reportedⁱ with 85% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ

**2.11**

Compound 2.11 To a solution of compound **2.7** (0.131 g, 0.343 mmol, 1.00 eq) in CH₂Cl₂ (6 ml) cooled to 0°C was added dropwise a solution of di-*tert*-butyle dicarbonate (78.6 mg, 0.360 mmol, 1.05 eq) in CH₂Cl₂ (5 ml). The mixture was then stirred at room temperature for 24 h. The colorless solution was evaporated under vacuum to give a white oil which was directly used for the next step without further purification. To a solution of the ester (1.66 g, 3.44 mmol, 1.00 eq) in MeOH (70 mL) was added potassium hydroxide (1.93 g, 34.4 mmol, 10.0 eq). The white mixture was heated to reflux for 5 h then cooled to room temperature. The solution was acidified with a solution of HCl 10% until pH 1. The aqueous layer was extracted with AcOEt (4x50 mL) then the combined organic layers were washed with water (2x40 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A viscous yellow oil (1.52 g, 97.0%) was obtained from purification by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 3/7). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 8.04 (d, ³J=8.0 Hz, 2H); 7.32 (s, 2H); 7.23 (s, 1H); 7.03 (m, 2H); 4.49-4.34 (m, 4H); 1.50 (m, 9H); 1.30 (s, 18H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 171.70; 156.16; 151.11; 130.51; 128.45; 127.94; 127.30; 122.46; 122.01; 121.44; 80.48; 34.87; 31.56; 28.57; HR-MS ESI [M+Na]⁺_{calc} = 476.27713, [M+Na]⁺_{found} = 476.27860.

**2.12**

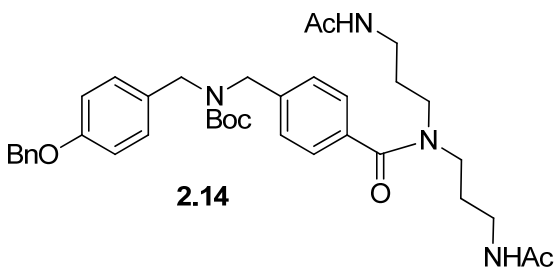
N-Acetyl-*N*-(2-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide **2.12** was prepared following a slightly modified procedure previously reported.^{iv} The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 4/6) to afford the desired product quantitatively. NMR ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 7.80 (d, ³J=7.5 Hz, 1H); 7.69 (t, ³J= 7,5 Hz, 1H); 7.58 (t, ³J= 7,5 Hz, 1H); 7.29 (d, ³J= 7,5 Hz, 1H); 2.28 (s, 6H) ; NMR ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 172.55; 137.47; 133.56; 131.70; 129.64; 127.70, 124.93; 121.31; 26.62; HR-MS ESI [M+Na]⁺_{calc}= 268.05558, [M+Na]⁺_{found}= 268.05531.

**2.13**

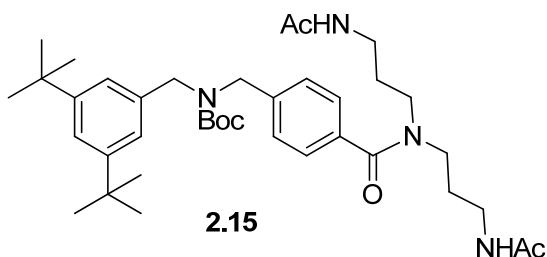
Compound 2.13 was prepared using a different method from the one from literature^v to improve the yield. To a solution of *N*(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine (1.82 mL, 12.9 mmol, 1 eq) in EtOH (35 mL) cooled to 0°C was added compound **2.12** (6.28 g, 28.4 mmol, 2.20 eq). The mixture was stirred at 0°C for 7 h and then overnight at room temperature. The yellow solution was concentrated in vacuo then purified by flash chromatography (SiO₂, gradient CH₂Cl₂/MeOH: 9/1 to 6/4) giving a viscous brown oil (2.692 g, 96.8%). NMR ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 6.41 (br s, 1H); 3.35 (q, ³J=6.5 Hz, 4H); 2.66 (t, ³J= 6,5 Hz, 4H); 1.98 (s, 6H); 1.68 (qn, ³J= 6,5 Hz, 4H) ; NMR ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 171.05; 46.51; 37.09; 28.15; 22.97 ; HR-MS ESI [M+H]⁺_{calc}= 216.17065, [M+H]⁺_{found}= 216.17047; [M+Na]⁺_{calc}= 238.15260, [M+Na]⁺_{found}= 238.15255.

^{iv} Y. Murakami, K. Kondo, K. Mild, Y. Aldyama, T. Watanabe, Y. Yokoyama, *Tet. Lett.*, **1997**, Vol. 38. No. 21, 3751-3754

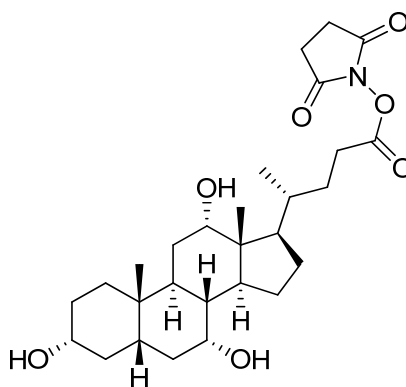
^v Y. Kikugawa, K. Mitsui, T. Sakamoto, M. Kawase, H. Tamiya, *Tet. Lett.*, **1990**, Vol.31, No. 2, 243-246



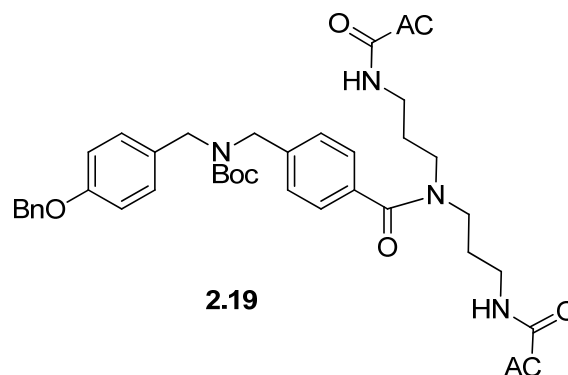
Compound 2.14 In a dry flask under N₂, to a solution of compound **2.10** (0.477 g, 1.07 mmol, 1.00 eq) in anhydrous DMF (15 mL) were added (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (0.707 g, 1.60 mmol, 1.50 eq), a solution of compound **2.13** (0.344 g, 1.60 mmol, 1.50 eq) in dry DMF (5 mL) and ethyldiisopropylamine (0.650 mL, 3.73 mmol, 3.50 eq). The brown mixture was stirred at room temperature under N₂ for 17 h. The brown mixture was partitioned between AcOEt (70 mL) and water (50 mL). The organic layer was washed with water (50 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (60 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (2x50 mL). The organic layer was washed with water (30 mL) then dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A yellow oil (0.555 g, 80.5%) was obtained from purification by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 9/1). NMR ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 7.48-7.18 (m, 9H); 7.10 (ls, 2H); 6.92 (d, ³J=8.8 Hz, 2H); 6.00 (br s, 1H); 5.05 (s, 2H); 4.40-4.26 (m, 4H); 3.57 (br s, 2H); 3.27 (br s, 4H); 3.06 (br s, 2H); 2.00 (br s, 3H), 1.88-1.64 (m, 7H); 1.49 (s, 9H); 1.24 (s, 1H) ; NMR ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 172.56; 170.88; 170.69; 158.26; 156.01; 140.01; 137.00; 132.26; 130.03; 129.40; 128.94; 128.68; 128.08; 127.79; 127.54; 126.64; 125.04; 80.44; 70.17; 49.18; 48.66; 46.94; 41.94; 36.77; 36.41; 29.77; 28.99; 28.54; 27.49; 23.25 ; HR-MS ESI [M+H]⁺_{calc} = 645.36466, [M+H]⁺_{found} = 645.36611; [M+Na]⁺_{calc} = 667.34661, [M+Na]⁺_{found} = 667.34718.



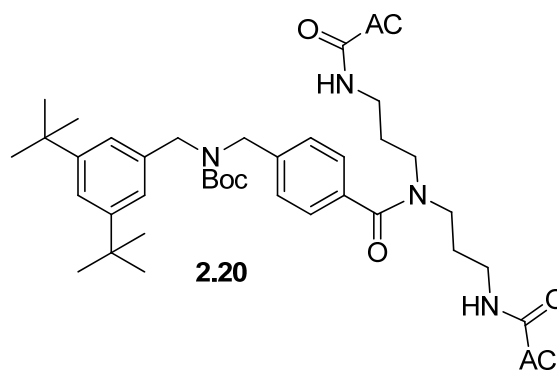
Compound 2.15 In a dry flask under N₂, to a solution of compound **2.11** (1.40 g, 3.09 mmol, 1.00 eq) in anhydrous DMF (10 mL) were added (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (2.05 g, 4.64 mmol, 1.50 eq), a solution of compound **2.13** (0.999 g, 4.64 mmol, 1.50 eq) in anhydrous DMF (10 mL) and diisopropylamine (1.89 mL, 10.8 mmol, 3.50 eq). The mixture was stirred at room temperature under N₂ for 18 h. The brown mixture was partitioned between AcOEt (90 mL) and water (50 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (3x30 mL). The organic layer was washed with distilled water (2x50 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (3x30 mL), then dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum. A brown paste (1.60 g, 79.5%) was obtained from purification by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 9/1). NMR ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 7.32 (m, 5H); 7.04 (br s, 2H); 4.47-4.29 (m, 4H); 3.59 (br s, 2H); 3.29 (br s, 4H); 3.09 (br s, 2H); 2.00 (br s, 3H); 1.80 (m, 7H); 1.51 (s, 9H); 1.32 (s, 18H) ; NMR ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 172.49; 170.67; 156.06; 151.10; 140.01; 136.73; 135.23; 127.91; 126.63; 121.86; 121.40; 80.26; 50.31; 48.70; 46.91; 41.94; 36.65; 36.35; 34.82; 31.51; 28.96; 28.49; 27.49; 23.30; 23.09 ; MS ESI [M+H]⁺_{calc}= 651.4, [M+H]⁺_{found}= 651.3.

