



HAL
open science

Polymérisation supramoléculaire de cyclodextrines : application à la compaction d'ADN

Julien Rossignol

► **To cite this version:**

Julien Rossignol. Polymérisation supramoléculaire de cyclodextrines : application à la compaction d'ADN. Polymères. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066639 . tel-01625943

HAL Id: tel-01625943

<https://theses.hal.science/tel-01625943>

Submitted on 30 Oct 2017

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

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

Université Pierre et Marie Curie

ED 406 - Chimie Moléculaire de Paris Centre
Institut Parisien de Chimie Moléculaire - Equipe GOBS

**Polymérisation supramoléculaire de cyclodextrines
Application à la compaction d'ADN**

Par Julien Rossignol
Thèse de doctorat de chimie

Dirigée par le Professeur Matthieu Sollogoub

Soutenance prévue le 28 octobre 2016

Devant un jury composé de :

M. Nicolas Giuseppone	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
M. Eric Monflier	Professeur, Université d'Artois	Rapporteur
M. Damien Baigl	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
M. Matthieu Sollogoub	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Directeur de thèse
M. Laurent Bouteiller	Directeur de recherche, Université Pierre et Marie Curie	Invité
M. Mickaël Ménand	Maître de conférence, Université Pierre et Marie Curie	Invité

Hâtez-vous lentement, et sans perdre courage,
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage,
Polissez-le sans cesse, et le repolissez,
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez.

Boileau, *L'Art Poétique*, Chant 1

REMERCIEMENTS

Je remercie les Professeurs Nicolas Giuseppone et Eric Monflier d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse.

Je remercie aussi nos collaborateurs et notamment le Professeur Damien Baigl et le Docteur Sergii Rudiuk de m'avoir permis d'explorer de nouveaux horizons scientifiques permettant de mettre en valeur notre travail. Je remercie aussi le Docteur Laurent Bouteiller et Gaëlle Pembouong pour leur aide dans la caractérisation de nos systèmes supramoléculaires.

Enfin, je remercie le Professeur Matthieu Sollogoub et le Docteur Mickaël Ménand de m'avoir accompagné dans la conduite de ce projet de thèse et dans l'écriture de ce manuscrit.

ABSTRACT

The synthesis of defined nanometric structures in water remains a challenge for supramolecular chemists. The interaction between adamantane and β cyclodextrin was thus used to build new supramolecular polymers in solution. The use of a bridged structure enabled us to suppress the self-inclusion phenomenon and to enhance the solubility of our compounds. Supramolecular polymers were characterised using several techniques (ROE, ITC, DOSY, SANS), forming linear species up to 26 polymerised units. These structures were used to condense DNA at low concentrations, taking advantage on their host-guest behavior. Another condensation mechanism was discovered, involving non-specific interactions between cyclodextrins. The same structures were used to transfect plasmidic DNA, but were inefficient. This could be due to their low charge density.

KEY WORDS : cyclodextrin, adamantane, host-guest, supramolecular polymerisation, DNA, condensation, transfection

RÉSUMÉ

La formation de structures nanométriques définies dans l'eau demeure un défi pour les chimistes supramoléculaires. L'interaction entre cyclodextrines β et adamantane a ici été utilisée pour former des polymères supramoléculaires en solution. L'utilisation d'une structure pontée nous a permis d'éviter la formation de l'espèce auto-incluse et d'augmenter la solubilité de nos dérivés. Les polymères supramoléculaires ont été caractérisés par différentes techniques (ROE, ITC, DOSY, SANS), et forment des espèces linéaires en solution allant jusqu'à 26 unités polymérisées. Celles-ci ont été utilisées pour compacter de l'ADN à des concentrations basses en mettant à profit l'association entre monomères. Un deuxième mécanisme, reposant sur des interactions non spécifiques entre cyclodextrines, a aussi été observé. Enfin, les structures synthétisées ont été utilisées dans la transfection d'ADN plasmidique, mais ne sont pas efficaces. Ce comportement pourrait provenir de leur faible densité de charge.

MOTS CLÉS : cyclodextrine, adamantane, hôte-invité, polymérisation supramoléculaire, ADN, compaction, transfection

TABLE DES MATIÈRES

I	INTRODUCTION	1
1	BIOMIMÉTISME ET CHIMIE SUPRAMOLÉCULAIRE	3
1.1	La nature comme modèle	3
1.2	Chimie bio-inspirée	4
1.3	Virus de la mosaïque du tabac	5
1.3.1	Découverte	5
1.3.2	Structure générale du virus	6
1.3.3	Formation du virus	7
1.3.4	Interactions ARN - capsid	8
1.3.5	Désassemblage du virus	11
1.4	Interactions utilisables	12
II	CONSTRUCTION D'UN SYSTÈME SUPRAMOLÉCULAIRE INSPIRÉ PAR LE VMT	15
2	ASSEMBLAGE DE CYCLODEXTRINES POUR FORMER UN POLYMÈRE SUPRAMOLÉCULAIRE	17
2.1	Complexes d'inclusion à partir de cyclodextrines	17
2.1.1	Cyclodextrines : structure et propriétés	17
2.1.2	Complexes d'inclusion	18
2.1.3	Applications des complexes d'inclusion de cyclodextrines	21
2.2	Fonctionnalisation de cyclodextrines	22
2.2.1	Fonctionnalisation directe	23
2.2.2	Utilisation de groupements protecteurs	27
2.3	Association supramoléculaire de cyclodextrines et caractérisation	30
2.3.1	Modes d'association entre monomères	31
2.3.2	Caractérisation des polymères supramoléculaires	35
2.4	Revue des polymères supramoléculaires à partir de cyclodextrines dans l'eau	47
2.4.1	Structures fondées sur la cyclodextrine α	47
2.4.2	Structures fondées sur la cyclodextrine β	52
2.4.3	Structures alternant cyclodextrines α et β	54
2.5	Optimisation de la polymérisation supramoléculaire de cyclodextrines	56
2.5.1	Considérations initiales et expériences préliminaires	56
2.5.2	Limitation des équilibres défavorables	57
2.6	Système ponté par le diaminobutane	57
2.6.1	Conception du système	57
2.6.2	Synthèse	60
2.6.3	Caractérisation	63
2.7	Système ponté par deux triazoles	71
2.7.1	Synthèse	72
2.7.2	Caractérisation	73
2.8	Conclusion	77

3	ASSEMBLAGE D'UN POLYMÈRE SUPRAMOLÉCULAIRE AVEC L'ADN	79
3.1	Concept de compaction	79
3.2	<i>In vivo</i>	81
3.2.1	Stratégies mises en place	81
3.2.2	Implications biologiques	83
3.3	<i>In vitro</i>	85
3.3.1	Polycations et chaînes polycationiques covalentes	85
3.3.2	Polymères neutres et tensioactifs cationiques	90
3.4	Interactions entre monomères AB et ADN	92
3.4.1	Système expérimental	93
3.4.2	Expériences préliminaires	94
3.4.3	Etude de monomères AB dans la compaction de l'ADN	97
3.5	Conclusion	103
4	TRANSFERT DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE PAR UN ASSEMBLAGE CYCLO- DEXTRINES / ADN	105
4.1	Transfection d'ADN	105
4.1.1	Vecteurs utilisables	106
4.2	Utilisation de cyclodextrines di chargées en transfection	111
4.2.1	Choix du plasmide	111
4.2.2	Compaction de plasmides	111
4.2.3	Transfection	115
4.3	Conclusion	117
III	CONCLUSION	119
5	RÉSULTATS OBTENUS ET PERSPECTIVES	121
5.1	Résultats	121
5.2	Perspectives	121
IV	EXPERIMENTAL PART	125
6	EXPERIMENTAL PART	127
6.1	Synthesis	127
6.2	Supramolecular polymers characterisation	153
6.3	Microscopy	153
6.4	DNA condensation curves	155
V	APPENDICE	157
A	APPENDICE	159
A.1	Catémères	159
A.1.1	Formes cristallines des acides carboxyliques	159
A.1.2	Facteurs influençant la formation de catémères	159
A.1.3	Dérivés d'adamantane	161
A.2	Modèle isodesmique	164
A.3	Condensation de contre-ions	166
	BIBLIOGRAPHIE	169

ABRÉVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AFM	Atomic Force Microscopy
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Bz	Benzoyle
C	Cytosine
CD	Cyclodextrine
CPHC	Chaîne Polymère Hautement Chargée
CPRG	Chlorophenol red β -D-Galactopyranose
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DIBAL-H	Diisobutylaluminium hydride
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
D _p	Degré de polymérisation
EDCI	1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl)Carbodiimide
EM	Effective Molarity
G	Guanine
Glc	Glucose
HOBt	Hydroxybenzotriazole
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PAMAM	Polyamidoamine
pb	Paire de bases
Pd/C	Palladium sur Charbon
PEG	Polyéthylenglycol
PEI	Polyéthylèneimine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
r.t.	Room Temperature
SANS	Small Angle Neutron Scattering
T	Thymine
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle

TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofurane
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Uracile
VdW	Van der Waals
VMT	Virus de la Mosaique du Tabac
VPO	Vapor Pressure Osmometry

Première partie

INTRODUCTION

1.1 LA NATURE COMME MODÈLE

Depuis les débuts de l'épopée de l'Homme, celui-ci a cherché à imiter ce qu'il observait dans la nature. Dédale mit au point des ailes reproduisant celles des oiseaux pour son fils Icare¹. Jigoro Kano aurait inventé le Judo en voyant les branches d'un saule ployer sous le poids de la neige. Le Corbusier créa une échelle lui permettant de structurer ses bâtiments aux dimensions humaines² et Gaudí conçut le toit de la Sagrada Família comme une canopée soutenue par des troncs de pierre. La nature est ainsi source d'inspiration dans de nombreuses disciplines.

Beaucoup d'inventions résultent de l'observation du monde environnant. Le Velcro®(issu de la combinaison des mots « velours » et « crochet ») fut mis au point par George de Mestral en 1948. Se demandant pourquoi son chien revenait couvert de graines de bardane après chacune de ses parties de chasse, il eut l'idée d'observer au microscope la structure de celles-ci. Il put alors voir qu'elles possédaient une multitude de petits crochets souples leur permettant de s'accrocher à une pièce de tissu ou à une fourrure de chien (Figure 1). En utilisant deux pièces faites en nylon, l'une munie d'une multitude de boucles, et l'autre de crochets, il inventa une technologie maintenant à l'origine de 134 brevets.

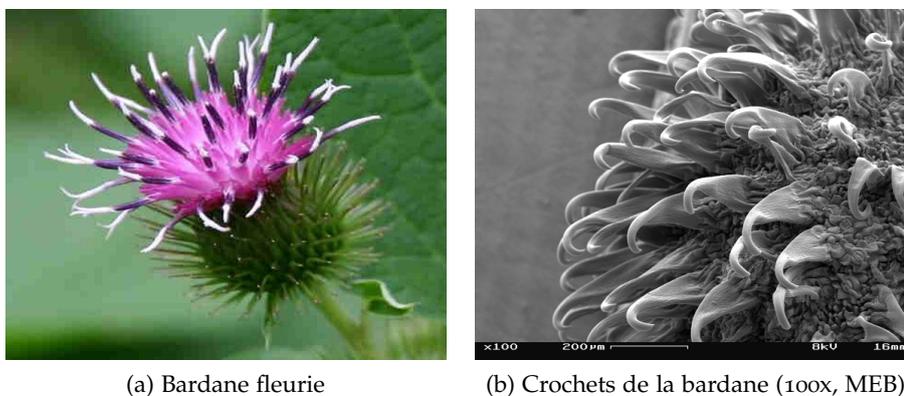


FIGURE 1 – Structure de la bardane à différentes échelles

L'imitation de la nature, ou biomimétisme, a évolué au cours des siècles grâce au progrès des techniques d'observation. En l'absence de microscope, il aurait été impossible pour George de Mestral d'inventer le Velcro®. Ainsi, les développements techniques ont permis à de nombreux phénomènes d'être élucidés et mimés avec bénéfice par l'Homme. On peut citer, à titre d'exemple, la superhydrophobie (faculté pour une surface d'être très difficilement mouillable) à l'origine de l'effet Lotus, qui donne l'impression que les gouttes d'eau glissent à la surface des feuilles de cette

1. Ovide, *Métamorphoses*, VIII, 183-235

2. Le Corbusier, *Le Modulor*

plante. Cet effet est connu depuis des millénaires en Asie³ mais son explication n'est venue que dans les années 70 lorsque les techniques de microscopie ont permis de décrire avec précision la structure de la surface des feuilles de lotus (Figure 2). Ces observations et la rationalisation de ce phénomène (la feuille est composée d'un ensemble de pics recouverts de cire hydrophobe, qui empêchent les interactions favorables avec les gouttes d'eau) ont aussi donné naissance à de nombreuses applications (peinture auto-nettoyante par exemple).

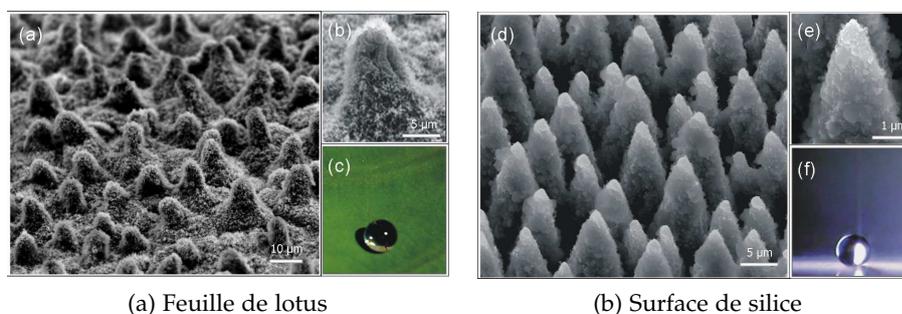


FIGURE 2 – Comparaison de la structure de la feuille de lotus et de son analogue silicié et du comportement d'une goutte d'eau à leur surface.[1]

1.2 CHIMIE BIO-INSPIRÉE

Si la compréhension de phénomènes naturels ayant lieu à l'échelle microscopique est devenue plus aisée avec l'évolution des techniques, les mimer reste une tâche complexe. En particulier, dans le domaine de la chimie, la synthèse de produits naturels reste une tâche extrêmement difficile. Les enzymes permettent aux systèmes biologiques des transformations efficaces et spécifiques, et il est souvent ardu de trouver les conditions permettant de les égaler. Ce domaine de la chimie est intimement lié à l'invention de nouvelles méthodes permettant de convertir des groupes fonctionnels ou de créer de nouvelles liaisons covalentes de manière spécifique. Ces méthodes peuvent ensuite être employées pour la synthèse de structures complexes naturelles.

Plus récemment, un domaine explorant les molécules et leurs interactions à une échelle plus grande a émergé : il s'agit de la chimie supramoléculaire. Jean-Marie Lehn la définit comme la chimie « au-delà de la molécule », c'est-à-dire ne considérant plus celle-ci comme une entité isolée, mais étudiant les interactions intermoléculaires et la possibilité de former des « supermolécules » par le biais d'interactions de faible énergie. Ce domaine est intimement lié au biomimétisme, car les interactions intermoléculaires jouent des rôles de première importance dans le vivant (Figure 3).

En effet, celles-ci sont à l'origine de l'association de phospholipides formant une bicouche lipidique et permettant la compartimentation nécessaire à la vie. Elles permettent aussi l'adhésion cellulaire *via* des protéines situées à la surface des membranes. Cette adhésion est nécessaire à la formation d'organismes complexes pluricellulaires. De plus, ces interactions sont primordiales dans le fonctionnement du

3. Il en est fait référence dans le Bhagavad-Gita (5.10), l'un des textes fondateurs de l'hindouisme : « De même que l'eau ne mouille pas les feuilles du lotus, le péché n'affecte pas celui qui, sans attachement, s'acquitte de son devoir, en offrant ses fruits au Seigneur Suprême »

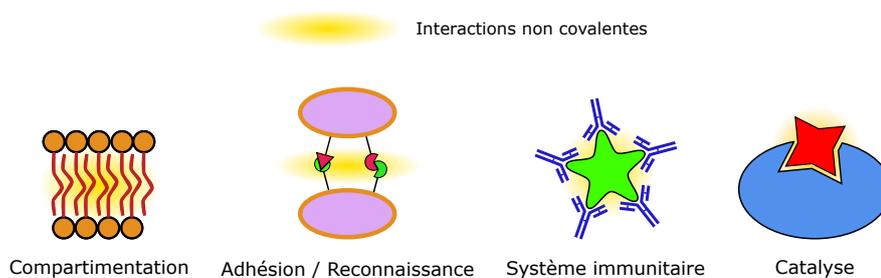


FIGURE 3 – Exemples de phénomènes faisant intervenir des interactions non covalentes *in vivo*.

système immunitaire, où des anticorps se lient à leurs antigènes de manière non covalente, afin de permettre leur détection et leur élimination. Enfin, l'exemple le plus frappant pour le chimiste est certainement le fonctionnement des enzymes évoquées précédemment, catalyseurs naturels permettant la transformation chimique de molécules en stabilisant un état de transition au sein de leur site actif par des interactions de faible énergie. L'activité de celles-ci est souvent conditionnée à la présence de cofacteurs, et modulée par la présence d'effecteurs allostériques, interagissant eux aussi de manière non covalente avec l'enzyme.

Ces interactions sont aussi présentes dans la structure quaternaire des protéines qui permet à plusieurs sous-unités d'interagir. La structure alors obtenue acquiert de nouvelles propriétés par cet assemblage. Ce phénomène est visible dans la formation du collagène, où des peptides identiques s'assemblent en triple hélices, en fibrilles puis en fibres. Cette protéine structurale est la plus répandue chez les mammifères, et ses propriétés mécaniques résultent directement de cet assemblage particulier. Il est aussi possible d'avoir un assemblage concerté où des molécules de nature différentes interagissent de manière complémentaire. On peut citer à titre d'exemple le virus de la mosaïque du tabac (VMT), où les interactions entre l'ARN viral et les peptides formant la capsidie sont à l'origine d'une structure hélicoïdale particulière jouant un rôle majeur dans son cycle de réplication.

Ainsi, l'un des défis pour les chimistes supramoléculaires consiste à essayer de mimer ces assemblages complexes, et de faire émerger de nouvelles propriétés à partir de l'association de plusieurs entités. Afin de mimer la nature, il convient de connaître les interactions moléculaires utilisées dans ces assemblages soumis au processus évolutif depuis des millions d'années.

Nous proposons donc ici une revue des interactions de faible énergie intermoléculaires et notions importantes intervenant dans la formation de structures supramoléculaires naturelles en prenant pour exemple le virus de la mosaïque du tabac (Figure 4).

1.3 VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC

1.3.1 Découverte

Le virus de la mosaïque du tabac (VMT) est connu depuis le XIX^e siècle même si son identification comme virus ne date que des années 30. Ce virus est l'un des plus étudiés en raison de sa facilité de production et de son innocuité.[2]

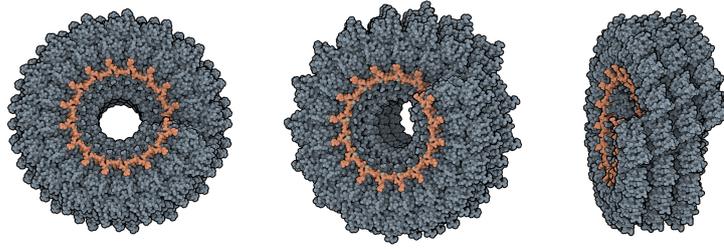


FIGURE 4 – Structure hélicoïdale du VMT résultant des interactions entre sa capside et son ADN. Seules 49 sous-unités sont ici représentées.

Après l'identification de sa structure (prix Nobel de chimie 1946), il fallut près de 40 ans pour avoir une idée plus précise de la manière dont ce virus se formait. Ces travaux aboutirent au prix Nobel de chimie 1982 attribué à Klug pour « ses recherches sur la microscopie électronique cristallographique et ses découvertes sur la structure des complexes protéines - acides nucléiques biologiquement importants ».

En reprenant les travaux de Klug et les données cristallographiques les plus récentes disponibles, nous allons nous intéresser à la structure de ce virus et aux facteurs qui lui permettent de se former. Cela nous permettra d'introduire les concepts et notions utiles dans la formation synthétique de supermolécules biomimétiques.

1.3.2 Structure générale du virus

Le VMT est un virus comportant un ARN simple brin protégé par un manteau composé de 2130 protéines identiques. Il a une forme cylindrique d'une longueur de 300 nm et une section de 18 nm en moyenne. La capside possède un creux de 4 nm de diamètre sur toute sa longueur et l'ARN y est disposé de manière hélicoïdale (Figure 5).

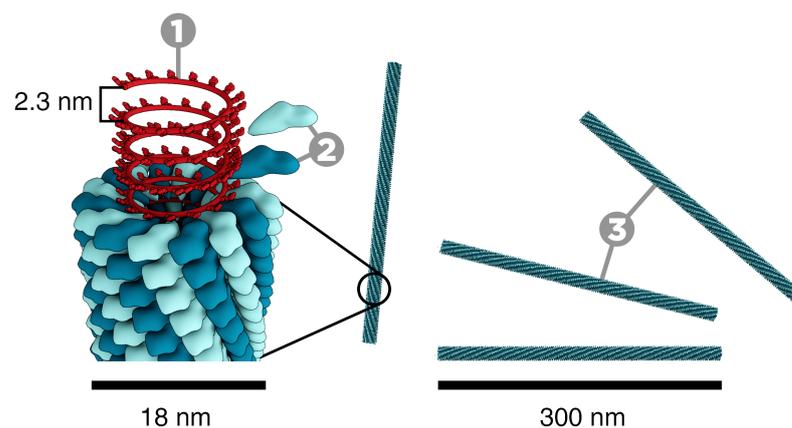


FIGURE 5 – Structure générale du VMT :

1 - ARN viral 2 - Protéines du manteau 3 - Capside protéique

1.3.3 Formation du virus

La structure de la capside du virus est composée d'un assemblage hélicoïdal de protéines, avec 16,3 protéines par tour d'hélice. Cependant, contrairement à ce qui avait d'abord été postulé, la capside n'est pas formée préalablement à la fixation de l'ARN à l'intérieur de celle-ci.

En effet, dans des conditions physiologiques et en l'absence d'ARN, seuls deux anneaux empilés (17 unités protéiques chacun) se forment. Si on ajoute l'ARN viral à ces anneaux, il y a formation du virus.[3]

En l'absence d'ARN, les deux anneaux ne sont pas parfaitement superposés : ils ne sont en contact que par leur partie externe. Une fois l'ARN viral en contact avec l'interface des deux anneaux, ceux-ci changent de morphologie pour constituer la base hélicoïdale du virus. L'ARN se réorganise alors jusqu'à ce qu'une boucle soit accessible à deux autres anneaux qui répètent ce processus jusqu'à l'assemblage complet de la capside (Figure 6).

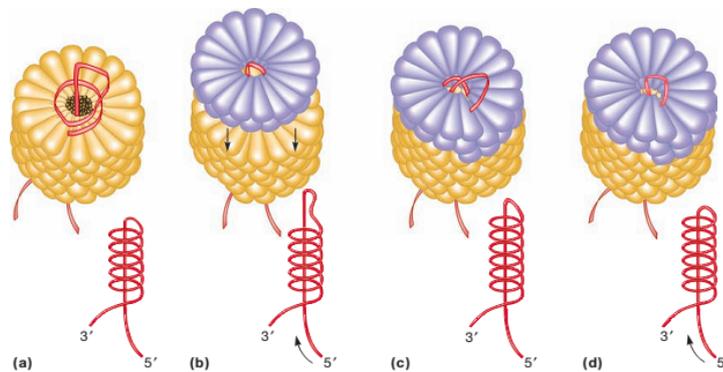


FIGURE 6 – Étapes de l'assemblage du VMT :

- (a) Après l'ajout de deux anneaux à la capside, une boucle d'ARN est accessible
- (b) Un dimère d'anneaux peut alors interagir avec celle-ci
- (c) Cela provoque un changement de structure du dimère
- (d) Il peut donc s'empiler sur la capside. L'ARN se réorganise pour reformer une boucle.

L'assemblage du virus fait appel à plusieurs notions de chimie supramoléculaire. La première étape, consistant à former l'empilement des deux anneaux correspond à un auto-assemblage. En effet, cette association est spontanée, réversible, et repose sur des interactions non covalentes. Il y a ensuite complémentarité (géométrique et chimique) entre cet empilement et l'ARN du virus. On peut aussi observer un phénomène de coopérativité positive : la première association entre ARN et protéines est la plus coûteuse énergétiquement. L'ajout d'autres sous-unités est favorisé par la stabilisation mutuelle de l'ARN et des anneaux protéiques. Cela correspond à un processus de nucléation-élongation caractéristique des systèmes coopératifs supramoléculaires (Figure 7).

Nous allons ici détailler les interactions ARN - protéine au sein du VMT, conduisant à son auto-assemblage coopératif. Cela nous permettra de faire un bilan des interactions non-covalentes utilisables en solvant aqueux afin de former des structures nanométriques définies.

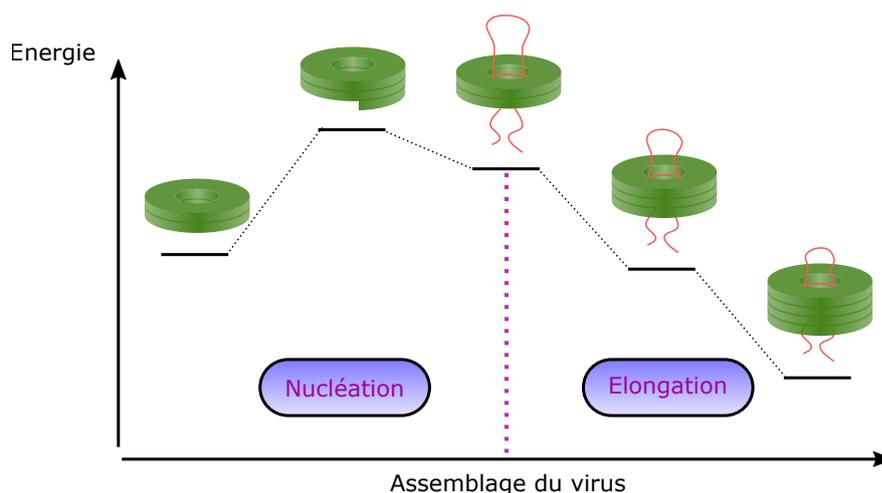


FIGURE 7 – Processus de nucléation-élongation à l'origine de la formation du VMT

1.3.4 Interactions ARN - capsid

Les nucléotides formant la molécule d'ARN peuvent être décomposés en trois parties : une base azotée, un ribose et un groupement phosphate (Figure 8). Chacune est responsable de diverses interactions avec les protéines de la capsid et nous allons ici les résumer.

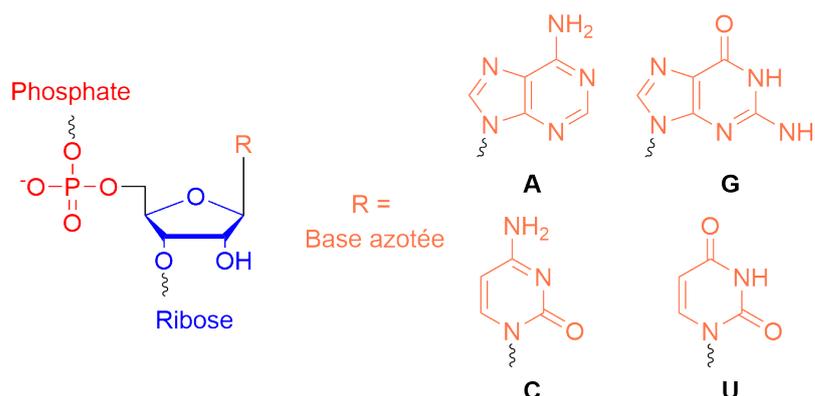


FIGURE 8 – Structure d'un nucléotide

L'unité de base d'interaction entre l'ARN et la capsid se compose d'un trinucéotide et d'une unité protéique. Le trinucéotide présent dans la structure cristallographique nous servant de référence est GAA.[4]

1.3.4.1 Interactions base - protéine

Les travaux menés par Zimmern ont montré que le processus d'assemblage du virus nécessitait une séquence spécifique d'ARN.[5] En effet, il est nécessaire d'avoir une base guanine tous les trois nucléotides sur un nombre conséquent de triplets (environ 30) afin d'obtenir un assemblage efficace. En son absence, il n'y a pas de nucléation et le virus ne peut se former.

D'après les études structurales faites à partir de VMT cristallisés, trois interactions sont majoritairement responsables de cet effet : deux liaisons hydrogène et une interaction de type Van der Waals.

Les liaisons hydrogène sont des cas particuliers d'interactions dipôle-dipôle et engagent un donneur d'hydrogène ainsi qu'un accepteur. L'hydrogène (δ^+), interagit avec l'atome donneur, riche en électrons (δ^-). Ici, les liaisons hydrogène se font entre les résidus aspartate 115 (accepteur) et l'amine de la guanine, et entre l'arginine 122 (donneur) et l'oxygène de la guanine (Figure 9).

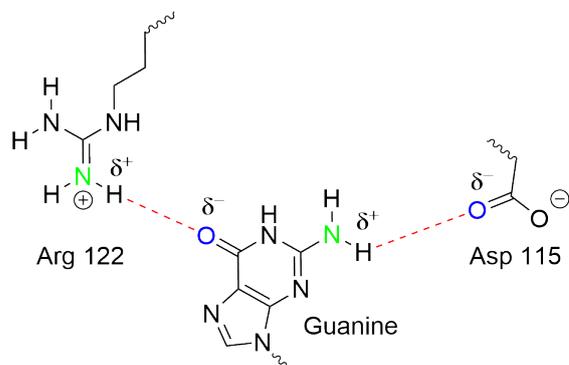


FIGURE 9 – Liaisons hydrogène entre l'arginine 122, l'aspartate 115 et la guanine

L'un des hydrogènes de l'arginine, lié à un hétéroatome chargé positivement, est très appauvri en électrons. Il peut donc interagir avec l'oxygène de la guanine qui possède deux doublets non liants. De même, l'un des hydrogènes de la guanine, lié à un azote plus électronégatif que lui, est aussi appauvri. Il interagit avec un oxygène de l'aspartate, enrichi par la délocalisation d'une charge négative.

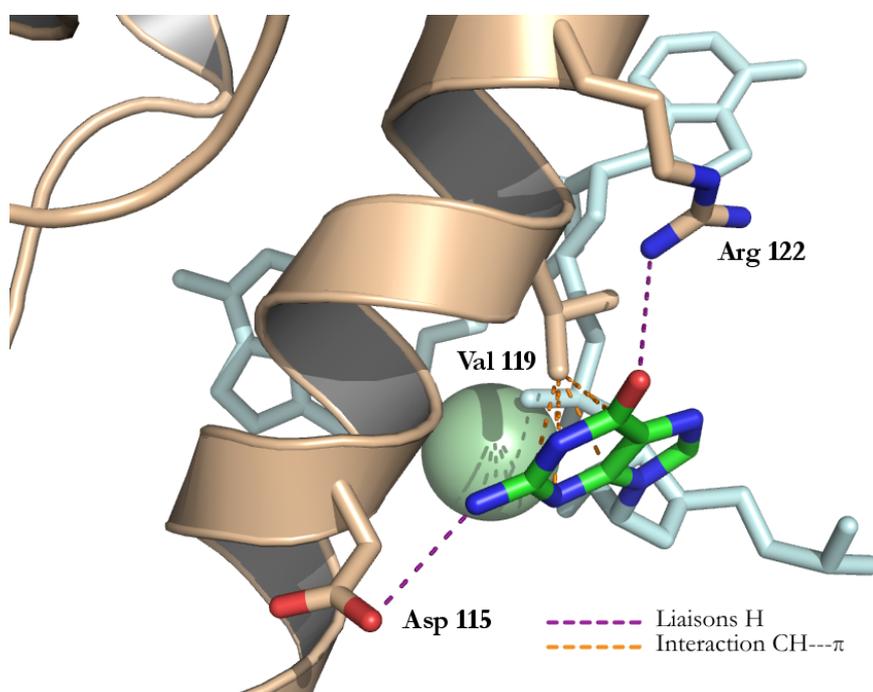


FIGURE 10 – Interactions entre guanine et capside

Les autres bases sont discriminées car elles ne possèdent pas la bonne taille (C), ou le bon arrangement d'atomes accepteurs et donateurs de liaisons hydrogène (A, U) pour se fixer au site de liaison. De plus, une interaction de type CH— π entre un méthyle de la valine 119 et la surface de la guanine stabilise la liaison de l'ARN à la protéine (Figure 10). Elle peut-être assimilée à une liaison hydrogène très faible en considérant le carbone méthylique comme atome donneur et le nuage π comme accepteur. Elle résulte majoritairement de forces dispersives ainsi que d'une interaction électrostatique de moindre ampleur.[6] Bien que moins stabilisante que la liaison hydrogène, cette interaction joue un rôle important dans nombre de structures protéiques pouvant se lier à des guanines.[7]

1.3.4.2 Interactions ribose - protéine

Les expériences de Gallie ont montré que le VMT avait une forte spécificité pour l'ARN par rapport à l'ADN. En effet, même si la séquence est identique, le virus ne s'assemble pas quand il est mis en présence d'ADN.[8] Cette différence de comportement peut avoir deux origines : le remplacement de l'uracile par la thymine dans l'ADN, ou l'absence d'hydroxyle en 2' dans les molécules d'ADN (Figure 11).

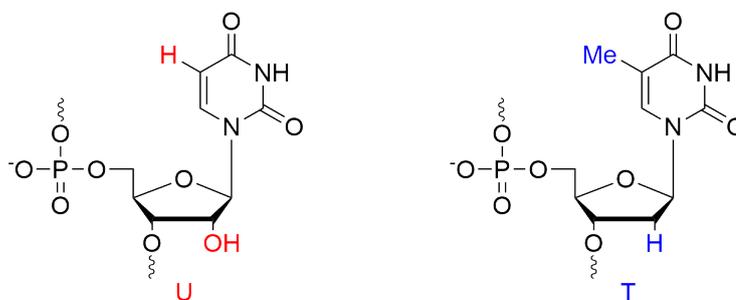


FIGURE 11 – Différences structurales entre Uracile et Thymine

On peut supposer que la présence du méthyle dans la structure de la thymine gêne le processus de nucléation. Il est par contre établi que les hydroxyles en 2' jouent un rôle dans la formation du VMT.

Cela est visible dans la structure cristallographique où l'hydroxyle du ribose de la guanosine interagit par liaison hydrogène avec l'aspartate 115 et stabilise son positionnement. Il chélate aussi un ion calcium qui joue un rôle majeur dans l'activité virale comme nous le verrons ensuite. Cet ion calcium est aussi chélaté par l'aspartate 115 et l'hydroxyle a donc ici un double rôle structurant.

Le sucre de l'adénosine située après la guanosine joue aussi un rôle en compensant des charges. En effet, d'après la structure cristallographique on remarque que les phosphates des adénosines 2 et 3 sont très proches (5,16 Å). Leurs charges négatives se repoussant, cela n'est rendu possible que par la présence de groupes permettant de diminuer localement la densité de charge. Ici, l'hydroxyle de l'adénosine 2 établit une liaison hydrogène avec le phosphate de l'adénosine 3, ce qui permet de stabiliser la structure en diminuant les répulsions électrostatiques (Figure 12).

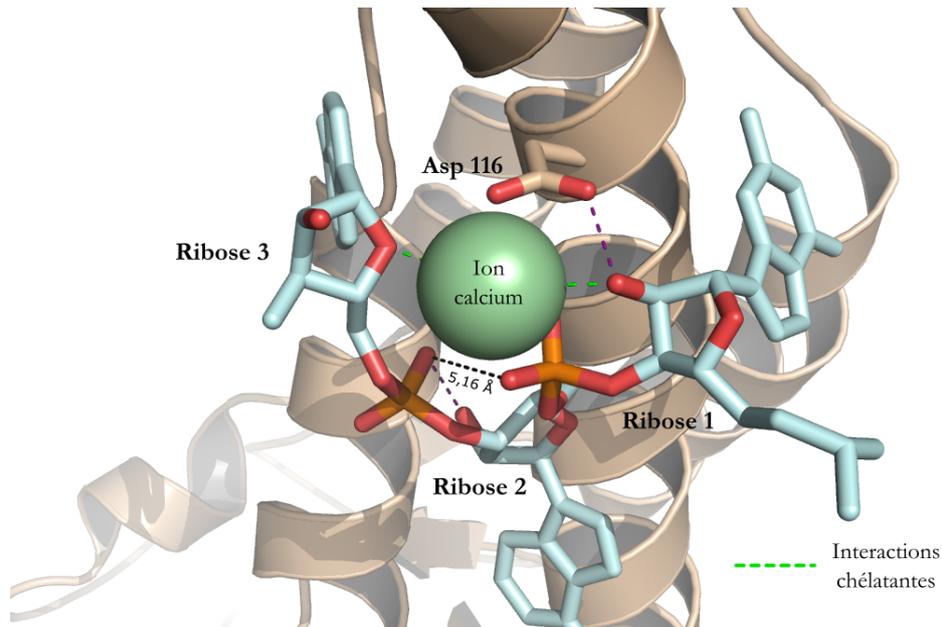


FIGURE 12 – Interactions des riboses structurant le VMT

1.3.4.3 Interactions phosphate - protéine

Les interactions entre les phosphates et les acides aminés de la protéine sont de nature électrostatique. On observe une complémentarité de charges entre des résidus chargés positivement (arginine majoritairement) et les phosphates chargés négativement. Ils participent aussi à la chélation de l'ion calcium discutée précédemment. Une des caractéristiques remarquables est la présence d'une interaction déstabilisante entre un résidu aspartate 116 et le phosphate de l'adénosine 2. Cela peut paraître surprenant mais se comprend : les virus ont évolué pour avoir une structure plus proche de l'équilibre métastable que du minimum énergétique. En effet, une structure trop stable constituerait un frein à la libération du matériel génétique du virus une fois son hôte infecté.

1.3.5 Désassemblage du virus

Une des autres caractéristiques de cette structure est sa faculté à répondre aux stimuli extérieurs. Une fois l'hôte infecté, celle-ci doit pouvoir se désassembler afin de permettre l'accès à son matériel génétique par les ribosomes de la cellule.

Lorsque le virus est dans le milieu extracellulaire, il possède au sein de sa structure un certain nombre d'ions Ca^{2+} ainsi que des protons. Ces espèces diminuent les répulsions intercharges qui peuvent exister entre des carboxylates et/ou des phosphates. Une fois le virus internalisé par une cellule, il change d'environnement. Les concentrations en Ca^{2+} et H^+ sont plus faibles. Ainsi, les protons et les ions calcium sont relargués dans le milieu intracellulaire, et ne diminuent plus les répulsions entre charges négatives. La structure de la capsid est donc déstabilisée. Cette hypothèse fut formulée en premier par Caspar qui identifia les carboxylates (résidus glutamate et aspartate) disposés en couronne et majoritairement responsables de cet effet (Figure 13).[9]

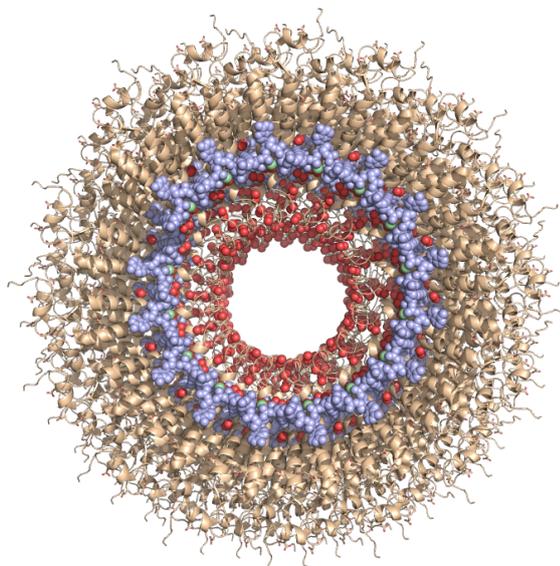


FIGURE 13 – Vue du VMT le long de son axe de symétrie.