**2.18**

N-Succinimidyl ester of cholic acid was prepared following the synthetic procedure previously reportedⁱ with 98% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ

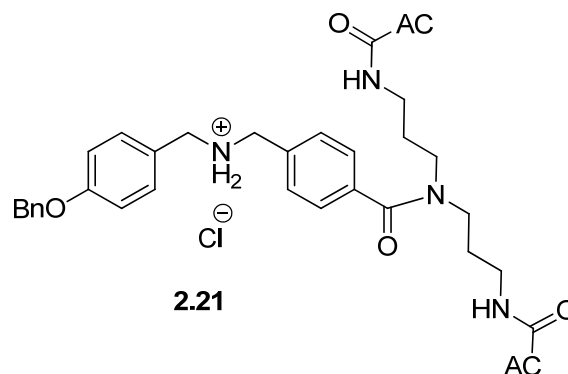


Umbrella thread Boc protected 2.19 To a solution of compound **2.14** (0.384 g, 0.595 mmol, 1.00 eq) in MeOH/H₂O 3/2 (20 mL) cooled to 0°C was slowly added potassium hydroxide (4.00 g, 71.4 mmol, 120 eq). The white mixture was heated to reflux for 24 h then cooled to room temperature and quenched with H₂O (30 mL). After extraction with CH₂Cl₂ (3x15 mL), the organic phase was washed with brine (2x20 mL), dried over MgSO₄ and evaporated in vacuo to afford a white solid (0.20 g, 60%). It was directly used for the next step. To a solution of *N*-succinimidyl ester of cholic acid **2.18** (0.357 g, 0.198 mmol, 2.00 eq) in DMF (4 mL) heated to 50°C was added the previous compound (0.198 g, 0.353 mmol, 1.00 eq). The solution was heated to 70°C for 6 h then cooled to room temperature and concentrated under vacuum. Purification by flash chromatography (SiO₂, CHCl₃/MeOH: 7/3) gave a white solid (0.144 g, 30.3%). The product presented identical spectral data to that previously reported.¹

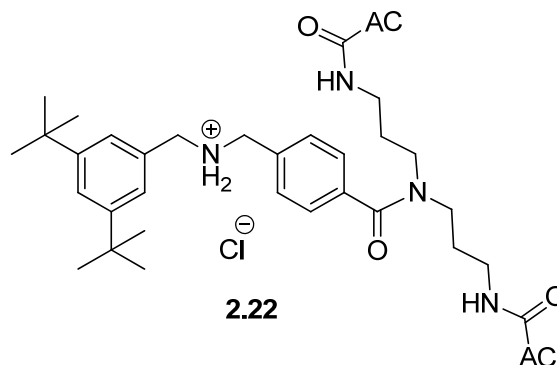


Umbrella thread Boc protected 2.20 To a solution of compound **2.15** (1.60 g, 2.46 mmol, 1.00 eq) in MeOH/H₂O 3/2 (50 mL) cooled to 0°C was slowly added potassium hydroxide (16.5 g, 0.295 mmol, 120 eq). The orange mixture was heated to reflux for 16 h. The light

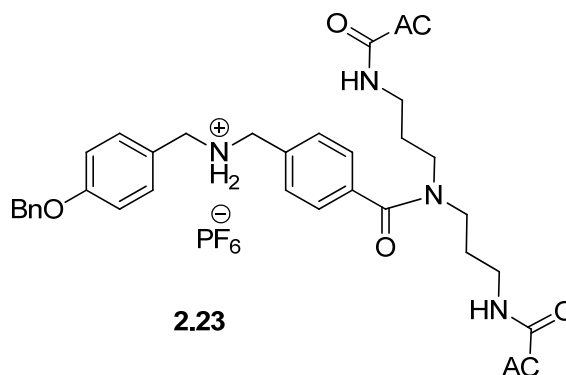
yellow media was cooled to room temperature and extracted with CH_2Cl_2 (3x60 mL). The organic layer was washed with brine then dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum giving a yellow solid (1.05 g, 75.3%) directly used in the next step without purification. To a solution of activated cholic acid **2.18** (1.66 g, 3.29 mmol, 2.00 eq) in DMF (25 mL) heated to 50°C was added the previous compound (0.933 g, 1.65 mmol, 1.00 eq). The yellow mixture was heated to 70°C for 19 h cooled to room temperature then 0°C . A white solid precipitated from addition of ice-cold water and was filtered and dried under vacuum. Purification by flash chromatography (SiO_2 , gradient $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1 to 8/2) gave a white solid (0.590 g, 26.6%). ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) 7.31 (m, 5H); 7.08 (m, 2H); 4.43 (m, 4H); 3.94 (m, 2H); 3.79 (br s, 2H); 3.55 (m, 2H); 3.37 (m, 2H); 3.28 (m, 2H); 3.01 (m, 2H); 2.37-1.52 (m, 39H); 1.49 (s, 9H); 1.31 (s, 18H); 1.29-0.93 (m, 12H); 0.91 (s, 6H); 0.69 (m, 6H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm) 176.81; 176.62; 176.28; 169.62; 157.59; 152.11; 128.86; 128.57; 122.98; 122.22; 81.58; 73.92; 72.80; 68.96; 47.98; 47.46; 43.12; 42.92; 40.90; 40.40; 37.82; 37.17; 36.96; 36.86; 36.49; 35.85; 35.60; 34.23; 34.12; 33.30; 33.03; 31.95; 31.14; 29.56; 28.78; 28.56; 27.80; 24.25; 23.25; 18.01; 17.92; 17.81; 13.12; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}} = 1347.98089$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}} = 1347.97869$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}} = 1369.96283$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}} = 1369.96134$.



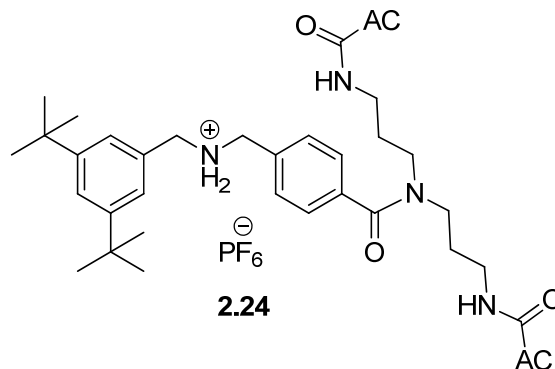
Umbrella thread chloride 2.21 was prepared following the synthetic procedure previously reportedⁱ quantitatively. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ



Umbrella thread chloride 2.22 To a solution of Boc-protected umbrella-axle **2.20** (0.132 g, 98.0 μmol , 1.00 eq) in EtOH cooled to 0°C was added a solution of HCl 4.00 M (1.84 mL, 7.36 mmol, 75.0 eq) dropwise. The medium was stirred at 0°C for 20 min then at room temperature for 48 h. The yellow solution was evaporated under vacuum and recrystallized in $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$ to give a light yellow solid (88.7 mg, 70.3%). NMR ^1H (CD_3OD , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$ 7.63 (d, $^3J=7.6$ Hz, 2H); 7.53 (s, 1H); 7.48 (d, $^3J=7.6$ Hz, 2H); 7.41 (s, 2H); 4.34 (s, 2H); 4.28 (s, 2H); 3.95 (br s, 2H); 3.80 (br s, 2H); 3.56 (m, 2H); 3.37 (m, 2H); 3.27 (m, 2H); 2.97 (m, 2H); 2.37-1.37 (m, 48H); 1.35 (s, 18H); 1.32-0.93 (m, 12H); 0.92 (s, 6H); 0.70 (m, 6H); NMR ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) $\delta(\text{ppm})$ 176.85; 176.73; 173.31; 153.14; 138.94; 133.88; 131.65; 128.29; 125.31; 124.64; 73.96; 72.83; 68.99; 52.87; 51.76; 47.98; 47.46; 44.06; 43.15; 42.99; 40.98; 40.43; 37.96; 37.68; 36.92; 36.48; 35.87; 34.22; 34.07; 33.34; 31.82; 31.17; 29.60; 28.72; 28.47; 27.87; 24.24; 23.19; 17.79; 13.05; HR-MS ESI $[\text{M}]^+_{\text{calc}} = 1247.92846$, $[\text{M}]^+_{\text{found}} = 1247.93045$.

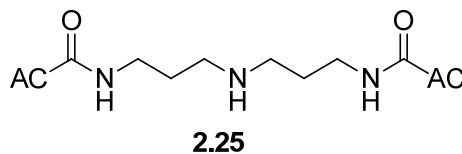


Umbrella thread hexafluorophosphate 2.23 was prepared following the synthetic procedure previously describedⁱ with 81% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ

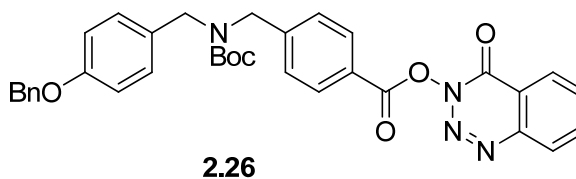


Umbrella thread hexafluorophosphate 2.24 To a solution of compound **2.22** (0.258 g, 0.201 mmol, 1.00 eq) in MeOH (4 mL) was added a saturated solution of ammonium hexafluorophosphate (0.327 g, 2.01 mmol, 10.0 eq) in water (2 mL). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then evaporated in vacuo. The white solid was washed with water and filtered to give a white powder (0.2678 g, 98.1%). ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ(ppm) 7.57 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 7.54 (t, ⁴J=1.6 Hz, 1H); 7.48 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 7.35 (d, ⁴J=1.6 Hz, 2H); 4.29 (s, 2H); 4.23 (s, 2H); 3.95 (br s, 2H); 3.80 (br s, 2H); 3.56 (m, 2H); 3.38 (m, 2H); 3.27 (m, 2H); 2.96 (m, 2H); 2.35-1.36 (m, 48H); 1.35 (s, 18H); 1.31-0.95 (m, 12H); 0.92 (s, 6H); 0.70 (m, 6H); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ(ppm) 176.85; 173.36; 153.20; 138.97; 133.90; 131.74; 131.56; 128.30; 125.21; 124.67; 74.00; 72.84; 69.02; 52.97; 51.86; 48.00; 47.47; 44.00; 43.15; 43.00; 37.93; 37.69; 36.91; 36.47; 35.87; 34.25; 34.09; 33.33; 31.79; 31.17; 29.59; 28.71; 28.47; 27.67; 24.24; 23.18; 17.77; 13.03; HR-MS ESI [M]⁺_{calc} = 1247.92846, [M]⁺_{found} = 1247.93073.

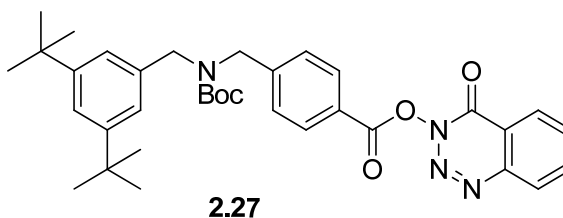
Second route



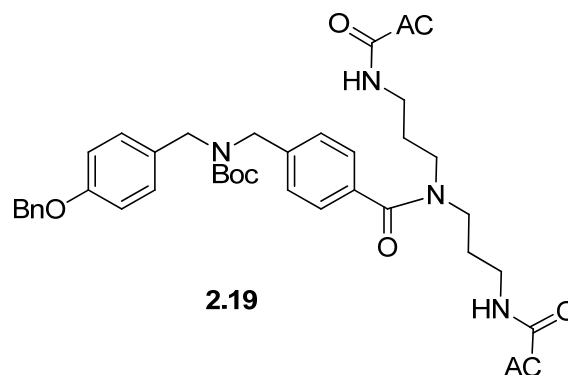
Umbrella 2.25 was prepared following the synthetic procedure previously describedⁱ with 76% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ



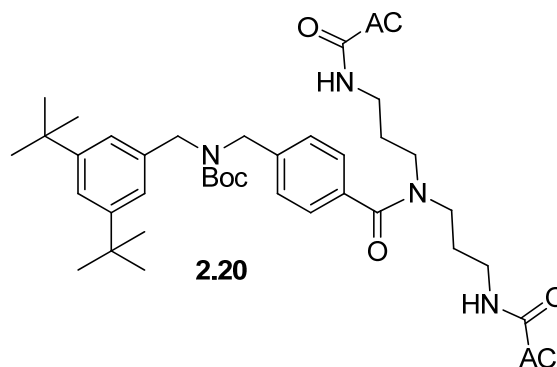
Compound 2.26 was prepared following the synthetic procedure previously describedⁱ quantitatively. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ



Compound 2.27 To a solution of compound **2.11** (91.4 mg, 0.202 mmol, 1.00 eq) in dry CH_2Cl_2 (10 mL) were added 3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one (36.7 mg, 0.222 mmol, 1.10 eq) and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (45.7 mg, 0.222 mmol, 1.10 eq). The colorless mixture was stirred at room temperature under N_2 for 24 h. The white solid was filtered off and washed with CH_2Cl_2 (3x10 mL). The yellow solution was evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography (SiO_2 , AcOEt/Hex: 2/8) afforded a colorless oil (0.119 g, 98.5%). NMR ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 8.43 (d, $^3\text{J}=8.0$ Hz, 1H); 8.27 (d, $^3\text{J}=8.4$ Hz, 1H); 8.20 (d, $^3\text{J}=8.0$ Hz, 2H); 8.04 (t, $^3\text{J}=8.0$ Hz, 1H); 7.87 (t, $^3\text{J}=8.0$ Hz, 1H); 7.37 (m, 3H); 7.06 (m, 2H); 4.53-4.38 (m, 4H); 1.51 (m, 9H); 1.32 (s, 18H); NMR ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm) 163.90; 157.61; 152.19; 151.86; 145.65; 137.08; 134.40; 131.59; 130.10; 129.45; 126.50; 123.28; 122.95; 122.36; 81.81; 79.10; 35.62; 34.73; 31.92; 28.73; 26.73; 26.04; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}}=621.30474$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}}=621.30349$.



Umbrella thread Boc protected 2.19 was prepared following the synthetic procedure previously reportedⁱ with 88% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ

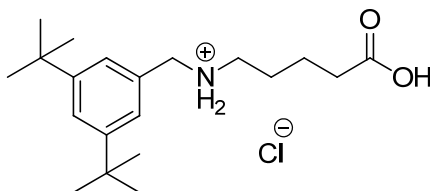


Umbrella thread Boc protected 2.20 To a solution of umbrella **2.25** (1.02 g, 1.11 mmol, 2.25 eq) in dry DMF (25 mL) were added triethylamine (0.340 mL, 2.47 mmol, 15.0 eq) and a solution of compound **2.27** (0.296 g, 0.495 mmol, 1.00 eq) in dry DMF (10 mL). The yellow solution was stirred at room temperature under N₂ for 20 h, then evaporated under vacuum. A white solid (0.231 g, 34.6%) was obtained from purification by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 85/15).^{vi}

^{vi} Characterizations available in the first route.

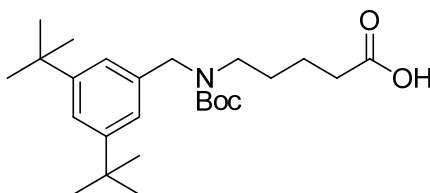
Synthesis of the linear umbrella thread

Second route



2.30

Compound 2.30 was prepared using a slightly modified literature method.^{vii} No particular precaution was taken (inert atmosphere). The crude material was purified by concretization in Et₂O to afford 58% yield without any counter-ion exchange. The product presented identical spectral data to literature.^{viii}

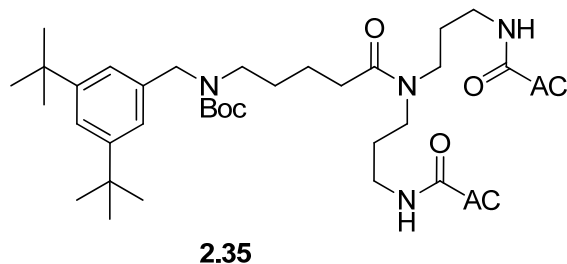


2.33

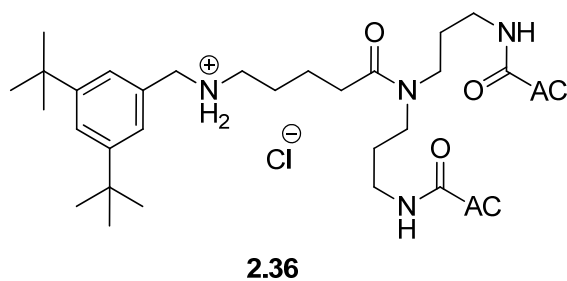
Compound 2.33 To a solution of compound **2.30** (500 mg, 1.40 mmol, 1.00 eq) and diisopropylamine (0.490 mL, 2.81 mmol, 2.00 eq) in THF (25 mL) cooled to 0°C was added dropwise a solution of di-*tert*-butyle dicarbonate (0.340 g, 1.56 mmol, 1.11 eq). The colorless mixture was stirred at room temperature for 21 h, and then evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 3/7) afforded a colorless oil (0.398 g, 67.5%). The product presented identical spectral data to that previously reported.^{viii}

^{vii} D. W. Zehnder II, D. B. Smithrud, *Org. Lett.*, **2001**, 3 (16), 2485-2487.

^{viii} I. Smukste, D. B. Smithrud, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68 (7), 2547-2558.

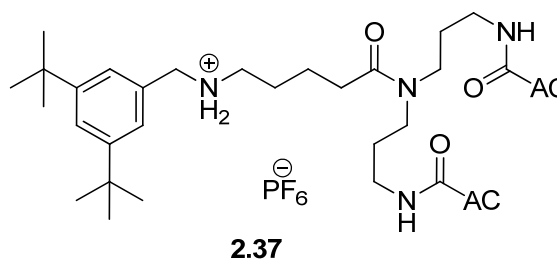


Umbrella thread Boc protected 2.35 To a solution of compound **2.33** (22.4 mg, 53.4 μmol , 1.00 eq) in dry DMF (1.5 mL) cooled to 0°C was added *N*-methylmorpholine (6.00 μL , 53.4 μmol , 1.00 eq) and isobutyl chloroformate (7.00 μL , 53.4 μmol , 1.00 eq). A solution of umbrella **2.25** (48.7 mg, 53.4 μmol , 1.00 eq) and *N*-methylmorpholine (6.00 μL , 53.4 μmol , 1.00 eq) in dry DMF (1.5 mL) was added dropwise. The light yellow mixture was stirred under N_2 at room temperature for 18 h then evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography (SiO_2 , gradient $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$: 5/95 to 3/7) gave a white solid (46.4 mg, 66.1%). NMR ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 7.30 (s, 1H); 7.04 (s, 2H); 4.37 (m, 2H); 3.95 (m, 2H); 3.83 (s, 2H); 3.42-3.09 (m, 8H); 2.64-1.37 (m, 61H); 1.30 (s, 18H); 1.30-1.11 (m, 8H); 1.09-0.80 (m, 14H); 0.66 (br s, 6H); MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}} = 1314.0$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}} = 1313.7$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}} = 1335.98$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}} = 1335.8$.



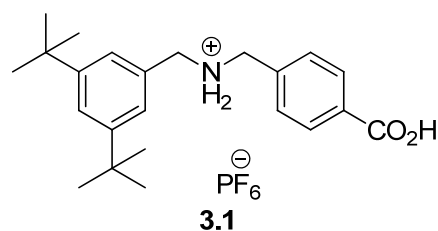
Umbrella thread chloride 2.36 To a solution of compound **2.35** (46.4 mg, 35.3 μmol , 1.00 eq) in EtOH (4.5 mL) cooled to 0°C was added a solution of HCl 4.00 M (0.66 mL, 2.6 mmol, 75 eq). The mixture was stirred at 0°C for 20 min then at room temperature for 67 h, then it was evaporated under vacuum. A yellow solid (16.4 mg, 37.2%) was obtained by recrystallization in $\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$. NMR ^1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) 7.54 (s, 1H); 7.37 (s, 2H); 4.18 (s, 2H); 3.94 (m, 2H); 3.79 (m, 2H); 3.38 (m, 2H); 3.23-3.05 (m, 6H); 2.47 (t,

$^3J=6.0$ Hz, 2H); 2.36-1.37 (m, 56H); 1.36 (s, 18H); 1.29 (m, 2H); 1.03 (m, 6H); 0.97 (m, 2H); 0.92 (s, 6H); 0.70 (br d, $^3J=3.2$ Hz, 6H).