La couronne de **carboxylates** est stabilisée par des protons et des **ions calcium**. Lorsque le VMT pénètre dans une cellule, sa structure est déstabilisée par le départ de ses cations et son **ADN** peut alors être transcrit.

Les 69 premiers nucléotides de l'ARN du VMT ne possèdent pas de guanine, ils constituent donc la partie la plus affectée par cette déstabilisation. Cela conduit au désassemblage de 5 tours de capsid, ce qui rend l'extrémité 5' de l'ARN accessible. Le reste de la structure est aussi déstabilisé mais reste en place. Une fois qu'un ribosome commence à traduire l'ARN viral, le reste de la structure se désassemble et le cycle de réplication viral commence.

1.4 INTERACTIONS UTILISABLES

Nous avons vu que la structure du VMT repose principalement sur deux types d'interactions : liaisons hydrogène et interactions électrostatiques. Cependant, un autre type d'interaction est nécessaire pour l'association des unités protéiques entre elles : il s'agit de l'effet hydrophobe. Il repose sur les interactions entre l'eau et des espèces chimiques peu ou pas polaires. Les interactions entre l'eau et ces molécules sont défavorables car celles-ci ne peuvent ni former de liaisons hydrogène avec elle, ni interagir favorablement avec elle comme dipôle. Il est alors plus favorable énergétiquement de minimiser les contacts entre l'eau et ces molécules. Cela aboutit à une agglomération de celles-ci et peut permettre un assemblage. Dans le VMT, on peut observer la présence de domaines hydrophobes stabilisant la structure en anneaux puis en hélice. Ceux-ci sont d'une importance majeure pour limiter le nombre de molécules d'eau dans la structure. En effet, l'eau est un solvant compétiteur pour la formation de liaisons hydrogène ainsi que pour les effets électrostatiques qu'elle écranterait fortement. L'effet hydrophobe est en revanche le plus fort dans l'eau. Il est donc souvent utilisé comme force motrice principale dans la synthèse de supermolécules en milieu aqueux.

Malgré de nombreuses avancées en chimie supramoléculaire, il reste à l'heure actuelle encore impossible de former des structures de taille entre 10 et 1000 nanomètres, dans l'eau, de manière contrôlée et hiérarchique, comme cela peut s'observer dans la nature. Nous avons vu avec l'étude de la structure du VMT que les interactions sélectionnées par l'évolution sont très spécifiques afin d'accomplir une fonction constante (dans le cas du VMT, de former une structure se désassemblant en milieu cellulaire et permettant la reproduction du virus).

Cette spécificité peut apparaître comme une limitation dans notre optique biomimétique car elle suppose une connaissance extensive et prédictive des interactions intermoléculaires dans l'eau. N'ayant pas les millions d'années de processus essai-erreur naturel à notre disposition, nous proposons de nous inspirer de la structure du VMT en utilisant des interactions plus générales aboutissant à une structure plus simple. Notre projet est de relever ce défi *via* l'utilisation de cyclodextrines qui sont des molécules solubles dans l'eau et capables de s'auto-assembler lorsqu'elles sont fonctionnalisées.

Compte-tenu du mode de structuration du VMT nous avons identifié deux grandes phases pour notre approche :

- Former une structure définie dans l'eau, composée de plusieurs monomères (correspondant à l'association initiale de deux anneaux chez le VMT)
- Former une structure d'ordre supérieur par ses interactions avec l'ARN

Nous présenterons donc d'abord comment il est possible de former des structures polymères supramoléculaires reposant sur des cyclodextrines puis comment celles-ci interagissent avec l'ADN. Nous étudierons notamment si l'ADN permet, comme dans le cas du VMT, d'assister la formation d'une structure supramoléculaire. De plus, la structuration du VMT lui permet de transférer son ARN à une cellule cible. Nous verrons donc dans une dernière partie si une structure formée entre les cyclodextrines et l'ADN est efficace pour transférer du matériel génétique à une cellule (Figure 14).

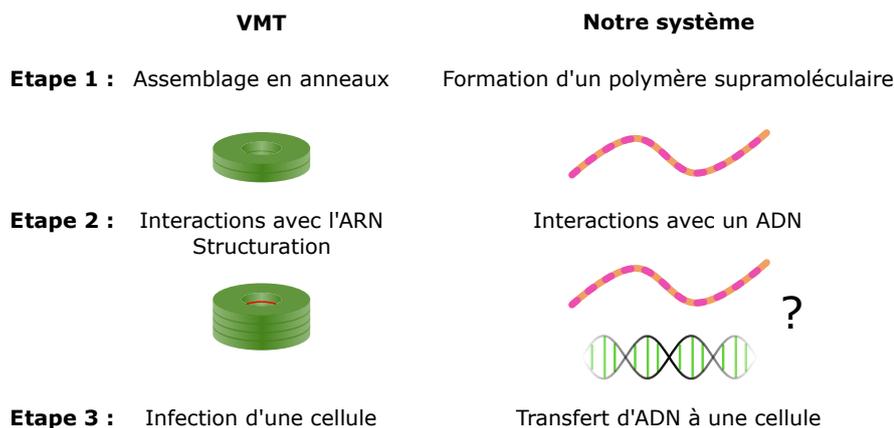


FIGURE 14 – Schéma général de notre approche s'inspirant du VMT

Deuxième partie

CONSTRUCTION D'UN SYSTÈME SUPRAMOLÉCULAIRE
INSPIRÉ PAR LE VMT

ASSEMBLAGE DE CYCLODEXTRINES POUR FORMER UN POLYMÈRE SUPRAMOLÉCULAIRE

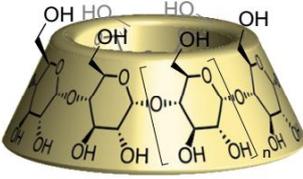
Afin de former des structures auto-assemblées s'inspirant de l'association des protéines de la capsid du VMT, nous proposons ici la synthèse de polymères supramoléculaires de cyclodextrines fondés sur leur capacité à former des interactions hôte-invité. Afin de comprendre ce phénomène, nous détaillerons d'abord l'origine de la formation des complexes d'inclusion entre une cyclodextrine et un invité. Nous verrons ensuite comment il est possible de fonctionnaliser la cyclodextrine, afin de former des espèces pouvant polymériser en solution. Les méthodes de caractérisation de ces polymères supramoléculaires seront ensuite détaillées. Enfin, les exemples des polymères supramoléculaires de cyclodextrines existant dans la littérature seront présentés avant d'introduire le travail effectué durant cette thèse.

2.1 COMPLEXES D'INCLUSION À PARTIR DE CYCLODEXTRINES

2.1.1 Cyclodextrines : structure et propriétés

La découverte des cyclodextrines est attribuée au chimiste français Antoine Villiers. Celui-ci étudiait la dégradation de l'amidon sous l'action de souches bactériennes. En 1891, il décrit dans une publication la formation « en très petite quantité [...] [d']un hydrate de carbone qui se sépare en de beaux cristaux radiés ».[10] Ce fut la première occurrence dans la littérature de la production de cyclodextrines (il cristallisa probablement les formes α et β), bien que l'élucidation de leur structure n'eut lieu que dans les années 50 avec les travaux de Freudenberg et French.[11]

Les cyclodextrines sont composées d'unités d' α -D-glucopyranose qui s'enchaînent *via* des liaisons 1,4 pour former un cycle allant de 6 à 8 membres pour les plus courantes. Leur structure tridimensionnelle est celle d'un cône tronqué. Les dimensions de celui-ci varient selon le nombre d'unités présentes dans le cycle (Figure 15).



Type de cyclodextrine	α	β	γ
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Diamètre de la cavité (nm)	0,47	0,60	0,75
Diamètre externe (nm)	1,46	1,54	1,75
Hauteur (nm)	0,79	0,79	0,79

FIGURE 15 – Dimensions des cyclodextrines α , β et γ . [12]

Chaque unité glucopyranose présente 3 hydroxyles libres : un hydroxyle primaire localisé sur le col étroit (dit col primaire) et deux hydroxyles secondaires localisés sur le col large (dit col secondaire) de la cyclodextrine. La présence de ces nombreux hydroxyles confère à la cyclodextrine une solubilité dans l'eau qui varie selon sa taille. On observe en effet que la cyclodextrine β est beaucoup moins soluble dans l'eau (18.5 g/L à 20 °C) que celles de type α (145 g/L) et γ (232 g/L).[13] Cela est dû à sa géométrie qui favorise les liaisons hydrogène intramoléculaires au niveau du col secondaire, et diminue ses interactions favorables avec l'eau.[14]

La structure cavitaire des cyclodextrines est à l'origine de leur faculté à complexer d'autres molécules. Cramer fut l'un des premiers à étudier de manière extensive les propriétés de complexation des cyclodextrines.[15] Il remarqua que la cavité de la cyclodextrine présentait un caractère hydrophobe, lui permettant d'interagir favorablement avec des molécules apolaires en milieu aqueux.[11] Il introduisit alors la notion de complexe d'inclusion résultant de l'incorporation d'une molécule dans la cavité de la cyclodextrine, de manière non covalente et réversible. Ces complexes d'inclusion sont à l'origine de l'intérêt des cyclodextrines en chimie supramoléculaire, et nous allons maintenant voir les facteurs influençant leur formation.

2.1.2 Complexes d'inclusion

En milieu aqueux, les cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion avec différents composés organiques. La nature de ce phénomène est multiple et a longtemps été discutée en raison de la difficulté à analyser de manière indépendante ses différentes composantes. Nous allons ici présenter les principaux facteurs ayant été étudiés dans la littérature.

2.1.2.1 Interaction dipôle-dipôle

La présence d'interactions électrostatiques de type dipôle-dipôle entre la molécule invitée et la cyclodextrine peut favoriser la formation du complexe d'inclusion. Les cyclodextrines sont en effet des molécules polarisées avec un moment dipolaire orienté du col secondaire vers le col primaire, le long de leur axe de symétrie.[16] L'énergie d'interaction entre deux dipôles (interaction de Keesom) est donnée par :

$$E_{\text{Keesom}} = -\frac{(\mu_1 \mu_2)^2}{3(4\pi\epsilon)^2 k_B T r^6}$$

avec

- μ_i Moment dipolaire de la molécule i (C.m)
- ϵ Permittivité du milieu (F.m⁻¹)
- k_B Constante de Boltzmann (J.K⁻¹)
- T Température (K)
- r Distance intermoléculaire (m)

Plus la valeur du moment dipolaire de chaque molécule est importante, plus l'énergie d'interaction l'est. La valeur du moment dipolaire de la cyclodextrine étant fixée, les variations du moment dipolaire de l'invité ont une influence sur la formation du complexe d'inclusion.

Il est possible de mettre cet effet en évidence en étudiant la complexation de séries de composés de moments dipolaires croissants. Par exemple, la série des dérivés de l'acide benzoïque *para*-substitué permet d'établir une corrélation entre la constante de complexation avec la cyclodextrine α et le caractère donneur ou accepteur du substituant, c'est-à-dire sa capacité à moduler le moment dipolaire de l'invité (Figure 16).

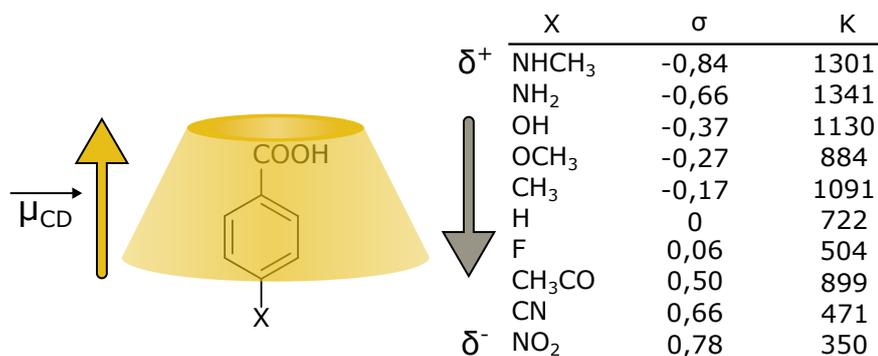


FIGURE 16 – Mise en évidence de l'interaction électrostatique invité/cyclodextrine α . Les constantes d'équilibre K sont déduites du pK_a de l'acide carboxylique interagissant avec la cavité, mesuré par titrage potentiométrique.[17]

$\sigma = \log(K_a/K_{a_{ref}})$, où K_a est la constante thermodynamique de l'équilibre acido-basique $RCOOH + H_2O \xrightleftharpoons{K_a} RCOO^- + H_3O^+$ en l'absence de cyclodextrine, $K_{a_{ref}}$ correspondant à la valeur obtenue quand $X=H$.

Cependant cette variation de polarité s'accompagne d'un changement de la taille et de l'hydrophobie de la molécule, ne permettant pas la mesure de l'effet de la variation d'un seul paramètre. De plus, il est possible que le sens de l'inclusion change selon le substituant de l'acide benzoïque.

Il est donc difficile d'estimer indépendamment l'influence de la polarité de l'invité sur la complexation. Certains modèles montrent cependant que l'effet électrostatique ne joue qu'un rôle mineur dans la complexation de benzenes mono-substitués avec l' α -cyclodextrine.[18]

2.1.2.2 Autres interactions de Van der Waals

Deux autres interactions de type Van der Waals existent entre la cavité et l'invité : celles de type dipôle-dipôle induit (interactions de Debye) et celles de type dipôle instantané - dipôle instantané (interactions de London). Leur énergie est donnée par :

$$E_{Debye} + E_{London} = -\frac{\alpha_2 \mu_1^2 + \alpha_1 \mu_2^2}{(4\pi\epsilon)^2 r^6} - \frac{3\alpha_1 \alpha_2}{2(4\pi\epsilon)^2 r^6} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$$

avec

- α_i Polarisabilité de la molécule i ($\text{A}^2\text{s}^4\text{kg}^{-1}$)
- μ_i Moment dipolaire de la molécule i (C.m)
- ϵ Permittivité du milieu (F.m^{-1})
- r Distance intermoléculaire (m)
- I_i Potentiel d'ionisation de la molécule i (J)

Pour ces deux énergies, les deux facteurs principaux sont la polarisabilité des molécules et la distance intermoléculaire (le terme contenant les potentiels d'ionisation varie peu pour différentes molécules).[19] La polarisabilité d'une molécule apolaire est liée à son rayon de Van der Waals par la relation :

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 R^3$$

avec

- α Polarisabilité de la molécule ($\text{A}^2\text{s}^4\text{kg}^{-1}$)
- ϵ_0 Permittivité du vide (F.m^{-1})
- R Rayon de Van der Waals de la molécule (m)

Ainsi l'augmentation de la taille moléculaire de l'invité (dans les limites permises par les dimensions de la cavité) permet d'augmenter sa polarisabilité α et de diminuer la distance intermoléculaire r , ce qui permet une plus grande affinité de l'invité pour la cavité (Figure 17).

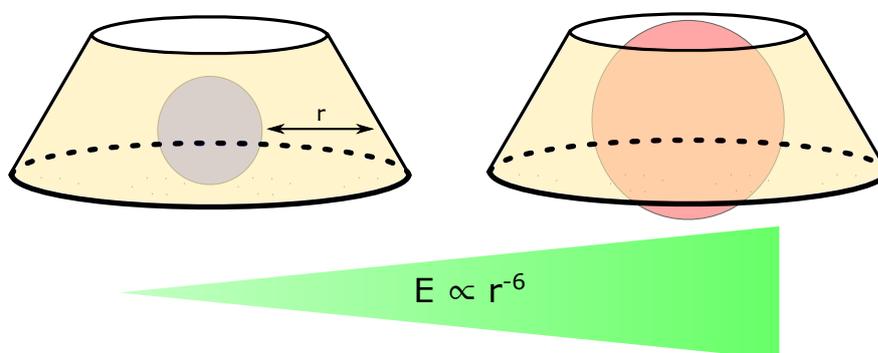


FIGURE 17 – Evolution de l'interaction de Van der Waals en fonction de la taille de l'invité

On peut observer l'effet de la polarisabilité de l'invité avec l'évolution des constantes de complexation de dérivés du benzène de polarisabilité croissante par les cyclodextrines α et β (Figure 18).

La constante d'association K_a entre hôte et invité croît avec la polarisabilité de celui-ci. Cependant la corrélation est ici meilleure pour la cyclodextrine α que pour la β . La cavité de la cyclodextrine β étant plus grande que celle de l' α , les dérivés du benzène établissent moins d'interactions favorables de type Van der Waals avec elle (r est plus grand). D'autres facteurs, autres que la polarisabilité, entrent alors en jeu, d'où la moins bonne corrélation des K_a avec cette dernière pour la cyclodextrine β . Cela explique aussi les valeurs de K_a plus élevées pour la cyclodextrine α ici (r plus petit).

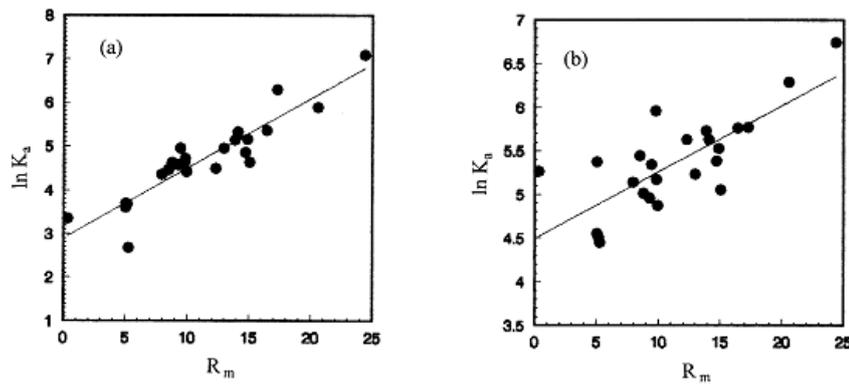


FIGURE 18 – Constante d'association entre dérivés du benzène et cyclodextrines α (a) et β (b) en fonction de leur polarisabilité molaire R_m . [18]

2.1.2.3 Effet hydrophobe

L'effet hydrophobe repose sur la modification des interactions affectant les molécules d'eau au sein du système solvant/hôte/invité. La solvation d'une molécule apolaire par l'eau n'est pas favorable car il n'y a pas d'interactions électrostatiques ou de liaisons hydrogène entre elles : la molécule apolaire déstabilise l'organisation du solvant. Au sein de la cavité de la cyclodextrine sont aussi confinées des molécules d'eau qui solvatent un environnement hydrophobe. La formation d'un complexe d'inclusion entre une molécule apolaire et la cyclodextrine permet la libération de ces molécules d'eau et la réorganisation du solvant ce qui est énergétiquement favorable pour le système (Figure 19).

2.1.2.4 Autres facteurs

Des interactions d'importance moindre existent aussi. Des liaisons hydrogène stabilisantes peuvent par exemple exister entre l'invité et la cavité. La cyclodextrine peut alors jouer un rôle de donneur *via* ses hydroxyles. [20]

Le passage d'une conformation de haute énergie à une conformation plus stable lors de la formation du complexe d'inclusion est aussi parfois cité, bien que peu de preuves expérimentales appuient ces résultats. Il semble plus pertinent de parler d'adaptation de la géométrie de la cavité afin de s'accomoder au mieux de la forme de l'invité (« induced-fit »). [21]

2.1.3 Applications des complexes d'inclusion de cyclodextrines

Depuis les travaux pionniers du XX^e siècle, la production de cyclodextrines est devenue aisée. [22] Elles sont donc maintenant utilisées industriellement pour diverses applications.

Les cyclodextrines sont par exemple présentes depuis de nombreuses années dans certaines formulations pharmaceutiques. Leur capacité à former des complexes d'inclusion permet d'augmenter la biodisponibilité de médicaments en favorisant leur passage dans le système circulatoire. [23] En effet, beaucoup de principes actifs ont une solubilité modérée dans l'eau, ce qui limite leur concentration et donc leur activité *in vivo*. La formation d'un complexe d'inclusion avec une cyclodextrine permet

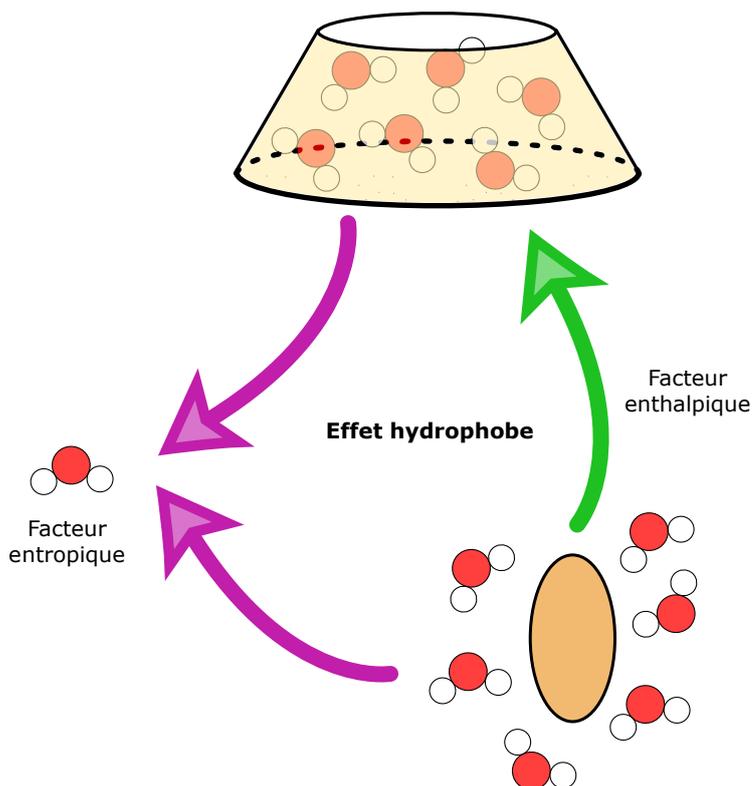


FIGURE 19 – Stabilisation du système par libération des molécules d'eau solvatant l'invité et la cavité de la cyclodextrine

d'augmenter leur solubilité. De plus, le complexe formé est moins sensible à la dégradation (et en particulier à l'oxydation) que la molécule seule. La cyclodextrine agit donc comme une enveloppe protectrice pour ces molécules jusqu'à ce qu'elles soient internalisées par les cellules cibles.[24] En outre, les cyclodextrines sont biocompatibles et ne déclenchent pas de réponse immunitaire lorsqu'elles sont injectées dans un organisme.

Cette propriété est aussi utile dans d'autres applications comme en parfumerie (augmentation de la persistance des odeurs) ou dans l'industrie agro-alimentaire (conservateur).

Nous avons vu les différents facteurs responsables de la formation de complexes d'inclusion de cyclodextrines dans l'eau. Ceux-ci sont essentiels dans la formation de polymères supramoléculaires mais nécessitent l'emploi de cyclodextrines fonctionnalisées. Nous allons donc maintenant voir les méthodes permettant la modification chimique des cyclodextrines.

2.2 FONCTIONNALISATION DE CYCLODEXTRINES

Plusieurs stratégies de synthèse existent pour fonctionnaliser la cyclodextrine. Nous détaillerons d'abord comment il est possible de mono ou di-fonctionnaliser la cyclodextrine native sans la protéger. Nous verrons ensuite comment l'utilisation de groupements protecteurs peut permettre d'améliorer certaines synthèses aboutissant au composé mono ou di-fonctionnalisé.

La nomenclature utilisée pour chaque sucre est la même que pour les hexoses, avec une numérotation des atomes commençant au carbone anomère (C¹) et terminant au CH₂ (C⁶). Les unités de la cyclodextrine sont nommées de A à F (cyclodextrine α) ou G (cyclodextrine β) dans le sens des liaisons α-1,4, en partant du H¹ de l'unité la plus substituée (Figure 20).

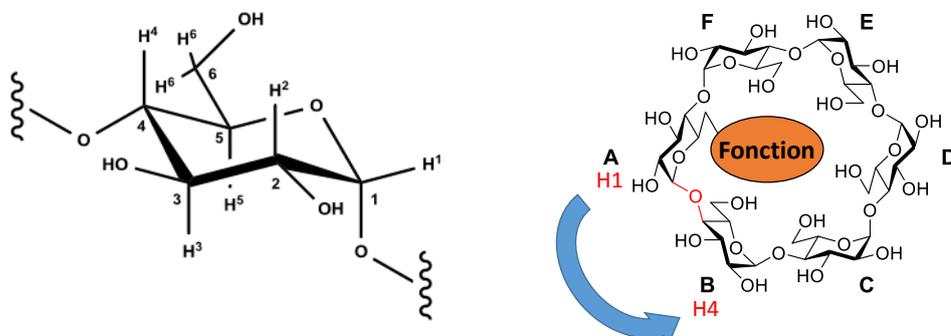


FIGURE 20 – Nomenclature des cyclodextrines

2.2.1 Fonctionnalisation directe

La possibilité la plus répandue pour fonctionnaliser la cyclodextrine est de travailler sur sa forme native. Les méthodes permettant de fonctionnaliser sélectivement la cyclodextrine reposent sur la différence de réactivité et de position (col primaire ou secondaire) entre ses hydroxyles (Figure 21).

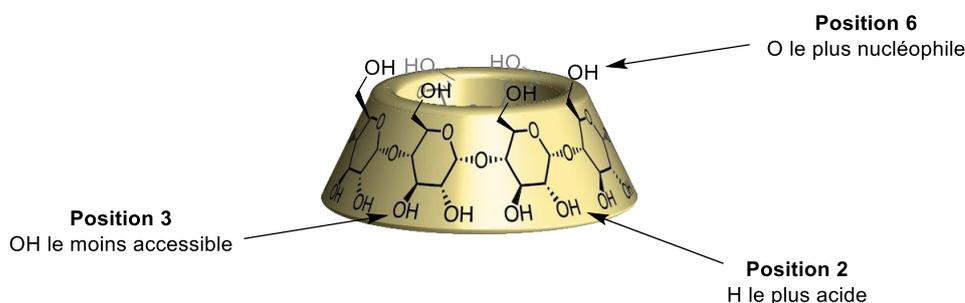


FIGURE 21 – Réactivité des différents hydroxyles de la cyclodextrine

L'hydroxyle en position 2 est le plus acide en raison de l'effet inductif attracteur exercé par les atomes d'oxygène environnants. Celui en position 3 est le plus encombré pour des raisons géométriques. Celui en position 6 est le plus nucléophile car c'est un alcool primaire, contrairement aux deux autres.

2.2.1.1 Mono-fonctionnalisation

POSITION 2 La position 2 de la cyclodextrine comporte l'hydroxyle le plus acide. Il est possible de fonctionnaliser cette position en mettant à profit cette propriété grâce à l'action d'une base forte (classiquement NaH) en présence d'un électrophile pouvant être attaqué par l'alcoolate obtenu. L'électrophile choisi est en général le chlorure de tosylate, qui permet ensuite d'accéder à une grande diversité de fonctions

par substitution. Toutefois, la réaction est difficile à contrôler et aboutit en général à un mélange d'espèces mono et di-substituées.[25]

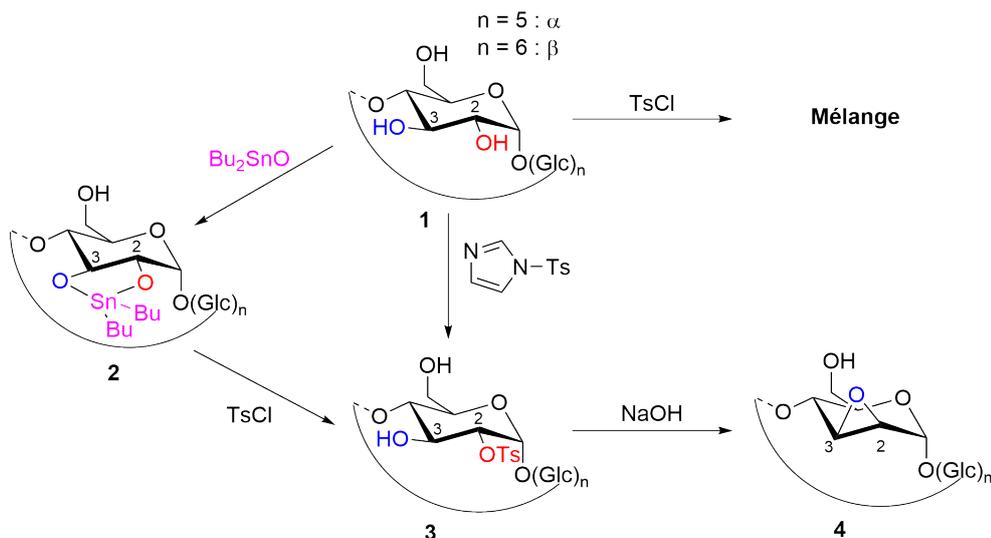


FIGURE 22 – Tosylation de la position 2 et sous produit

Il est possible d'améliorer la régiosélectivité de la réaction en employant du Bu_2SnO , qui active sélectivement les oxygènes 2 et 3 de la cyclodextrine par la formation de l'intermédiaire cyclique 2. La cyclodextrine β 2-tosylée est alors obtenue avec un rendement de 32 %, le reste étant majoritairement du produit de départ.[26]

L'emploi de dérivés du chlorure de tosylo est aussi possible, l'imidazole de tosylo permettant la formation de la cyclodextrine α 2-tosylée avec un rendement de 30 %.[27] L'introduction d'un tosylo peut cependant conduire à sa substitution intramoléculaire, aboutissant à la formation de l'époxyde 4 (Figure 22).

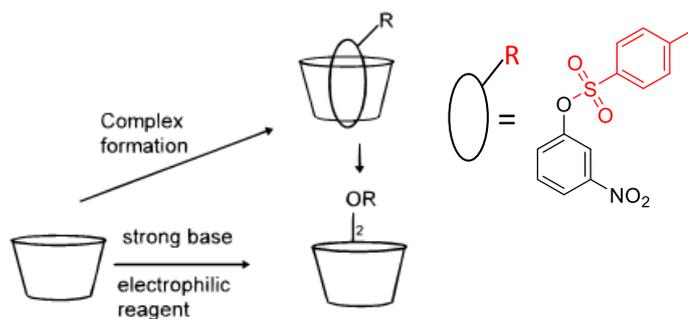


FIGURE 23 – Stratégies de fonctionnalisation en position 2.[28]

Il est aussi possible d'utiliser la capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion afin de favoriser la réaction en position 2. Ainsi, dans un mélange 2/1 DMF/ H_2O , le 3-nitrophenyl toluenesulfonate ($c = 88 \text{ mol/L}$) est inclus dans la cavité de la cyclodextrine β , son groupement nitro pointant vers le col primaire. Le complexe d'inclusion formé oriente le tosylo vers le col secondaire, ce qui permet l'attaque d'un alcoolate en position 2 de manière préférentielle (Figure 23). Le produit mono tosylé en position 2 est alors obtenu sélectivement avec un rendement de 10 %.[29]

POSITION 3 La fonctionnalisation en position 3 est la plus complexe à obtenir car cette position est la moins réactive des trois. La réaction directe étant complexe, il est nécessaire de recourir à des moyens détournés afin de la fonctionnaliser.

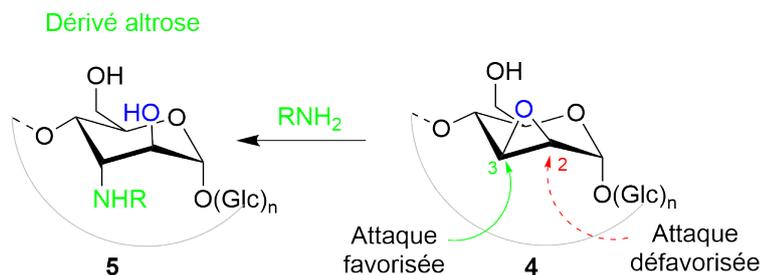


FIGURE 24 – Stratégie de fonctionnalisation en position 3 passant par un époxyde

Ainsi, l'époxyde 4 précédemment évoqué est préférentiellement attaqué en position 3 par un nucléophile (Figure 24). Les nucléophiles les plus généralement utilisés sont l'ammoniac ou des amines primaires.[30, 31] Cette méthode aboutit à une cyclodextrine modifiée car la stéréochimie des carbones 2 et 3 est inversée sur l'une de ses unités (dérivé altrose 5).

POSITION 6 La position 6 est la plus nucléophile de la cyclodextrine. Les méthodes permettant de la fonctionnaliser sont plus nombreuses que celles pour les positions 2 et 3.

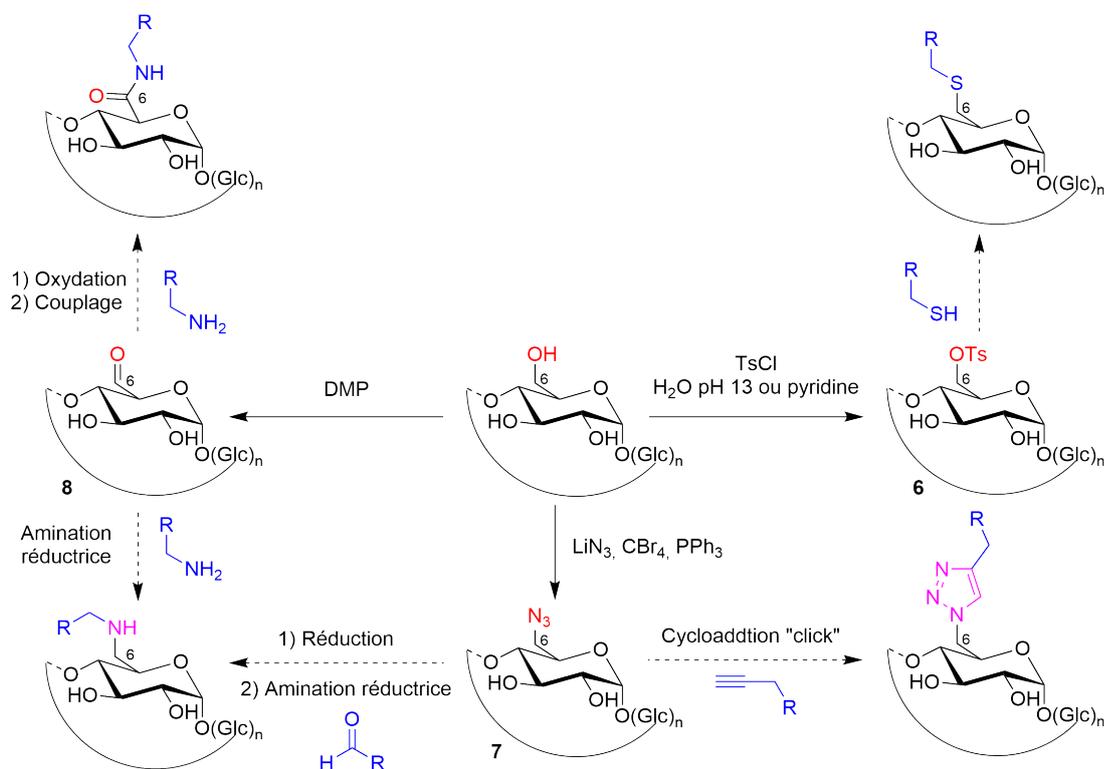


FIGURE 25 – Stratégies de fonctionnalisation en position 6

Il est possible d'utiliser le chlorure de tosyloxy en milieu aqueux basique afin de fonctionnaliser un alcool en position 6. Ceux-ci étant les plus nucléophiles, ils réagissent en premier avec l'électrophile. Il est cependant nécessaire de contrôler la durée de la réaction afin de limiter la formation de composés polysubstitués. Les dérivés monotosylés en position 6 sont obtenus avec un rendement de 16 et 28 % respectivement pour les cyclodextrines α et β . [32] Le dérivé tosylé 6 obtenu peut ensuite être substitué par la fonction voulue (Figure 25).

Il est aussi possible d'utiliser la pyridine comme solvant. [33] Celle-ci étant incluse dans la cavité, elle empêche le chlorure de tosyloxy d'y avoir accès. La tosylation est alors orientée vers la position 6 au lieu de la position 2, ce qui permet d'obtenir la cyclodextrine α 6-tosylée avec un rendement de 46 %.

La cyclodextrine 7, fonctionnalisée en position 6 par un azoture, peut être directement obtenue en utilisant une réaction de type Appel, en présence de CBr_4 , de PPh_3 et de LiN_3 avec un rendement de 18 et 15 % pour les cyclodextrines α et β . [34] L'azoture obtenu peut être engagé dans des réactions de cycloaddition catalysées au cuivre, ou réduit en amine par hydrogénation ou réduction de Staudinger en vue d'une fonctionnalisation future.

Enfin, l'utilisation du periodinane de Dess-Martin permet une oxydation sélective d'un alcool en position 6 en aldéhyde avec un rendement de 85 % environ pour les cyclodextrines α et β . [35] L'aldéhyde 8 obtenu peut ensuite être fonctionnalisé par une réaction d'amination réductrice ou oxydé en acide carboxylique pouvant ensuite être couplé à une amine.

2.2.1.2 Di-fonctionnalisation

POSITIONS 2 La di-fonctionnalisation repose ici sur des méthodes analogues à la mono-fonctionnalisation, permettant de conserver une bonne régiosélectivité pour les hydroxyles en position 2. En revanche, l'orientation relative des positions fonctionnalisées n'est pas contrôlée et les rendements obtenus souvent très faibles. Ainsi, l'utilisation du Bu_2SnO et de TsCl sur la cyclodextrine β aboutit à la formation des composés fonctionnalisés en $2^A, 2^B$, $2^A, 2^C$ et $2^A, 2^D$ avec de faibles rendements (1,8, 2,6 et 3,6 % respectivement). [36]

De même, l'utilisation de chlorure de *meta*-nitrobenzenesulfonyle permet l'obtention de ces composés avec des rendements de 2, 4 et 1 %. [37]

POSITIONS 3 De manière analogue à la mono-substitution, la di-substitution peut se faire en partant des époxydes résultant de l'élimination de tosylates d'une cyclodextrine di-substituée en position 2.

Il est aussi possible d'utiliser le chlorure de 2-naphtalenesulfonyl pour obtenir les cyclodextrines β sulfonylées en positions $3^A, 3^C$ et $3^A, 3^D$ avec des rendements de 4,5 et 4,4 %. [38]

POSITIONS 6 La cyclodextrine β peut être doublement fonctionnalisée de manière régiosélective en utilisant des dérivés de chlorures de di-sulfonyle (Figure 26). L'utilisation de dérivés de géométries différentes permet d'accéder aux cyclodextrines di-substituées $6^A, 6^B$, $6^A, 6^C$ et $6^A, 6^D$ avec des rendements respectifs de 12, 24 et 20 %. [39, 40]

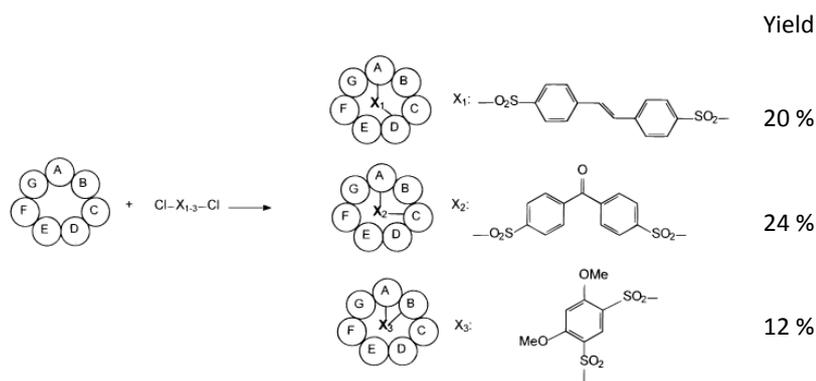


FIGURE 26 – Di-fonctionnalisation en position 6 régiosélective par l'utilisation de dérivés di-sulfonylés.[28]

Ces méthodes dites directes présentent le désavantage commun d'aboutir en général à des mélanges de produits, et à de faibles rendements dans le cas de la di-substitution. Une autre méthode consiste alors à utiliser des groupements protecteurs, permettant de s'affranchir des réactions secondaires sur les autres positions.

2.2.2 Utilisation de groupements protecteurs

2.2.2.1 Mono-fonctionnalisation

POSITION 2 Il est possible de protéger les alcools en position 6 afin d'éviter leur réaction avec l'électrophile choisi (Figure 27). Ainsi, la réaction de chlorure de *tert*-butyldiméthylesilyle en présence de base dans le DMF (pour la cyclodextrine α) ou dans la pyridine (cyclodextrine β) permet d'obtenir la cyclodextrine 6-silylée sur le col primaire avec des rendements supérieurs à 80 %. Celle-ci présente l'avantage d'être soluble dans des solvants organiques classiquement utilisés. La réaction de la cyclodextrine per-6-silylée avec le chlorure de tosyloxy en présence de NaH dans le THF permet ainsi d'obtenir le composé mono-tosylé α ou β en position 2 et silylé sur le col primaire avec un rendement de 32 %.[41, 42]

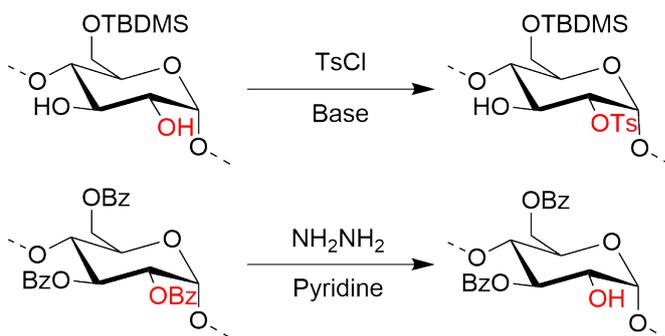


FIGURE 27 – Utilisation de groupements protecteurs pour fonctionnaliser la cyclodextrine en position 2

Une autre possibilité consiste à utiliser une protection totale de la cyclodextrine, puis une déprotection sélective afin d'avoir accès au site choisi. Ainsi, la cyclodextrine

β perbenzoylée peut être sélectivement mono-déprotégée sur la position 2 par l'action de l'hydrazine dans la pyridine avec un rendement de 24 %.[43] L'alcool libre obtenu peut ensuite être fonctionnalisé par le dérivé souhaité.

POSITION 3 L'utilisation de groupements protecteurs silylés sur le col primaire, vue précédemment, permet d'obtenir la cyclodextrine mono-tosylée en position 2 et per-silylée sur le col primaire. Cette cyclodextrine peut, comme sur la forme native, former l'époxyde entre les positions 2 et 3 résultant du départ d'un tosylate. La présence de groupes silylés sur le col primaire augmente la régiosélectivité en faveur de la position 3 lors de l'ouverture de l'époxyde.

Cela est utilisé pour former de manière spécifique des dérivés per-silylés sur le col primaire, portant un azoture (utilisation de NaN_3 , rendement quantitatif) ou une fonction amine (utilisation de NH_3 , rendement de 85 %) en position 3.[42]

POSITION 6 Nous avons vu qu'il était possible de protéger spécifiquement les alcools en position 6 de la cyclodextrine par l'utilisation de groupements silylés. En protégeant les alcools en position 2 et 3 par des acétyles, et en déprotégeant le col primaire à l'aide de fluorures, on accède à une cyclodextrine où seules les positions 6 sont accessibles à un électrophile.[44] Cependant, cela ne permet pas de supprimer la réaction de plusieurs hydroxyles en position 6.

La méthode que nous utilisons repose sur la déprotection sélective d'une cyclodextrine protégée sur toutes ses positions. En soumettant une cyclodextrine per-benzylée à l'action du DIBAL-H, il est possible d'obtenir une mono-déprotection sur le col primaire donnant accès à la fonctionnalisation ultérieure de la cyclodextrine.[45]

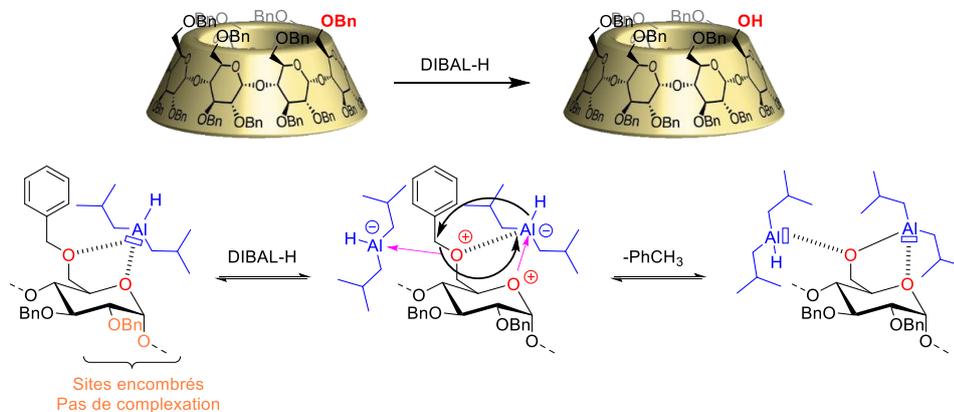


FIGURE 28 – Mécanisme de déprotection d'un benzyle par l'action du DIBAL-H

Le mécanisme de la déprotection repose sur l'action conjointe de deux molécules de DIBAL-H par benzyle. Celles-ci se complexent au niveau de pinces oxygénées composées d'un oxygène en position 6 et de l'oxygène endocyclique de l'unité glucose. Cette complexation est régiospécifique, la haute densité de groupements benzyles sur le col secondaire inhibant la formation d'un complexe entre l'aluminium et les oxygènes 1 et 2 d'une unité glucose. La formation de la pince O-Al-O permet un accès facilité à une deuxième molécule de DIBAL-H interagissant avec l'oxygène 6 en tant qu'acide de Lewis. Cela renforce l'électrophilie du carbone benzyle, qui est ensuite attaqué par un hydruure, aboutissant à la déprotection de l'oxygène 6 et à la formation

de toluène (Figure 28).[46] La cyclodextrine mono-déprotégée en position 6 est alors obtenue avec un rendement de 67 % environ, aussi bien pour les cyclodextrines α que β .

2.2.2.2 Di-fonctionnalisation en positions 6

Les méthodes permettant la di-fonctionnalisation de la cyclodextrine reposant sur des groupements protecteurs sont peu nombreuses et se limitent aux positions 6.

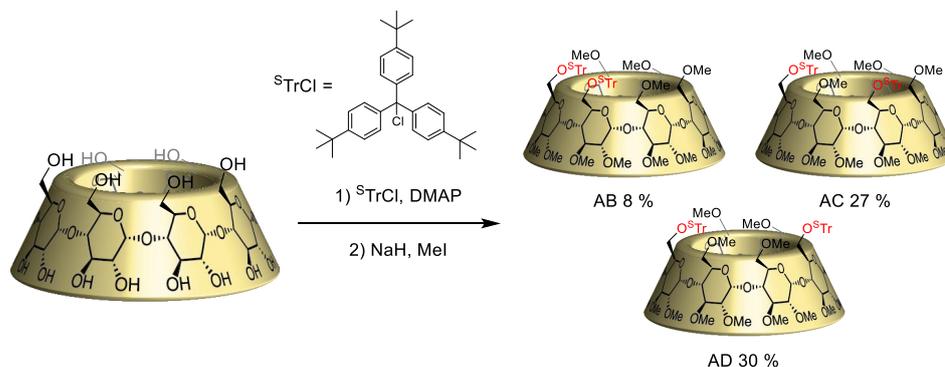


FIGURE 29 – Différenciation de deux alcools en position 6 par l'utilisation du super-trityle

L'utilisation du groupement protecteur super-trityle sur la cyclodextrine α permet d'obtenir majoritairement des produits di-protégés sur le col primaire (Figure 29). Après méthylation de toutes les autres positions, les cyclodextrines di-supertritylées $6^A,6^B$, $6^A,6^C$ et $6^A,6^D$ sont obtenues avec des rendements de 8, 27 et 30 %.[47] Après déprotection des super-trityles par HBF_4 , la fonctionnalisation de deux positions 6 est possible.

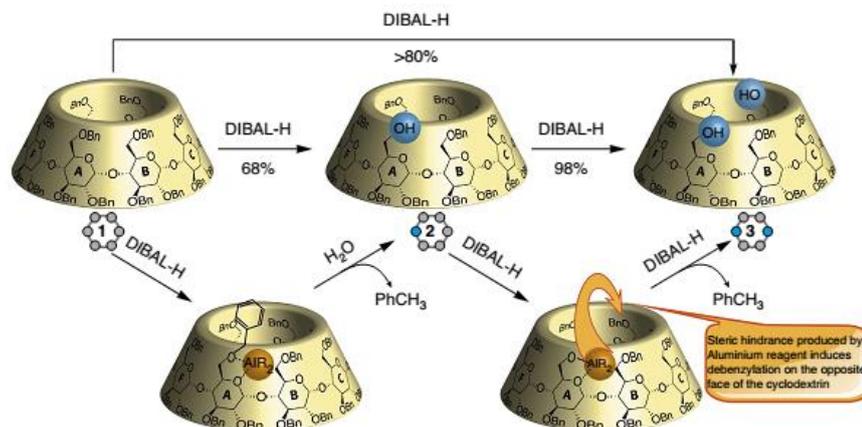


FIGURE 30 – Déprotection séquentielle de deux alcools en position 6 par l'utilisation du DIBAL-H.[48]

La méthode reposant sur l'emploi du DIBAL-H sur une cyclodextrine per-benzylée permet aussi d'aboutir à un diol. La deuxième déprotection se fait sur le site diamétralement opposé à celui de la première, en raison de l'encombrement stérique des deux molécules de DIBAL sur le site déprotégé en premier. Ainsi, la deuxième dé-

protection se fait de manière régiospécifique pour donner de manière reproductible le régioisomère AD doublement déprotégé sur le col primaire (Figure 30).

Cette méthode est remarquable en raison des hauts rendements obtenus et de la prédictibilité de la régiosélectivité. Elle a notamment permis de synthétiser une cyclodextrine α possédant 6 substituants différents sur son col primaire en déprotégeant séquentiellement, et de manière contrôlée, les différents alcools du col primaire. Cela représente l'obtention d'un unique arrangement parmi les 120 possibles avec 6 fonctions différentes sur le col primaire de la cyclodextrine α . [48]

En plus des rendements élevés obtenus, cette méthode permet de travailler dans des solvants organiques avec des méthodes classiques de chimie organique ce qui facilite les étapes de fonctionnalisation.

Nous avons montré les différentes possibilités existant pour fonctionnaliser la cyclodextrine, sur une ou deux positions. Cette fonctionnalisation, en plus de la capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion, donne accès à la synthèse de polymères supramoléculaires.

2.3 ASSOCIATION SUPRAMOLÉCULAIRE DE CYCLODEXTRINES ET CARACTÉRISATION

Les polymères supramoléculaires sont analogues à ceux construits par liaisons covalentes mais reposent sur l'association de monomères par des interactions de faible énergie. Il est nécessaire que celles-ci soient directionnelles pour former une chaîne et non pas un agrégat sans forme distincte. A ce dessein, il est possible d'utiliser un ensemble de liaisons hydrogène capable d'orienter chaque monomère vis-à-vis du suivant (Figure 31).

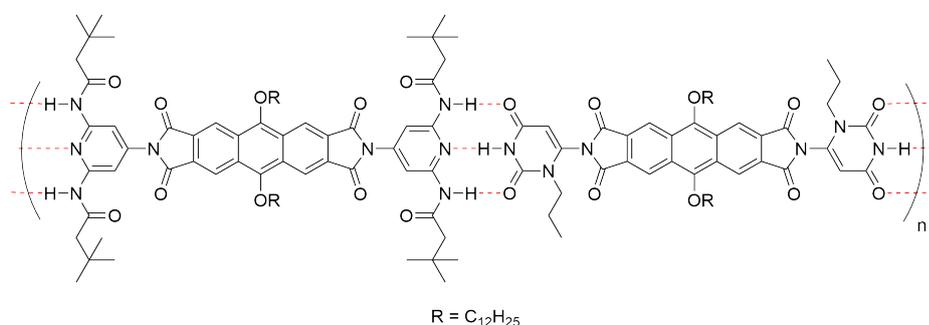


FIGURE 31 – Polymère supramoléculaire rigide reposant sur des liaisons hydrogène. [49]

Cependant, l'eau étant un bon compétiteur pour ces liaisons, il est complexe de former un polymère supramoléculaire en milieu aqueux reposant uniquement sur celles-ci. [50] *A contrario*, l'interaction hydrophobe est par définition forte en milieu aqueux, mais celle-ci n'est pas directionnelle. La cavité des cyclodextrines permet d'apporter une contrainte géométrique à l'interaction par le confinement de l'invité, et donc la directionnalité nécessaire à la synthèse de polymères.

Deux solutions sont alors imaginables afin de former un polymère supramoléculaire de cyclodextrines : mélanger des monomères hôtes divalents avec des monomères invités divalents (monomères dits de types AA et BB) ou utiliser un seul monomère constitué d'une partie hôte et d'une partie invité (monomère dit de type AB,

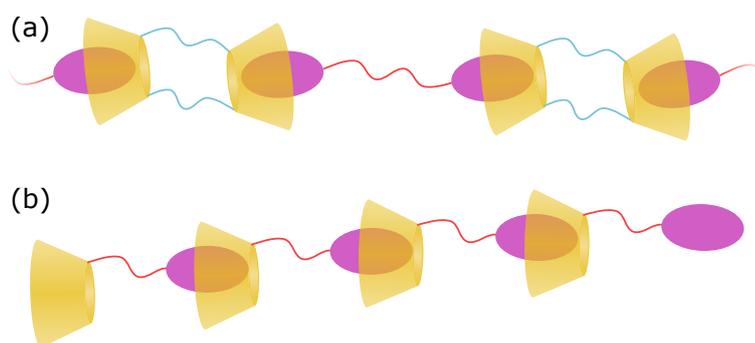


FIGURE 32 – Types de polymères supramoléculaires à partir de cyclodextrines
 (a) Polymère de type AA-BB
 (b) Polymère de type AB

Figure 32).

Nous nous concentrerons ici exclusivement sur les monomères de type AB. Une fois en solution, ceux-ci sont soumis à plusieurs équilibres qui dictent la structure qu'ils adoptent.

2.3.1 Modes d'association entre monomères

2.3.1.1 Formation de structures anisotropes

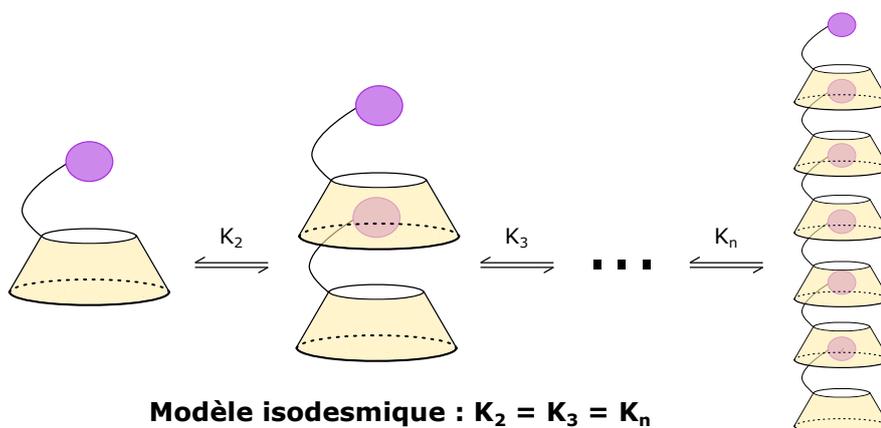


FIGURE 33 – Modèle isodesmique d'association

ASSOCIATION ISODESMIQUE La formation d'un polymère supramoléculaire suit une loi dite isodesmique si l'association de chaque monomère AB est gouvernée par une unique constante d'association K , qui n'est pas modifiée par la longueur du polymère déjà formé (Figure 33). Dans ce modèle, le degré de polymérisation est proche de \sqrt{KC} , où C est la concentration initiale en monomère dans la solution (cette hypothèse n'est valable que si $KC \gg 1$, voir Appendice A).

C'est le modèle le plus utilisé dans la polymérisation supramoléculaire de monomères AB de cyclodextrines et il est souvent compatible avec les degrés de polymérisation observés en solution.

ASSOCIATION COOPÉRATIVE La formation d'un assemblage moléculaire de monomères AB est dite coopérative lorsque les constantes thermodynamiques de chaque étape ne sont pas égales. On peut distinguer deux types de coopérativité, mises en évidence dans deux revues par Hunter, Anderson et Ercolani : la coopérativité allostérique et la coopérativité de type chélate. [51, 52]

Coopérativité allostérique La coopérativité allostérique est la plus connue des deux. Elle repose sur la modification de la nature et/ou du nombre d'interactions entre monomères lors de la polymérisation.

A titre d'exemple, considérons une cyclodextrine doublement fonctionnalisée. L'une de ses fonctions assure l'interaction axiale hôte-invité, alors que l'autre peut interagir avec les fonctions du même type, mais seulement si l'espacement entre elles est assez grand (pour des raisons stériques, par exemple). L'association initiale entre les monomères ne profite pas de l'interaction stabilisante entre ces deux fonctions. En revanche, à partir de l'ajout d'une troisième unité au système, ces interactions peuvent stabiliser l'ensemble (Figure 34).

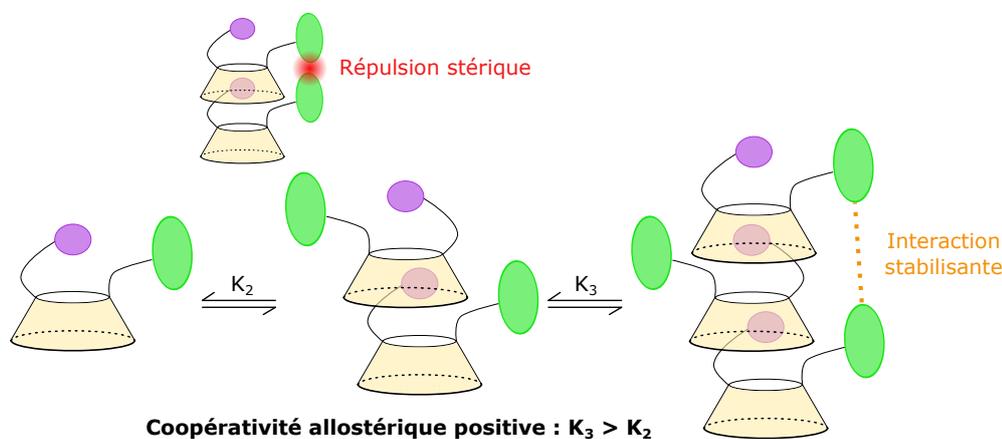


FIGURE 34 – Coopérativité allostérique positive

De manière générale, pour la coopérativité positive, on observe que $K_i > K_2$, où K_i correspond à la constante d'association du i^e monomère sur le polymère. La coopérativité négative existe aussi, et dans ce cas, $K_i < K_2$.

Coopérativité de type chélate Une autre forme de coopérativité, dite de type chélate, existe aussi chez les polymères supramoléculaires. Celle-ci concerne la formation de systèmes cycliques par une association intramoléculaire entre deux unités d'un même polymère. La croissance en longueur du polymère supramoléculaire, en augmentant sa flexibilité, peut favoriser ce mode d'association. Lorsque la taille du polymère augmente, la concentration en invité à proximité de la cavité libre du polymère est supérieure à celle des monomères libres en solution. L'invité libre et la cavité libre situés sur la même chaîne polymère ont alors plus de chance d'interagir pour aboutir à l'espèce cyclique (Figure 35).

La molarité effective (EM) caractérise la propension du polymère à se cycliser, plutôt qu'à réagir avec une autre unité en poursuivant la polymérisation. Ainsi, si on note K la constante d'équilibre régissant l'ajout d'un monomère au polymère déjà formé, on note $K' = K \cdot EM$ la constante d'équilibre conduisant à la cyclisation du polymère.

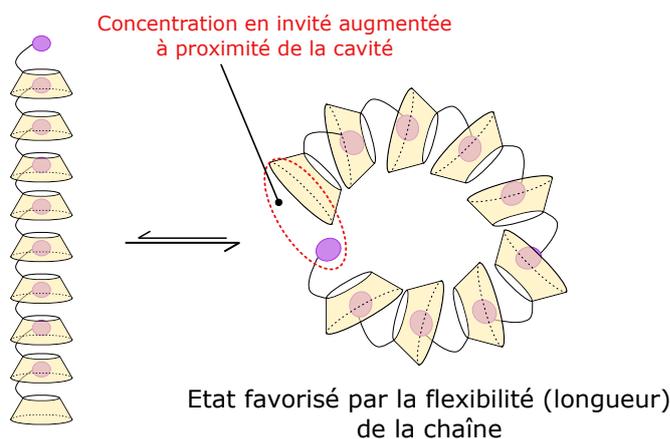


FIGURE 35 – Etat pré-cyclisation favorisé par la flexibilité du polymère

Pour une molarité effective supérieure à 1, le processus de cyclisation est favorisé par rapport à la polymérisation et conduit à l'inhibition de celle-ci. En revanche, si $EM \ll 1$, la formation d'espèces cycliques n'est pas significative et n'influe pas sur la polymérisation supramoléculaire (Figure 36).

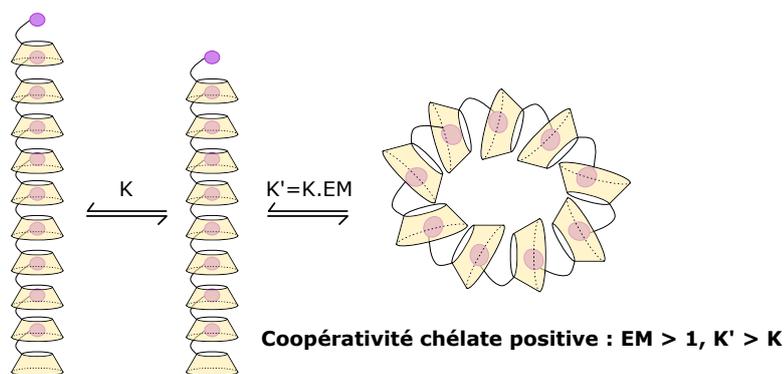


FIGURE 36 – Coopérativité de type chélate positive

AUTO-INCLUSION L'auto-inclusion est un équilibre spécifique aux cyclodextrines qui défavorise la formation du polymère supramoléculaire. Celle-ci se produit lorsque l'invité s'inclut dans la cavité à laquelle il est lié covalamment. Deux mécanismes sont possibles :

- Direct : l'inclusion de l'invité se fait par le col primaire de la cyclodextrine
- Par retournement de sucre : l'inclusion de l'invité se fait par le col secondaire *via* une rotation à 360° d'une unité glucose (Figure 37, [53])

On peut considérer cet équilibre comme un cas particulier de la coopérativité chélate. En effet, là aussi, la concentration en invité à proximité de la cavité est grande en raison du bras liant ces deux entités. Si le système est capable de passer la barrière énergétique conduisant à l'inclusion (interaction avec le col primaire dans le cas de l'inclusion directe et rotation du sucre pour l'autre mécanisme), cette forme est en général favorisée par rapport à la formation du dimère supramoléculaire (c'est-à-dire que la molarité effective est ici grande, Figure 38).

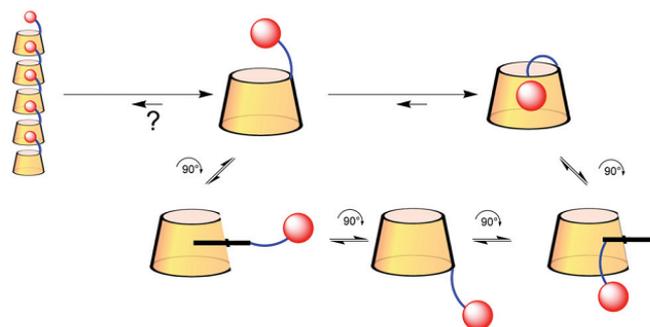


FIGURE 37 – Mécanisme de l'auto-inclusion mettant en jeu le retournement complet d'une unité glucose de la cyclodextrine.[54]

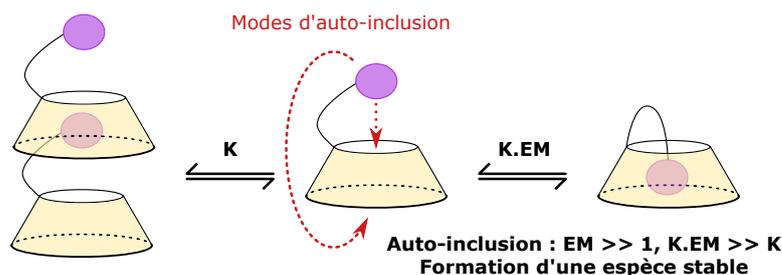


FIGURE 38 – Schéma de l'auto-inclusion

Cet effet est favorable entropiquement car pour la même stabilisation de l'invité dans une cavité, on ne contraint pas deux cyclodextrines comme lors de la formation du dimère. De plus, le dimère, contrairement à l'espèce auto-incluse, aboutit à la formation d'une espèce où l'un des invités n'est pas inclus dans une cavité, ce qui est défavorable énergétiquement. Enfin, si le bras liant l'invité à la cavité est assez flexible, sa torsion aboutissant à l'espèce auto-incluse ne représente pas une grande barrière énergétique (Figure 39).

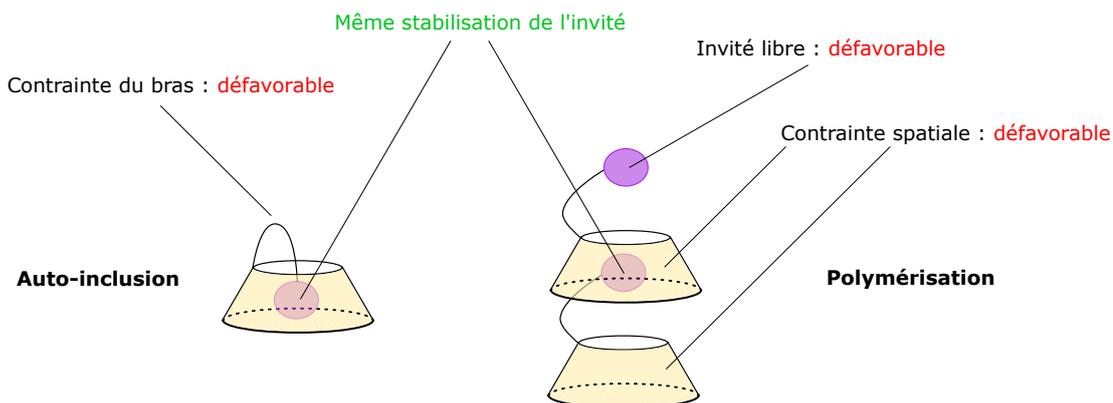


FIGURE 39 – Comparaison des facteurs favorisant l'auto-inclusion et la formation d'un dimère supramoléculaire

Cette auto-inclusion est un phénomène à ne pas négliger car il conduit souvent à la formation d'espèces stables incapables de former des polymères.

2.3.1.2 Formation de structures isotropes : agrégation

L'association de monomères de cyclodextrines en solution peut aussi résulter d'une agrégation. Les cyclodextrines sont en effet connues pour former des agrégats de taille variable selon leur type. Ceux-ci seraient dus à des interactions de type liaisons hydrogène entre cols secondaires bien que leur mode de formation soit encore discuté.[55] En présence d'agents chaotropes¹ ou à pH élevé, la proportion de ces agrégats diminue.

Cependant, l'utilisation de ces conditions n'est pas toujours compatible avec les systèmes utilisés dans la polymérisation supramoléculaire. L'équilibre menant à l'agrégation défavorise alors la formation du polymère supramoléculaire, et peut même constituer un puits thermodynamique si l'agrégat formé est stable.

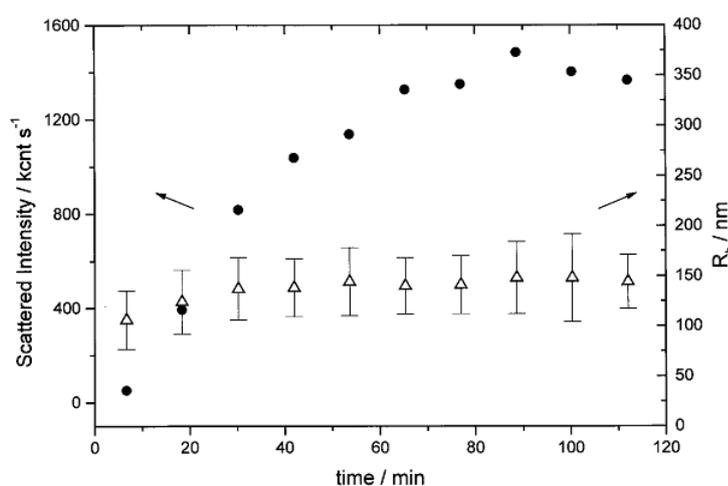


FIGURE 40 – Caractérisation d'agrégats de cyclodextrine β (12 mM, solution filtrée au préalable au travers d'un filtre de 0,02 μm de porosité) par DLS.[56]

● : Intensité diffusée △ : Rayon hydrodynamique moyen des agrégats

En filtrant les échantillons, il est en général possible de retirer les agrégats présents dans le milieu et d'obtenir des cyclodextrines monomères. Cependant, la cyclodextrine β présente un comportement particulier où les agrégats se reforment rapidement même après filtration (Figure 40). La cinétique de l'équilibre entre forme agrégée et monomère est donc rapide, contrairement aux autres types de cyclodextrines, ce qui peut constituer un frein à la polymérisation.

Nous avons vu que plusieurs modes d'association sont théoriquement possibles pour les monomères AB de cyclodextrines. Afin de déterminer si le monomère choisi permet la polymérisation supramoléculaire, il est nécessaire de caractériser les espèces présentes en solution.

2.3.2 Caractérisation des polymères supramoléculaires

Les polymères supramoléculaires de cyclodextrines sont des systèmes dynamiques et leur caractérisation précise est une tâche difficile. Il est souvent nécessaire d'utiliser plusieurs techniques afin de confirmer leur existence. Nous allons les résumer ici

1. Les agents dits chaotropes permettent de déstabiliser les interactions intermoléculaires (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals) en solution.

en nous concentrant sur les techniques utilisées dans le cadre de cette thèse. Nous présenterons aussi brièvement les techniques utilisées pour caractériser les polymères supramoléculaires dans la littérature.

La caractérisation repose en général sur 4 étapes (Figure 41). Il est d'abord nécessaire de confirmer la formation d'un complexe d'inclusion entre la fonction hydrophobe choisie et la cavité. Ensuite, il est possible d'avoir accès à la constante thermodynamique régissant la formation du polymère. Le degré de polymérisation à différentes concentrations peut alors être estimé et être relié au K calculé précédemment. Enfin, la structure (linéaire, cyclique) des espèces en solution peut-être sondée. Nous allons présenter les techniques permettant d'effectuer ces différentes étapes.

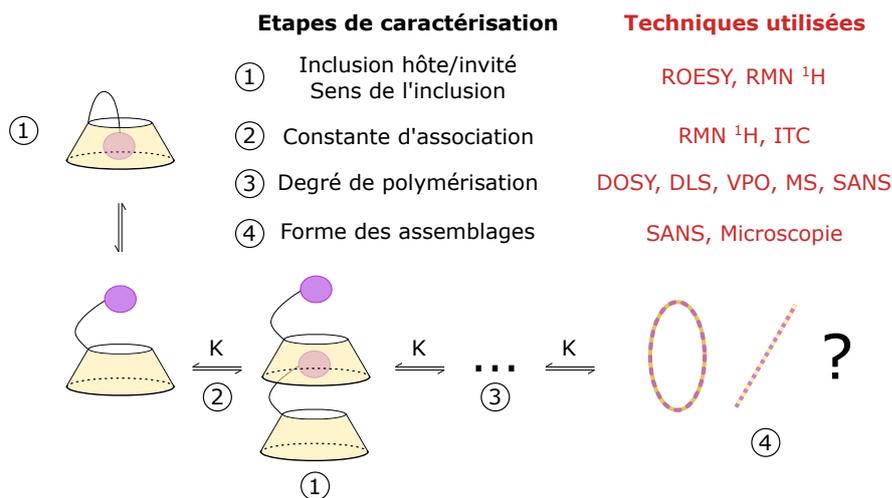


FIGURE 41 – Etapes de caractérisation des polymères supramoléculaires et techniques utilisées

2.3.2.1 Mise en évidence de l'interaction hôte-invité

NOE (NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT) L'utilisation du NOE permet d'obtenir des informations précises sur l'arrangement moléculaire du polymère supramoléculaire.

Cet effet repose sur le couplage dans l'espace entre deux spins nucléaires, généralement d'atomes d'hydrogène. Cet effet dépend fortement de la distance internucléaire (Intensité $\propto d^{-6}$). Afin de simplifier l'explication du phénomène, nous supposons que les spins considérés ne sont pas couplés scalairement à d'autres spins.

Dans le spectromètre RMN, à l'équilibre, le spin nucléaire d'un proton peut avoir deux niveaux d'énergie : le niveau le plus bas dit α où celui-ci est parallèle au champ magnétique appliqué, et le niveau supérieur, dit β où le spin est antiparallèle au champ magnétique appliqué. L'état α est plus peuplé que le β en raison de son énergie plus basse.

L'énergie de transition d'un état à l'autre est quantifiée et correspond à une fréquence de rayonnement précise selon la relation $\Delta E = h\nu$ avec h la constante de Planck et ν la fréquence de transition. En appliquant une radiofréquence précise de manière continue, c'est à dire en apportant de l'énergie pour la transition de l'état α vers l'état β , on égalise les populations de spins entre les deux états (Figure 42).

Lorsque deux spins sont couplés dans l'espace, le retour à l'équilibre de l'un d'eux (c'est à dire le rétablissement des populations α et β initiales) influe sur la distribution

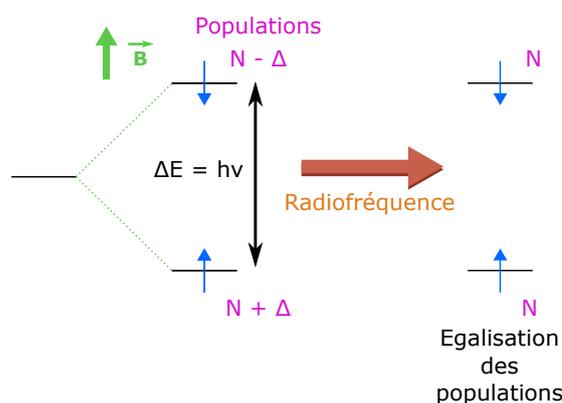


FIGURE 42 – Egalisation des populations de spins entre les différents états
 Δ : Différence de population entre états α et β .

des spins de l'autre. Le NOE peut être mis en évidence en saturant les transitions entre niveau α et β pour un noyau donné. On nommera S le spin irradié (Saturated) et I le spin d'intérêt (dont on veut savoir s'il est couplé spatialement à S). Ce spin I peut lui aussi avoir deux niveaux d'énergie α et β . Afin de simplifier, nous supposons que ces états sont de même énergie que ceux du spin S. Ainsi, le couple (SI) peut avoir les états ($\alpha\alpha$), ($\alpha\beta$), ($\beta\alpha$) et ($\beta\beta$), de la plus petite à la plus grande énergie (Figure 43).

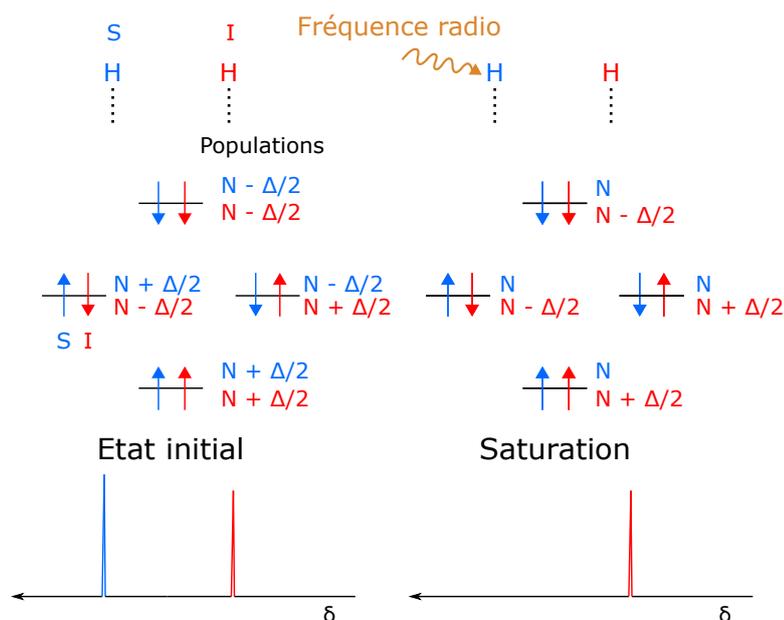


FIGURE 43 – Effet de la saturation de S sur les populations et le spectre RMN ^1H

Afin de revenir à son état d'équilibre, plusieurs transitions sont accessibles au spin S. On notera W leurs probabilités respectives. Les transitions simple quantum² de S (dont la probabilité est notée W_1^S) se font sans que l'état du spin I ne soit changé. Cependant, elles sont saturées par l'application des radiofréquences et n'ont pas d'influence sur le spectre proton, où le signal de S est absent.

Les transitions double quanta et zéro quanta (dont la probabilité est notée respectivement W_2 et W_0) sont à l'origine du NOE. La transition double quanta pour le

2. Transition où le nombre quantique de spin du système varie de 1

couple (SI) représente le passage d'un état ($\beta\beta$) vers l'état ($\alpha\alpha$), et la transition zéro quantum représente le passage de l'état ($\beta\alpha$) vers l'état ($\alpha\beta$). Elles permettent le retour à l'état α de spins de S, tout en changeant l'état de spins de I.

Ces transitions changent la distribution des spins de I. Pour la transition double quanta, des spins de l'état β passent à l'état α , qui possède déjà un excès de population, étant l'état le plus stable. Cette transition amplifie donc la différence de population entre α et β , et donc l'intensité de la résonance du spin I sur le spectre RMN. La transition zéro quantum, quant à elle, fait passer des spins de I de l'état α à l'état β , ce qui diminue la différence de population entre les deux états. L'intensité de la résonance du spin I est donc réduite.