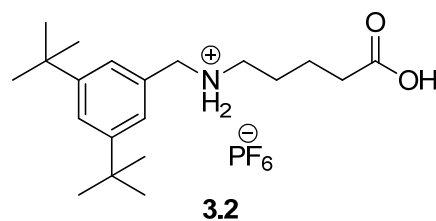
Umbrella thread hexafluorophosphate 2.37 A solution of ammonium hexafluorophosphate (0.349 g, 2.04 mmol, 10.0 eq) in minimum of water (1 mL) was added to a solution of compound **2.36** (0.255 g, 0.204 mmol, 1.00 eq) in minimum MeOH (1.8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. After evaporation in vacuo, the residue was washed with water and filtered off. The solid was washed once again with water then CHCl_3 affording a white solid (0.262 g, 94.7%). NMR ^1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) 7.54 (s, 1H); 7.37 (s, 2H); 4.18 (s, 2H); 3.95 (m, 2H); 3.79 (m, 2H); 3.38 (m, 2H); 3.24-3.06 (m, 6H); 2.47 (m, 2H); 2.35-1.37 (m, 56H); 1.35 (s, 18H); 1.25 (m, 2H); 1.07-0.94 (m, 8H); 0.92 (br s, 6H); 0.71 (br s, 6H).

Synthesis of the ammonium threads hexafluorophosphate and the DCC-rotaxanes

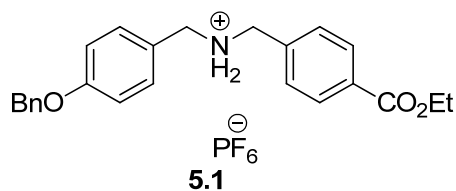


Compound 3.1 To a solution of compound **2.7** (2.24 g, 5.87 mmol, 1.00 eq) in MeOH (110 mL) was added potassium hydroxide (3.65 g, 58.7 mmol, 10.0 eq). The mixture was heated to reflux for 19 h, then cooled to room temperature. The solution was acidified to pH 1 with

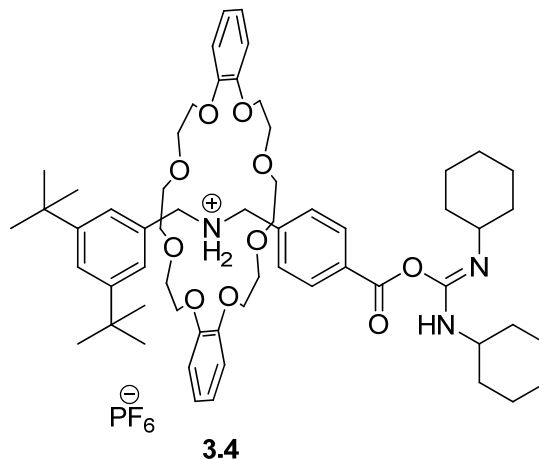
a solution of HCl 10% then concentrated in vacuo. The residue was washed with water, AcOEt, acetone and Et₂O to afford a white powder (chloride salt). To a solution of this solid in minimum MeOH was added saturated solution of ammonium hexafluorophosphate (7.83 g, 48.0 μmol, 10.0 eq) in water. The suspension was stirred overnight then filtered off and washed with water to afford a white solid (2.26 g, 77.1%). NMR ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ(ppm) 8.10 (d, ³J=7.6 Hz, 2H); 7.59 (d, ³J=7.6 Hz, 2H); 7.54 (s, 1H); 7.36 (s, 2H); 4.33 (s, 2H); 4.26 (s, 2H); 1.34 (s, 18H).



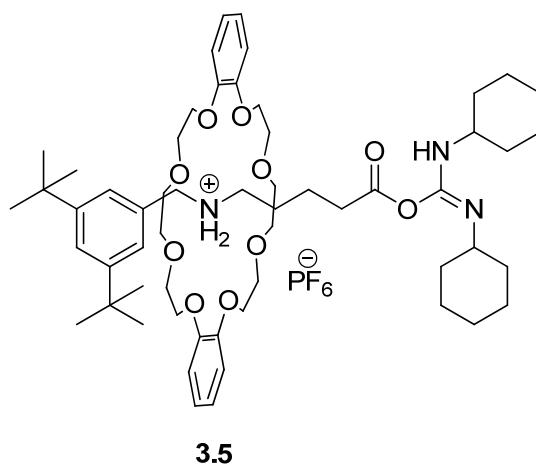
Compound 3.2 A solution of ammonium hexafluorophosphate (0.671 g, 4.12 mmol, 6.00 eq) in minimum of water was added to a solution of compound **2.30** (200 mg, 0.562 mmol, 1.00 eq) in minimum acetone. The solution was extracted with Et₂O (3x10 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated in vacuo giving a white solid (0.166 g, 63.5%). NMR ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 7.50 (s, 1H); 7.38 (s, 2H); 4.18 (s, 2H); 3.11 (m, 2H); 2.37 (m, 2H); 1.74 (m, 4H); 1.33 (s, 18H) ; NMR ¹³C (CD₃OD, 75 MHz) δ(ppm) 177.04; 152.91; 131.67; 125.10; 124.32; 52.84; 48.26; 35.65; 33.89; 31.67; 26.29; 22.59.



Compound 5.1 was prepared as described in the literature.ⁱ The product presented identical spectral data to that previously reported.ⁱ

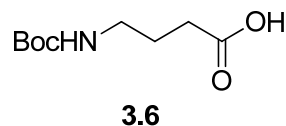


DCC-rotaxane 3.4 To a solution of compound **3.1** (0.054 g, 0.107 mmol, 1.00 eq) in CH₃CN/CHCl₃ 3/1 (10 mL) was added dibenzo-24-crown-8 (96.4 mg, 0.215 mmol, 2.00 eq). The mixture was heated to 40°C for 15 min then cooled to 0°C. Dicyclohexylcarbodiimide (26.6 mg, 0.129 mmol, 1.20 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 2 h. After evaporation in vacuo, the white solid was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 98/2) to give a white solid (0.117 g, quant.). ¹H NMR (CDCl₃/CD₃CN, 300 MHz) δ(ppm) 8.08-7.56 (m, 2H); 7.48-7.16 (m, 3H); 7.07 (m, 8H); 6.91-6.70 (m, 2H); 4.69 (m, 2H); 4.25 (m, 8H); 4.18-3.84 (m, 4H); 3.75 (m, 10H); 3.66-3.35 (m, 10H); 1.94 (m, 6H); 1.86-1.51 (m, 6H); 1.47-0.71 (m, 22H); MS ESI [M]⁺_{calc} = 1008.6, [M]⁺_{found} = 1008.5.

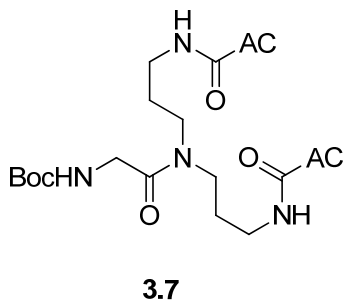


DCC-rotaxane 3.5 To a solution of compound **3.2** (0.100 g, 0.215 mmol, 1.00 eq) in CH₃CN/CHCl₃ 3/1 (10 mL) was added dibenzo-24-crown-8 (0.193 g, 0.430 mmol, 2.00 eq). The mixture was stirred at room temperature for 20 min then cooled dicyclocarbodiimide (0.0531 g, 0.258 mmol, 1.20 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 2 h. After evaporation in vacuo, the white solid was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 98/2) to give a white solid (0.166 g, 69.1%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 7.37 (s, 1H); 7.05 (m, 9H); 4.66 (s, 2H); 4.31 (m, 10H); 3.79 (m, 15H); 3.63 (m, 15H); 3.33 (t, ³J=5.6 Hz, 2H); 2.73 (t, ³J=6.4 Hz, 2H); 1.83 (m, 4H); 1.77-1.42 (m, 2H); 1.31 (m, 20H); 0.88 (m, 2H); MS ESI [M]⁺_{calc} = 974.6, [M]⁺_{found} = 974.5.

Derivatization and/or protection of the umbrella

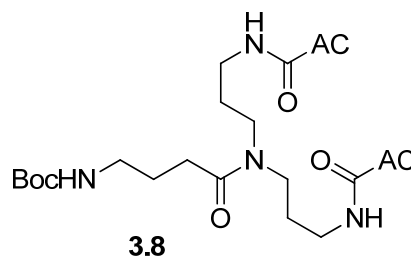


Boc protected γ-aminobutyric acid 3.6 was prepared following a modified literature procedure.^{ix} The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The crude material was purified by flash chromatography (SiO₂, AcOEt) to afford the desired product with 92%. The product presented identical spectral data to that previously reported.^{ix}

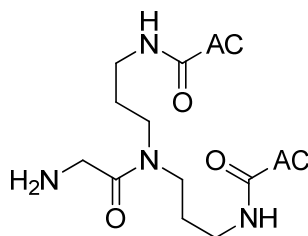


^{ix} S. Buchini, A. Buschiazzo, S. G. Withers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2700-2703.

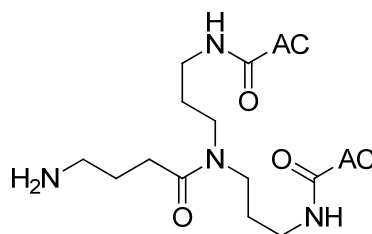
Compound 3.7 To a solution of *Boc*-Gly-OH (41.2 mg, 0.234 mmol, 1.00 eq) in dry DMF (1.5 mL) cooled to 0°C were added *N*-methylmorpholine (25.0 μL, 0.234 mmol, 1.00 eq) and isobutyl chloroformate (31.0 μL, 0.234 mmol, 1.00 eq). A solution of umbrella **2.25** (0.214 g, 0.234 mmol, 1.00 eq) and *N*-methylmorpholine (25.0 μL, 0.234 mmol, 1.00 eq) in dry DMF (2 mL) was added dropwise. The white mixture was stirred under N₂ at 0°C for 30 min then at room temperature for 18 h. The solution was evaporated under vacuum then purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 8/2) to give a light yellow solid (0.186 g, 74.1%). NMR ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 4.25 (t, ³J=1.2 Hz, 2H); 4.10-3.78 (m, 8H); 3.49-3.20 (m, 8H); 2.91 (m, 2H); 2.81 (d, ³J=4.8 Hz, 3H); 2.57-1.47 (m, 34H); 1.45 9s, 9H); 1.39 9m, 4H); 1.24 (m, 3H); 1.04 (m, 10H); 0.88 (m, 9H); 0.69 (m, 3H) ; MS ESI [M+H]⁺_{calc}= 1069.8, [M+H]⁺_{found}= 1069.8; [M+Na]⁺_{calc}= 1091.8, [M+Na]⁺_{found}= 1091.7.