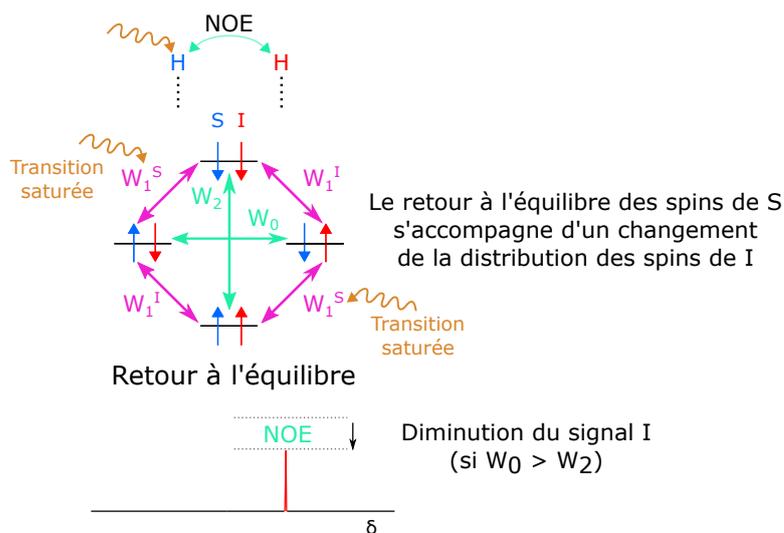


FIGURE 44 – Schéma du NOE

Cependant, dès que la différence entre les populations α et β du spin I est modifiée par les transitions zéro et deux quanta, des transitions simple quanta de I (dont la probabilité est notée W_1^I) se mettent en place, pour revenir à la distribution initiale des spins de I. Celles-ci s'opposent au NOE, et si $W_1^I \gg W_2$ et $W_1^I \gg W_0$, il est possible de ne pas voir le NOE, même s'il existe (Figure 44).

L'expérience NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) consiste donc à caractériser un nouvel état stationnaire, obtenu par la saturation des transitions simple quanta d'un spin S. La différence de population entre les états α et β du spin I lors de l'acquisition du spectre RMN dépend alors de sa relation spatiale avec le spin S.

En pratique, le NOE observé est proportionnel à $W_2 - W_0$. Cependant, pour certaines molécules, cette différence est très faible et le NOE peu visible. Il est alors nécessaire d'utiliser une séquence modifiée dite ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) où le signal observé est proportionnel à $2W_0 + \frac{1}{2}W_2$. C'est en particulier le cas pour certains monomères AB de cyclodextrines.

Grâce au NOE, on peut vérifier l'inclusion de l'invité dans la cavité ainsi que le sens de celle-ci en fonction des corrélations observées entre les protons de la cavité et ceux de l'invité. Plus précisément, les H^3 et H^5 de la cyclodextrine pointent vers l'intérieur de la cavité, les H^3 étant les plus proches du col secondaire. Leurs interactions avec les protons de l'invité nous renseignent sur la profondeur et le sens de l'inclu-

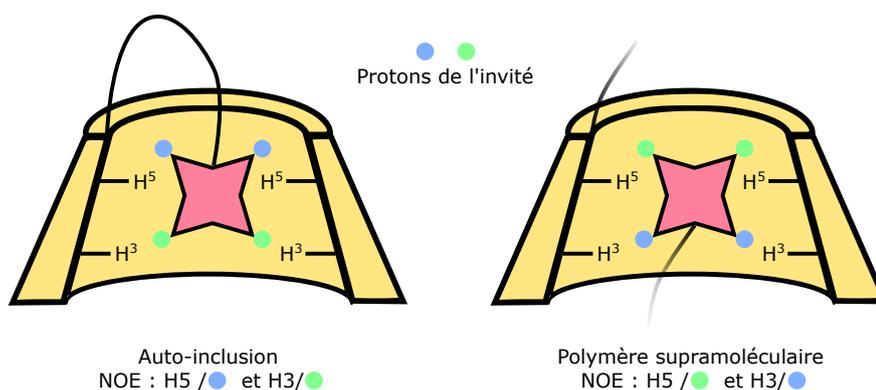


FIGURE 45 – Vérification de l'inclusion par NOE et identification de l'espèce en solution

sion, permettant la discrimination de l'espèce auto-incluse et de l'espèce polymérisée (Figure 45).

SPECTRE RMN ^1H À CONCENTRATION VARIABLE En l'absence d'auto-inclusion, la concentration initiale en monomère AB détermine le degré de polymérisation supramoléculaire en solution. Différentes concentrations impliquent donc différentes distributions d'espèces dans le milieu. L'interaction hôte-invité étant rapide à l'échelle de temps de mesure de la RMN, les signaux obtenus résultent d'une moyenne de toutes les espèces présentes en solution.

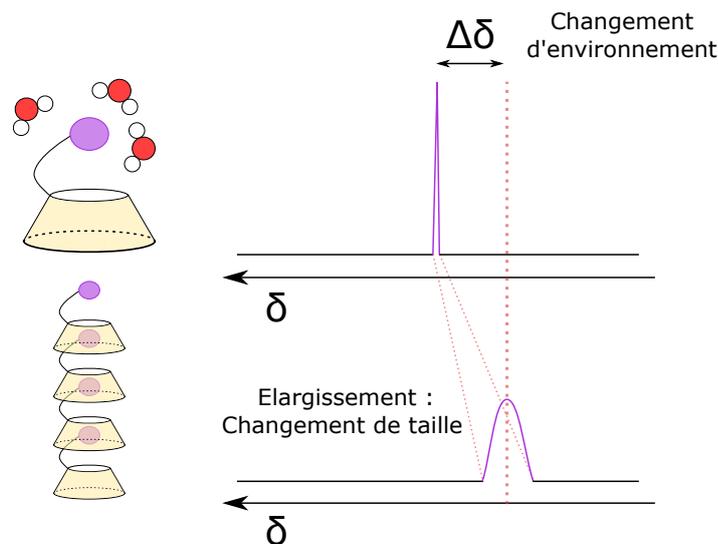


FIGURE 46 – Modification des spectres RMN lors de la formation d'un polymère supramoléculaire

Deux phénomènes sont généralement visibles. Tout d'abord, la polymérisation supramoléculaire induit une variation des déplacements chimiques des protons du monomère en raison de la modification de leur environnement magnétique. En particulier, les protons de l'invité, qui passent d'un environnement aqueux à l'intérieur de la cavité, voient leur déplacement chimique modifié (Figure 46).

De plus, il est possible d'observer un élargissement des signaux lorsque des polymères supramoléculaires sont présents en solution. Cela est dû à la différence de

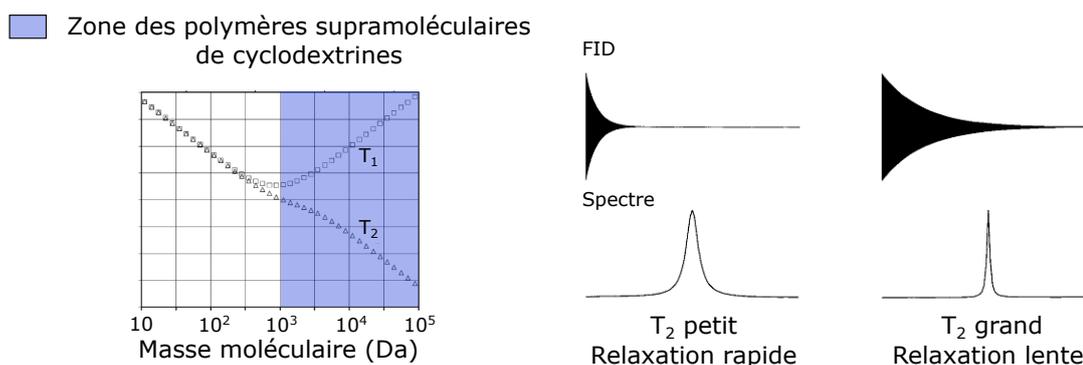


FIGURE 47 – Temps de relaxation T_1 et T_2 en fonction du poids moléculaire (gauche) et allure d'un signal RMN d'espèces de différentes tailles (droite).[57]

relaxation des spins nucléaires entre petites et grandes molécules. On observe une diminution du temps de relaxation transversale T_2 lors de la croissance en taille des molécules en solution. Cette relaxation accélérée résulte de l'interaction spin-spin intra- ou intermoléculaire qui est d'autant plus forte que la réorientation moléculaire est lente.[57] Elle induit une inhomogénéité de la magnétisation ressentie par les molécules en solution, aboutissant à l'élargissement des signaux dans le spectre RMN (Figure 47).

2.3.2.2 Affinité entre monomères

Une fois la présence d'un complexe d'inclusion intermoléculaire confirmée, il est possible d'avoir accès à l'affinité existant entre monomères.

TITRAGE DE L'HÔTE PAR L'INVITÉ L'analyse de spectres RMN ^1H de complexes d'inclusion A+B à concentration variable permet d'obtenir des informations thermodynamiques sur la complexation, et donc indirectement sur la polymérisation des monomères AB. L'acquisition de plusieurs spectres à divers rapports $\frac{[\text{Hôte}]}{[\text{Invité}]}$ et la comparaison des déplacements chimiques observés permet l'accès à la constante d'association entre A et B.[58] Celle-ci ne représente cependant qu'une valeur approchée par rapport au système réel où des monomères AB interagissent.

CALORIMÉTRIE Le titrage isotherme calorimétrique (ITC) repose sur la mesure des variations de chaleur lorsqu'un hôte et un invité sont mélangés. Cette mesure permet de déduire les paramètres thermodynamiques principaux de l'assemblage étudié. Nous présenterons d'abord la technique dans le cadre d'un système A+B classique, l'étude de l'association entre monomères AB reposant sur les mêmes principes.

L'appareil se compose de deux cellules isolées au sein d'une boîte calorifugée. L'une des cellules est remplie d'une solution à concentration donnée d'hôte. L'autre sert de référence et n'est remplie que de solvant. La température des deux cellules est maintenue égale en permanence par l'appareil. Une microsiringue située au dessus de la cellule contenant l'hôte permet l'injection d'un volume V (quelques microlitres) d'une solution concentrée d'invité (Figure 48).

Chaque injection induit la formation du complexe d'inclusion au sein de la chambre, et donc une variation de chaleur au sein de la cellule. La température de la cellule de-

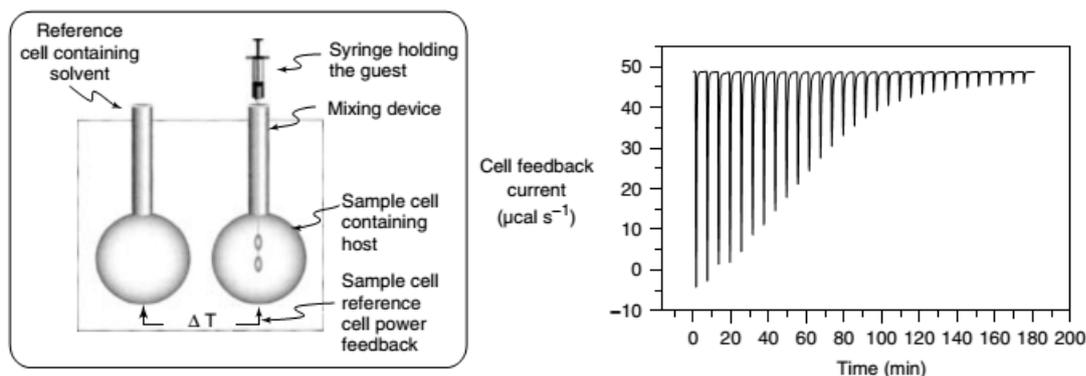


FIGURE 48 – Schéma d’une expérience d’ITC où une solution d’invité est injectée séquentiellement à l’hôte (gauche) et variation de la chaleur en fonction du temps lors de l’expérience (droite).[58]

vant être maintenue constante, l’appareil module le courant permettant de réguler la température lorsque le complexe d’inclusion se forme. En analysant les variations de ce courant au cours du titrage (qu’on relie ensuite à des variations de chaleur), il est possible de connaître les paramètres thermodynamiques de l’assemblage (Figure 49).

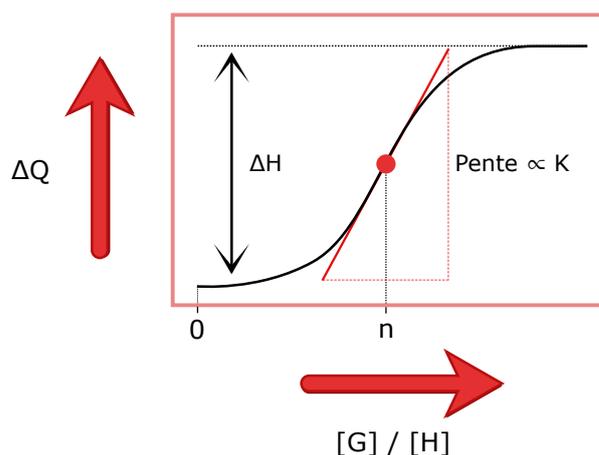


FIGURE 49 – Schéma d’une courbe tracée à partir de mesures en ITC. On peut en déduire la variation d’enthalpie ΔH , la stoechiométrie n et la constante d’équilibre K

Il est possible de réaliser ces titrages en diluant une solution concentrée de monomère AB dans la cellule remplie d’eau. Cette dilution provoque un désassemblage des espèces polymères formées, d’où une variation de chaleur au sein de la cellule. En effectuant des mesures à différentes concentrations initiales en monomère AB, il est possible de déduire les paramètres thermodynamiques de l’assemblage. En pratique, l’appareil comprend un logiciel d’analyse des courbes obtenues qui essaye de trouver le meilleur modèle (isodesmique, coopératif allostérique positif par exemple) pour le système étudié de manière itérative.

2.3.2.3 Estimation du degré de polymérisation

MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION PAR RMN L’expérience DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) est une technique de RMN permettant la mesure du

coefficient de diffusion translationnel D des espèces chimiques composant un échantillon.

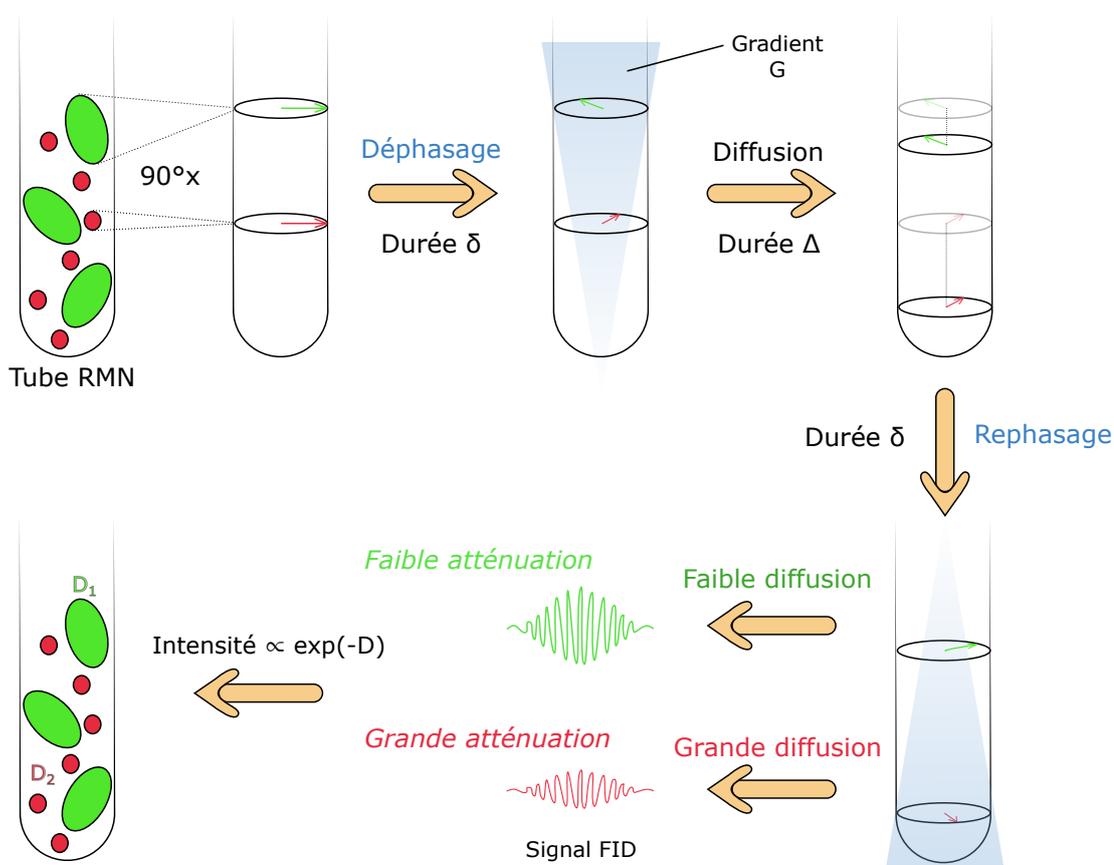


FIGURE 50 – Schéma d'une expérience de DOSY

Elle repose sur l'utilisation de deux gradients de champ de sens opposé selon l'axe du champ magnétique imposé. Un premier gradient de déphasage est d'abord appliqué, puis les espèces en solution diffusent dans le tube RMN pendant un temps choisi. Le même gradient est ensuite appliqué dans le sens opposé.

Dans le cas d'une diffusion nulle, le deuxième gradient appliqué permet un rephasage total des spins et l'écho de spin obtenu n'est pas atténué. En revanche, plus une espèce diffuse vite, plus l'intensité de l'écho de spin est atténuée. En comparant l'intensité du signal obtenu avec et sans gradients, il est possible de déduire le coefficient de diffusion de l'espèce considérée (Figure 50). De manière plus précise, on a :

$$\ln\left(\frac{I_{\text{grad}}}{I_0}\right) = -\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D = -bD$$

avec

I_{grad}	Intensité de l'écho de spin en présence de gradients
I_0	Intensité de l'écho de spin en l'absence de gradients
γ	Rapport gyromagnétique du noyau étudié ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$)
G	Gradient de champ appliqué ($\text{T}\cdot\text{m}^{-1}$)
δ	Durée du gradient appliqué (s)
Δ	Intervalle de temps entre les deux gradients (s)
D	Coefficient de diffusion translationnel ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)

En effectuant des mesures avec G et/ou δ variant, $\ln(I_{\text{grad}}/I_0)$ en fonction de b . Après régression linéaire, on obtient la valeur $-D$ de la pente de la droite sur laquelle sont –en théorie– situés tous les points. On a donc accès au coefficient de diffusion translationnel des espèces en solution (ou de la moyenne pondérée de ceux-ci, si les signaux RMN des espèces se recouvrent).

Une espèce ne formant pas d'assemblage supramoléculaire aura un coefficient de diffusion constant en fonction de la concentration en monomère. On observe en revanche une diminution de celui-ci si l'espèce s'assemble. Selon la forme attendue (linéaire, sphérique) il est aussi possible d'estimer la taille moyenne des objets en solution à partir du coefficient de diffusion obtenu.

DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE (DLS) La DLS est une technique permettant de mesurer la taille moyenne des particules composant un échantillon liquide. Elle repose sur la différence de diffusion de la lumière selon la taille des molécules.

Lorsque des molécules sont en solution, elles sont soumises au mouvement brownien. Plus la molécule est de taille importante, moins ce mouvement est rapide. La DLS consiste à identifier la dynamique du mouvement d'un échantillon de molécules afin d'en déduire leur taille moyenne (Figure 51).

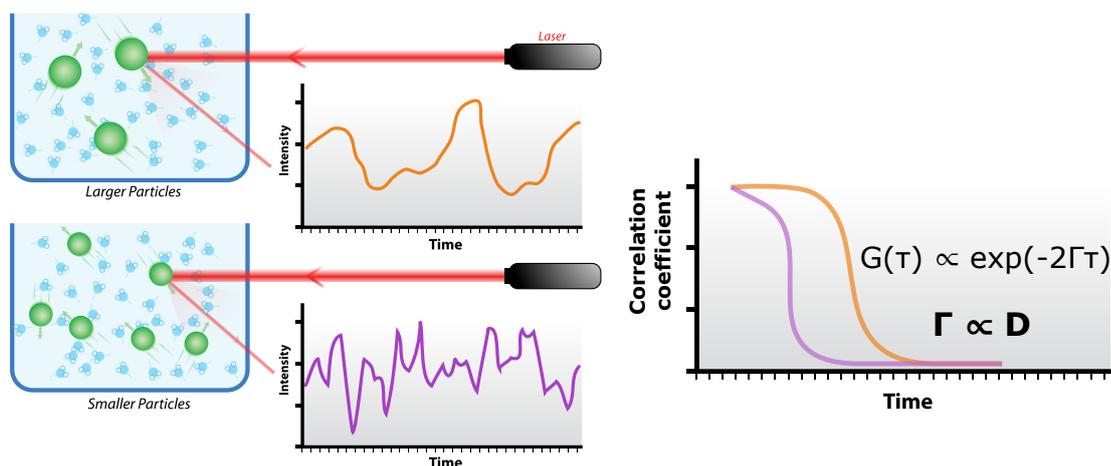


FIGURE 51 – Schéma de la fluctuation de l'intensité diffusée pour deux types de particules et des corrélogrammes correspondants

Lorsqu'un rayonnement laser illumine une molécule de petite taille, l'intensité diffusée fluctue rapidement en fonction du temps en raison de la réorganisation permanente des molécules donnant lieu à des nouvelles interférences avec le rayonnement. En revanche, pour une population de molécules de grande taille, cette fluctuation

est beaucoup plus lente. Dans la DLS, la fluctuation de l'intensité est mesurée au moyen d'un corrélateur qui compare l'intensité diffusée à un instant t puis à différents moments $t + \delta t$. L'analyse de la décroissance de la corrélation (c'est-à-dire de la similarité entre $I(t)$ et $I(t + \delta t)$) permet de déduire une grandeur caractéristique de l'échantillon directement reliée aux paramètres de la mesure (indice optique du milieu, longueur d'onde du laser, angle de mesure) et au coefficient de diffusion moyen de l'espèce en solution. Ainsi, la fonction d'autocorrélation $G(\tau)$ a pour expression :

$$G(\tau) = A (1 + B e^{-2\Gamma\tau})$$

$$\Gamma = Dq^2$$

avec

- A Valeur de la ligne de base de la fonction d'autocorrélation
- B Ordonnée à l'origine de la fonction d'autocorrélation
- q Facteur prenant en compte les paramètres de l'expérience (m^{-1})
- D Coefficient de diffusion translationnel ($m^2.s^{-1}$)

L'analyse de la courbe obtenue permet donc l'accès au coefficient de diffusion translationnel des particules en solution. En ayant ce coefficient, l'appareil déduit le rayon hydrodynamique d'une sphère équivalente selon la formule de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

avec

- R_h Rayon hydrodynamique (m)
- k_B Constante de Boltzmann ($J.K^{-1}$)
- T Température (K)
- η Viscosité du milieu (Pa.s)
- D Coefficient de diffusion translationnel ($m^2.s^{-1}$)

Cependant, cette mesure ne donne qu'une valeur approchée de la taille pour une forme d'assemblage non sphérique. De plus, l'intensité diffusée étant très supérieure pour les polymères que pour le monomère (l'intensité est proportionnelle à d^6 , où d est le diamètre de la particule), il est souvent nécessaire d'utiliser la distribution en nombre afin d'avoir une bonne idée des espèces réellement présentes en solution.

OSMOMÉTRIE À PRESSION DE VAPEUR (VPO) La VPO est une technique utilisée en chimie des polymères qui permet d'avoir accès à la masse moléculaire moyenne de molécules en solution. Elle repose sur la propriété suivante : la dissolution d'un composé non volatil dans une solution provoque une diminution de sa pression de vapeur. Celle-ci correspond à la pression exercée par la phase gazeuse d'un liquide enfermé dans une enceinte, à l'équilibre et à une température donnée.

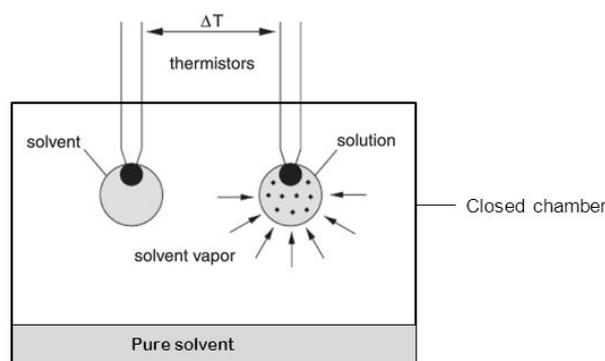


FIGURE 52 – Principe de l'osmométrie à pression de vapeur

L'appareil utilisé consiste en une chambre isolée, au sein de laquelle deux gouttes de solvant sont placées. Ce système est à l'équilibre et la température de chaque goutte est suivie en continu. L'une des gouttes est alors remplacée par une autre contenant le polymère à une concentration donnée. Le système va revenir à l'équilibre, provoquant une diminution de la pression de vapeur dans la chambre. Celle-ci est accomplie par la condensation de molécules de solvant au niveau de la goutte comprenant le polymère supramoléculaire. Cette condensation provoque une variation de sa température, qu'il est possible de relier à la masse moyenne des entités en solution (Figure 52).

SPECTROMÉTRIE DE MASSE La spectrométrie de masse repose sur la détection de composés ionisés en fonction de leur rapport masse/charge, ce qui permet l'identification d'espèces de différentes tailles.

Les liaisons entre monomères formant un polymère supramoléculaire étant de faible énergie, il est nécessaire de procéder à une ionisation douce de l'échantillon. Deux techniques peuvent alors être utilisées : l'ESI (ElectroSpray Ionisation) ou le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation). La première consiste à ioniser le composé au sein d'un nuage de gouttelettes. La seconde nécessite l'adsorption du composé sur une matrice qui est ensuite irradiée par un laser, permettant la désorption du composé et son ionisation.

Cette technique permet d'avoir accès à des distributions de masse qu'il est possible de relier à des états de polymérisation. Cependant, les conditions d'obtention de la mesure sont très différentes de celles en solution.

2.3.2.4 Caractérisation de la structure globale des objets

DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES La diffusion de neutrons aux petits angles est une technique permettant d'identifier la taille et la structure globale de particules en solution.

L'interaction entre un faisceau de neutrons et les molécules contenues dans un échantillon conduit à la diffusion d'un rayonnement dont la direction est changée par rapport à celle du rayonnement incident. La somme des rayons diffusés apparaît sous la forme d'une tache au niveau du détecteur. On mesure alors l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde q (proportionnel à l'éloignement au centre de la

tache de diffusion) dont le module est défini par :

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

avec

2θ Angle de déviation du rayon incident (rad)

λ Longueur d'onde du rayonnement (m)

L'intensité du rayonnement diffusé est détectée pour différents q , en faisant varier θ et/ou λ , la valeur de θ étant faible pour la mesure d'objets entre 1 et 100 nm (d'où le nom de la technique). L'intensité mesurée en fonction de q permet d'accéder à la section efficace macroscopique des objets en solution. Cette section efficace correspond à la probabilité qu'un neutron a d'interagir avec les objets en solution par unité de longueur. Cette probabilité est directement reliée à la taille et à la forme des objets (Figure 53).

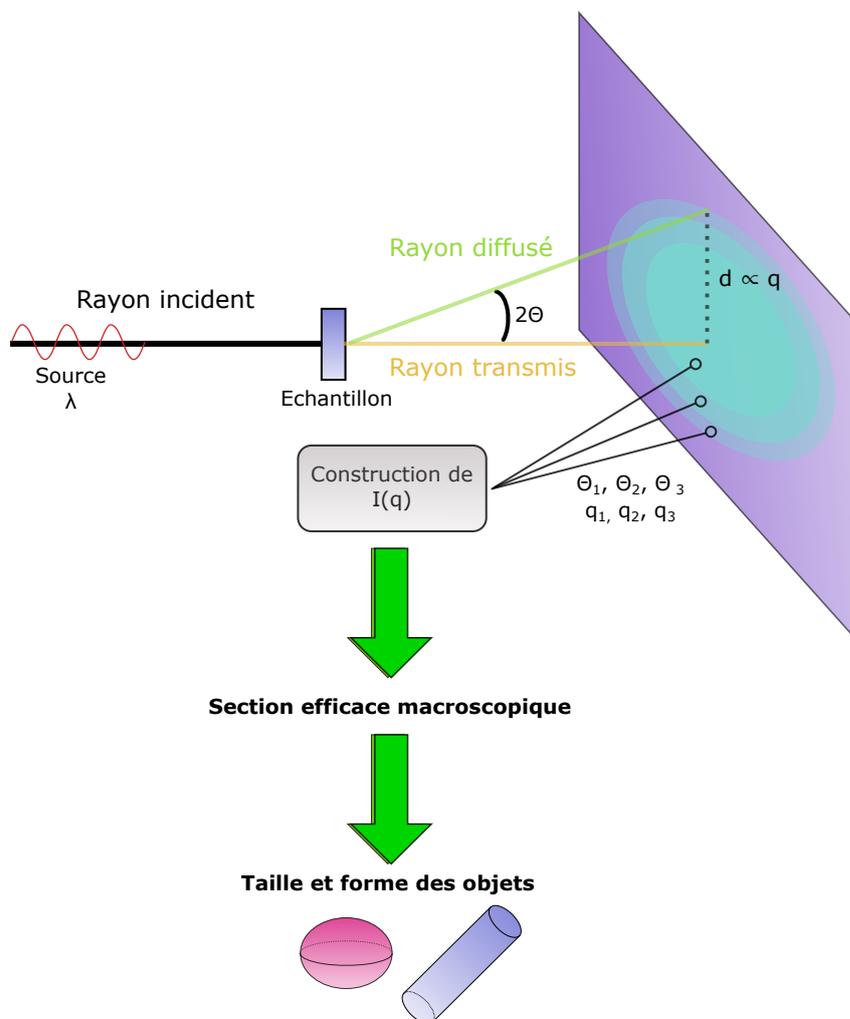


FIGURE 53 – Schéma du SANS

En pratique, la courbe $I(q)$ obtenue peut être comparée à des modèles donnant son allure théorique pour différentes formes et tailles. On peut alors connaître l'aspect des objets en solution.

MICROSCOPIE Certains systèmes sont parfois caractérisés par microscopie à effet tunnel ou AFM. Ces techniques permettent une visualisation directe de la forme obtenue lors de la polymérisation. Cependant, les conditions d'obtention de la mesure sont éloignées de celles en solution. Dans les deux cas, le polymère est immobilisé sur une surface où les interactions sont différentes de celles dans l'eau. De plus, le greffage de l'échantillon à la surface se fait en général par évaporation lente du solvant, ce qui ne permet pas de relier les espèces observées à une concentration en monomère.

Nous avons vu qu'un important panel de techniques existe afin de caractériser les polymères supramoléculaires en solution, de la formation du complexe hôte-invité à la structure globale des assemblages obtenus. Nous allons maintenant voir quels systèmes monomères AB, fondés sur les cyclodextrines, ont déjà été développés dans la littérature.

2.4 REVUE DES POLYMÈRES SUPRAMOLÉCULAIRES À PARTIR DE CYCLODEXTRINES DANS L'EAU

L'équipe de Harada fut l'une des premières à s'intéresser au thème de la polymérisation de monomères de type AB à partir de cyclodextrine en milieu aqueux. Certaines structures dimériques de monomères AB à partir de cyclodextrines β avaient déjà été identifiées à la fin des années 90, mais la polymérisation supramoléculaire n'était alors pas l'objet de ces recherches.[59, 60]

Nous verrons dans un premier temps les structures obtenues à partir de cyclodextrines α , qui sont les plus nombreuses, puis celles obtenues à partir de cyclodextrines β .

2.4.1 Structures fondées sur la cyclodextrine α

Les premiers travaux sur la polymérisation supramoléculaire de cyclodextrines sont dus à l'équipe de Harada, avec des systèmes reposant sur l'interaction entre un phényle et une cyclodextrine α .[61] Lorsque la cyclodextrine α est fonctionnalisée en position 6 par un groupement hydrocinnamoylé, les spectres RMN ^1H obtenus varient avec la concentration initiale en monomère (Figure 54). De plus, des contacts NOE sont visibles entre les protons aromatiques de l'invité, et ceux de l'intérieur de la cavité. Ces signaux sont attribués à des complexes intermoléculaires de petite taille (hypothétiquement des dimères, même si aucune mesure le confirmant n'est rapportée).

La rigidification du bras entraîne un changement du comportement des molécules en solution. Les variations de déplacement chimique à concentration variable dans D_2O sont alors plus importantes que précédemment (Figure 54). Cela est attribué à une association favorisée, visible aussi VPO, où la masse moléculaire moyenne des espèces en solution croît avec la concentration pour atteindre 2200 g/mol à 10 mM

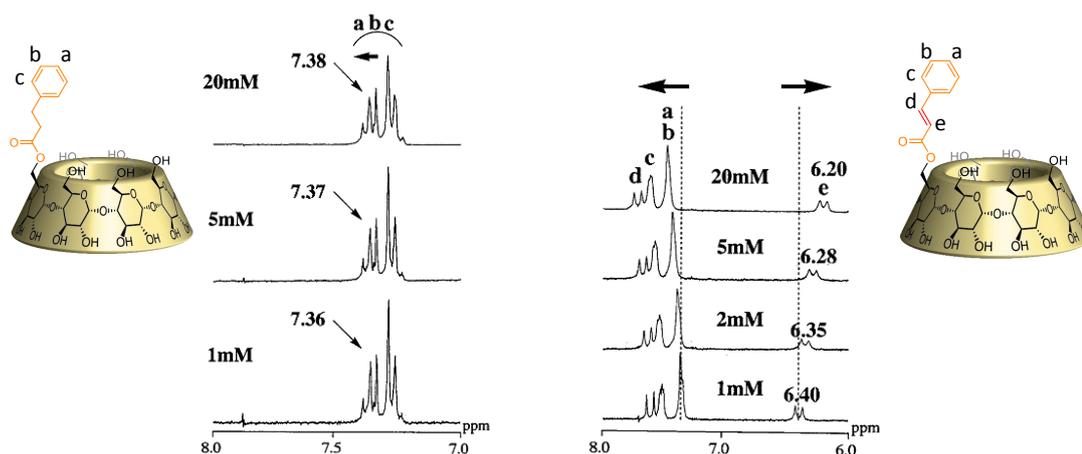


FIGURE 54 – Influence de la rigidification du bras sur les variations de déplacements chimiques

(soit un trimère, [Figure 55](#)). La rigidification du bras semble donc ici être un facteur favorable à la polymérisation supramoléculaire.

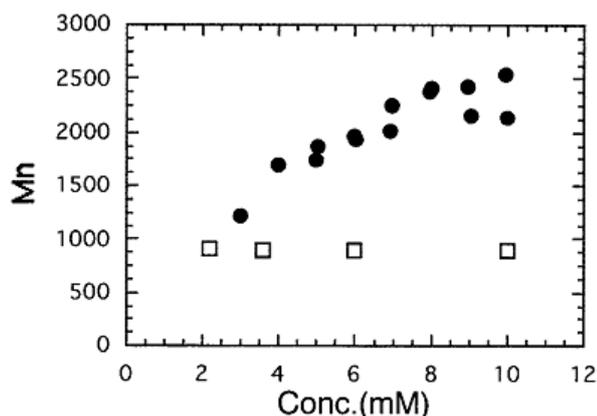


FIGURE 55 – Masse moléculaire moyenne des espèces en solution pour la cyclodextrine α native (□) et fonctionnalisée par un bras phényl rigide (●)

La même équipe a aussi étudié l'influence de la position portant la fonction phényl. Deux dérivés, l'un fonctionnalisé en position 6 et l'autre en position 3, ont donc été synthétisés.[62] La fonction utilisée est ici un cinnamamide. Les deux dérivés ont des déplacements chimiques qui varient avec la concentration et des contacts NOE confirment la présence d'un complexe d'inclusion ([Figure 56](#)).

De plus, le coefficient de diffusion mesuré par DOSY pour chaque espèce décroît avec l'augmentation de la concentration en monomère, ce qui est le signe de la formation d'espèces polymères. La VPO permet d'estimer les tailles des assemblages obtenus en fonction de la concentration. Le monomère fonctionnalisé en position 6 stagne sous forme dimérique à partir de 10 mM, alors que celui fonctionnalisé en position 3 atteint un plateau correspondant à 12 unités polymérisées à partir de 30 mM ([Figure 57](#)).

Cette stagnation à partir de 30 mM est attribuée à la formation d'espèces cycliques, inhibant la polymérisation. La formation de ces espèces cycliques résulterait de la flexibilité croissante de la chaîne polymère lorsque des unités s'ajoutent.

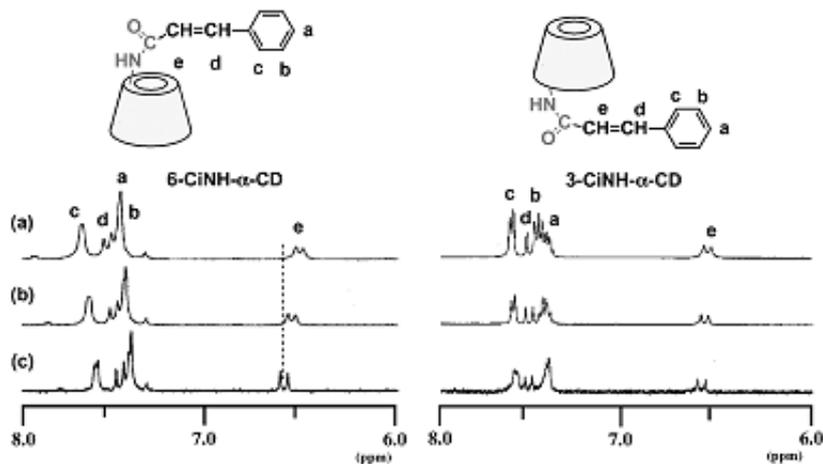


FIGURE 56 – Déplacements chimiques (400 MHz, D₂O, 310 K) des espèces synthétisées à 1 mM (a), 20 mM (b) et 40 mM (c).[62]

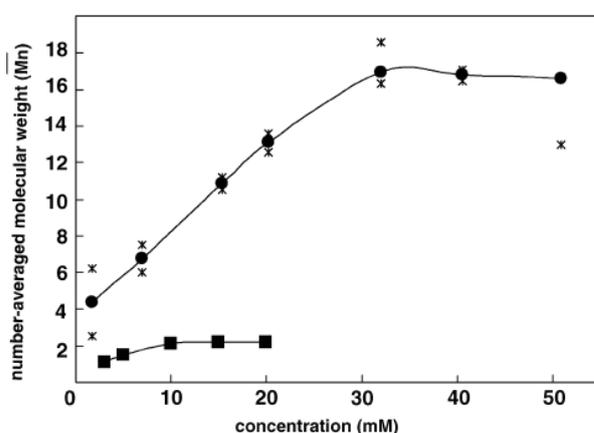


FIGURE 57 – Comparaison des tailles de polymères pour des monomères fonctionnalisés en position 3 (●) ou 6 (■)

L'utilisation d'un système où le phényle est substitué en *para* par un groupement encombrant permet de s'affranchir de la formation de ces espèces cycliques.[63] Ainsi, l'introduction d'un groupement NHBoc permet de former des assemblages supramoléculaires, confirmés par ROESY et spectre ¹H à concentration variable (Figure 58).

Cependant, la taille moyenne du polymère supramoléculaire estimée par VPO (masse moléculaire moyenne de 16000 g/mol à 30 mM, soit un degré de polymérisation de 13) est similaire à celle du système précédent. Ainsi, même si aucune structure cyclique n'est ici détectée, la modification de l'invité ne permet toujours pas de dépasser les 13 unités polymérisées à 30 mM.

De manière surprenante, la présence du groupement *tert*-butyle impose la conformation de chaque unité ajoutée au polymère par effet stérique. Cela aboutit à la formation d'une structure chirale, mise en évidence par l'apparition de bandes Cotton en dichroïsme circulaire, dont l'intensité croît avec la concentration. C'est le premier exemple d'un polymère supramoléculaire chirale à partir de cyclodextrines fonctionnalisées en monomères AB.

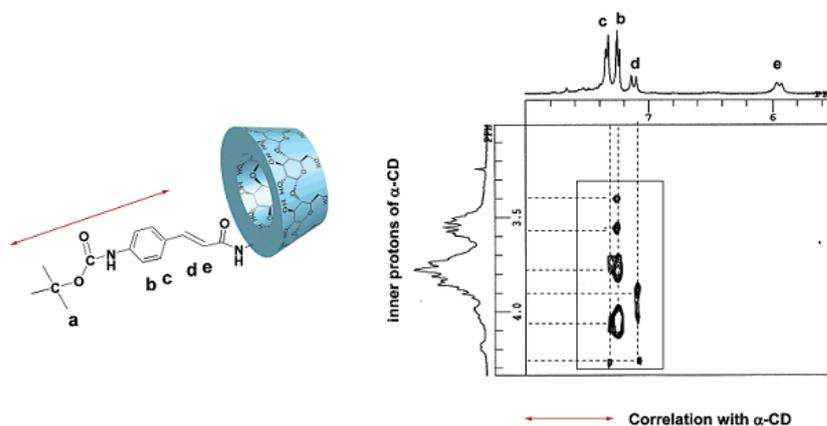


FIGURE 58 – Spectre ROESY montrant les interactions entre protons de la partie phényle et la cavité de la cyclodextrine

Il est aussi possible de concevoir des systèmes où la morphologie des assemblages en solution est commutable.[64]

En fonctionnalisant une cyclodextrine par un stilbène, l'assemblage obtenu dépend de la conformation *cis* ou *trans* de celui-ci en raison de leur différence d'affinité pour la cavité de la cyclodextrine α ($K \approx 1260 \text{ M}^{-1}$ pour le *cis* et $K \approx 360 \text{ M}^{-1}$ pour le *trans*). La cyclodextrine α fonctionnalisée en 3 par un stilbène donne un dimère dans sa conformation *trans*. Ce dimère est stabilisé par l'inclusion mutuelle de l'invité de chaque cyclodextrine dans la cavité de l'autre (Figure 60).

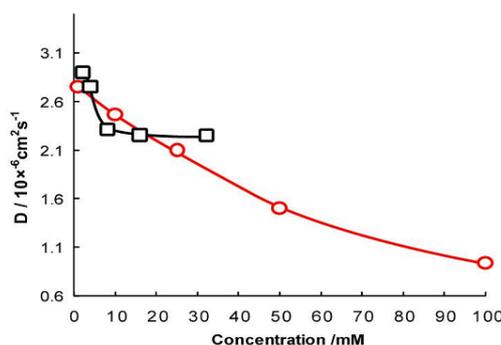


FIGURE 59 – DOSY de la cyclodextrine α fonctionnalisée par un stilbène *cis* (○) comparée avec celle d'un dimère de référence (□)

Lorsque l'échantillon est irradié, 85 % des molécules sont converties en leur forme *cis*. Cependant, malgré la faible affinité de cette forme pour la cavité de la cyclodextrine, on observe une nette diminution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration (Figure 59).

Cette association est inattendue, d'autant plus que le spectre ROESY de cette molécule ne montre pas de corrélation entre les protons situés à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine, et ceux du stilbène *cis*. Cet assemblage ne repose donc pas sur des interactions hôte-invité. Le spectre de dichroïsme circulaire montre la présence de plusieurs groupes *cis*-stilbène proches, en raison d'empilements π - π entre ces motifs (Figure 60). Ceux-ci disparaissent si l'eau est remplacée par du méthanol ou si de la cyclodextrine β , capable de complexer efficacement le stilbène *cis*, est ajoutée

au milieu. Le plus grand assemblage de ce type, observé dans le spectre de masse (ESI/TOF), correspond à 22 unités.

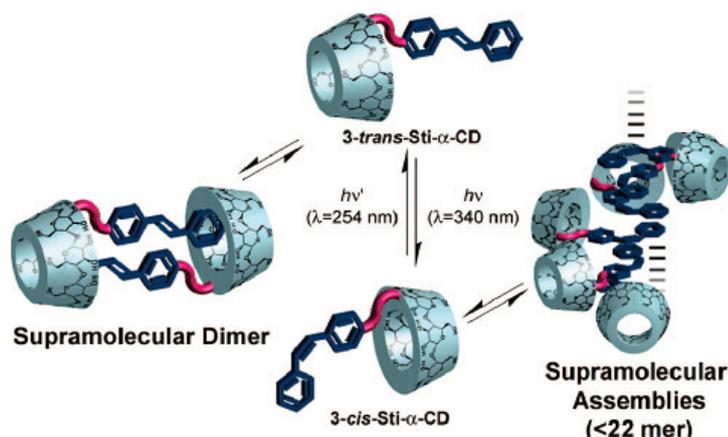


FIGURE 60 – Structures supramoléculaires observées en fonction de l'isomère du stilbène.[64]

L'assemblage observé à 100 mM possède le coefficient de diffusion le plus petit obtenu par l'assemblage de monomères de type AB de cyclodextrine α ($D = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Cependant, celui-ci ne repose pas sur des associations hôte-invité.

Plus récemment, des valeurs similaires ont été atteintes par des cyclodextrines fonctionnalisées en position 2 ou 3 par un groupement cinnamyl, similaires à celles introduites par Harada, dont l'inclusion est confirmée par des spectres ROESY et la diminution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration en monomère (Figure 61).[65]

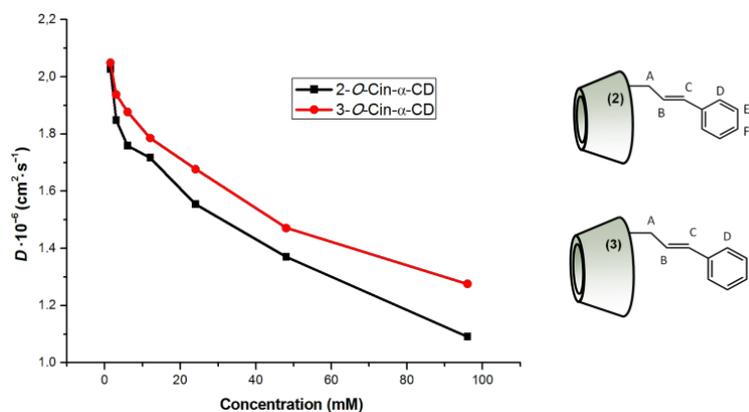


FIGURE 61 – Evolution du coefficient de diffusion pour deux cyclodextrines fonctionnalisées en position 2 ou 3 par un cinnamyle

Les auteurs caractérisent aussi les espèces obtenues par DLS, et voient apparaître de larges espèces, même à faible concentration (taille moyenne de 700 nm à 9,2 mM). Ceux-ci sont incompatibles avec l'unique formation d'un polymère supramoléculaire linéaire, dont la longueur ne devrait excéder 5 nm à cette concentration (dans le cadre du modèle isodesmique, le degré de polymérisation est estimé à 3 environ). Les auteurs attribuent ce phénomène à une agrégation d'assemblages supramoléculaires où l'interaction entre la cavité et l'invité est stabilisante. En ajoutant un compétiteur ou

en changeant de solvant (DMSO), ces agrégats disparaissent. L'augmentation de la température permet aussi de diminuer la taille des agrégats (Figure 62).

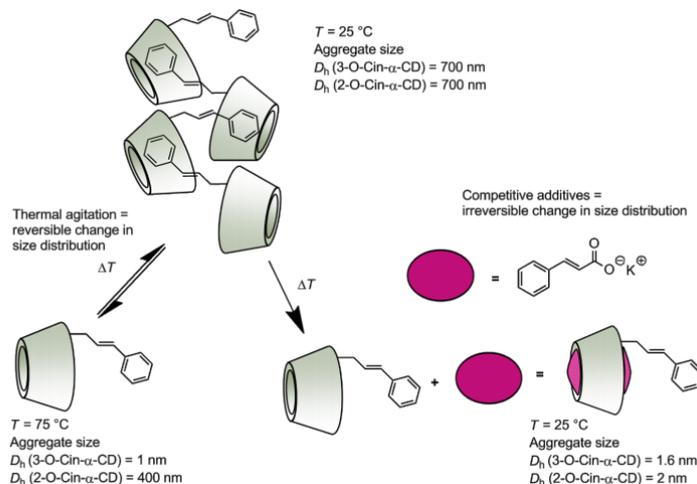


FIGURE 62 – Schéma général de l'équilibre entre monomère et agrégat.

2.4.2 Structures fondées sur la cyclodextrine β

En raison de leur solubilité plus faible que celle des cyclodextrines α , les exemples de systèmes fondés sur des cyclodextrines β formant des polymères supramoléculaires en solution sont plus restreints. Certains monomères de type AB conduisent ainsi à la formation de structures supramoléculaires à l'état solide. [61, 62, 66]

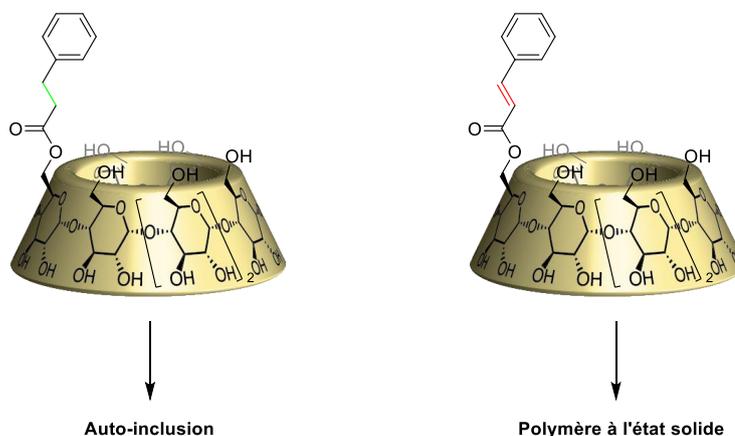


FIGURE 63 – Rigidification du bras *via* l'introduction d'une insaturation

Les premiers travaux concernant l'utilisation de monomères AB de cyclodextrines β dans le but de former des polymères supramoléculaires en solution proviennent encore de l'équipe de Harada.[61] L'utilisation du bras hydrocinnamoyloyle flexible aboutit à la formation d'une espèce auto-incluse, où l'invité lié à la cyclodextrine est complexé par sa propre cavité. Cela est mis en évidence par l'absence de modification des déplacements chimiques lorsque la concentration en monomère augmente, bien que l'interaction entre le phényle et la cavité soit mise en évidence par un spectre

ROESY. L'introduction d'une insaturation dans le bras induit la formation d'un polymère supramoléculaire à l'état solide (Figure 63).

Parallèlement, les travaux de Lincoln montrent que des monomères formés à partir d'adamantane et de cyclodextrine β reliés par un bras flexible peuvent conduire à des espèces auto-incluses stables (Figure 64).[67] L'addition de compétiteur adamantane carboxylate ne permet alors pas de déplacer l'équilibre vers la forme libre.

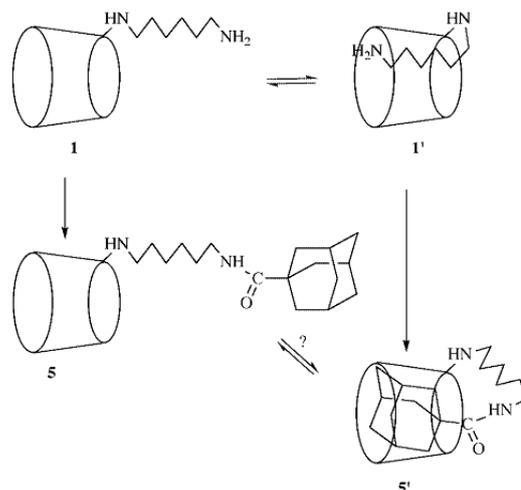


FIGURE 64 – Système utilisé par Lincoln aboutissant à l'auto-inclusion

L'utilisation d'invités de type tosyl ou naphthyl introduits en position 6 de la cyclodextrine permet la formation de grandes espèces caractérisées par DLS (Figure 65).[68] Cependant, les tailles observées sont attribuées à la formation d'agrégats stables résultant de l'association de polymères supramoléculaires entre eux.

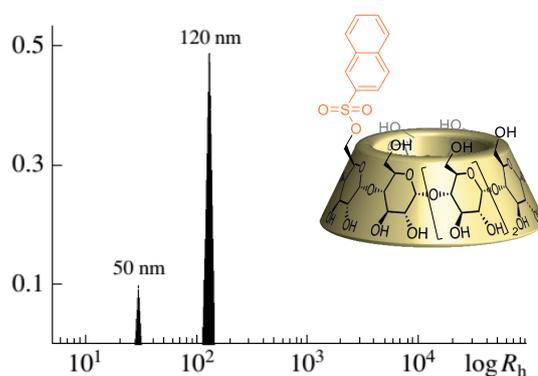


FIGURE 65 – Agrégats observés par DLS à 3 mM

Le groupe de Ritter observe lui aussi de grandes tailles d'objets en DLS, en utilisant des monomères AB liant un adamantane à la cavité en position 6.[69] Ces tailles évoluent avec le temps pour aboutir à la formation d'espèces de taille moyenne de 700 nm à une concentration de 14 mM au bout de 24 h (Figure 66).

Ces grandes tailles sont attribuées à la formation d'espèces cycliques en équilibre avec le polymère supramoléculaire linéaire, bien qu'aucune technique ou modèle permettant de confirmer leur présence ne soient utilisés.

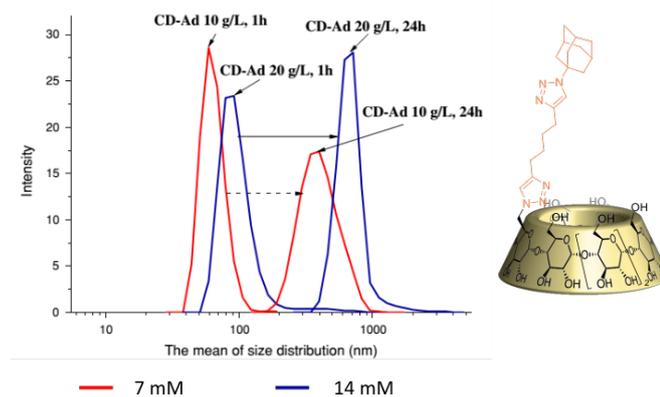


FIGURE 66 – Agrégats observés par DLS en fonction de la concentration et du temps.

L'utilisation d'un invité cinnamoyl-trinitrophényl permet la formation de polymères supramoléculaires de cyclodextrines β mis en évidence par ROESY et VPO (Figure 67).[70]

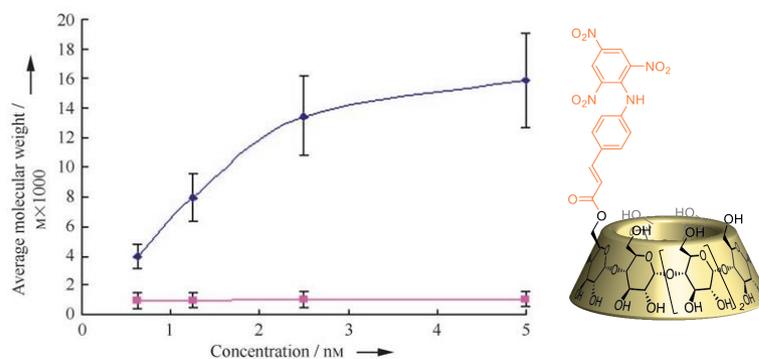


FIGURE 67 – VPO du monomère AB et de la cyclodextrine α en fonction de leur concentration.

La VPO indique une taille de 8 unités environ à 5 mM. En augmentant la concentration, une transition de phase sol-gel est observée, aboutissant à la formation d'un hydrogel à partir de 20 mM. Celui-ci se caractérise par une augmentation nette de la viscosité de la solution. L'observation d'un échantillon par AFM confirme la présence de fibres enchevêtrées.

Ce phénomène résulterait de l'association des polymères supramoléculaires entre eux, *via* des liaisons hydrogène entre fibres adjacentes. En effet, l'ajout d'invité compétiteur, ou de molécule perturbant les liaisons hydrogène (urée) provoque la transition gel-sol.

2.4.3 Structures alternant cyclodextrines α et β

Afin de pouvoir profiter des meilleures constantes d'association hôte-invité de la cyclodextrine β , sans pâtir d'une mauvaise solubilité ou de la formation d'espèces auto-incluses, l'équipe de Harada a mis au point deux systèmes mixtes où des mélanges de cyclodextrines α et β sont utilisés.

Dans le premier, elle utilise des cyclodextrines α fonctionnalisées en position 3 par un adamantane et des cyclodextrines β fonctionnalisées en position 6 par un dérivé

de phényle (Figure 68).[71] La formation du polymère supramoléculaire est prouvée par RMN et aboutit à la formation de structures de masse moléculaire moyenne de 10000 g/mol à 10 mM en VPO (soit entre 7 et 8 unités polymérisées).

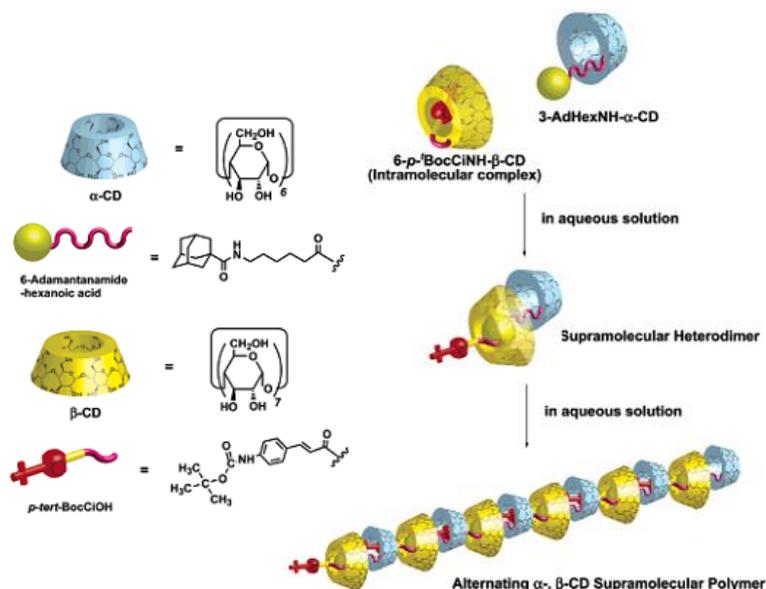


FIGURE 68 – Système alternant cyclodextrines α et β . [71]

Dans le second exemple, un enchaînement de [2]-rotaxanes est utilisé pour former le polymère supramoléculaire.[72] Une cyclodextrine β fonctionnalisée par un dérivé cinnamoylé terminé par une amine, formant des espèces auto-incluses en solution, est mise en présence d'un compétiteur adamantane, ce qui déplace l'équilibre en faveur de sa forme libre. L'ajout de cyclodextrine α provoque la formation du complexe d'inclusion avec le cinnamoylé libre, dont l'extrémité amine peut alors être bouchonnée pour former le [2]-rotaxane. Le bouchon choisi est un bon invité pour la cavité de la cyclodextrine β , ce qui permet la formation de polymères supramoléculaires en solution (Figure 69).

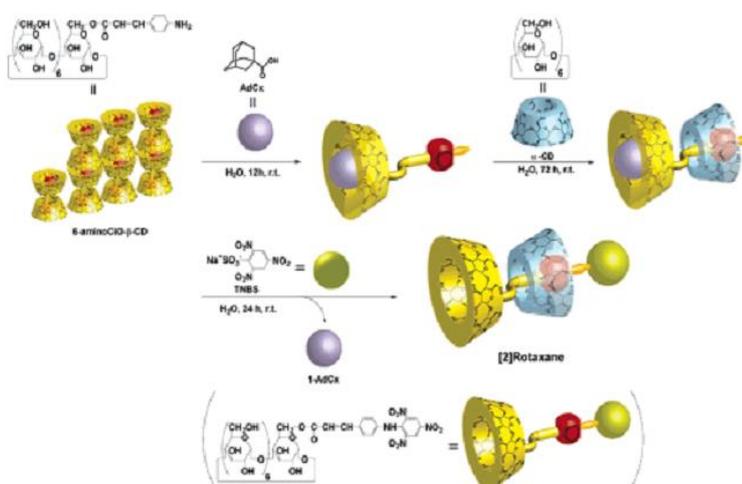


FIGURE 69 – [2]-rotaxane de cyclodextrines α et β permettant la formation de polymères supramoléculaires.[72]

La structure du polymère est confirmée par RMN et la VPO montre qu'on atteint un degré de polymérisation de 8 environ à 10 mM. Une image de microscopie à effet tunnel montre une structure linéaire de plus de 20 nm. Cependant, celle-ci est obtenue sur une surface, après évaporation lente d'une solution de monomère, ce qui ne reflète pas forcément le comportement des espèces en solution.

La construction d'un polymère supramoléculaire fondé sur les cyclodextrines est donc une tâche complexe, notamment avec les cyclodextrines β où l'auto-inclusion, la faible solubilité, et la formation d'agrégats constituent des freins à la polymérisation. Notre laboratoire a voulu relever ce défi avec pour but de synthétiser des polymères supramoléculaires de cyclodextrines en solution de taille supérieure à ceux observés jusqu'à présent. Nous allons donc d'abord rappeler les différentes étapes de ce projet ayant précédé cette thèse, avant de présenter la réflexion ayant conduit à celle-ci.

2.5 OPTIMISATION DE LA POLYMÉRISATION SUPRAMOLÉCULAIRE DE CYCLODEXTRINES

2.5.1 Considérations initiales et expériences préliminaires

Nous avons précédemment vu les différents équilibres pouvant conduire à l'assemblage de monomères AB. Dans tous les cas conduisant à une polymérisation, la constante d'association entre monomères constitue la pierre angulaire de l'assemblage. Dans l'optique de former le polymère le plus long possible en solution, il est nécessaire de chercher des couples cyclodextrine/invité dont la constante d'association est élevée.

Le système cyclodextrine β /adamantane constitue l'un d'eux ($K > 10^4 \text{ M}^{-1}$).^[73] Pourtant, il n'existe pas d'exemple dans la littérature où des polymères supramoléculaires reposant uniquement sur ce couple sont formés en solution. Les dérivés de cyclodextrine β fonctionnalisés par de l'adamantane décrits conduisent à des espèces auto-incluses ou à des polymères supramoléculaires solides.^[66, 67]

Afin de tenter de polymériser des monomères AB de cyclodextrines β fonctionnalisées par de l'adamantane, deux dérivés ont précédemment été synthétisés par notre équipe : l'un reliant l'adamantane à la cyclodextrine par un bras triazole et l'autre par un bras succinyl.^[54] Le composé au bras triazole est insoluble dans l'eau, ce qui le disqualifie pour former des polymères en solution. Le composé au bras succinyl, quant à lui, forme une espèce auto-incluse. L'auto-inclusion est montrée par ROESY et confirmée par DOSY, où le coefficient de diffusion mesuré reste constant en fonction de la concentration (Figure 70).

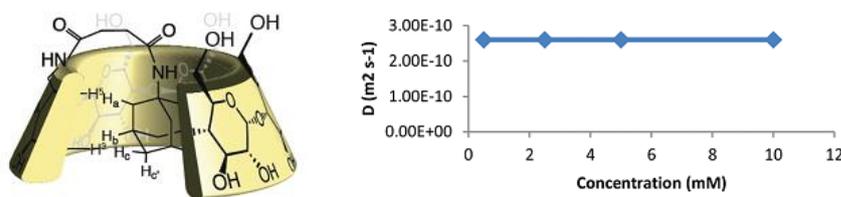


FIGURE 70 – Structure de l'espèce auto-incluse observée par ROESY (gauche) et coefficient de diffusion de l'espèce à concentration variable (droite)

L'adamantane étant trop volumineux pour s'inclure par le col primaire de la cyclodextrine, et le bras le liant à la cyclodextrine n'étant pas assez long et flexible pour que celui-ci ait directement accès au col secondaire, un mécanisme d'auto-inclusion par retournement d'un sucre est proposé.

Les résultats obtenus avec ces deux molécules nous confrontent au même problème que les exemples précédemment décrits. La solubilité peut en général être améliorée en introduisant des groupements polaires sur le monomère synthétisé. En revanche, certains phénomènes comme l'auto-inclusion sont pour l'instant difficilement contrôlés. Nous avons donc décidé de mettre au point une méthode permettant de limiter les équilibres défavorables empêchant la polymérisation.

2.5.2 Limitation des équilibres défavorables

Trois phénomènes défavorisent la polymérisation supramoléculaire : la formation d'espèces cycliques, l'agrégation et l'auto-inclusion. Les deux premiers équilibres sont difficiles à prévoir : la cyclisation dépend d'un nombre important de facteurs et l'agrégation n'est pas toujours rationalisée. On connaît en revanche les mécanismes conduisant à l'auto-inclusion. De plus, cet équilibre est le plus délétère des trois car il inhibe totalement la polymérisation, là où des espèces cycliques peuvent cohabiter avec le polymère supramoléculaire linéaire formé.

Afin de contrer l'auto-inclusion, il est nécessaire d'amplifier la barrière énergétique conduisant à ce phénomène. Nous avons précédemment vu que l'équipe de Harada avait eu recours à la rigidification d'un bras pour passer d'une espèce auto-incluse à une espèce polymère.[61] Ce changement se faisait cependant au détriment de la solubilité, le polymère supramoléculaire étant obtenu à l'état solide.

Nous proposons une autre approche afin de contrer l'auto-inclusion. Celle-ci consiste à ponter deux unités glucose diamétralement opposées sur le col primaire de la cyclodextrine, l'une d'elle étant ensuite fonctionnalisée par un invité adamantane. Cette approche permet de supprimer l'inclusion par ses deux mécanismes connus. En effet, la présence du pont encombre la face primaire de la cyclodextrine et empêche une inclusion directe par celle-ci. De plus, le sucre portant l'invité étant lié à une autre unité de la cyclodextrine, celui-ci ne peut se retourner pour former l'espèce auto-incluse. Enfin, des travaux précédents menés au laboratoire ont montré que le pontage en AD du col primaire de la cyclodextrine β permettait d'augmenter sa constante d'association avec l'acétate d'adamantane dans l'eau.[74]

Différentes structures pontées ont donc été synthétisées dans le cadre de cette thèse. Celles-ci vont être présentées en reliant leur fonctionnalisation aux propriétés désirées.

2.6 SYSTÈME PONTÉ PAR LE DIAMINOBTANE

2.6.1 Conception du système

Afin de pouvoir profiter de la forte interaction entre adamantane et cyclodextrine β , tout en supprimant l'auto-inclusion et en améliorant la solubilité de la cyclodextrine, un nouveau système a été conçu.

Ce système repose sur le pontage de la cyclodextrine par une diamine puis sur la fonctionnalisation de ce pont. Plus précisément, un pont à 4 carbones a été choisi, car celui-ci conserve la structure conique de la cavité après étude par modèle moléculaire. Le groupement adamantane est séparé de la cyclodextrine par 2 carbones. Cela représente un compromis entre un bras rigide qui pourrait figer le système et un bras long et flexible qui pourrait favoriser l'auto-inclusion ou la cyclisation (Figure 71).

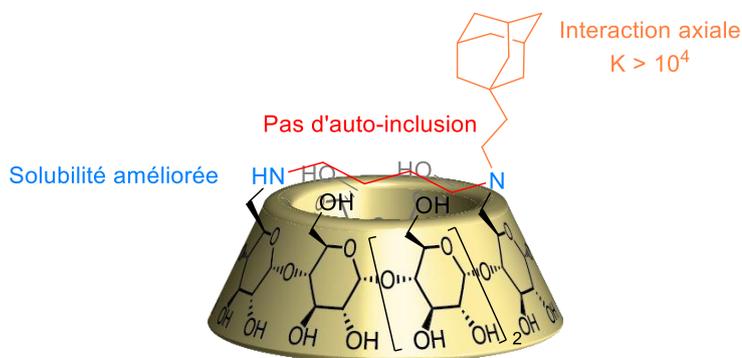


FIGURE 71 – Monomère cible

Afin de synthétiser cette molécule, la rétrosynthèse imaginée débute par la déprotection des unités sucres. Précédemment, la fonction adamantane serait introduite par une amination réductrice sur la cyclodextrine pontée diamine. Celle-ci serait obtenue de manière analogue, en faisant réagir la diamine sur la cyclodextrine portant deux aldéhydes sur son col primaire. Ceux-ci résulteraient d'une oxydation d'alcools primaires, obtenus après double déprotection sélective du col primaire d'une cyclodextrine β perbenzylée par le DIBAL-H (Figure 72).

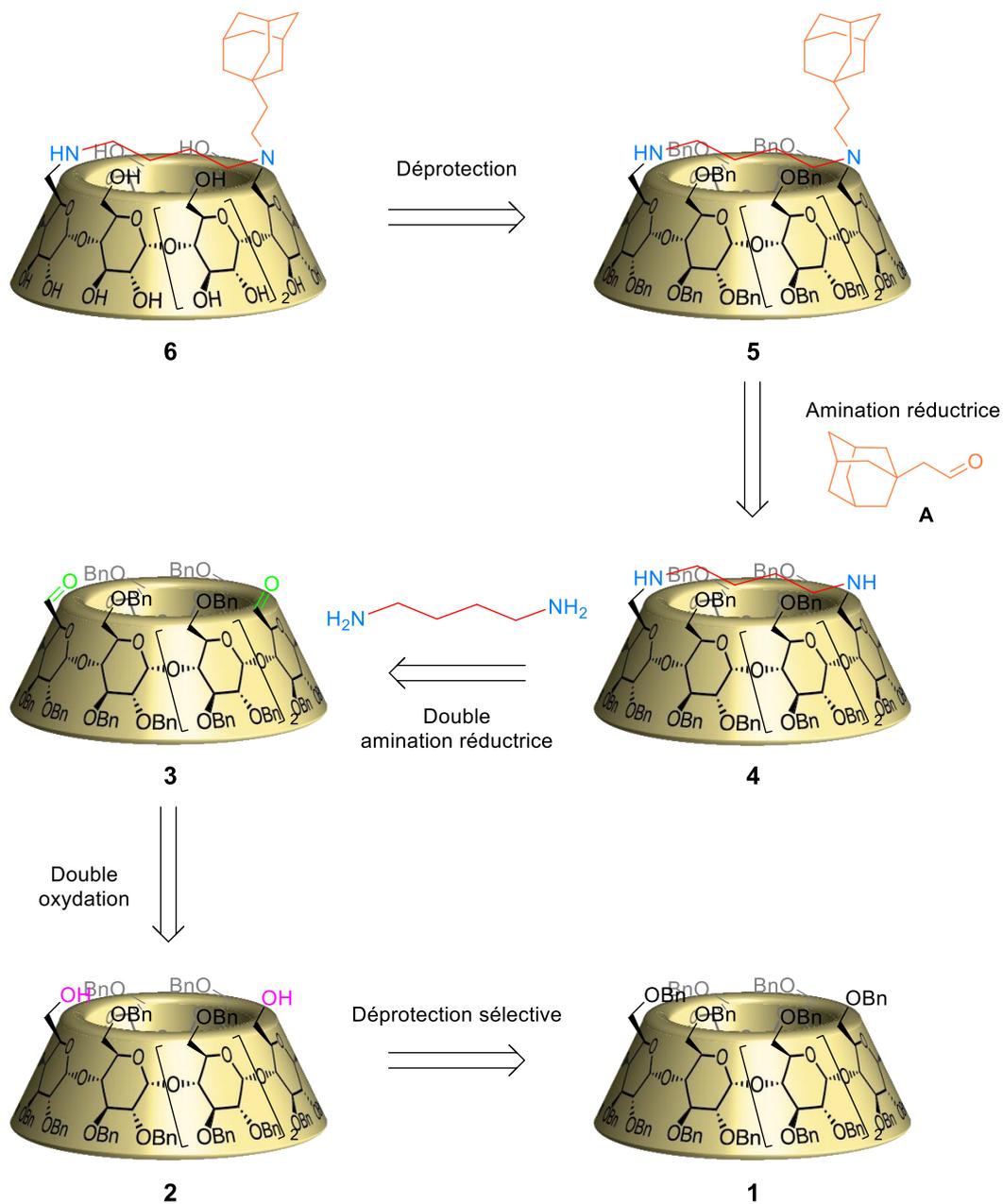


FIGURE 72 – Rétrosynthèse du monomère cible

2.6.2 Synthèse

La cyclodextrine β native est tout d'abord perbenzylée avec un rendement de 90 %. Le col primaire subit une double déprotection par l'action du DIBAL-H pour conduire au diol avec un rendement de 80 %. Enfin, les alcools primaires sont oxydés par une oxydation de Swern, conduisant au dialdéhyde avec un rendement de 80 % (Figure 73).

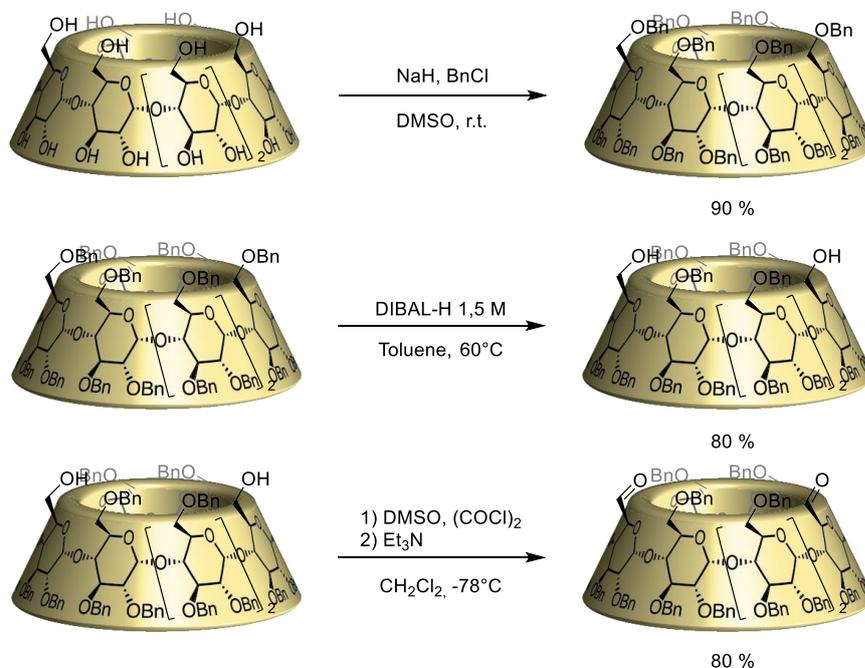
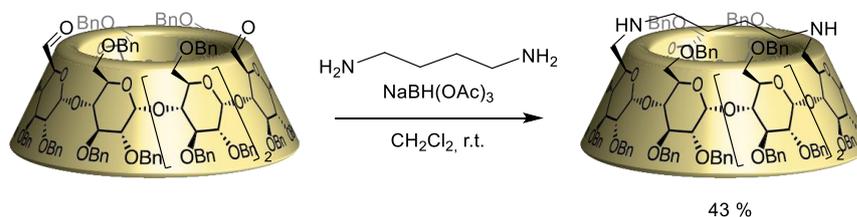


FIGURE 73 – Premières étapes de la synthèse du monomère AB cible

Le pontage est ensuite effectué par une double amination réductrice entre le diaminobutane et le dialdéhyde. Après purification, la cyclodextrine pontée est obtenue avec un rendement de 43 % (Figure 74). Une deuxième espèce, non isolée jusqu'à présent, est aussi formée. Un spectre de masse du brut réactionnel, après traitement aqueux, permet de mettre en évidence la formation d'une espèce correspondant à la complexation d'un borane par la cyclodextrine pontée incomplètement réduite. Il est probable que ce complexe existe préalablement et rende la réduction d'une des imines difficile.

FIGURE 74 – Pontage de la cyclodextrine β di-aldéhyde par le diaminobutane

Le spectre de masse obtenu montre l'apparition d'une espèce que nous attribuons à la forme $[M+BH]^+$ (Figure 75). Celle-ci correspondrait à une forme incomplètement

réduite possédant une imine d'un côté du pont, et une amine de l'autre. La complexation du borane pourrait avoir lieu au sein de la cavité, avec une action concertée des deux fonctions à l'origine de sa stabilité (Figure 76). La structure précise de ce complexe est cependant difficilement accessible.

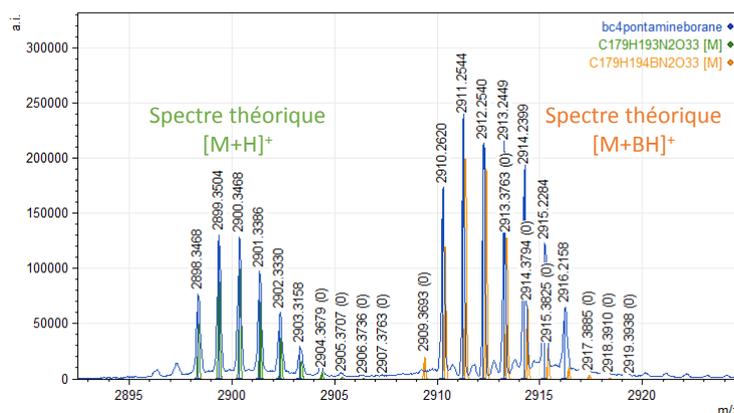


FIGURE 75 – Spectre de masse du brut réactionnel après traitement aqueux

Le modèle présenté ici n'est qu'une hypothèse, le problème étant qu'une interaction électrostatique entre l'imine et le borane devrait augmenter l'électrophilie de celle-ci, et donc faciliter sa réduction, ce qui n'est pas en accord avec la stabilité de l'espèce observée. Elle pourrait alors résulter de facteurs géométriques favorables.

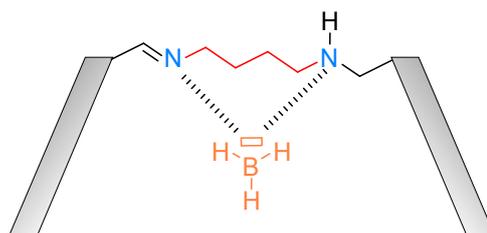


FIGURE 76 – Structure possible du complexe amine-borane

Cette espèce n'est pas visible en spectrométrie de masse avant traitement aqueux. Les tentatives de purification du brut sans traitement aqueux ne permettant pas d'augmenter le rendement obtenu, différentes méthodes ont été employées afin d'empêcher la formation du complexe amine-borane.

Un traitement au NH_3 aqueux à 25 % a d'abord été utilisé. Les molécules de NH_3 devaient jouer un rôle de compétiteur des azotes du pont pour la complexation du borane. Celles-ci étant des amines plus nucléophiles que celle du pont, elles devaient pouvoir mieux complexer les boranes que celui-ci. Malgré cela, le complexe boré est toujours observé après traitement.

Nous avons alors entrepris une stratégie consistant à diminuer la nucléophilie des azotes du pont en les protonnant. Pour ce faire, un traitement au HCl 1M fut utilisé. Les azotes protonnés n'ayant plus de doublet électronique libre à disposition, ceux-ci ne devraient pas pouvoir complexer un acide de Lewis tel que le borane. Cependant, encore une fois, le borane est observé après traitement.

Des essais furent alors réalisés dans l'optique de casser le complexe déjà formé, et non plus d'empêcher sa formation. L'équipe de Couturier avait précédemment décrit

une méthode permettant de casser des complexes amine-borane reposant sur l'utilisation de palladium sur charbon en présence de méthanol.[75] Le palladium permet de catalyser la dissociation du complexe amine-borane et la formation de triméthoxyborane selon l'équation $R_2NH \cdots BH_3 + MeOH \xrightarrow{10\%Pd/C} R_2NH + B(OMe)_3 + H_2$. Cependant, aucune de ces méthodes n'a permis d'obtenir un résultat satisfaisant permettant d'augmenter le rendement de la réaction.