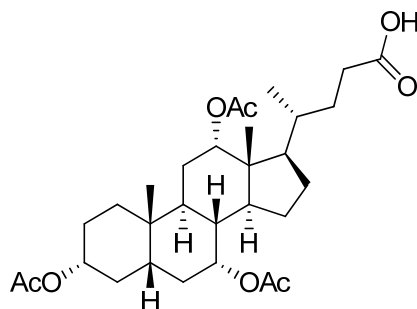
Compound 3.8 To a solution of *Boc* protected γ -aminobutyric acid **3.6** (50.0 mg, 0.246 mmol, 1.00 eq) in dry DMF (2 mL) cooled to 0°C were added *N*-methylmorpholine (27.0 μL, 0.246 mmol, 1.00 eq) and isobutyl chloroformate (31.0 μL, 0.234 mmol, 1.00 eq). A solution of umbrella **2.25** (0.224 g, 0.246 mmol, 1.00 eq) and *N*-methylmorpholine (27.0 mL, 0.246 mmol, 1.00 eq) in dry DMF (2 mL) was added dropwise. The yellow mixture was stirred under N₂ at 0°C for 30 min then at room temperature for 21 h. The solution was evaporated under vacuum then purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 8/2) to afford a yellow solid (0.174 g, 64.5%). NMR ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 4.56 (s, 1H); 3.91 (br s, 2H); 3.76 (br s, 2H); 3.34 (m, 2H); 3.27 (m, 2H); 3.19-3.01 (m, 6H); 2.35 (t, ³J=7.2 Hz, 2H); 2.31-1.43 (m, 41H); 1.40 (s, 9H); 1.38-1.20 (m, 10H); 1.09 (m, 3H); 1.00 (d, ³J=6.0 Hz, 6H); 0.93 (m, 2H); 0.88 (s, 6H); 0.67 (s, 6H) ; MS ESI [M+H]⁺_{calc}= 1097.8, [M+H]⁺_{found}= 1097.5; [M+Na]⁺_{calc}= 1119.79, [M+Na]⁺_{found}= 1119.63.

**3.9**

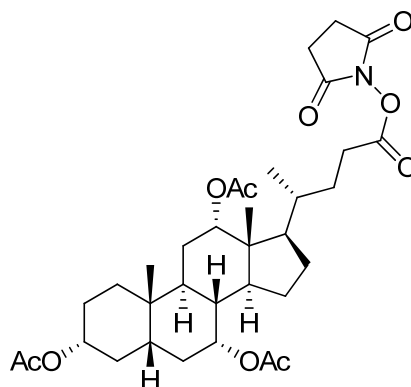
Gly derivated umbrella 3.9 To a solution of HCl 4.00 M in dioxane (1.73 mL, 6.94 mmol, 40.0 eq) was added compound **3.7** (0.186 g, 0.173 mmol, 1.00 eq) and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. After evaporation under vacuum, the residue was quenched with a saturated solution of K_2CO_3 (10 mL) forming a precipitate. A beige solid (0.168 g, quant.) was obtained by filtration. NMR 1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) 3.92 (m, 4H); 3.76 (br s, 2H); 3.42 (m, 2H); 3.27 (m, 4H); 2.47-2.15 (m, 10H); 2.07-1.06 (m, 50H); 1.02 (m, 6H); 0.96 (m, 2H); 0.88 (s, 6H); 0.68 (s, 6H) ; MS ESI $[M+H]^+$ _{calc}= 969.7, $[M+H]^+$ _{found}= 969.6; $[M+2H]^{2+}$ _{calc}= 485.4, $[M+2H]^{2+}$ _{found}= 485.5.

**3.10**

GABA derivated umbrella 3.10 To a solution of HCl 4.00 M in dioxane (1.47 mL, 5.88 mmol, 40.0 eq) was added compound **3.7** (0.161 g, 0.147 mmol, 1.00 eq) and the mixture was stirred for 4 h at room temperature. The residue was quenched with a saturated solution of K_2CO_3 (6 mL) and concentrated in vacuo. The solid was washed with water, acetone and $CHCl_3$. A brown solid (0.088 g, 60.1%) was obtained by filtration. NMR 1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) 3.91 (br s, 2H); 3.76 (br s, 2H); 3.34 (m, 2H); 3.28 (m, 4H); 3.14 (m, 4H); 3.14 (m, 4H); 2.4 0 (m, 2H); 2.23 (m, 6H); 2.07 (m, 2H); 2.03-1.13 (m, 44H); 1.08 (m, 2H); 1.00 (br d, $^3J=6.8$ Hz, 6H); 0.93 (m, 2H); 0.88 (s, 6H); 0.67 (s, 6H) ; MS ESI $[M+H]^+$ _{calc}= 997.76, $[M+H]^+$ _{found}= 997.69.

**3.14**

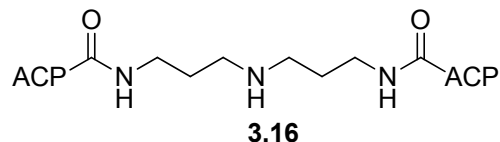
Acetyl protected cholic acid 3.14 was prepared following a modified method previously reported.^x The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, and then quenched with a solution of HCl 10%. After extraction with Et₂O, the combined organic phases were washed with a solution of HCl 10% (10 mL), H₂O (10 mL) and brine (10 mL), then dried over MgSO₄, filtered and evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 8/2) gave the desired material with 95% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.^x

**3.15**

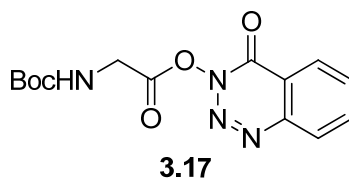
Activated protected cholic acid 3.15 To a solution of compound **3.14** (0.775 g, 1.45 mmol, 1.00 eq) in dry THF (10 mL) was added *N*-hydroxysuccinimide (0.172 g, 1.492 mmol, 1.03 eq) and the mixture was stirred at room temperature for 5 min under N₂. A solution of dicyclocarbodiimide (0.308 g, 1.49 mmol, 1.03 eq) in dry THF (5mL) was added dropwise.

^x H. Gao, J. R. Dias, *Synth. Comm.*, **1997**, 27(5), 757-776.

The solution was stirred at room temperature under N₂ for 24 h. The white suspension was filtered off and washed with AcOEt. The solution was evaporated in vacuo and the residue was purified by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 4/6) to give a white solid (0.802 g, 87.6%). NMR ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 5.07 (m, 1H); 4.88 (m, 1H); 4.55 (m, 1H); 2.82 (br s, 4H); 2.64 (m, 1H); 2.50 (m, 1H); 2.12 (s, 3H); 2.07 (s, 3H); 2.03 (s, 3H); 2.01-1.00 (m, 22H); 0.90 (s, 3H); 0.83 (br d, ³J=6.8 Hz, 3H); 0.73 (s, 3H).

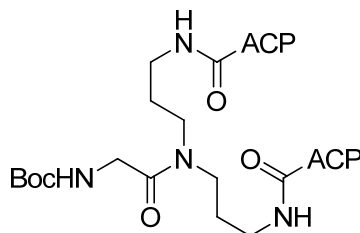


Protected umbrella 3.16 N-(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine (0.020 mL, 0.168 mmol, 1.00 eq) was added to a solution of compound **3.15** (0.212 g, 0.336 mmol, 2.00 eq) in DMF (2 mL). The solution was stirred at room temperature for 21 h, then cooled to 0°C and quenched with iced water (100 mL). The mixture was extracted with CHCl₃ (3x150 mL). The combined organic layers were washed with water (4x80 mL) and dried over MgSO₄, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography (Al₂O₃, CHCl₃/MeOH: 9/1) gave white crystals (82.3 mg, 42.0%). NMR ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 5.08 (m, 2H); 4.90 (m, 2H); 4.58 (m, 2H); 3.44 (m, 4H); 2.92 (br s, 4H); 2.30 (m, 2H); 2.14 (s, 6H); 2.09 (m, 8H); 2.05 (m, 8H); 2.03-1.01 (m, 46H); 0.91 (s, 6H); 0.82 (br d, ³J=6.8 Hz, 6H); 0.72 (s, 6H) ; HR-MS ESI [M+H]⁺_{calc}= 1164.76693, [M+H]⁺_{found}= 1164.76379; [M+Na]⁺_{calc}= 1186.74888, [M+Na]⁺_{found}= 1186.74685.

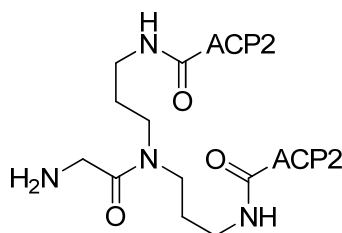


Compound 3.17 To a solution of *Boc*-Gly-OH (50.0 mg, 0.285 mmol, 1.00 eq) in dry CH₂Cl₂ (7 mL) were added 3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4-one (52.3 mg, 0.314 mmol, 1.10 eq) and dicyclocarbodiimide (65.4 mg, 0.314 mmol, 1.10 eq). The mixture was stirred at room temperature for 24 h under N₂. The white solid was filtered off and washed with CH₂Cl₂. The colorless solution was evaporated under vacuum. The white solid was washed

with Et₂O and filtered off. The yellow solution was evaporated in vacuo then purified by flash chromatography (SiO₂, Hex/AcOEt: 4/6) to afford a white solid (38.0 mg, 41.6%). NMR ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 8.36 (d, ³J=8.0 Hz, 1H); 8.22 (d, ³J=8.0 Hz, 1H); 8.01 (t, ³J=8.0 Hz, 1H), 7.84 (t, ³J=8.0 Hz, 1H); 4.43 (m, 2H); 1.45 (m, 9H).

**3.18**

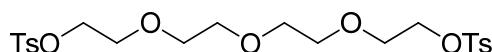
Compound 3.18 To a solution of protected umbrella **3.16** (7.50 mg, 0.064 mmol, 2.25 eq) in dry DMF (2 mL) were added triethylamine (60.0 μL, 0.429 mmol, 15.0 eq) and compound **3.17** (9.20 mg, 28.6 μmol, 1.00 eq). The dark yellow solution was stirred at room temperature under N₂ for 22 h, then evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 9/1) afforded a brown oil (38.6 mg, quant.). NMR ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ(ppm) 5.06 (m, 2H); 4.88 (m, 2H); 4.55 (m, 2H); 3.92 (s, 2H); 3.40 (m, 2H); 3.25 (m, 4H); 3.15 (m, 2H); 2.27 (m, 2H); 2.11 (m, 6H); 2.06 (m, 6H); 2.02 (s, 6H); 2.01-1.44 (m, 34H); 1.42 (s, 9H); 1.41-1.20 (m, 10H); 1.15-0.98 (m, 4H); 0.89 (s, 6H); 0.80 (m, 6H); 0.70 (s, 6H); MS ESI [M+Na]⁺_{calc} = 1343.8, [M+Na]⁺_{found} = 1343.7.

**3.19**

Protected derivated umbrella 3.19 To a solution of HCl 4.00 N in dioxane (0.380 mL, 1.53 mol, 40.0 eq) was added compound **3.18** (50.7 mg, 0.0384 mmol, 1.00 eq). The solution was stirred at room temperature for 5 h then quenched with a saturated solution of K₂CO₃ (20 mL). The solution was concentrated under vacuum. After addition of water, the brown

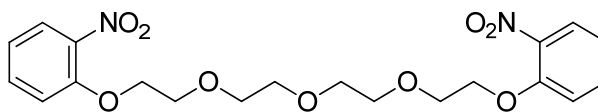
solid was filtered off affording a light yellow solid (20.8 mg, 47.6%). NMR ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 5.07 (br s, 2H); 4.89 (br s, 2H); 4.03 (m, 2H); 3.56-3.08 (m, 10H); 2.23 9m, 2H); 2.16-2.05 (m, 14H); 2.06 -0.95 (m, 48H); 0.90 (br s, 6H); 0.81 (m, 6H); 0.71 (br s, 6H) ; MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}} = 1137.78$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}} = 1137.6$.

Synthesis of the clips



3.21

Tetra(ethylene glycol) di-p-tosylate 3.21 was prepared following the synthetic procedure previously described^{xi} with 87% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.^{xi}



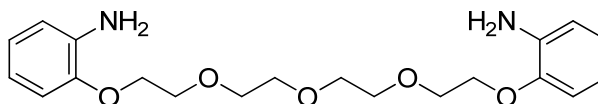
3.22

1,11-Bis(2-nitrophenoxy)-3,6,9-trioxaundecane 3.22 was prepared following a modified synthetic procedure.^{xii} The reaction media was heated to reflux for 21 h then cooled to room temperature and concentrated in vacuo. The dark orange residue was dissolved in water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with water, dried over MgSO_4 and evaporated under vacuum. The desired product was obtained from purification by flash chromatography (SiO_2 , Hex/AcOEt: 3/7) with 63% yield. NMR ^1H (CDCl_3 , 400 MHz)

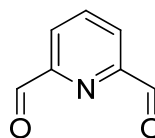
^{xi} K. M. Bongers, R. J. B. H. N. Van den Berg, L. H. Heitman, A. P. IJzerman, J. Oosterom, C. M. Timmers, H. S. Overkleeft, G. A. Van der Marel, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 4841-4856.

^{xii} J. Kim, T. Morozumi, H. Hiraga, H. Nakamura, *Anal. Sci.*, **2009**, *Vol. 29*, No. 11, 1319-1325.

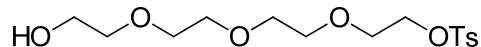
δ (ppm) 7.80 (dd, $^3J=8.0$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, 2H); 7.50 (td, $^3J=7.9$ Hz, $^4J=1.7$ Hz, 2H); 7.08 (dd, $^3J=7.9$ Hz, $^4J=0.7$ Hz, 2H); 7.01 (td, $^3J=7.8$ Hz, $^4J=1.1$ Hz, 2H); 4.25 (t, $^3J=4.6$ Hz, 4H); 3.89 (t, $^3J=4.9$ Hz, 4H); 3.77-3.57 (m, 8H); NMR ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm) 152.39; 140.20; 134.18; 125.64; 120.65; 115.10; 71.19; 70.75; 69.68; 69.37 ; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{NH}_4]^+_{\text{calc}}=454.18201$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+_{\text{found}}=454.18246$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}}=459.1374$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}}=459.13839$.

**3.23**

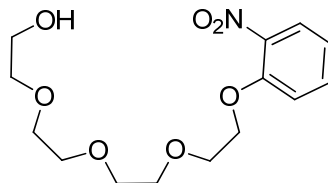
Clip 3.23 was prepared following a modified synthetic procedure.^{xii} To a solution of compound **3.24** (0.629 g, 1.44 mmol, 1.00 eq) in EtOH (30 mL) was added palladium on activated charcoal 10% (0.154 g, 0.144 mmol, 0.10 eq) and the solution was heated to 50°C. A solution of hydrazine hydrate 50-60% (1.98 mL, 20.2 mmol, 14.0 eq) in EtOH (5 mL) was added dropwise at 50°C then the mixture was heated to reflux for 3 h. The black mixture was filtered over celite and the yellow solution was evaporated under vacuum giving a white viscous oil (0.439 g, 80.8%). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 6.87-6.65 (m, 8H); 4.33 (br s, 2H); 4.17-4.07 (m, 4H); 3.89- 3.79 (m, 4H); 3.77-3.62 (m, 10H) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 146.75; 136.23; 122.00; 119.07; 116.03; 113.33; 70.83; 70.72; 69.86; 68.63 ; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}}=377.2071$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}}=377.20767$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}}=399.18904$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}}=399.1902$.

**3.24**

2,6-Pyridinedicarboxaldehyde **3.24** was prepared following the synthetic procedure previously reported^{xiii} with 29% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.^{xiii}

**3.25**

Compound **3.25** was prepared following the synthetic procedure previously reported^{xiv} with 89% yield. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 7.80 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 7.34 (d, ³J=8.4 Hz, 2H); 4.16 (t, ³J=4.2 Hz, 2H); 3.76-3.55 (m, 14H); 2.44 (s, 3H) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 144.97; 133.09; 129.99; 128.15; 72.60; 70.88; 70.79; 70.60; 70.46; 69.37; 68.84; 61.88; 21.79 ; HR-MS ESI [M+H]⁺_{calc}= 349.1316, [M+H]⁺_{found}= 349.133; [M+NH₄]⁺_{calc}= 366.1581, [M+NH₄]⁺_{found}= 366.159.

**3.26**

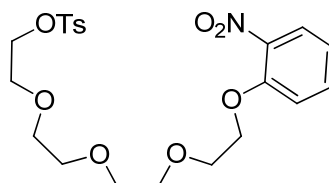
1-Hydroxy-11-(2'-nitrophenoxy)-3,6,9-trioxaundecane **3.26** was prepared using a different method from the one from literature.^{xv} To a solution of 2-nitrophenol (0.024 g, 0.172 mmol, 1.00 eq) and potassium carbonate (23.8 mg, 0.172 mmol, 1 eq) in DMF (0.6 mL) was added a solution of the previous compound (60.0 mg, 0.172 mmol, 1.00 eq) in DMF (0.4 mL). The orange mixture was heated to reflux for 16 h then cooled down to room temperature. The solvent was concentrated in vacuo. The residue was quenched with H₂O (15 mL) then extracted with AcOEt (3x15 mL). The organic layer was washed with H₂O

^{xiii} X. Zhang, Penn State Res. Found., *AU 5777300 A*, 04 Jan **2001**.

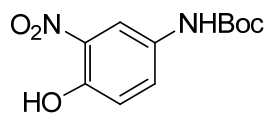
^{xiv} P. S. Shirude, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 5207-5215.

^{xv} M. Kimura, K. Kajita, N. Onoda, S. Morosawa, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55(16), 4887-4892.

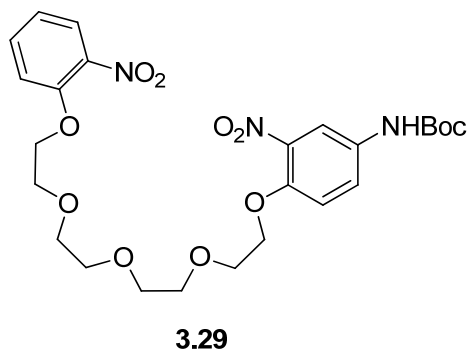
(3x15 mL) then dried over MgSO₄, filtered off and evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 95/5) afforded a brown oil (36.1 mg, 66.4%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 7.82 (d, ³J=8.1 Hz, 1H); 7.52 (t, ³J=8.0 Hz, 1H); 7.11 (d, ³J=8.7 Hz, 1H); 7.03 (t, ³J=7.8 Hz, 1H); 4.27 (t, ³J=4.5 Hz, 2H); 3.91 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.81-3.57 (m, 12H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 152.39; 140.19; 134.22; 125.74; 120.76; 115.04; 72.58; 71.24; 70.72; 70.44; 69.73; 69.39; 61.87; HR-MS ESI [M+H]⁺_{calc} = 316.13908, [M+H]⁺_{found} = 316.14054.