Des essais ont été faits afin de favoriser la réduction complète du composé. Le changement de solvant (THF ou MeCN) permet d'effectuer la réaction à des températures plus élevées mais les essais dans ces solvants à 60 °C pendant 24 h n'ont pas donné de résultats concluants.

Afin de greffer la fonction adamantane sur le pont par une amination réductrice, le 1-adamantane ethanol est oxydé en aldéhyde en utilisant du TEMPO et un coxydant (diacétate de iodobenzène). Après purification, l'aldéhyde est obtenu avec un rendement de 88 % (Figure 77).

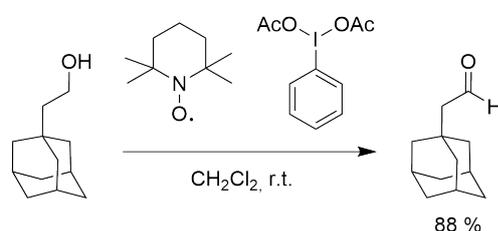


FIGURE 77 – Oxydation du 1-adamantane ethanol par le TEMPO

Si cette molécule est laissée au contact de l'oxygène à température ambiante, elle est oxydée en acide et cristallise sous une forme particulière dite catémère (voir section A.1). Il est donc nécessaire de stocker l'huile obtenue sous atmosphère inerte, à -20 °C.

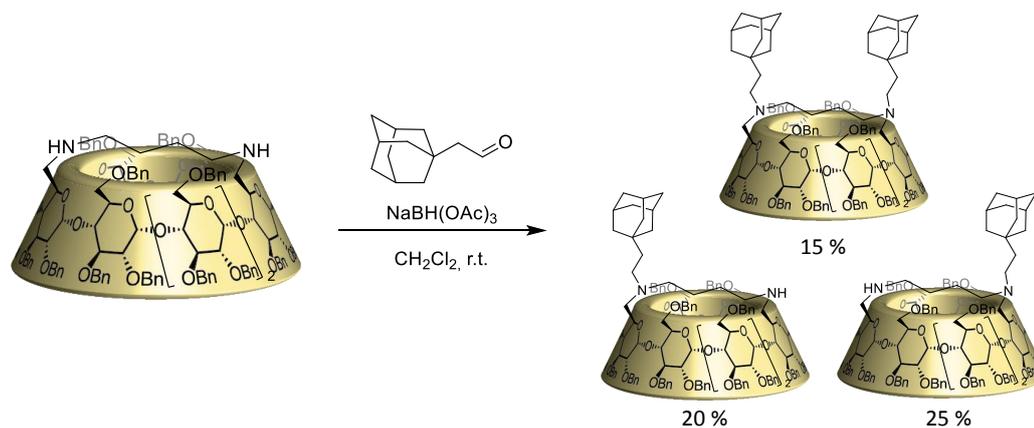


FIGURE 78 – Introduction de l'adamantane sur le pont de la cyclodextrine par amination réductrice

L'introduction de la fonction adamantane par amination réductrice conduit à un mélange de trois produits en plus du produit de départ : le produit difonctionnalisé et deux régioisomères monofonctionnalisés AD et AE (Figure 78). L'ajout supplémentaire d'adamantane induit la formation d'une plus grande proportion de produit

disubstitué.

Après purification, ces différents produits sont obtenus avec un rendement de 15, 20 et 25 % respectivement. L'utilisation d'un milieu dilué ne permet pas d'améliorer la proportion de produit monosubstitué obtenue. De même, l'utilisation de faibles températures n'est pas non plus efficace dans ce but.

On ne travaille ensuite que sur le régioisomère majoritaire AD.

Enfin, les alcools de la cyclodextrine sont déprotégés par hydrogénation des benzyles en présence de palladium sur charbon et d'acide trifluoroacétique. La cyclodextrine déprotégée est obtenue avec un rendement de 50 % après purification par HPLC (Figure 79). Celle-ci est nécessaire afin de séparer la molécule désirée des unités où un benzyle est réduit sous forme de cyclohexyle (cela représente environ 5 à 10 % du produit obtenu).

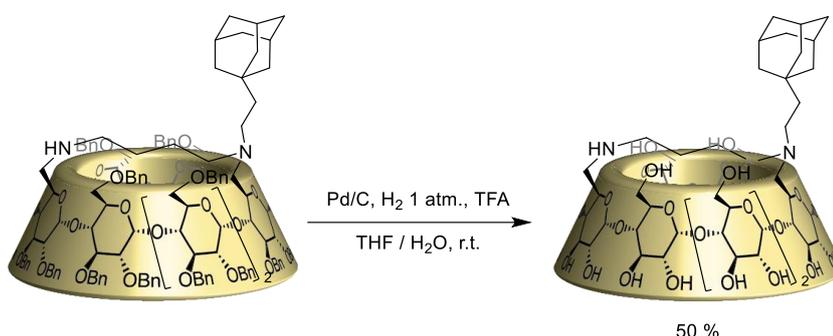


FIGURE 79 – Déprotection des benzyles de la cyclodextrine par hydrogénation

2.6.3 Caractérisation

2.6.3.1 ROE

L'utilisation du ROE (spectre TROESY) permet de confirmer la présence d'interactions hôte-invité entre cyclodextrine et adamantane (Figure 80).

Les protons H_b , H_c et H_c' sont censés être ceux les plus profondément inclus dans la cavité. Les H_c étant en partie superposé aux H_a , il est complexe d'obtenir des informations sur la position de ces protons par rapport à la cavité. Nous allons donc analyser les interactions faites par les deux autres types de protons de l'adamantane. Ceux-ci interagissent avec des protons externes du pont, ce qui résulte de l'inclusion de l'adamantane dans la cavité. Ces protons interagissent aussi avec les H^5 de la cavité, ce qui implique une inclusion relativement profonde. Des contacts sont aussi visibles dans des zones comprenant des H^3 et des H^5 , ce qui ne renseigne pas sur la géométrie du complexe d'inclusion, mais confirme son existence.

Les protons H_a et H_c font de nombreux contacts avec la cavité dont les taches se recouvrent, ce qui confirme aussi la présence du complexe d'inclusion sans préciser sa géométrie. Il est cependant possible de voir deux contacts H^5 / H_c .

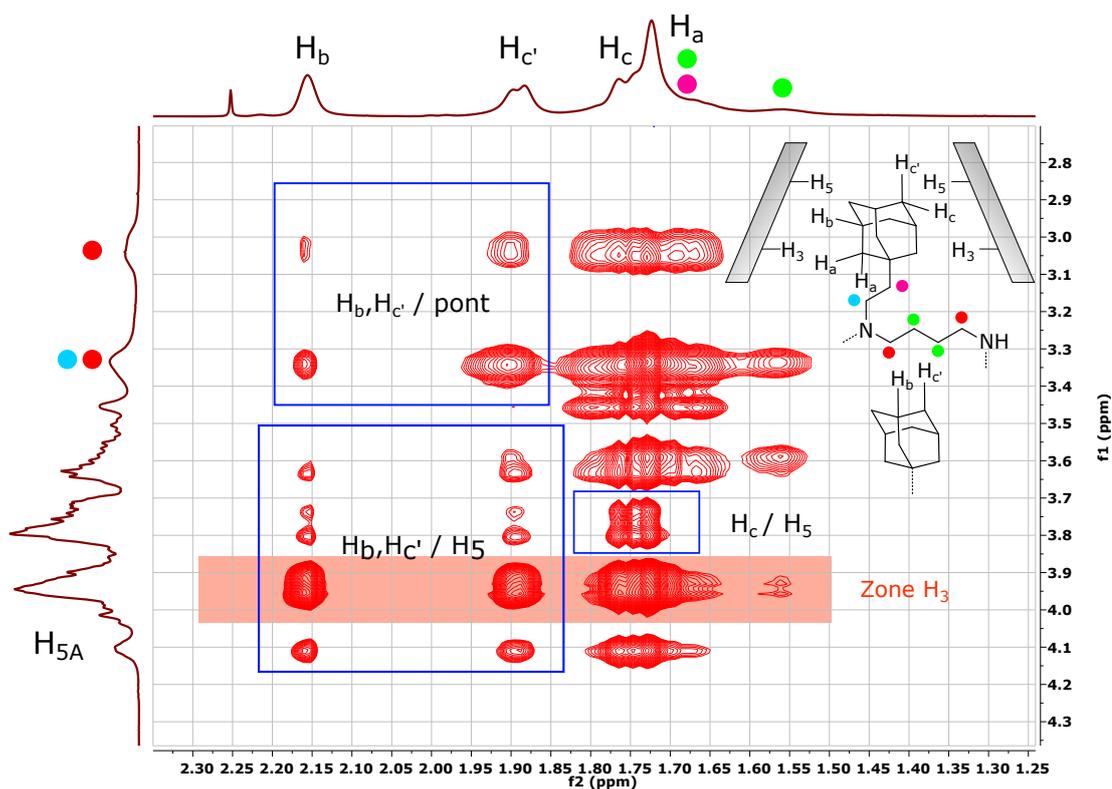


FIGURE 80 – TROESY de la cyclodextrine β pontée fonctionnée par un adamantane à 18 mM (D_2O , 600 MHz, 300 K)

2.6.3.2 Spectre proton à concentration variable et titrage

En analysant le spectre proton de la molécule finale à des concentrations croissantes, on observe un élargissement des signaux et une modification des déplacements chimiques (Figure 81). On constate un blindage des H^1 de la cyclodextrine lorsque la concentration augmente. Il y a donc changement de l'environnement magnétique de ces protons, même si ceux-ci pointent vers l'extérieur de la cavité. Le suivi du déplacement des H^3 ou H^5 est ici complexe car aucun ne sort de la zone entre 4,1 et 3,2 ppm qui comprend l'ensemble des protons de la cavité. En effet, la cyclodextrine a ici une symétrie C_7 , toutes les unités étant différenciées. Cela implique un fort recouvrement des protons dans des gammes réduites de déplacements chimiques, ce qui ne permet de suivre que quelques protons.

La molécule analogue portant seulement le pont diamine n'a pas ce changement de comportement lors de l'augmentation de sa concentration. Il est possible d'effectuer un titrage de celle-ci par un analogue d'adamantane afin d'avoir une estimation de la constante d'association entre la cyclodextrine pontée et un adamantane. Pour ce faire nous avons choisi un dérivé d'adamantane soluble : l'iodure de triméthylamineadamantane. Une solution saturée de ce composé en présence de 5 mM de cyclodextrine β pontée est préparée puis ajoutée par palier à un tube RMN contenant 5 mM de cette même cyclodextrine. La concentration en cyclodextrine est donc constante, et l'ajout du mélange adamantane/cyclodextrine va progressivement saturer les cavités disponibles. L'affinité pour la cavité se mesure en fonction de l'écart entre les déplacements chimiques sans invité, et ceux mesurés avec une concentration

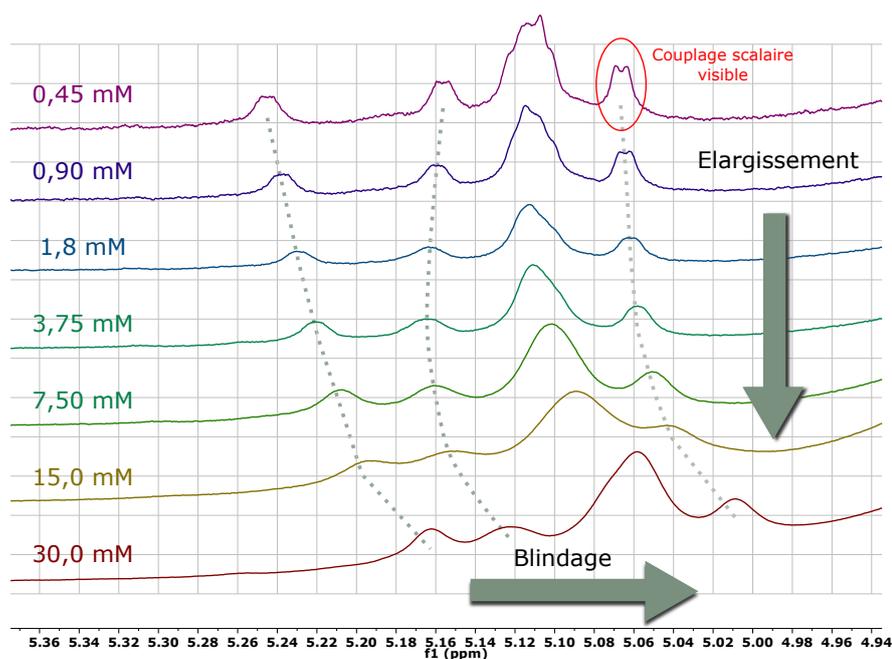


FIGURE 81 – Modification du déplacement chimique et de l'aspect des H^1 avec l'augmentation de la concentration en cyclodextrine

croissante en invité. On peut ensuite approcher la constante d'association grâce à un algorithme.[76] On suit ici l'évolution des H^1 en fonction du nombre d'équivalents d'invité ajouté (Figure 82).

Le suivi de ces trois H^1 nous permet de déduire une constante d'affinité faible $K \approx 600 M^{-1}$ (voir partie expérimentale), en-deçà des constantes de l'ordre de 10^4 généralement mesurées pour l'interaction entre un adamantane et une cyclodextrine.[73]

Cette faible constante peut être due au pont, qui déstabiliserait le complexe d'inclusion par effet stérique (même si nous avons précédemment vu que la constante d'association était améliorée lorsqu'une structure pontée analogue était utilisée), ou à la charge portée par l'invité, qui défavoriserait son interaction avec l'hôte lui aussi chargé. On remarque aussi qualitativement un faible changement du déplacement chimique des H^1 en comparaison avec celui observé lors de l'étude de la cyclodextrine β pontée adamantane (0,09 ppm pour le H^1 le plus déblindé dans le cas de la cyclodextrine portant un adamantane contre 0,01 ppm dans le cas de la titration).

Les spectres acquis avec le monomère AB laissent penser qu'il y a formation d'espères multimériques en solution. Cependant, la faible constante d'association mesurée entre une cyclodextrine pontée et un adamantane chargé doit être élucidée. L'ITC nous permet d'avoir accès à la constante d'association des monomères AB, dans le cadre du modèle isodesmique.

2.6.3.3 ITC

Les mesures d'ITC ont été réalisées par G. Pembouong dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Polymères de l'IPCM.

Les mesures sont faites en injectant par paliers une solution concentrée de cyclodextrine β fonctionnalisée dans la cuve de mesure de l'appareil. La dilution provoque un

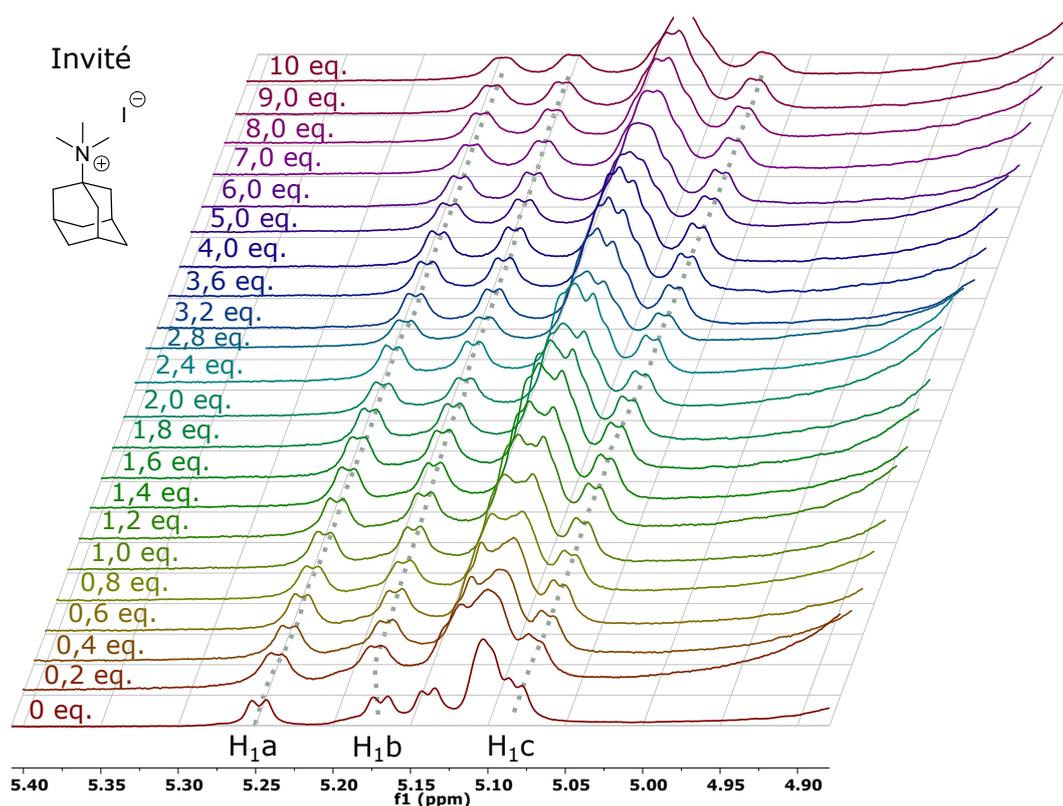


FIGURE 82 – Suivi des H^1 lors du titrage de la cyclodextrine pontée (5 mM) par un mélange adamantane/cyclodextrine pontée (solution saturée en invité, 5 mM de cyclodextrine)

désassemblage du polymère (ou du complexe d'inclusion) qui provoque un échange de chaleur dans la cuve, permettant d'obtenir un ΔH global pour une concentration initiale en cyclodextrine donnée. En répétant cette opération à différentes concentrations, il est possible d'approcher la constante d'association entre monomères.

La courbe obtenue montre bien une dissociation endothermique d'espèces supramoléculaires (Figure 83). Il y a ensuite reformation des espèces polymères (ou du complexe hôte-invité) avec l'injection successive de monomère, responsable de l'allure décroissante des courbes. On n'observe pas de plateau en début de dilution, qui serait le signe d'une association coopérative (la première interaction entre deux monomères étant défavorable dans ce cas là, l'espèce reste monomère sur une gamme relativement large de concentrations). Le modèle isodesmique donne des courbes approchées qui sont conformes avec les mesures faites.

On obtient alors $K \approx 11000 \text{ M}^{-1}$ dans le cadre d'un modèle isodesmique. Les mêmes expériences effectuées avec le système cyclodextrine β pontée et adamantane triméthylammonium donnent un $K \approx 500 \text{ M}^{-1}$. A titre de comparaison, l'interaction mesurée entre une cyclodextrine β native et le même invité donne $K \approx 7500 \text{ M}^{-1}$. La charge du pont vis-à-vis de l'invité chargé joue donc bien un rôle répulsif à l'origine de ces faibles constantes et ne reflète pas le système réel. La faible constante d'association observée par RMN et ITC entre la cyclodextrine β pontée et l'iodure de triméthylammonium adamantane s'explique donc majoritairement par la répulsion des charges entre ces espèces.

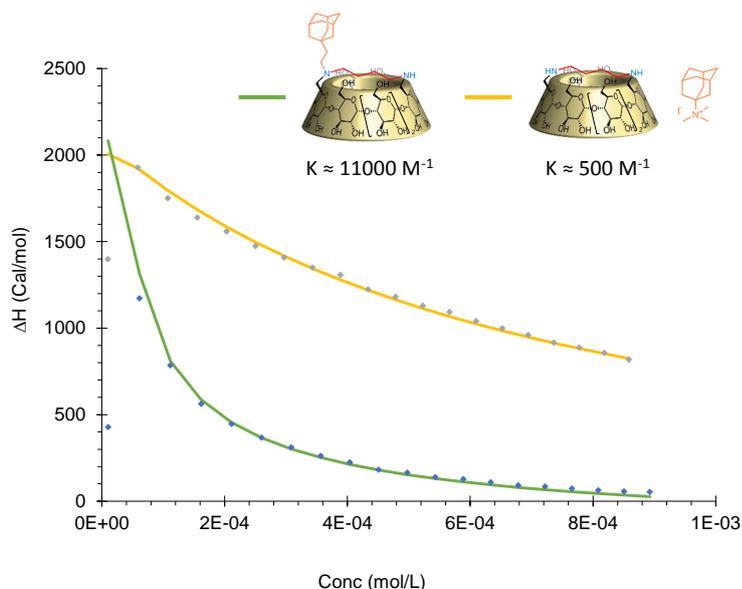


FIGURE 83 – Courbes ITC obtenues par dilution du monomère AB (concentration initiale : 5 mM) et par injection d’une solution d’iodure de triméthylammonium adamantane (5 mM) dans une solution de cyclodextrine β pontée (1 mM).

2.6.3.4 DOSY

Des expériences de mesure du coefficient de diffusion ont été faites en parallèle des spectres protons à différentes concentrations. Nous avons comparé le comportement de la cyclodextrine fonctionnalisée pouvant former des polymères supramoléculaires et celui de la cyclodextrine seulement pontée (Figure 84).

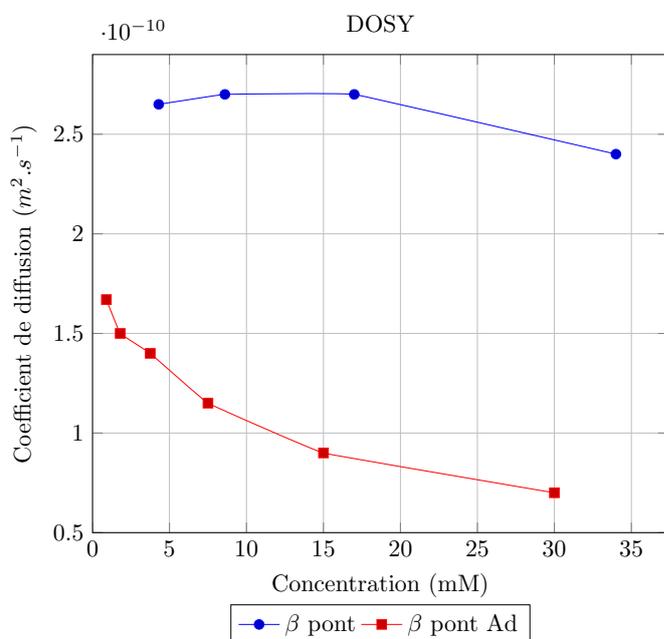


FIGURE 84 – Comparaison des coefficients de la cyclodextrine 6 et de son équivalent sans adamantane, en fonction de la concentration
Conditions des mesures : D₂O, 600 MHz, 300 K

On observe une diminution progressive du coefficient de diffusion de la cyclodextrine **6** lorsque sa concentration croît. Au contraire, celui de la cyclodextrine pontée reste constant, même si une légère diminution est observée à partir de 30 mM. Cette différence de comportement témoigne de la formation d'assemblages d'ordre supérieur dans le cas de la cyclodextrine pontée fonctionalisée.

On peut vérifier la cohérence de la DOSY avec la constante d'association précédemment mesurée par ITC pour l'association des monomères. A 30 mM, le coefficient de diffusion observé est $D = 7.10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. Dans l'hypothèse de la formation d'un polymère supramoléculaire linéaire, celui-ci devrait être analogue à un cylindre, plus ou moins flexible selon le degré de polymérisation. Certains modèles ont été développés afin d'extraire de coefficients de diffusion translationnels des paramètres caractérisant les formes cylindriques.[77] En particulier, il est possible d'obtenir le rapport entre la longueur du cylindre et son diamètre qu'on nommera p . D'après ce modèle, on a :

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} \left[\ln\left(\frac{L}{d}\right) + v \right]$$

$$v = 0,312 + 0,565 \frac{d}{L} - 0,100 \left(\frac{d}{L}\right)^2$$

avec

- D Coefficient de diffusion translationnel ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
- k_B Constante de Boltzmann (J.K^{-1})
- T Température (K)
- η Viscosité du milieu (Pa.s)
- L Longueur du cylindre (m)
- d Diamètre du cylindre (m)

En introduisant p et en isolant les termes le contenant, on obtient :

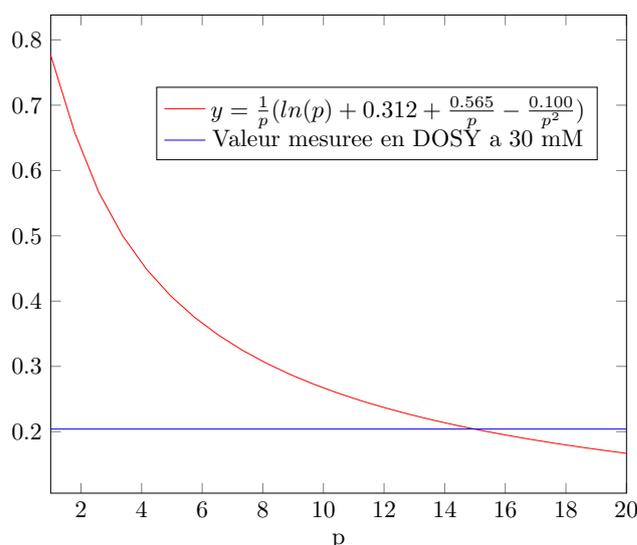
$$\frac{3D\pi\eta d}{k_B T} = \frac{1}{p} \left(\ln(p) + 0,312 + \frac{0,565}{p} - \frac{0,100}{p^2} \right)$$

avec

$$p = \frac{L}{d}$$

Cette équation ne peut se résoudre analytiquement, mais on peut tracer la courbe $y = f(p)$ lui correspondant. Il suffit alors de calculer la valeur du membre de gauche et de regarder à quelle abscisse celle-ci correspond pour trouver la valeur de p correspondant à notre système (Figure 85).

On voit que le p correspondant à une concentration de 30 mM est de 15. La forme observée est donc, d'après ce modèle, 15 fois plus longue que large. Le diamètre

FIGURE 85 – Calcul de p

d d'une cyclodextrine β étant d'environ 1 nm, et sa hauteur d'environ 0,8 nm, on obtient un degré de polymérisation $D_p \approx 19$. On surestime cependant légèrement ici le D_p car on ne prend pas en compte la longueur du bras liant la cyclodextrine à l'adamantane dans la hauteur de chaque unité. On peut comparer ce résultat à celui donné par l'équation de Carothers dans le cadre du modèle isodesmique où $D_p = \sqrt{KC}$. Pour notre système à 30 mM, on obtient $D_p \approx 18$. Ces deux méthodes donnent des résultats similaires et montrent qu'on obtient un polymère supramoléculaire d'environ 18 unités à 30 mM.

2.6.3.5 DLS (Dynamic Light Scattering)

Une autre manière d'estimer la taille de nos assemblages est d'utiliser la DLS.

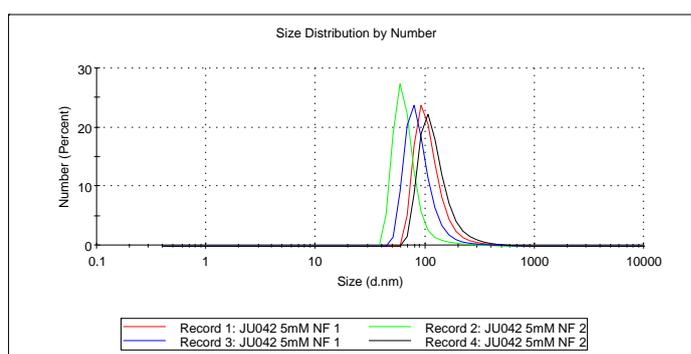


FIGURE 86 – DLS de la cyclodextrine 6 à 5 mM (échantillon non filtré)

Le rayon hydrodynamique moyen observé pour la cyclodextrine 6 à 5 mM est de 100 nm (Figure 86). Cela semble très élevé pour un polymère supramoléculaire de constante d'association $K \approx 11000 \text{ M}^{-1}$ (en calculant \sqrt{KC} , on obtient un degré de polymérisation de 7 environ). Cette mesure laisse supposer que dans les conditions de la DLS, la cyclodextrine forme des agrégats.

Afin de vérifier cette hypothèse, les mêmes mesures ont été effectuées en filtrant préalablement l'échantillon au travers d'un microfiltre (diamètre de pore : 0,1 μm). Dans le cas d'un polymère supramoléculaire, et non d'un agrégat, la réversibilité de l'assemblage devrait lui permettre de se reformer après filtration.

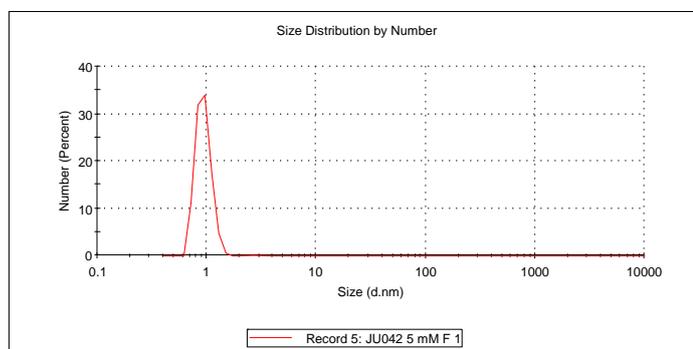


FIGURE 87 – DLS de la cyclodextrine β par un adamantane à 5 mM (échantillon filtré au travers d'un filtre de porosité 0,1 μm)

On observe une forte diminution du signal (c'est-à-dire que peu d'espèces sont présentes en solution), et une réduction de la taille observée de 100 à 1 nm environ qui correspond au passage à une cyclodextrine monomère (Figure 87). La filtration a donc vraisemblablement permis d'éliminer des agrégats de cyclodextrines. La DLS de la molécule portant seulement le pont donne des résultats similaires (Figure 88). L'agrégation observée n'est donc pas due à la fonctionnalisation du pont.

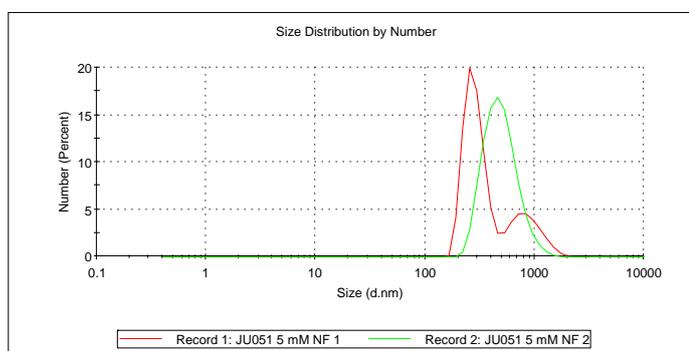


FIGURE 88 – DLS de la cyclodextrine β pontée à 5 mM (échantillon non filtré)

La DLS ne nous permet donc pas de caractériser nos espèces polymères ici, et met en évidence l'agrégation possible entre monomères.

2.6.3.6 SANS

Les expériences en diffusion de neutron permettent de donner d'autres informations sur la taille et la géométrie de l'assemblage.

L'approximation de Guinier permet d'avoir accès au rayon de giration moyen des espèces en solution. Elle n'est valable que pour q faible et est formulée par :

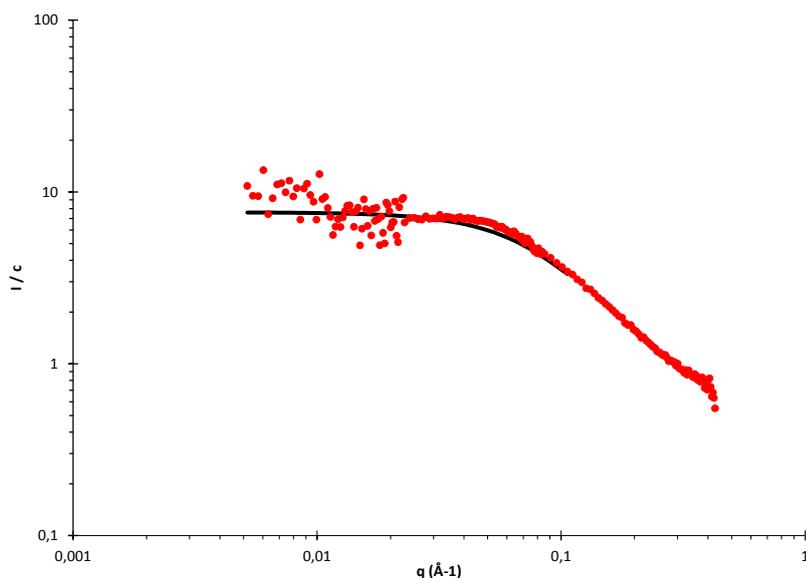


FIGURE 89 – Mesures obtenues par la diffusion de neutrons. La courbe noire représente la courbe théorique pour un cylindre de 5 Å de rayon et 60 Å de longueur

$$I(q) = I(0)e^{-\frac{(qR_g)^2}{3}}$$

- $I(q)$ Intensité diffusée à une distance q du centre de la tache
avec q Vecteur d'onde utilisé (m^{-1})
 R_g Rayon de giration moyen des espèces en solution (m)

D'après ce modèle, à une concentration de 6,8 mM, on obtient un rayon de giration moyen de 16 Å. La formule du rayon de giration d'un cylindre de rayon R et de longueur l est donnée par :

$$R_g^2 = \frac{R^2}{2} + \frac{l^2}{12}$$

En supposant $R = 5$ Å pour un cylindre composé de cyclodextrines, on obtient $l = 54$ Å, soit un degré de polymérisation de 7 environ à 6,8 mM. La formule \sqrt{KC} prévoit une valeur de D_p de 8,6 et est donc cohérente avec nos mesures.

L'utilisation d'un modèle de cylindre, hors approximation de Guinier, nous donne $l = 60$ Å, ce qui reste dans la gamme de la longueur précédemment obtenue (Figure 89).

2.7 SYSTÈME PONTÉ PAR DEUX TRIAZOLES

Le monomère AB précédent nous a permis de synthétiser des structures polymères d'environ 20 unités à 30 mM.

Nous nous sommes demandé quelle était l'influence du positionnement de l'invité

sur la longueur du polymère obtenu. En effet, dans le système utilisé précédemment, l'invité est décalé par rapport au centre de la cyclodextrine, ce qui peut diminuer l'interaction axiale entre monomères dans l'optique de former un polymère linéaire. Nous avons donc mis au point un autre monomère portant un invité partant du centre de la cavité.

Cela nous a aussi donné l'occasion de concevoir une synthèse plus simple, sans formation de multiples régioisomères.

2.7.1 Synthèse

La synthèse débute de manière analogue à celle du composé précédent par la formation d'un diol à partir de cyclodextrine β perbenzylée. Ces alcools sont convertis en mésyles avec un rendement de 96 %. Ceux-ci sont substitués par des azotures avec un rendement de 83 %. Parallèlement, l'adamantane acétaldéhyde est condensé sur la dipropylamine dans une réaction d'amination réductrice avec un rendement de 90 %. Les deux molécules obtenues réagissent dans une double cycloaddition catalysée par le cuivre pour former le produit final protégé, avec un rendement de 35 %. La cyclodextrine est ensuite déprotégée de la même manière que précédemment par hydrogénation en présence de palladium sur charbon et de TFA avec un rendement final de 60 % (Figure 90).

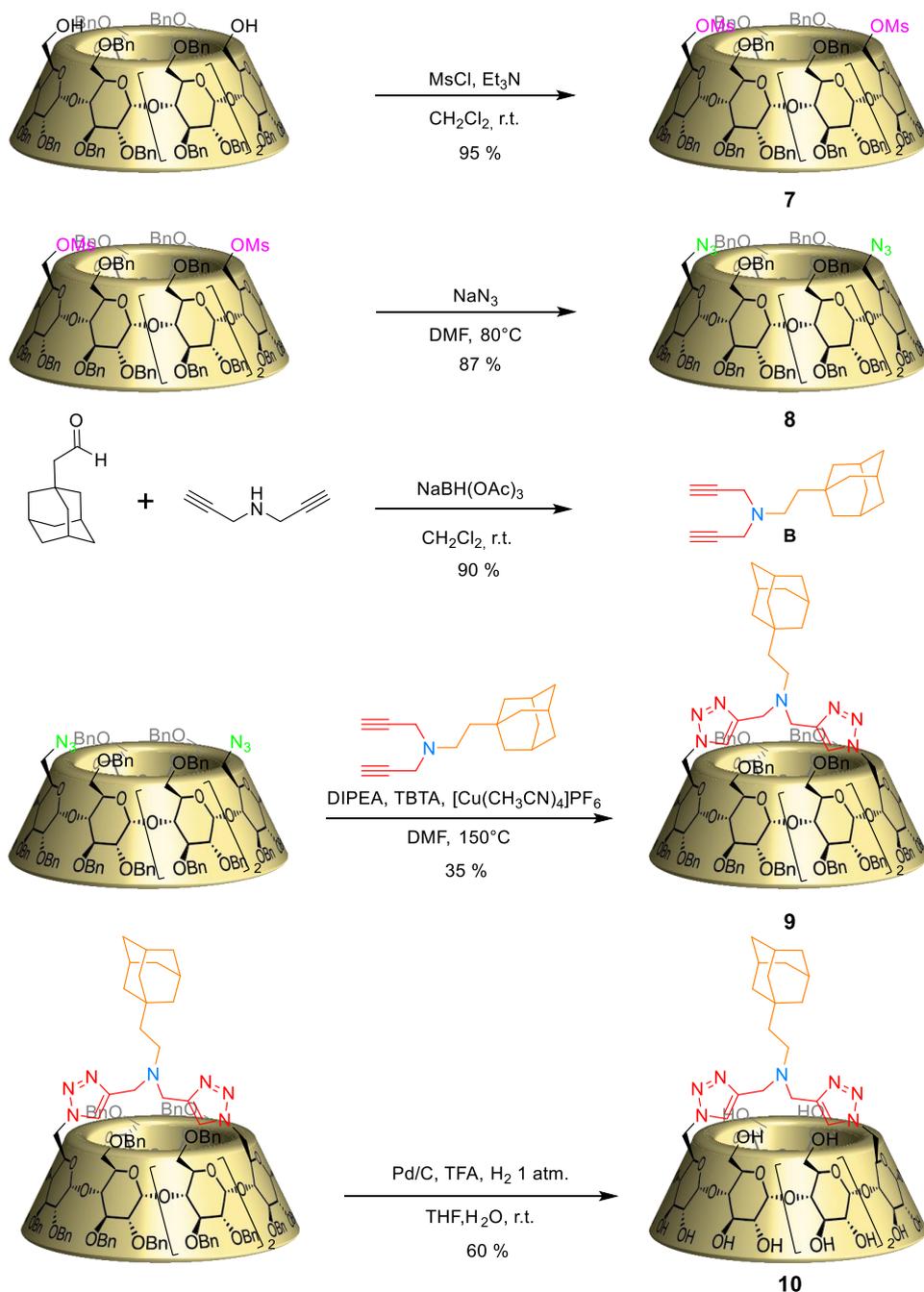


FIGURE 90 – Schéma de synthèse du composé ponté par deux triazoles

2.7.2 Caractérisation

2.7.2.1 ROE

L'utilisation du ROE permet d'observer des couplages entre la cavité et les protons de l'adamantane. L'analyse fine des interactions est ici complexe car les protons de l'intérieur de la cavité souffrent d'un recouvrement important (Figure 91).