**3.27**

Compound 3.27 To a solution of compound **3.26** (2.12 g, 6.72 mmol, 1.00 eq) and triethylamine (1.41 mL, 10.1 mmol, 1.50 eq) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (1.54 g, 8.08 mmol, 1.20 eq) in CH₂Cl₂ (20 mL). The yellow suspension was stirred at room temperature for 24 h then washed with a saturated solution of NaHCO₃ (100 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3x50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered off and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH: 98/2) gave a yellow oil (2.41 g, 76.2%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 7.80 (m, 3H); 7.51 (t, ³J=8.0 Hz, 1H); 7.33 (d, ³J=8.1 Hz, 2H); 7.10 (d, ³J=8.4 Hz, 1H); 7.03 (t, ³J=7.8 Hz, 1H); 4.26 (t, ³J=4.5 Hz, 2H); 4.15 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.90 (t, ³J=4.8 Hz, 2H); 3.73 (m, 2H); 3.67 (t, ³J=5.1 Hz, 2H); 3.62 (m, 2H); 3.58 (s, 4H); 2.43 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 152.39; 144.93; 140.20; 134.23; 133.08; 129.95; 128.12; 125.70; 120.71; 115.07; 71.20; 70.85; 70.81; 70.63; 69.72; 69.40; 68.78; 21.77; HR-MS ESI [M+H]⁺_{calc} = 470.14793, [M+H]⁺_{found} = 470.14721.

**3.28**

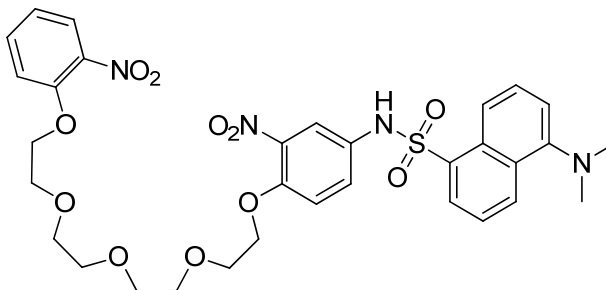
2-Nitro-4-(1,1-dimethylethoxycarbonylamino)phenol **3.28** was prepared using a different method from the one from literature.^{xvi} To a solution of 4-amino-2-nitrophenol (0.250 g, 1.62 mmol, 1.00 eq) in THF (3 mL) was added a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (0.389 g, 1.78 mmol, 1.10 eq). The dark red media was heated to reflux for 24 h then cooled to room temperature. It was diluted with AcOEt (10 mL) and washed with a solution of HCl 1% (5 mL), H₂O (5 mL), a saturated solution of NaHCO₃ (5 mL) and brine (5 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered off and evaporated in vacuo. A yellow solid (0.342 g, 82.8%) was obtained from purification by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 2/8). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ(ppm) 10.36 (s, 1H); 8.18 (br s, 1H); 7.57 (d, ³J=7.8 Hz, 1H); 7.10 (d, ³J=9.0 Hz, 1H); 6.46 (s, 1H); 1.52 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ(ppm) 152.80; 151.16; 133.24; 131.39; 129.33; 120.38; 114.08; 81.51; 28.40; HR-MS ESI [M+Na]⁺_{calc} = 277.07949, [M+Na]⁺_{found} = 277.08006.



Compound 3.29 To a solution of compound **3.28** (1.57 g, 3.33 mmol, 1.30 eq) and potassium carbonate (1.10 g, 4.61 mmol, 1.80 eq) in DMF (20 mL) was added 2-nitro-4-(1,1-dimethylethoxycarbonyl amino)phenol **3.22** (0.660 g, 2.56 mmol, 1.00 eq). The brown solution was heated to 85°C for 18 h and quenched with H₂O (100 mL) then extracted with AcOEt (3x50 mL). The organic layer was washed with brine (3x30 mL), dried over MgSO₄, filtered off and evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (SiO₂, AcOEt/Hex: 6/4) gave a yellow solid (1.11 g, 78.8%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)

^{xvi} M. E. Duggan, M. S. Egbertson, G. D. Hartman, S. D. Young, N. C. Ihle, Merck and Co. Inc., US 5854245, Jun. 26 1997.

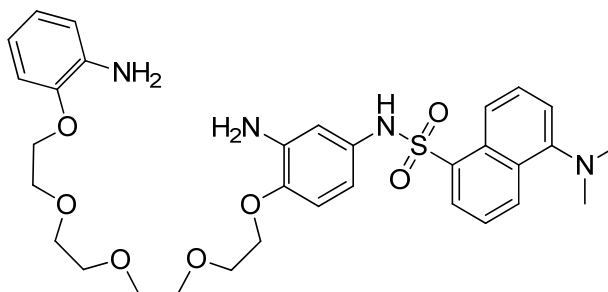
δ (ppm) 7.92 (s, 1H); 7.81 (d, $^3J=9.0$ Hz, 1H); 7.49 (m, 2H); 7.09 (d, $^3J=6.0$ Hz, 1H); 7.04 (m, 2H); 6.65 (s, 1H); 4.21 (m, 4H); 3.87 (m, 4H); 3.72 (m, 4H); 3.66 (m, 4H); 1.50 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 153.79; 141.50; 140.38; 134.24; 125.70; 120.69; 116.41; 112.30; 106.41; 106.22; 100.61; 96.48; 92.67; 79.44; 74.53; 71.22; 71.21; 71.19; 70.78; 70.77; 70.70; 70.33; 69.72; 69.55; 69.41; 68.55; 28.41; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}}=574.20073$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}}=574.20259$.



3.31

Compound 3.31 Compound **3.29** (0.521 g, 0.944 mmol, 1.00 eq) was dissolved in a solution of trifluoroacetic acid (4.70 mL, 63.2 mmol, 67.0 eq) in CH_2Cl_2 (20 mL). The brown solution was stirred at room temperature for 4 h then diluted with CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with a saturated solution of K_2CO_3 (30 mL) and brine (30 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered off and evaporated in vacuo affording a viscous orange oil (0.412 g, 96.6%) directly used in the next step. To a solution of the previous compound (0.481 g, 1.07 mmol, 1.00 eq) in CH_2Cl_2 (3 mL) cooled to 0°C was added pyridine (0.650 mL, 7.99 mmol, 7.50 eq). A solution of dansyl chloride (0.356 g, 63.2 mmol, 1.20 eq) in CH_2Cl_2 (6 mL) was added dropwise and the ice bath was removed. The orange mixture was stirred at room temperature for 2 h then diluted with CH_2Cl_2 (20 mL) and washed with a saturated solution of NaHCO_3 (30 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3x10 mL) and the combined organic layers were washed with a solution of HCl 1 M (30 mL), dried over MgSO_4 , filtered off and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography (SiO_2 , AcOEt/Hex: 7/3) afforded a yellow oil (0.588 g, 80.7%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 8.62 (br s, 1H); 8.34 (d, $^3J=8.8$ Hz, 1H); 8.08 (d, $^3J=7.2$ Hz, 1H); 7.81 (dd, $^3J=8.0$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, 1H); 7.61 (t, $^3J=8.0$ Hz, 1H); 7.48 (m, 2H); 7.18 (dd,

$^3J=8.8$ Hz, $^4J=2.8$ Hz, 1H); 7.09 (d, $^3J=8.0$ Hz, 1H); 7.01 (t, $^3J=8.4$ Hz, 1H); 6.91 (d, $^3J=9.2$ Hz, 1H); 4.24 (t, $^3J=5.2$ Hz, 2H); 4.14 (m, 2H); 3.87 (t, $^3J=4.8$ Hz, 2H); 3.81 (t, $^3J=4.4$ Hz, 2H); 3.69 (m, 4H); 3.61 (m, 4H); 2.96 (br s, 6H) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 152.36; 150.10; 140.06; 139.57; 134.29; 133.74; 131.12; 130.97; 130.59; 129.57; 129.44; 128.91; 128.75; 125.67; 123.51; 120.67; 118.80; 115.93; 115.72; 115.04; 106.88; 104.40; 71.14; 71.09; 70.67; 69.92; 69.64; 69.32; 45.62; 29.80 ; HR-MS ESI $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}}=685.21741$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}}=685.21824$; $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}}=707.19935$, $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}}=707.20001$.

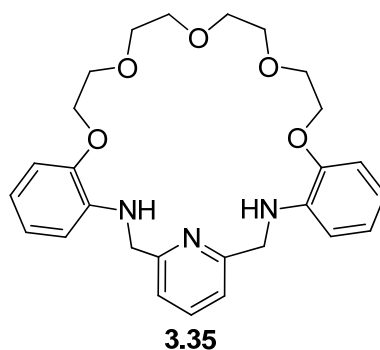


3.32

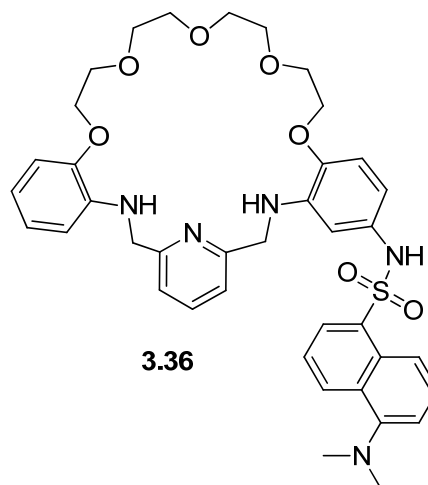
Fluorescent clip 3.32 To a suspension of compound **3.31** (0.588 g, 0.859 mmol, 1.00 eq) and palladium on activated charcoal 10% (0.091 g, 0.086 mmol, 0.10 eq) in EtOH (11 mL) at 50°C was added dropwise a solution of hydrazine hydrate 50% (1.17 mL, 12.0 mmol, 14.0 eq) in EtOH (4 mL). The black mixture was heated to reflux for 2 h then cooled to room temperature and filtered on celite. The yellow solution was evaporated in vacuo. A yellow oil (0.464 g, 86.4%) was obtained from purification by flash chromatography (SiO_2 , AcOEt). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 8.47 (d, $^3J=8.8$ Hz, 1H); 8.33 (d, $^3J=8.8$ Hz, 1H); 8.08 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H); 7.53 (t, $^3J=8.0$ Hz, 1H); 7.39 (t, $^3J=8.0$ Hz, 1H); 7.17 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H); 6.74 (m, 3H); 6.45 (d, $^3J=8.8$ Hz, 1H); 6.31 (d, $^3J=2.4$ Hz, 1H); 6.18 (dd, $^3J=8.8$ Hz, $^4J=2.4$ Hz, 1H); 4.11 (m, 2H); 3.97 (m, 2H); 3.80 (m, 2H); 3.75-3.59 (m, 12H); 2.87 (s, 6H) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 146.94; 145.94; 137.45; 136.51; 135.67; 134.59; 130.75; 130.61; 130.55; 130.32; 129.83; 128.50; 123.34; 122.06; 119.58; 119.00; 116.44; 115.26; 113.98; 113.24; 112.68; 119.00; 116.44; 115.26; 113.98; 113.24; 112.68; 110.54; 70.84; 70.74; 70.64; 69.89; 69.68; 69.10. 68.54; 45.57; 18.17 ; HR-MS ESI

$[M+H]^+_{calc} = 625.26900$, $[M+H]^+_{found} = 625.26940$; $[M+Na]^+_{calc} = 647.25100$, $[M+Na]^+_{found} = 647.25170$.