Les corrélations observées sont similaires pour les différents protons de l'adamantane, et seuls quelques H³ et H⁵ peuvent être identifiés. De plus, les protons des

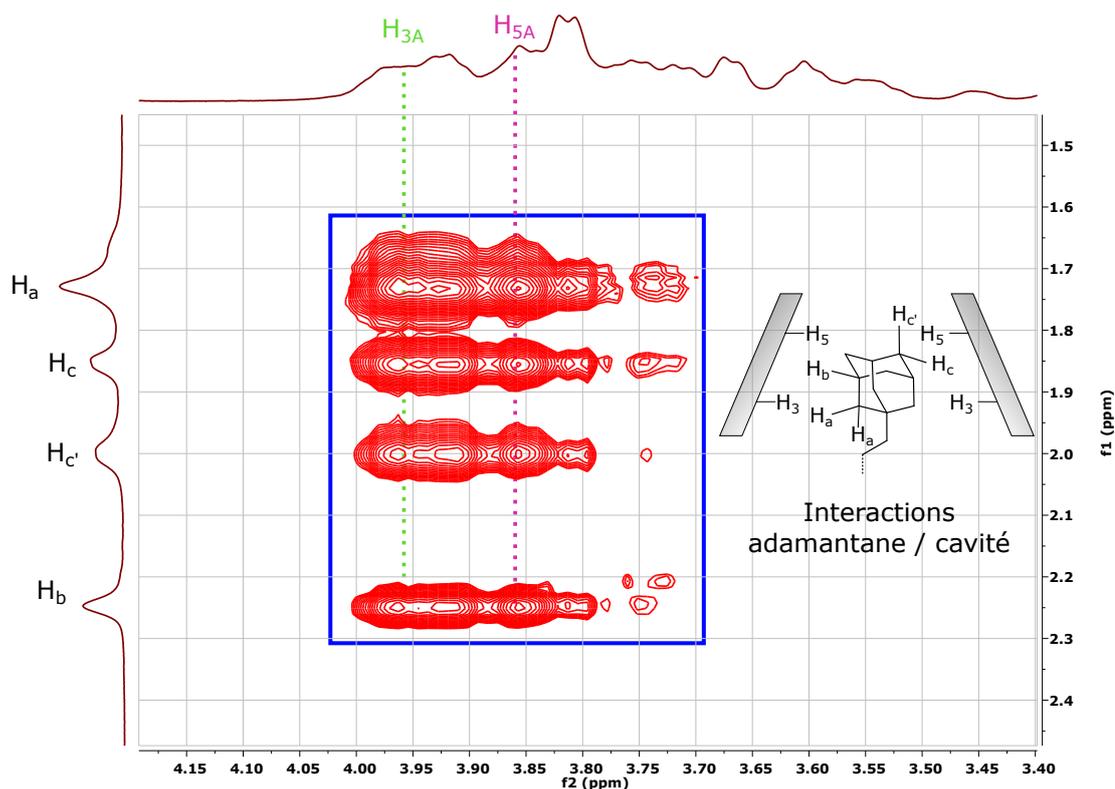


FIGURE 91 – TROESY du di triazole adamantane (10 mM), zone des protons de l'adamantane (D_2O , 600 MHz, 300 K)

triazoles ne montrent pas de corrélations particulières permettant d'identifier leur orientation.

Le ROE ne permet pas ici de déterminer la géométrie précise de l'inclusion, mais confirme son existence.

2.7.2.2 Spectre proton

Le spectre proton à concentration variable ne montre pas de grande différence de déplacement chimique pour les H^1 (Figure 92). Les H des triazoles ne sont pas non plus affectés par la concentration et sont confondus avec le bruit à partir de 1,8 mM.

Cela peut avoir deux significations :

- L'association entre monomères est très faible et le déplacement observé est celui du monomère non associé
- L'association entre monomères est forte et il y a déjà une grande majorité de cyclodextrines associées à la concentration la plus basse. Le déplacement des H^1 observé correspond à la forme associée de la cyclodextrine

Afin de tester nos hypothèses, nous avons mesuré la constante d'association de nos monomères par ITC.

2.7.2.3 ITC

Le calcul par ITC donne une constante d'association entre monomère $K \approx 28000 M^{-1}$ (Figure 93). L'association entre monomères est donc forte, et à 0,45 mM, dans l'hypo-

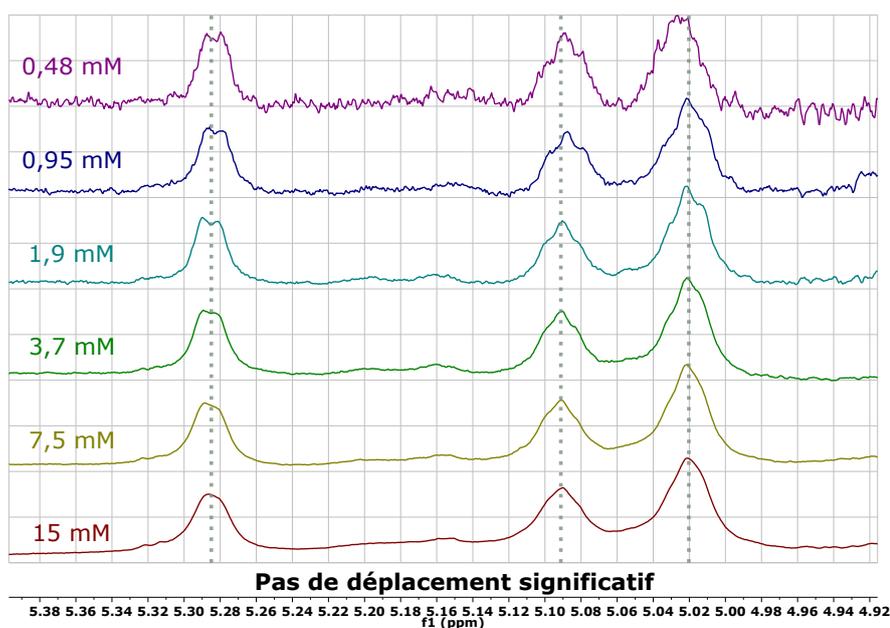


FIGURE 92 – Absence de modification des déplacements chimiques des H¹ pour la molécule

thèse du modèle isodesmique, on a $D_p \approx 3,5$. La proportion de cavités libres est donc de $\frac{1}{3,5} \approx 29\%$. On devrait donc bien observer un changement des déplacements chimiques des protons de la cavité lors de l'augmentation de la concentration initiale en monomère. Leur absence peut laisser supposer que les H¹ ne sont que peu affectés par la complexation de l'invité.

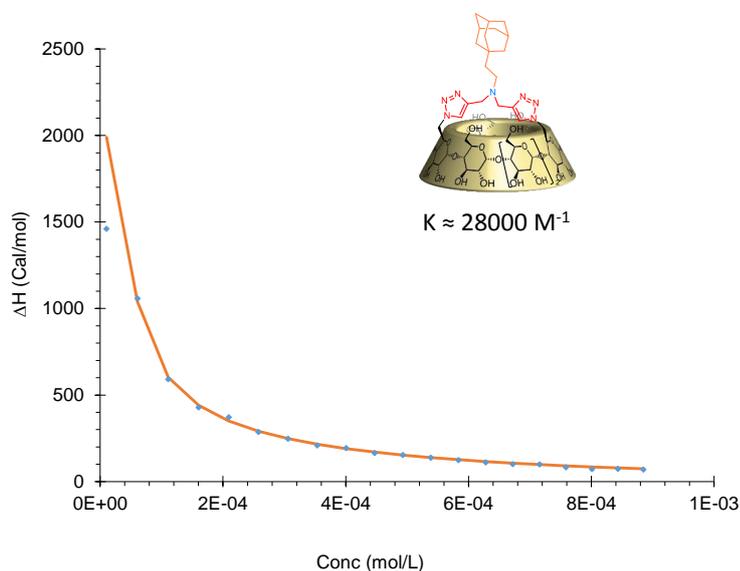


FIGURE 93 – Courbe ITC obtenue par dilution d'un échantillon de cyclodextrine à 5 mM

L'ITC montre donc que le positionnement central de l'invité permet d'améliorer la constante d'association entre monomères. L'utilisation de la DOSY nous permet de voir comment celle-ci se traduit sur les espèces présentes en solution.

2.7.2.4 DOSY

Pour chaque concentration précédemment étudiée par RMN ^1H , une mesure du coefficient de diffusion est effectuée.

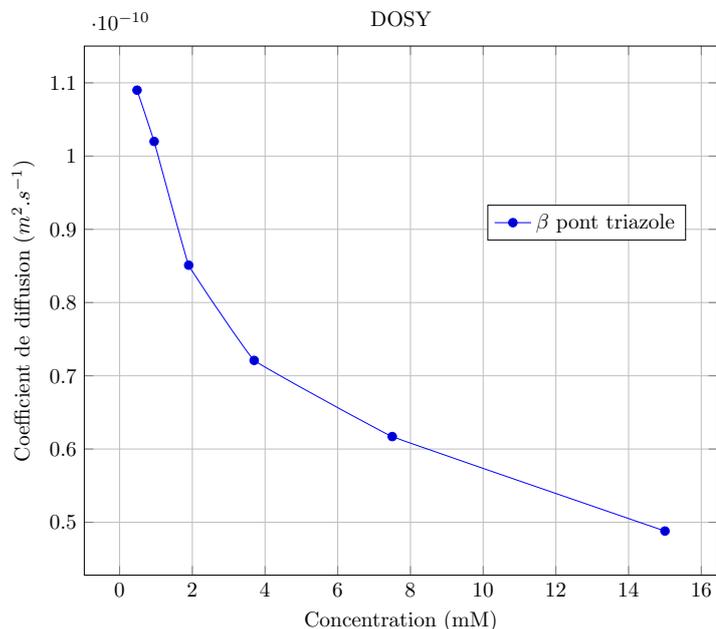


FIGURE 94 – DOSY du composé **10** (D_2O , 400 MHz, 300 K)

On observe une nette diminution du coefficient de diffusion avec la concentration, montrant la formation d'un polymère supramoléculaire (Figure 94).

Le problème de cette molécule est sa solubilité : au delà de 15 mM, on commence à saturer la solution. On peut calculer la longueur théorique du polymère obtenu à 15 mM de la même manière que précédemment (Figure 95).

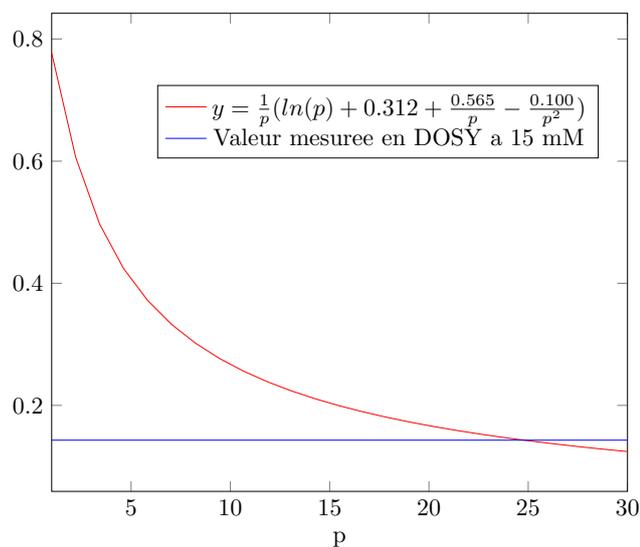


FIGURE 95 – Estimation du degré de polymérisation du composé **10** à 15 mM.

On a $p \approx 25$ à une concentration de 15 mM. Cela correspond à $D_p \approx 31$. On peut comparer cette valeur avec $\sqrt{KC} \approx 20$.

Les deux modèles ne donnent pas le même résultat ici, mais cela est compréhensible dans la mesure où la longueur du bras liant la cyclodextrine à l'adamantane n'est pas prise en compte dans le calcul de D_p à partir de p , ce qui surestime le résultat obtenu. La différence importante entre les deux résultats peut laisser supposer que l'ensemble pont/bras adopte une conformation tendue qui éloigne l'adamantane de la cavité et qui allonge chaque monomère.

2.7.2.5 SANS

La diffusion de neutrons nous permet de confirmer la structure globale du polymère.

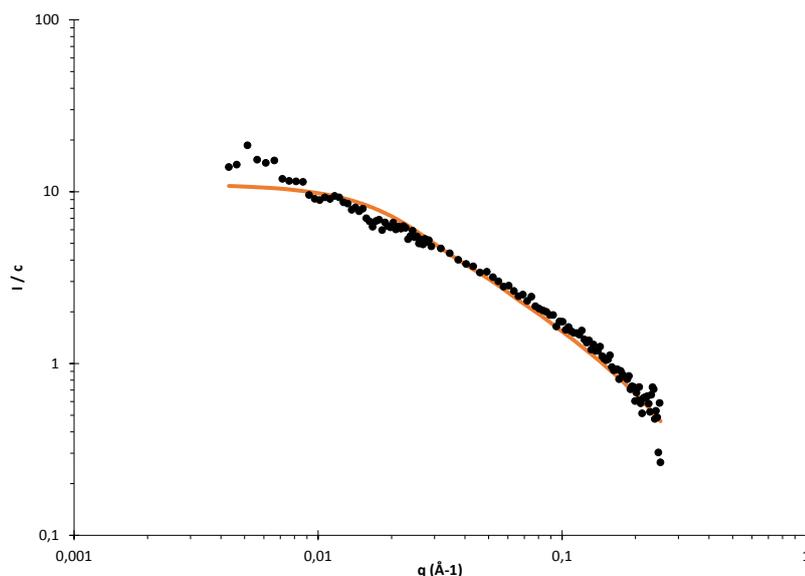


FIGURE 96 – Mesures obtenues par la diffusion de neutrons. La courbe orange représente la courbe équivalente pour un cylindre de 5 Å de rayon et 210 Å de longueur

En effet, la courbe obtenue pour un échantillon à 13 mM peut être approchée par celle correspondant à un cylindre de 21 nm de long pour 1 nm de large (Figure 96). Cela correspondrait à environ 26 unités polymérisées, ce qui est proche de $\sqrt{KC} \approx 19$.

2.8 CONCLUSION

Dans cette première partie, notre but était de synthétiser des monomères AB s'auto-assemblant en solution afin de former des espèces polymères supramoléculaires. L'association entre ces espèces devait reposer sur la formation d'un complexe entre un adamantane et la cyclodextrine β , qui est l'une des plus fortes pour les couples cyclodextrine/invité. Les quelques exemples tirés de la littérature montrent que les systèmes existant fondés sur cette interaction aboutissent à des espèces non solubles ou auto-incluses.

La mise au point d'un nouveau système où la cyclodextrine est pontée nous a permis de résoudre le problème de l'auto-inclusion de l'adamantane dans les cyclodextrines β . L'ajout d'une ou deux amines à la structure permet quant à elle d'assurer sa solubilité en milieu aqueux.

Deux structures ont été étudiées : l'une pontée par le diaminobutane, portant une fonction adamantane sur le col primaire, et l'autre pontée par deux triazoles, portant un adamantane davantage centré. Dans les deux cas, la formation d'un complexe d'inclusion est confirmée par ROESY, et les constantes d'association mesurées par ITC (11000 et 28000 M^{-1} respectivement) montrent que ces systèmes sont adéquats pour former des polymères supramoléculaires, la position centrale de l'adamantane favorisant l'association entre monomères.

A l'aide d'expériences DOSY et SANS, nous avons pu confirmer la formation d'espèces polymères, de forme cylindrique, allant jusqu'à un degré de polymérisation de 18 ou 25 unités, respectivement, aux concentrations étudiées.

La réussite de cette première étape nous a permis d'utiliser les molécules pontées par le diaminobutane afin d'évaluer leurs interactions avec un ADN linéaire.

ASSEMBLAGE D'UN POLYMÈRE SUPRAMOLÉCULAIRE AVEC L'ADN

Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'il était possible de former des structures supramoléculaires à partir des monomères AB synthétisés. La seconde étape de notre projet consiste désormais à étudier leur interaction avec l'ADN. L'identification de ces interactions peut-être problématique avec les techniques précédemment utilisées, l'introduction d'un ADN complexifiant de manière importante le système étudié et les phénomènes mis en jeu. De plus, l'interprétation des résultats obtenus pourrait être difficile.

Nous avons donc opté pour une méthode plus simple, afin de déterminer si nos structures interagissaient avec l'ADN. En présence d'une chaîne polymère chargée à concentration suffisante, l'ADN se replie sur lui-même pour former une espèce compacte (par opposition à la forme allongée qu'il adopte naturellement en solution). En revanche, la présence d'espèces monomères de charge inférieure à 3 ne permet pas ce repliement (*vide infra*). Ainsi, la compaction de l'ADN est un bon témoin de la structuration mutuelle de nos molécules et de l'ADN, car elle nécessite *a priori* la formation du polymère supramoléculaire. De plus, il est possible d'envisager, comme pour le VMT, que l'ADN assiste la formation d'une structure supramoléculaire à partir de nos monomères AB.

Nous allons d'abord voir plus précisément ce qu'est la compaction, et en quoi sa présence est indispensable *in vivo*. Nous verrons ensuite quels systèmes permettent de reproduire cette compaction *in vitro*. Enfin, l'influence de nos molécules sur la structure de l'ADN sera étudiée.

3.1 CONCEPT DE COMPACTION

L'ADN fait partie des polymères les plus connus et étudiés. Sa capacité de stockage de l'information génétique en fait la molécule de base des organismes vivants. Il est composé d'un enchaînement de nucléotides constitués d'une base azotée, d'un ribose ainsi que d'un groupe phosphate. Ceux-ci sont reliés par des liaisons phosphodiester 3'-5' (Figure 97).

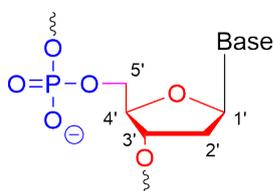


FIGURE 97 – Structure générale d'un nucléotide

Il existe quatre bases azotées pour l'ADN : l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. Ces bases sont capables chacune d'accepter et de donner des liaisons hydrogène. L'arrangement des atomes donneurs et accepteurs est unique pour chaque base

et est à l'origine de la complémentarité entre celles-ci : l'adénosine peut s'apparier avec la thymidine et la cytidine peut s'apparier avec la guanosine (Figure 98).

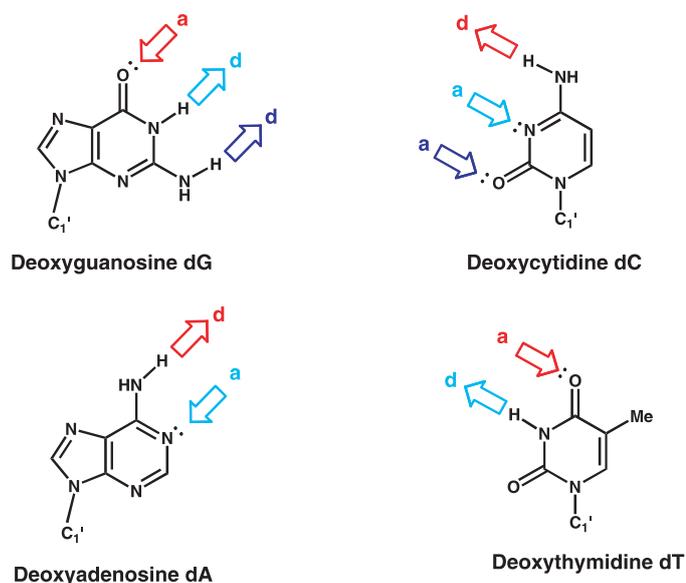


FIGURE 98 – La complémentarité des bases de l'ADN repose sur l'arrangement des atomes donneurs (d) et accepteurs (a) de liaisons hydrogène dans chacune des molécules.[78]

Ainsi, les couples de nucléotides C/G et A/T peuvent former respectivement trois et deux liaisons hydrogène entre eux. Ces couples ont une géométrie similaire lorsque les bases sont appariées, garantissant une homogénéité structurale de l'ADN à grande échelle (Figure 99).

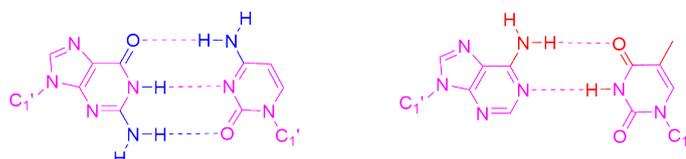


FIGURE 99 – Structures isomorphes des paires de bases G/C et A/T

Lorsqu'il est sous forme de double brin, l'ADN a une structure en double hélice résultant de sa conformation la plus stable maximisant les interactions favorables (géométrie des liaisons hydrogène et des empilements π - π entre bases) et minimisant celles défavorables (interactions électrostatiques entre phosphates). Plusieurs formes d'hélice pour l'ADN existent, même si la structure proposée par Watson et Crick (dite forme B de l'ADN) reste la plus répandue *in vivo*. [79] Nous allons ici présenter l'ADN double brin dans sa forme B, en mettant en évidence ses caractéristiques les plus remarquables.

Tout d'abord, l'ADN est une molécule chargée : chaque nucléotide portant une charge négative, l'ADN double brin porte deux charges négatives par paire de base. L'espacement entre chaque paire étant de 0,34 nm, il y a en moyenne une charge tous les 0,17 nm le long du polymère.

De plus, l'ADN double-brin est une molécule rigide localement. Cela se traduit par

une longueur de persistance (longueur à partir de laquelle la direction prise par un segment de chaîne n'influence plus celle du suivant) de 50 nm environ (soit 150 paires de bases). Sur cette distance, l'ADN peut-être considéré comme rigide (Figure 100).

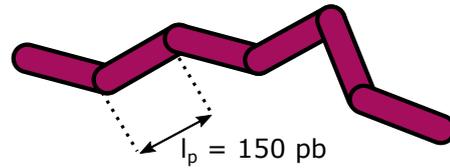


FIGURE 100 – La longueur de persistance d'un polymère correspond à la longueur sur laquelle il peut-être considéré rigide

Enfin, l'ADN double-brin a un rapport longueur/diamètre élevé. Pour un diamètre constant de 2 nm, la longueur peut atteindre l'échelle du centimètre pour certains chromosomes, soit une différence de 7 ordres de grandeur. Chez l'Homme, l'ensemble de l'information génétique représente environ 3 milliards de paires de bases réparties sur 23 paires de chromosomes. Mises bout à bout, cela représente une longueur de 2 mètres environ. Cependant, chez les eucaryotes, le noyau qui contient ces molécules fait 6 μm de diamètre.

La structure de l'ADN au sein des cellules ne correspond donc pas à celle décrite précédemment. L'évolution a sélectionné des mécanismes permettant à l'ADN d'être contenu dans un noyau cellulaire en diminuant l'espace qu'il occupe. Ceux-ci reposent sur une propriété particulière de ce polymère : il est possible, sous certaines conditions, de le compacter. La compaction est ici définie comme la capacité pour une chaîne étendue de se replier sur elle-même. Nous allons voir que cette compaction revêt différentes formes et fait intervenir différents mécanismes dans le vivant.

3.2 *in vivo*

3.2.1 Stratégies mises en place

Trois grandes stratégies ont été sélectionnées par l'évolution permettant la compaction de l'ADN *in vivo*. Celles-ci ne sont pas indépendantes et se complètent au sein des organismes bien que certains mécanismes soient prédominants selon les domaines du vivant.

3.2.1.1 Surenroulement

Un moyen efficace de diminuer le volume occupé par un brin d'ADN est le surenroulement. Celui-ci se produit quand le nombre de croisements entre les deux simples brins constituant l'ADN double brin est modifié. Cette modification de la structure en double hélice provoque la formation de boucles à l'origine du surenroulement.[80] Une analogie parlante est la forme que peut prendre un fil de téléphone ancien où l'hélice initiale peut-être surenroulée (Figure 101).

Ce phénomène est assisté par des enzymes (topoisomérases) et des protéines stabilisant les formes surenroulées de l'ADN (Figure 102). Il est présent chez les prokaryotes comme chez les eucaryotes et joue un rôle important dans la régulation de l'expression génétique, en modulant l'accès à certaines portions de l'ADN.

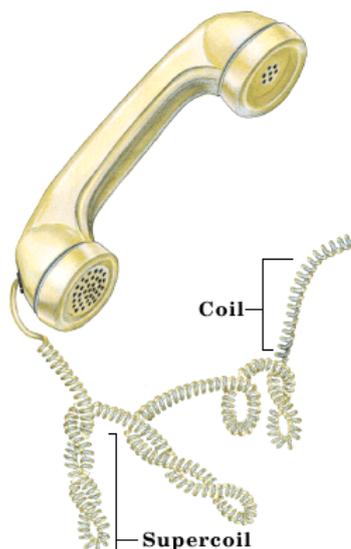


FIGURE 101 – Surenroulement d'un fil téléphonique

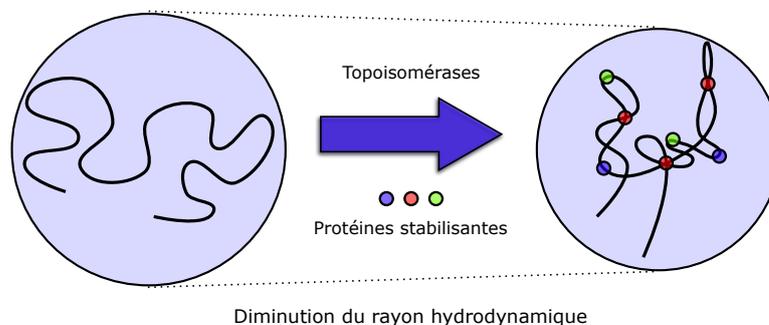


FIGURE 102 – Le surenroulement de l'ADN se fait à l'aide de protéines et conduit à une diminution de son rayon hydrodynamique

3.2.1.2 Encombrement moléculaire

Une autre stratégie consiste à saturer le milieu cellulaire ou nucléaire de macromolécules. Ces macromolécules restreignent l'espace accessible à l'ADN et favorisent sa compaction par effet de volume exclu. De plus, cet encombrement influe aussi sur les équilibres de réactions (l'activité des espèces n'est plus assimilable à leur concentration) et donc sur la reconnaissance moléculaire entre l'ADN et ses ligands.[81, 82] La concentration effective en protéines stabilisant la compaction d'ADN augmente, ce qui favorise par un deuxième mécanisme la compaction d'ADN (Figure 103).[83]

3.2.1.3 Utilisation de complexes protéiques

L'ADN peut aussi être compacté au sein des cellules par interaction avec des protéines. Celles-ci possèdent des résidus chargés positivement (lysine, arginine) et peuvent agir sur la structure de l'ADN de différentes façons. On distingue les protéines pouvant ponter deux segments d'ADN, celles pouvant imposer à l'ADN une tension locale et celles autour desquelles l'ADN peut s'enrouler (Figure 104).[80]

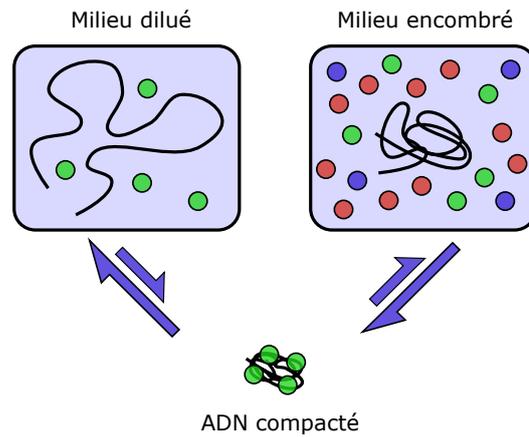


FIGURE 103 – Effets de l’encombrement macromoléculaire sur la compaction de l’ADN

Ce sont les plus étudiées et elles comprennent les histones, qui sont à l’origine de la structure chromosomale chez les eucaryotes.

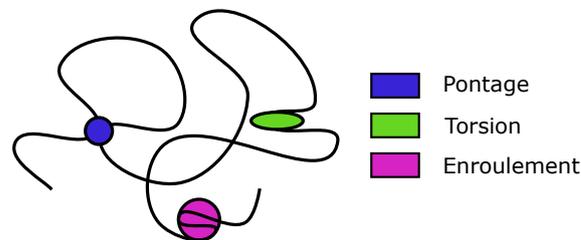


FIGURE 104 – Les protéines peuvent permettre la compaction de l’ADN via diverses actions

Les histones sont des protéines formant un octamère autour duquel l’ADN peut s’enrouler pour former le nucléosome qui est l’unité de base de la structure de l’ADN eucaryote *in vivo*. Autour de chaque octamère d’histones s’enroulent 147 paires de bases, chaque nucléosome étant séparé par 80 paires de bases. L’alternance des nucléosomes confère à l’ADN une structure dite en « collier de perles ». L’ensemble de l’ADN et des nucléosomes porte le nom de chromatine. Celle-ci peut se condenser davantage grâce à l’intervention d’une autre histone H₁ pour former une structure en fibre, où les nucléosomes sont agglomérés (Figure 105).[84] Des états supérieurs de condensation peuvent aussi être atteints au cours du cycle cellulaire, avec un maximum lors du processus de division cellulaire.

En moyenne, la longueur d’un chromosome humain au stade le plus avancé de compaction est de l’ordre du μm , alors que sa longueur totalement déplié est de l’ordre du cm. La compaction permet donc de réduire de 4 ordres de grandeur la taille occupée par un chromosome.

3.2.2 Implications biologiques

La structure locale de l’ADN au sein de la cellule est primordiale car c’est elle qui définit les régions transcriptionnellement actives. On peut ainsi définir deux types de chromatine :

- L’hétérochromatine, où la transcription est active et où les gènes sont accessibles

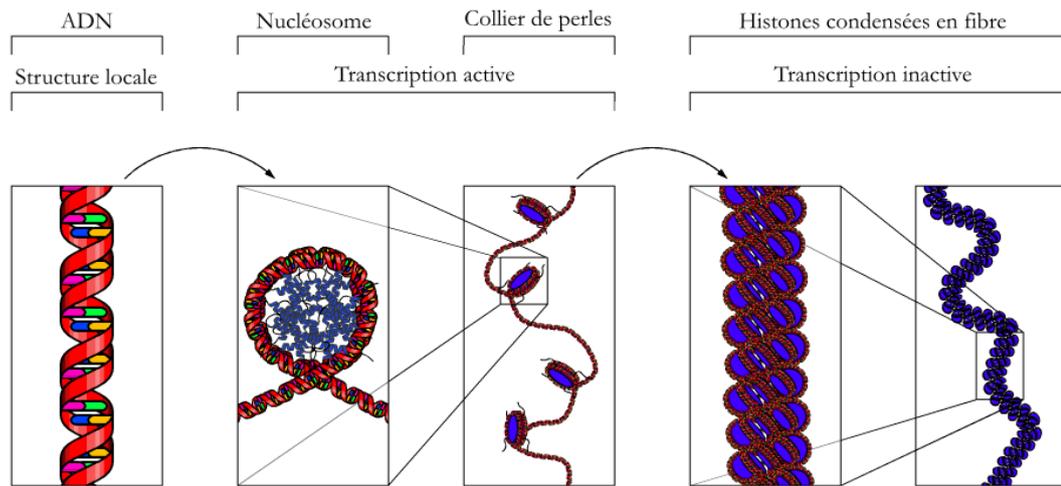


FIGURE 105 – L'ADN eucaryote possède des degrés progressifs de structuration en fonction de ses interactions avec des histones

- L'euchromatine, où les gènes ne sont pas transcrits en raison de leur état de compaction avancé

La facilité d'accès à la séquence nucléotidique d'un gène par les ARN polymérases va donc définir qualitativement et quantitativement les protéines produites par une cellule donnée. La régulation de cet accès à l'ADN constitue une forme de contrôle de l'expression génétique. En particulier, les modifications chimiques (acétylation, méthylation) affectant les histones ou les bases vont conduire à un changement de la structure locale de l'ADN et donc à des modifications de son expression.

Plus précisément, l'acétylation de résidus lysine d'histones provoque une diminution de leur charge globale, et donc de leur interaction électrostatique avec les phosphates de l'ADN. Cela permet une relaxation locale de l'ADN et un accès facilité à ses bases pour les transcrire (Figure 106). Certaines modifications chimiques des histones seraient héréditaires et pourraient faire partie d'un « code épigénétique » qui compléterait le code génétique en modulant durablement l'expression de protéines.[85]

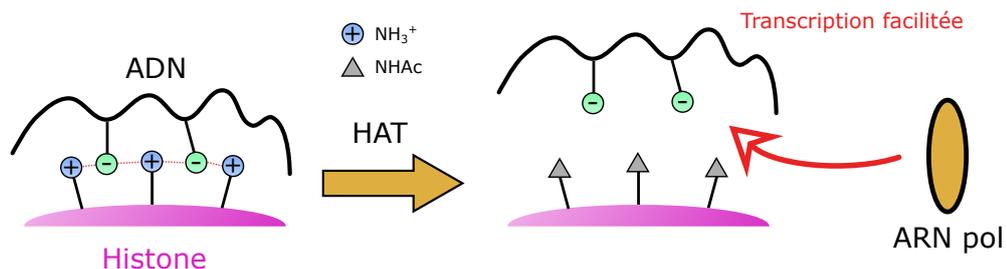


FIGURE 106 – L'acétylation des histones permet un accès facilité à l'ADN en diminuant leur charge

HAT : Histone Acetyl Transferase

Le surenroulement est aussi un moyen de réguler l'expression génétique. Lorsque l'ADN est sous sa forme B, toutes les bases sont appariées de manière optimale et les phosphates sont tournés vers le milieu extérieur. L'accès aux bases, qui contiennent l'information génétique, est alors impossible. L'action de topoisomérases permet de

moduler le surenroulement de l'ADN et de favoriser l'accès à certains sites afin d'initier la transcription de gènes[86].

Ce mode de contrôle existe aussi chez les procaryotes (*E. Coli*) où il a été montré que le degré de surenroulement et la modification de l'expression protéique en résultant pouvaient être corrélés aux conditions du milieu extérieur (température, concentration en nutriments par exemple). [87]

La compaction de l'ADN joue aussi un rôle prédominant chez certains virus. Lorsque celui-ci est compacté au sein de la capsid d'un bactériophage, la pression intérieure peut augmenter jusqu'à 5 MPa.[88] Une fois le virus lié à sa cible, la différence de pression avec le milieu intérieur de la cellule assiste la sortie de l'ADN (Figure 107).

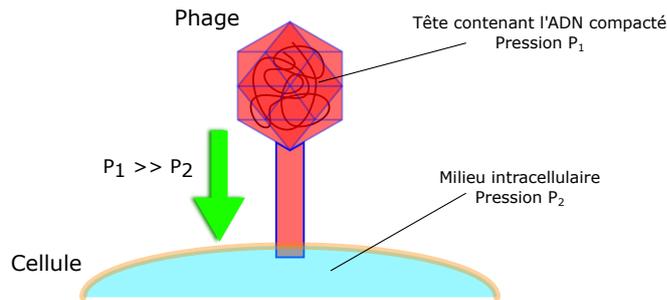


FIGURE 107 – Différence de pression aidant l'introduction du matériel génétique du phage

On estime qu'environ 20 % du matériel génétique du virus est internalisé par ce mécanisme, le reste l'étant par l'action de protéines motrices poussant l'ADN hors de la capsid.[89]

3.3 *in vitro*

3.3.1 Polycations et chaînes polycationiques covalentes

Dans certains cas particuliers, chez les eucaryotes, l'ADN n'est pas compacté par des histones. C'est le cas pour les spermatozoïdes où celles-ci ne sont responsables que de la compaction d'environ 10 % du matériel génétique. Le reste est compacté par des protamines qui sont des chaînes polypeptidiques d'environ 50 résidus, riches en arginine.[90] Il est donc possible de compacter l'ADN à l'aide de molécules plus simples que des protéines comportant plusieurs centaines d'acides aminés.

L'étude de la compaction de l'ADN *in vitro* repose sur l'utilisation de molécules chargées, plus simples que les protéines, que nous allons ici présenter en expliquant les mécanismes associés à ce phénomène.

3.3.1.1 Repliement d'une chaîne polyélectrolytique hautement chargée

En raison de sa densité de chargée importante, l'ADN fait partie des chaînes polyélectrolytiques hautement chargées selon la classification de Manning et Oosawa.[91, 92] Leur théorie prévoit une condensation de contre-ions à sa surface, c'est à dire la création de paires d'ions intimes entre certains phosphates de l'ADN et des contre-ions du milieu. Cela résulte d'une stabilisation des contre-ions en solution par effet électrostatique, et continue jusqu'à ce que le potentiel électrostatique de la chaîne

atteigne une valeur critique. Cette valeur correspond au moment où il est plus favorable énergétiquement pour un contre-ion de rester libre en solution, plutôt que de se condenser sur la chaîne (l'effet entropique l'emporte sur l'interaction électrostatique).

A partir d'une certaine neutralisation des charges de la chaîne, les interactions faites par l'ADN avec le solvant sont défavorables. Le polymère se replie donc sur lui-même. L'interaction intramoléculaire est favorisée par plusieurs effets, notamment la libération des contre-ions monovalents situés à proximité des phosphate de l'ADN (Figure 108). Plus précisément, le rapprochement de deux segments d'ADN permet :

- La libération de contre-ions positifs et négatifs qui est favorable entropiquement
- La libération d'une partie des molécules d'eau solvatant les charges qui est aussi favorable entropiquement
- Des interactions électrostatiques à courte distance qui est favorable enthalpiquement

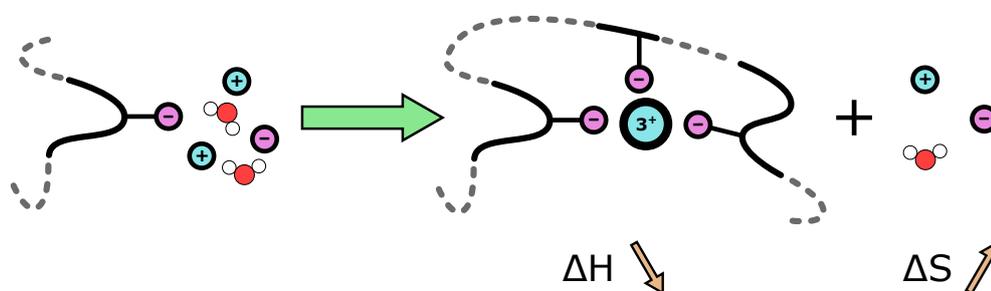


FIGURE 108 – Divers facteurs enthalpiques et entropiques sont responsables de la compaction

Dans le cas d'une chaîne polycationique, cette interaction peut s'accompagner d'un phénomène de pontage où celle-ci va interagir avec deux sections de l'ADN éloignées. Cela permet de favoriser localement la compaction de l'ADN.

Le taux de neutralisation (pourcentage de phosphates dont la charge est compensée sur la chaîne) augmente avec la valence du contre-ion ajouté au milieu. Expérimentalement, on observe qu'il est en général nécessaire d'avoir au moins 3 charges sur le contre-ion (permettant d'atteindre un taux de neutralisation de 89 %, voir section A.3) afin de compacter une chaîne d'ADN.[93] La compaction est donc de plus en plus aisée lorsque la charge du contre-ion augmente (Figure 109).

3.3.1.2 Molécules utilisées

Plusieurs types de molécules sont utilisables afin de compacter l'ADN *in vitro*. Toutefois, il est généralement difficile de comparer leur efficacité relative en raison des différents types d'ADN utilisés (linéaire ou circulaire, court ou long). De plus, les conditions d'expérience varient souvent d'une équipe à l'autre. Nous nous attachons donc ici à présenter les systèmes mis au point, et en particulier ceux reposant sur des cyclodextrines, en mettant en évidence les interactions intermoléculaires aboutissant à la compaction de l'ADN.

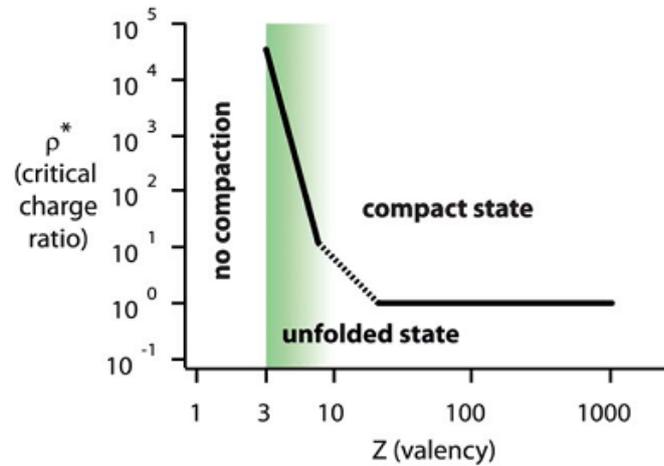


FIGURE 109 – Courbe théorique de la quantité de contre-ion nécessaire pour compacter l'ADN en fonction de sa charge Z avec $\rho^* = \frac{Z \cdot [\text{compactant}]}{n_{\text{phosphates}}[\text{ADN}]}$. [93]

POLYCATIONS DE HAUTE DENSITÉ DE CHARGE Nous appelons ici polycations de haute densité de charge les molécules où la charge est concentrée dans un volume réduit, contrairement aux chaînes polycationiques où celle-ci est répartie le long de la molécule.