Formation of wheels and rotaxanes

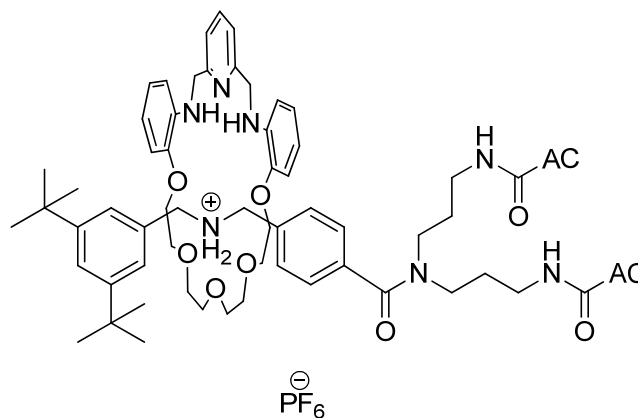


Wheel 3.35 was prepared following the synthetic procedure previously describedⁱ with 81% yield. The product presented identical spectral data to that previously reported.



Fluorescent wheel 3.36 A solution of compound **3.2** (0.039 g, 0.084 mmol, 1.0 eq), clip **3.32** (0.052 g, 0.084 mmol, 1.0 eq) and 2,6-pyridinedicarboxaldehyde **3.24** (0.011 g, 0.084 mmol, 1.0 eq) in MeCN (5 mL) was stirred at room temperature for 4 h. Borane tetrahydrofuran 1.0 M (0.42 mL, 0.42 mmol, 5.0 eq) was added and the mixture was stirred for 20 h at room temperature and was filtered off. The yellow solution was evaporated in vacuo. A yellow solid (0.062 g, quant.) was obtained from purification by flash

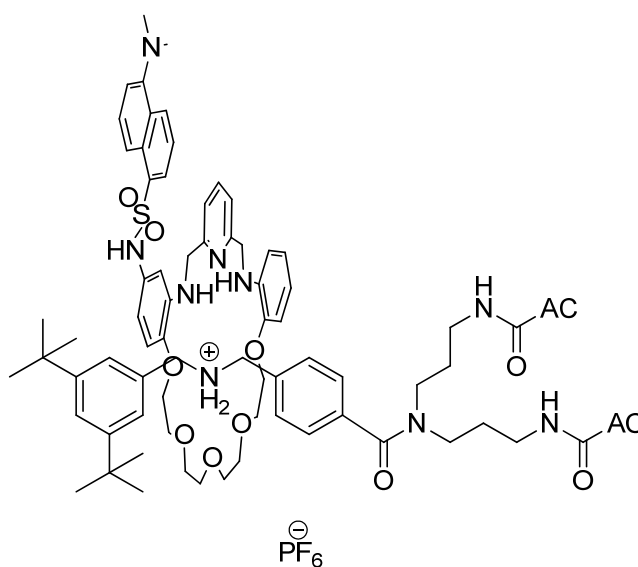
chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH : 95/5). ¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz) δ(ppm) 8.46 (d, ³J=8.8 Hz, 1H), 8.30 (d, ³J=8.4 Hz, 1H), 8.02 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H); 7.59 (m, 2H); 7.42 (t, ³J=8.0 Hz, 1H); 7.22 (t, ³J=8.0 Hz, 2H); 6.98 (d, ³J= 7.6 Hz, 1H); 6.87 (m, 1H); 6.61 (m, 3H); 6.18 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=2.8 Hz, 1H); 6.10 (d, ³J=2.4 Hz, 1H); 5.45 (s, 1H); 4.43 (s, 2H); 4.14-4.08 (m, 4H); 3.94 (m, 2H); 3.75 (m, 2H); 3.64 (m, 2H); 3.59 (m, 2H); 3.54 (m, 2H); 3.45 (m, 4H); 2.82 (s, 6H) ; ¹³C NMR (CD₃CN, 75 MHz) δ(ppm) 159.06; 158.80; 153.02; 147.14; 144.54; 141.20; 140.61; 138.18; 135.56; 132.77; 131.39; 131.29; 130.49; 130.42; 129.23; 124.22; 123.45; 120.96; 120.58; 119.74; 117.29; 116.22; 115.58; 114.70; 111.28; 110.34; 105.17; 71.40; 71.30; 71.19; 70.81; 70.60; 70.33; 49.41; 49.28; 45.67 ; HR-MS ESI [M+H]⁺_{calc} = 728.31125, [M+H]⁺_{found} = 728.31223 ; [M+Na]⁺_{calc} = 750.29319, [M+H]⁺_{found} = 750.29446.



3.37

Umbrella rotaxane 3.37 A solution of umbrella thread hexafluorophosphate **2.24** (24.8 mg, 0.0178 mmol, 1.00 eq), 2,6-pyridinedicarboxaldehyde **3.24** (2.40 mg, 0.0178 mmol, 1.00 eq) and clip **3.23** (6.70 mg, 0.0178 mmol, 1.00 eq) in acetonitrile (0.6 mL) was stirred at room temperature for 5 h. Borane tetrahydrofuran 1.00 M (90 μL, 0.089 mmol, 5.0 eq) was added and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. The yellow solution was evaporated under vacuum. The yellow solid was purified by flash chromatography (SiO₂, CHCl₃/MeOH: 85/15) to afford a white solid (7.0 mg, 21%). ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ(ppm) 7.80 (t, ³J=7.6 Hz, 1H); 7.47 (s, 1H); 7.37 (d, ³J=7.6 Hz, 2H), 7.28 (m, 2H), 6.97 (m, 4H); 6.79-6.64 (m, 6H); 6.42 (d, ³J=8.0 Hz, 2H), 4.59 (m, 4H); 4.27 (m, 2H); 4.16-3.63

(m, 20H); 3.51-3.35 (m, 8H); 3.28-3.10 (m, 4H); 2.38-1.31 (m, 50H); 1.09 (s, 18H); 1.07-0.93 (m, 9H); 0.90 (m, 6H); 0.68 (m, 6H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm) 160.41; 153.56; 148.21; 139.72; 139.20; 138.22; 135.40; 133.31; 129.06; 128.97; 128.65; 128.52; 125.65; 124.41; 123.30; 122.79; 121.19; 120.24; 113.99; 113.91; 111.36; 73.99; 72.86; 72.46; 72.38; 71.70; 69.03; 68.68; 65.47; 62.82; 54.47; 53.14; 50.58; 47.50; 43.16; 42.97; 40.99; 40.45; 36.48; 35.89; 35.77; 33.06; 31.70; 31.16; 30.74; 30.15; 29.60; 28.45; 27.86; 24.25; 23.72; 23.19; 14.43; 13.08; 12.86; HR-MS ESI $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}_{\text{calc}} = 864.59307$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}_{\text{found}} = 864.59207$; $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{calc}} = 1728.17830$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{found}} = 1728.17622$.



3.39

Fluorescent umbrella rotaxane 3.39 A solution of umbrella thread hexafluorophosphate **2.24** (7.6 mg, 0.055 mmol, 1.0 eq), 2,6-pyridinedicarboxaldehyde **3.24** (3.0 mg, 0.022 mmol, 1.0 eq) and fluorescent clip **3.32** (14 mg, 0.022 mmol, 1.0 eq) in acetonitrile (1 mL) was stirred at room temperature for 5 h. Borane tetrahydrofuran 1.0 M (0.11 mL, 0.090 mmol, 20 eq) was added and the mixture was stirred for 21 h at room temperature then filtered off. The solution was evaporated under vacuum. The yellow solid was purified by flash chromatography (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15) then by preparative TLC (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15) to afford a yellow solid (6.0 mg, 51%). ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) 8.51 (m, 1H); 8.34 (d, $^3\text{J}=8.8$ Hz, 1H); 7.93 (m, 1H); 7.59 (m, 2H); 7.48-7.12 (m, 8H); 6.94 (br s, 2H); 6.92-6.58 (m, 7H); 6.40 (m, 1H); 4.57 (m, 1H); 4.12-3.33 (m,

31H); 3.18 (m, 2H); 2.88 (br s, 6H); 2.76 (m, 2H); 2.59-1.23 (m, 48H); 1.13-1.00 (m, 24H); 1.01-0.80 (m, 12H); 0.77-0.57 (m, 6H) ; ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) $\delta(\text{ppm})$ 156.28; 153.52; 145.49; 139.66; 138.57; 138.23; 136.68; 133.20; 132.23; 131.36; 131.24; 131.13; 131.06; 129.33; 128.91; 128.83; 128.52; 128.33; 125.71; 125.56; 124.42; 124.25; 123.52; 123.19; 122.80; 120.67; 116.55; 111.30; 73.99; 72.86; 72.53; 72.30; 72.21; 71.66; 71.53; 69.02; 68.72; 68.64; 54.37; 50.92; 47.49; 45.89; 43.16; 42.98; 41.00; 40.46; 38.07; 37.87; 37.10; 37.00; 36.89; 36.48; 35.89; 35.72; 35.45; 34.26; 33.35; 33.14; 33.06; 32.04; 31.99; 31.90; 31.80; 31.63; 31.18; 30.75; 30.45; 30.12; 29.59; 28.76; 28.56; 27.87; 24.25; 23.73; 23.20; 18.02; 17.79; 14.44; 13.08 ; HR-MS ESI $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}_{\text{calc}} = 988.62376$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}_{\text{found}} = 988.62582$; $[\text{M}+\text{H}]^{+}_{\text{calc}} = 1976.24025$, $[\text{M}+\text{H}]^{+}_{\text{found}} = 1976.23629$.