Des complexes inorganiques, et en particulier $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, ont par exemple été étudiés dans la compaction de l'ADN *in vitro*. [94]

Du côté des cyclodextrines, l'équipe de Yannakopoulou a utilisé des dérivés perfonctionnalisés sur le col primaire par des groupements guanidinium afin de compacter de l'ADN plasmidique. [95] La haute densité de charge au niveau du col primaire est ici responsable d'interactions fortes avec les phosphates de la chaîne d'ADN, conduisant à sa compaction, visible par AFM (Figure 110).

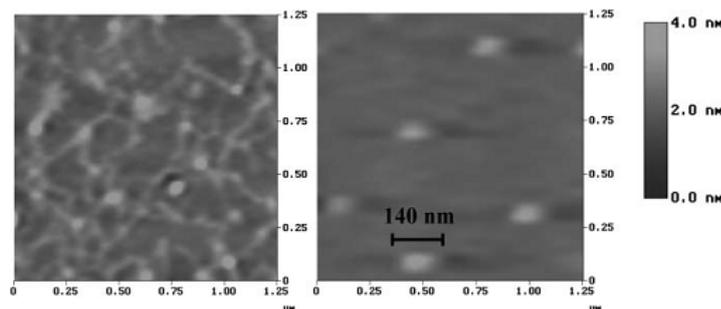


FIGURE 110 – Structure de l'ADN plasmidique observé par AFM sans cyclodextrine polycationique (gauche) et après incubation avec celles-ci (droite)

CHAÎNES POLYCATIONIQUES COVALENTES Les chaînes polycationiques les plus étudiées sont les polyamines à 3 charges ou plus (spermidine, spermine, poly-lysine, voir Figure 111). [96–98] Cependant, malgré la théorie, certains cations de valence 2 peuvent compacter l'ADN. Yoshikawa a étudié la capacité de compaction de diamines linéaires dont la longueur de chaîne variait. Il a ainsi pu montrer que, pour

une longueur de chaîne allant de trois à six carbones, seules les diamines possédant un nombre de carbones impair pouvaient compacter un ADN linéaire de phage T4.[99] Les auteurs ne donnent cependant pas de détails concernant la raison de ce comportement différent selon la longueur de chaîne.

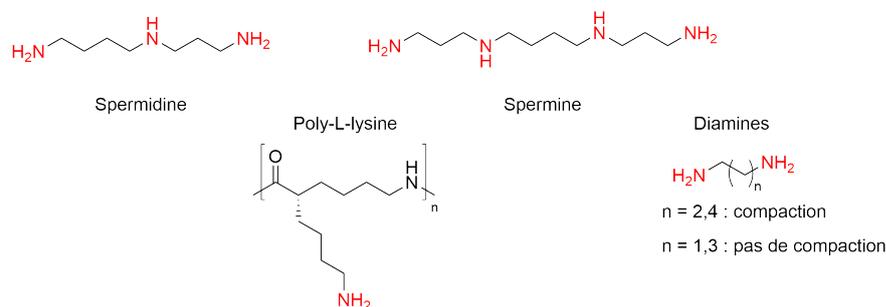


FIGURE 111 – Structures des chaînes polycationiques majoritairement étudiées *in vitro* dans la compaction de l'ADN

L'équipe de Feng a utilisé un système original reposant sur un pseudopolyrotaxane de cyclodextrines chargées enfilées sur un axe polypropylène glycol (Figure 112). [100] Ces cyclodextrines sont mono-fonctionnalisées par l'hexane-1,6-diamine sur le col primaire et peuvent compacter l'ADN sous forme de petites particules d'environ 100 nm de diamètre. L'introduction de cucurbit[6]uril permet de moduler l'action des amines par la formation du complexe d'inclusion avec l'hexane-1,6-diamine. Les particules observées sont alors de taille supérieure (environ 700 nm de diamètre), bien que cet effet ne soit pas expliqué.

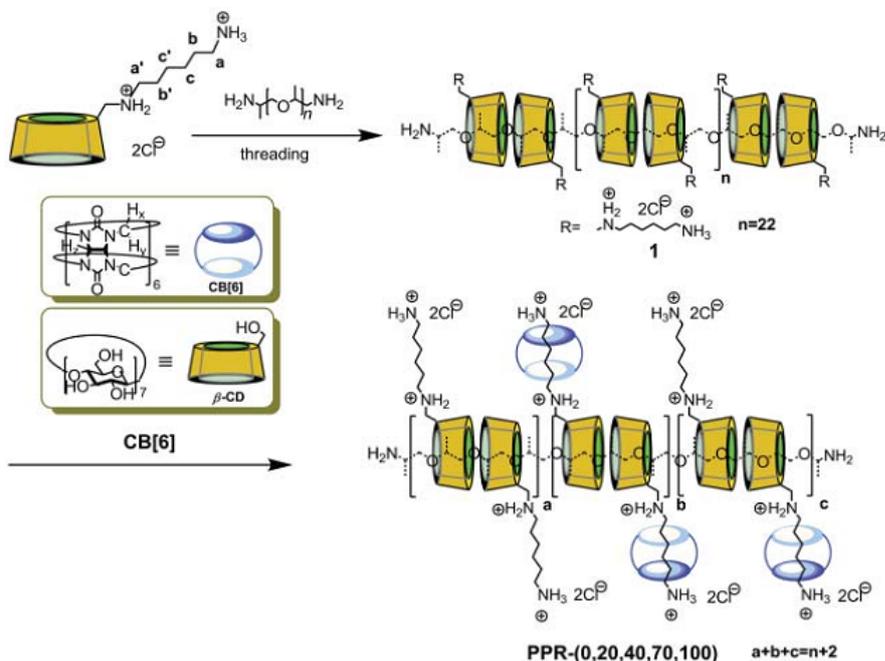


FIGURE 112 – Synthèse des pseudopolyrotaxanes chargés

Le groupe de Liu a aussi utilisé un pseudopolyrotaxane de cyclodextrines β afin de compacter l'ADN.[101] Celui-ci est composé de cyclodextrines monofonctionna-

lisées sur le col primaire par un bras polyamine, terminé par un motif anthracène (Figure 113). Ce motif est capable de s'intercaler entre les bases de l'ADN. L'ajout de cette interaction à celle de type électrostatique entre les phosphates et les amines permet la compaction d'ADN de manière efficace.

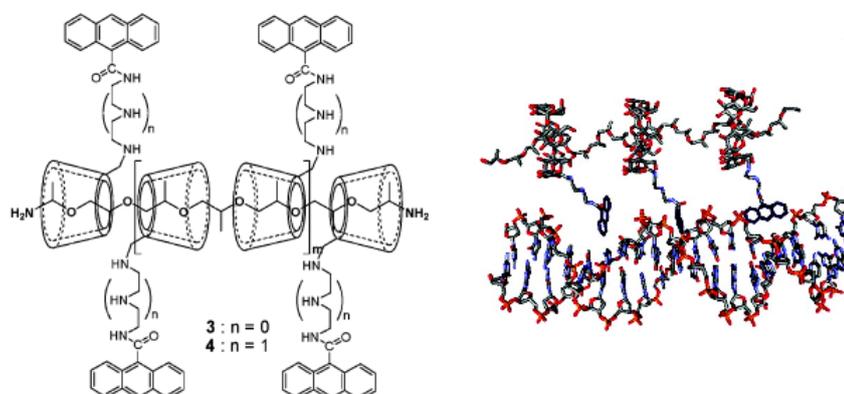


FIGURE 113 – Pseudopolyrotaxane comportant des bras amino-anthracène (gauche) et modélisation de la structure du complexe formé avec l'ADN (droite)

Cette même équipe a aussi mis au point un système reposant sur les mêmes interactions où une cyclodextrine β est greffée sur un chitosane, chargé positivement (Figure 114).[102] Des molécules possédant une extrémité pyrene, capable de s'intercaler entre deux bases de l'ADN, et une extrémité adamantane, capable de former un complexe d'inclusion avec la cyclodextrine β , sont ajoutées au milieu. L'assemblage supramoléculaire obtenu peut compacter l'ADN via les mêmes interactions que précédemment.

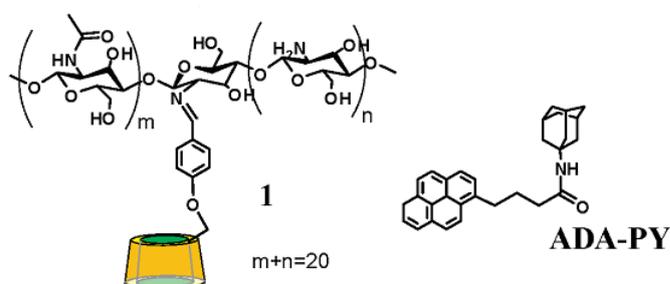


FIGURE 114 – Composants de l'assemblage supramoléculaire composé d'une polyamine et d'un pyrene

Le groupe de Midoux a observé que les cyclodextrines α per-fonctionnalisées par des histidines compactaient mieux l'ADN que celles per-fonctionnalisées par des lysines.[103] Ce résultat était surprenant car les lysines ($pK_a = 10,53$) sont davantage chargées positivement que les histidines ($pK_a = 6,10$) au pH utilisé ($pH = 7,4$). De manière encore plus surprenante, les composés per-fonctionnalisés par des histidines compactent l'ADN de manière comparable à des poly-L-lysine de 190 unités. Les auteurs supposent qu'il existe une interaction hôte invité entre une histidine et une cavité de cyclodextrine adjacente, permettant la liaison des monomères entre eux et l'augmentation de la densité de charge à proximité de l'ADN (Figure 115).

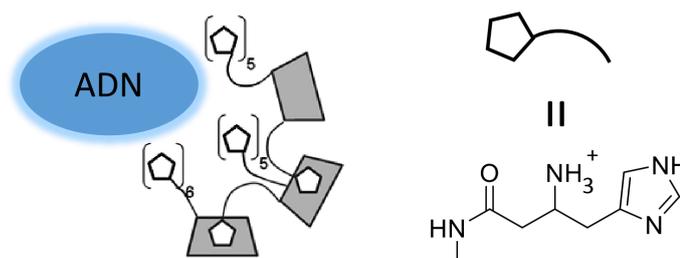


FIGURE 115 – Système postulé à l'origine des propriétés de compaction de la cyclodextrine α perfonctionnalisée par des histidines

Cependant, les expériences RMN réalisées (ROESY et DOSY) montrent que seule l'espèce auto-incluse est formée en l'absence d'ADN. Ainsi, les auteurs supposent que l'ADN permet de préorganiser la structure et de favoriser la formation du complexe hôte-invité.

Le groupe de Garcia Fernández a aussi mis à profit des interactions de type hôte-invité entre cyclodextrines permettant la formation de dimères compactant l'ADN.[104] Leur système repose sur des cyclodextrines mono fonctionnalisées par un xylène sur le col secondaire et perfonctionnalisées par des amines sur le col primaire (Figure 116).

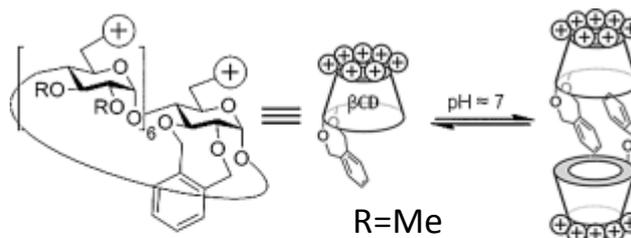


FIGURE 116 – Cyclodextrine polychargée sur le col primaire et portant une fonction xylène sur le col secondaire

L'association de ces cyclodextrines sous forme de dimère permet l'interaction avec le grand sillon de deux zones distinctes de l'ADN, ce qui conduit à sa compaction.

Le même groupe a aussi mis au point un système reposant sur des cyclodextrines β hepta-aminées sur le col primaire.[105] Celles-ci sont mises en présence de molécules portant un groupement adamantane à chaque extrémité afin de former le complexe 2 : 1 (Figure 117). De la même manière que précédemment, ces assemblages permettent de rapprocher deux zones éloignées de l'ADN en jouant le rôle de réticulants supramoléculaires.

3.3.2 Polymères neutres et tensioactifs cationiques

En dehors des polycations, d'autres systèmes sont utilisables afin de compacter l'ADN. Contrairement aux polycations se repoussant, ceux-ci interagissent collectivement de manière positive. Cette interaction positive, qui n'est pas présente avec des polycations classiques, permet de passer sous la barre théorique des 3 charges par molécule pour condenser l'ADN.

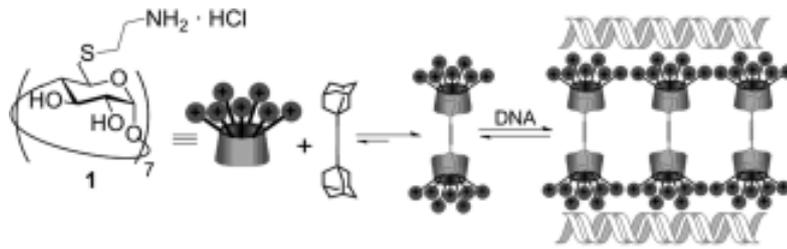


FIGURE 117 – Utilisation de dimères de cyclodextrines reliés par un invité divalent permettant la compaction de molécules d'ADN

3.3.2.1 Polymères neutres

Les polymères neutres peuvent permettre la compaction de l'ADN. Ces polymères interagissent de manière plus favorable entre eux qu'avec l'ADN et augmentent la pression osmotique s'exerçant sur l'ADN en s'associant. Plus leur concentration augmente, plus l'ADN établit de contacts défavorables avec le milieu et plus il devient énergétiquement favorable pour lui de se compacter. Cette compaction nécessite la présence de cations monovalents afin de compenser en partie la charge des phosphates (leur rapprochement constitue une barrière énergétique forte) et est nommée « ψ -condensation » (polymer-and-salt-induced condensation) [106, 107]. Ce mécanisme peut-être vu comme analogue à l'encombrement macromoléculaire *in vivo* précédemment décrit (Figure 118).

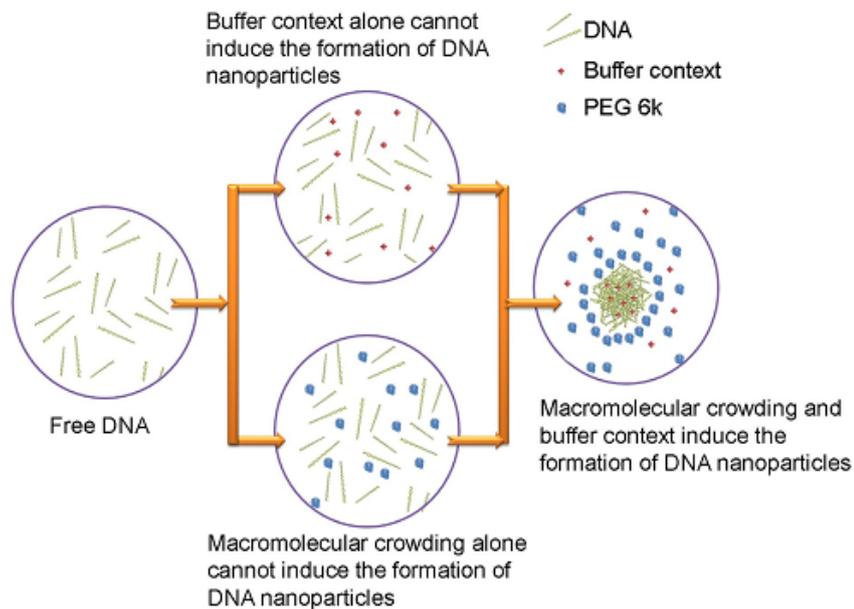


FIGURE 118 – Mécanisme de la ψ -condensation[108]

3.3.2.2 Tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques sont aussi capables de compacter l'ADN [109]. Ce sont des molécules amphiphiles, capables d'interagir avec l'ADN via leur charge positive,

mais aussi de s'associer entre elles grâce à leurs chaînes hydrophobes (Figure 119). Cette interaction présente un caractère coopératif positif en raison de la création puis de l'expansion d'un domaine hydrophobe. [110] Les tensioactifs les plus généralement utilisés sont des sels d'amines quaternarisées liées à une longue chaîne hydrophobe.

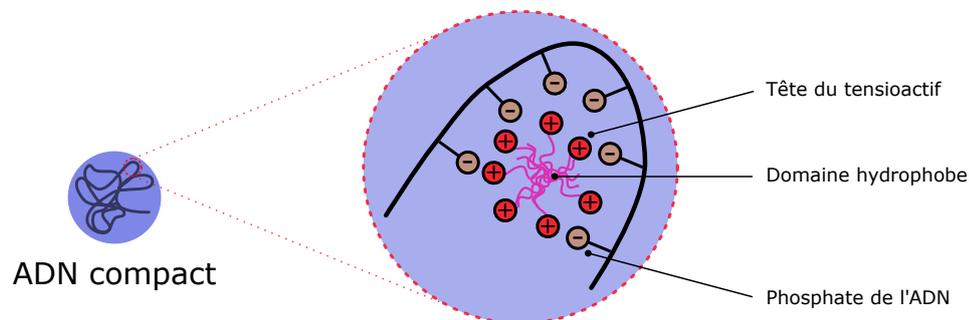


FIGURE 119 – La compaction de l'ADN à l'aide d'un tensioactif est assistée par l'effet hydrophobe résultant de l'association de chaînes aliphatiques

Des cyclodextrines ont aussi été utilisées dans des systèmes analogues. A titre d'exemple, le groupe de Garcia Fernández a mis à profit les méthodes de chimie click afin de fonctionnaliser le col primaire de cyclodextrines β par des chaînes de poly amines.[111] La face secondaire est quant à elle fonctionnalisée par des chaînes hydrophobes comportant 5 carbones (Figure 120).

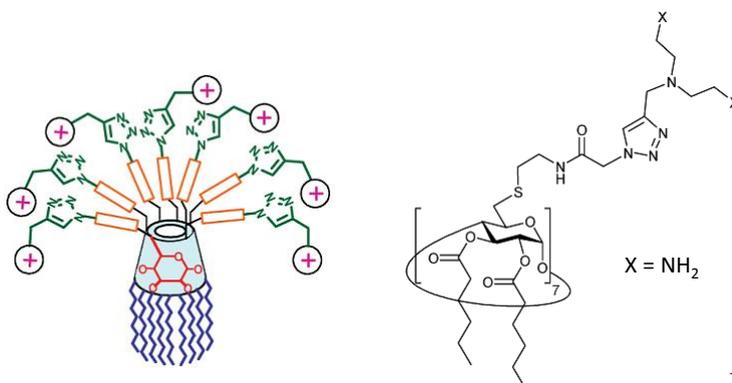


FIGURE 120 – Structure générale de la cyclodextrine amphiphile utilisée (gauche) et détail de la structure d'une unité (droite)

L'utilisation d'interactions faibles entre cyclodextrines permet à ces systèmes de compacter l'ADN. Cependant, l'utilisation de monomères pouvant former des polymères supramoléculaires en solution n'est pas rapportée. Nous avons donc voulu tester nos structures afin d'explorer cette voie.

3.4 INTERACTIONS ENTRE MONOMÈRES AB ET ADN

Nous avons vu qu'il est possible d'utiliser l'effet hydrophobe dans des systèmes moléculaires permettant la compaction d'ADN *in vitro* à l'aide de surfactants. Comme dit en introduction, notre but était ici de voir si la formation d'un polymère supramoléculaire pouvait induire la compaction de molécules d'ADN, et dans le sens inverse,

si l'ADN permettait de promouvoir une association supramoléculaire. Cela nécessite de pouvoir observer l'aspect des molécules d'ADN en présence de cyclodextrines.

3.4.1 Système expérimental

Au sein d'une collaboration avec l'équipe du Professeur Baigl, nous avons opté pour la microscopie de fluorescence afin de visualiser les molécules d'ADN. Elle permet l'observation d'ADN par l'intermédiaire d'un intercalant fluorescent (Figure 121).

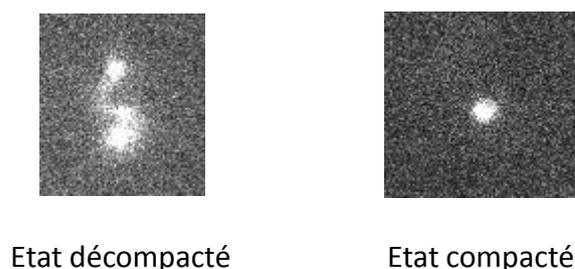


FIGURE 121 – Structures d'un ADN de phage T4 décompacté et compacté par microscopie de fluorescence

Dans notre cas, le système complet se composait de :

- L'ADN linéaire d'un phage T4 (169 kpb)
- Un intercalant fluorescent (YOYO-1) permettant de visualiser l'ADN sous illumination à 491 nm
- Un tampon TRIS-HCl imposant un pH de 7,4
- Une quantité variable de cyclodextrine fonctionnalisée

Pour chaque analyse, les différents constituants sont mélangés, puis une goutte est prélevée et déposée sur une lame de verre qui est directement observée au microscope. On observe alors en général un mélange d'espèces, où la proportion d'ADN compactés est variable. Il faut alors compter un nombre assez important d'ADN (environ 100 à nos concentrations), en les attribuant à des espèces compactées (globules) ou non (chaînes). On obtient ainsi la proportion d'ADN compactés pour une concentration en cyclodextrine choisie. En répétant cette opération à diverses concentrations, on peut construire la courbe du pourcentage d'ADN compacts en fonction de la concentration en cyclodextrine (Figure 122).

On définit C_{50} comme la concentration où 50 % des ADN dans le milieu sont compactés. Cette grandeur sera utilisée afin de comparer les efficacités de compaction pour nos différentes molécules. Il est toutefois important de savoir que ce type de mesures comporte une marge d'erreur de 10 % environ, ce qui est assez élevé. On s'attachera donc plus à la tendance des courbes, et à leurs comparaisons, qu'à la valeur absolue du pourcentage de compaction à une concentration donnée.

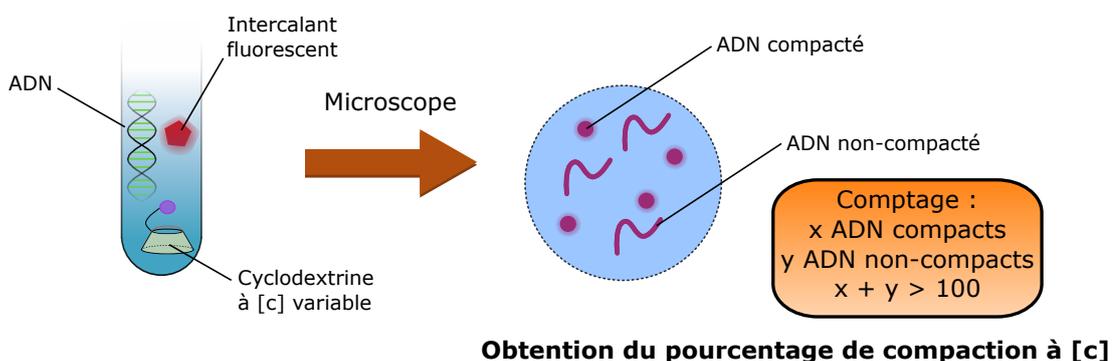


FIGURE 122 – Schéma d'une expérience en microscopie de fluorescence

3.4.2 Expériences préliminaires

3.4.2.1 Molécules testées

Dans un premier temps, nous avons choisi de tester différentes molécules ne devant en théorie pas compacter l'ADN, celles-ci comportant moins de trois charges, et étant incapables de s'assembler en solution. Pour les cyclodextrines α et β , nous avons donc testé les versions mono ou di-aminées sur le col primaire en positions AD, ainsi que les molécules où la cyclodextrine est pontée par le diaminobutane (Figure 123). Les molécules mono ou di-amine ont été obtenues par hydrogénation des molécules per-benzylées fonctionnalisées par des azotures, récupérées de stocks du laboratoire. Les molécules pontées ont été synthétisées de la manière décrite dans le chapitre précédent (par D. Colesnic pour la version α).

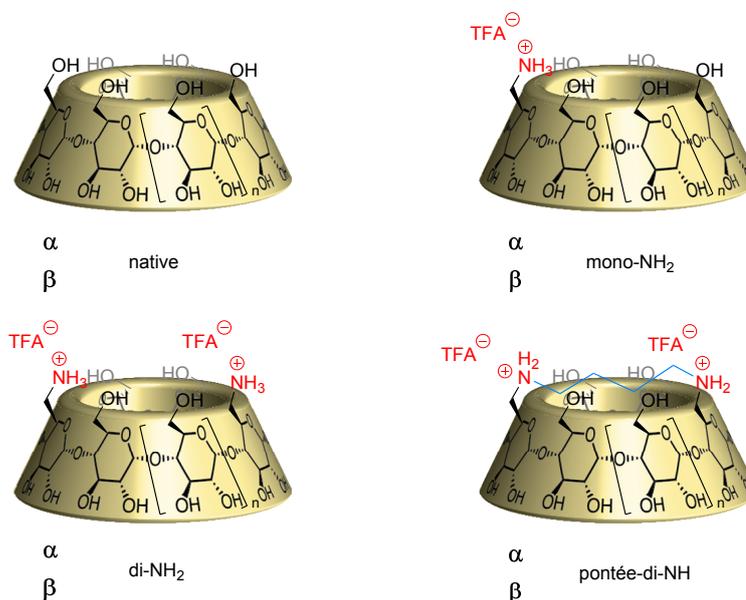


FIGURE 123 – Cyclodextrines utilisées dans les expériences préliminaires

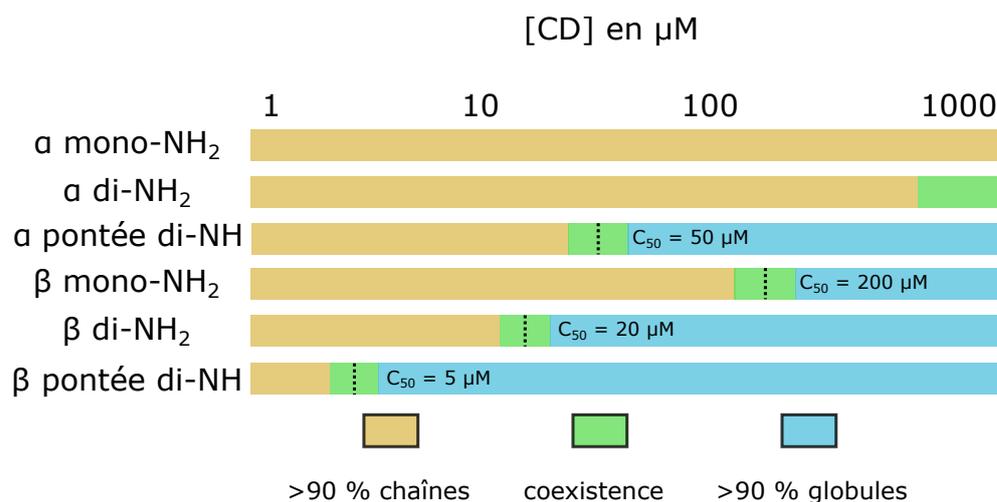


FIGURE 124 – Diagramme de la morphologie de l'ADN en fonction de la concentration en cyclodextrine mono ou di amine

3.4.2.2 Résultats

Tout d'abord, les cyclodextrines α et β ne compactent pas l'ADN sous leur forme native. Ne portant aucune charge, elles n'interagissent pas particulièrement avec l'ADN et sont donc incapables d'induire sa compaction. En revanche, de manière surprenante, des cyclodextrines mono- ou di-chargées, sans fonctionnalisation permettant un assemblage supramoléculaire, parviennent à compacter l'ADN à des concentrations relativement basses (Figure 124). Pour chaque série, α et β , une même tendance est observée : la capacité à compacter l'ADN suit cet ordre : pontée di-NH > di-NH₂ > mono-NH₂. Cependant, on constate que les cyclodextrines β ont un pouvoir de compaction supérieur lorsque des structures équivalentes sont comparées. De plus, le fait de ponter la cyclodextrine en gardant le même nombre de charges a un effet bénéfique sur la compaction, permettant de diminuer la C₅₀ d'un facteur 20 dans le cas de la cyclodextrine α et 4 dans le cas de la β . Cette observation est contradictoire avec les travaux de Yoshikawa, qui n'observait pas de compaction avec le diaminobutane (voir Figure 3.3.1.2). Nos essais avec un sel de TFA de diaminobutane donnent cependant des résultats similaires au sien, avec une C₅₀ au-delà de 1,5 mM.

La cyclodextrine est donc à l'origine d'un effet encore jamais observé, permettant d'induire la compaction de l'ADN même avec un nombre de charges inférieur à 3. Notre première hypothèse pour expliquer ce phénomène était la formation d'agrégats de cyclodextrines, induite par la haute concentration locale de celles-ci au niveau de la chaîne de l'ADN (Figure 125). Cela expliquerait la meilleure efficacité des cyclodextrines β par rapport aux α , celles-ci étant plus sujettes à l'agrégation. Certains modèles d'agrégation des cyclodextrines décrivent un réseau de liaison hydrogène entre celles-ci *via* les hydroxyles du col secondaire.[55] Ces interactions entre cols secondaires sont mises en évidence dans certaines structures cristallographiques, où elles permettent la formation de tunnels reliant les cavités entre elles.[112] Toutefois, la formation de ces structures nécessite en général la présence d'un invité au sein de la cavité.

Nous avons reproduit les expériences avec la cyclodextrine β pontée di-NH en ajoutant de l'urée au mélange dans le but de perturber les liaisons hydrogène inter-

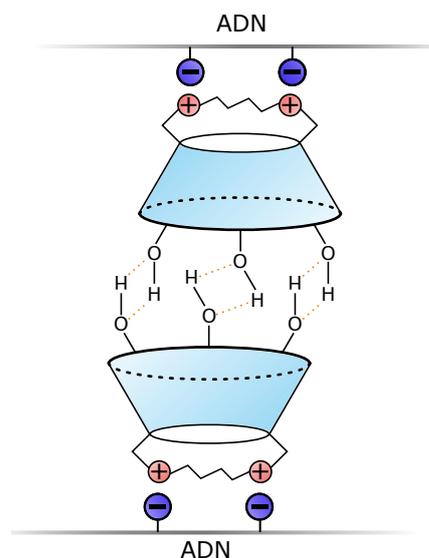


FIGURE 125 – Mode possible d'interactions entre cols secondaires de cyclodextrines pontées compactant l'ADN

moléculaires. A une concentration de 20 μM en cyclodextrine et de 1 M en urée, les ADN présents dans l'échantillon sont toujours tous compacts.

Cette urée étant ajoutée après la solution de cyclodextrine, mais avant l'ADN, nous nous sommes demandé si les potentiels agrégats pouvaient préexister dans le milieu (bien que les concentrations où les agrégats de cyclodextrine β sont décrits soient en général autour de 10 mM) et être ainsi protégés de l'urée. Nous avons donc essayé de passer l'échantillon ne contenant que l'urée et la cyclodextrine β pontée di-NH dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes à température ambiante. L'observation de l'échantillon donne le même résultat que précédemment : l'ADN est toujours entièrement compacté. Deux hypothèses sont alors possibles :

- L'association de ces cyclodextrines ne passe pas par des liaisons hydrogène
- L'association est trop forte pour être perturbée par l'excès d'urée présent

Ces deux hypothèses sont difficiles à tester et nous confrontent à une limite de notre système expérimental : il est compliqué d'obtenir des informations sur les interactions intermoléculaires de manière directe. Pour obtenir des informations il est nécessaire d'ajouter d'autres molécules ou de synthétiser des analogues afin de faire des déductions reposant sur les variations des diagrammes de compaction.

Un deuxième effet nous semblait intéressant à étudier : le pontage des deux amines sur le col primaire permet d'augmenter drastiquement la capacité de la cyclodextrine à compacter l'ADN. La différence de profil entre cyclodextrine mono-NH₂ et di-NH₂ laisse supposer que cette dernière interagit avec l'ADN par ses deux amines. Nous avons donc identifié les différences entre les amines libres et pontées, afin d'essayer de comprendre leur comportement différent.

Tout d'abord, la distance inter-amines est différente pour les deux espèces. Au moyen du logiciel Avogadro, nous avons modélisé la structure de cyclodextrines pontées ou non et calculé la distance intercharges lorsque l'énergie du système est minimale. Ces modèles sont fondés sur des structures cristallographiques de cyclodex-

trines et ne représentent donc pas la réalité en solution, mais peuvent donner des indices sur l'effet du pontage.

MOLÉCULE	DISTANCE INTER AMINES (Å)	C ₅₀ (µM)
Diaminobutane	6,130	1700
α di-NH ₂	7,625	1000
α pontée di-NH	6,282	50
β di-NH ₂	7,709	20
β pontée di-NH	6,246	4

TABLE 1 – Influence de la distance inter amines sur la compaction

Calculs effectués avec le programme Avogadro (minimisation de l'énergie par champ de force UFF)

Nous voyons que l'introduction du pont modifie effectivement la distance inter amines, aussi bien pour les cyclodextrines α que β (Tableau 1). Le rapprochement des amines de 1,4 Å environ pour chaque série pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'efficacité de compaction lors de l'introduction du pont. Le fait de contraindre spatialement les amines semble aussi important car le diaminobutane seul, dont la structure est flexible, ne compacte l'ADN qu'à de hautes concentrations. La fixation de cette diamine sur une cyclodextrine permet d'augmenter sa capacité à compacter l'ADN d'un facteur 34 (α) à 425 (β).

Le pontage des amines provoque aussi un changement de leur pKa. Cependant, le rapprochement des charges ne devrait pas favoriser l'ionisation des deux amines pontées par rapport aux libres. De plus, le pKa de ces amines étant proche de 10, et le pH utilisé de 7,4, on peut considérer que toutes les amines sont ici chargées.

Deux effets sont donc ici mis en jeu : l'un concerne une association des cyclodextrines, potentiellement par le col secondaire, qui pourrait résulter d'une agrégation induite en raison d'une forte concentration locale sur le brin d'ADN. Cette interaction est forte car elle serait à l'origine de la C₅₀ inférieure pour les molécules β mono-NH₂ par rapport aux α di-NH₂. L'autre concerne la distance inter-amines et la restriction de leurs degrés de liberté et est à l'origine de la supériorité des molécules pontées di-NH par rapport aux di-NH₂ dans la compaction de l'ADN.

Après ces résultats inattendus, nous avons décidé de tester des molécules capables de s'assembler en solution par des interactions hôte-invité.

3.4.3 Etude de monomères AB dans la compaction de l'ADN

3.4.3.1 Molécules pontées di-amines

Les monomères AB choisis correspondent, pour la version α, à la molécule pontée di-NH sur laquelle est condensée un bras phényle qui fut synthétisée par D. Colesnic. Ces molécules sont capables de former des oligomères en solution à concentration élevée, par interaction hôte-invité entre le phényle et la cavité de la cyclodextrine α. Pour la version β, il s'agit de la molécule pontée di-NH sur laquelle est condensée un bras adamantane, présentée dans le chapitre précédent (Figure 126).

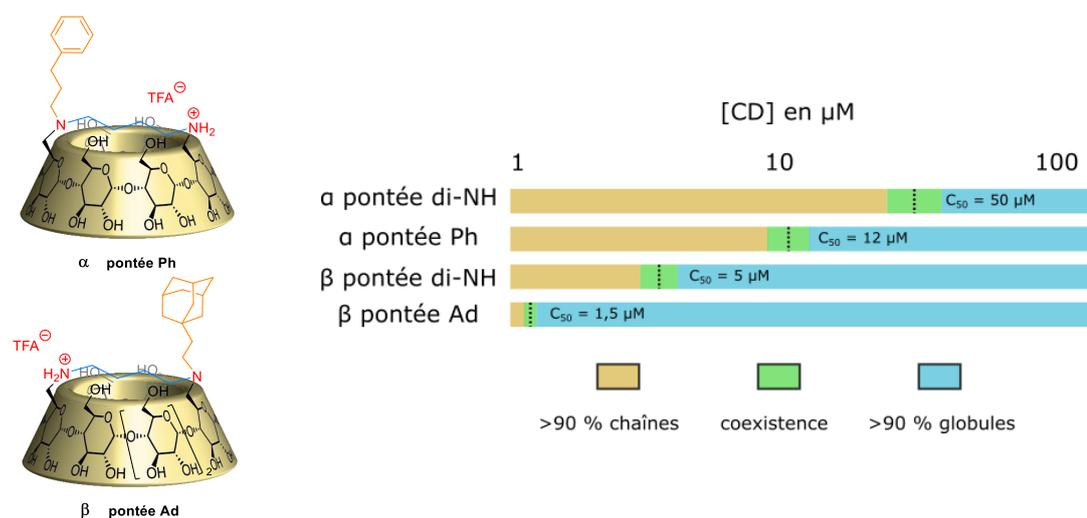


FIGURE 126 – Cyclodextrines capables d'auto-assemblage en solution utilisées (gauche) et profils de compaction comparées aux cyclodextrines pontées di-NH

On observe que les cyclodextrines fonctionnalisées compactent mieux l'ADN que celles pontées di-NH. La fonction hydrophobe étant le seul paramètre différent entre les systèmes, elle joue un rôle bénéfique dans la compaction en permettant de diviser par 4 environ la C_{50} . Les concentrations utilisées pour compacter l'ADN sont de 3 à 4 ordres de grandeur plus basses que celles permettant l'observation de polymères supramoléculaires. En effet, dans les concentrations de l'ordre du μM , les espèces sont dans leur état monomère. L'ADN induit donc la formation d'un assemblage supramoléculaire à l'origine de sa compaction.

On peut alors se poser la question du mode d'interaction des monomères AB avec l'ADN. Nous avons vu précédemment que les cyclodextrines pontées interagissaient avec l'ADN par leurs deux amines. L'une d'elle étant très encombrée dans les monomères α pontée Ph et β pontée Ad, ce mode d'interaction est remis en question pour les monomères AB. De plus, la seconde interaction était attribuée à une forte concentration locale à proximité de l'ADN induisant une agrégation, généralement décrite par des contacts favorables entre cols secondaires. Ici, une forte concentration locale pourrait induire la formation des complexes hôte-invité, empêchant les interactions entre cols secondaires. On peut aussi imaginer la création d'un domaine hydrophobe par l'intermédiaire des fonctions hydrophobes. Nous avons donc potentiellement différents modes d'interaction avec l'ADN selon la catégorie de molécules utilisées. Afin d'explorer l'influence réelle de la formation du complexe d'inclusion sur la compaction de l'ADN, nous avons mis au point un nouveau système.

3.4.3.2 Monomères AB mono-amine

Le nouveau système mis au point repose sur l'utilisation de deux espèces similaires, l'une pouvant s'auto-inclure, et l'autre étant pontée (Figure 127).

La molécule β succ-Ad est similaire à celle présentée dans le chapitre précédent (sous-section 2.5.1) qui formait une espèce auto-incluse stable en solution. La seule différence est l'introduction d'une amine sur le col primaire de la cyclodextrine. La synthèse de ce composé fut réalisée par D. Colesnic.

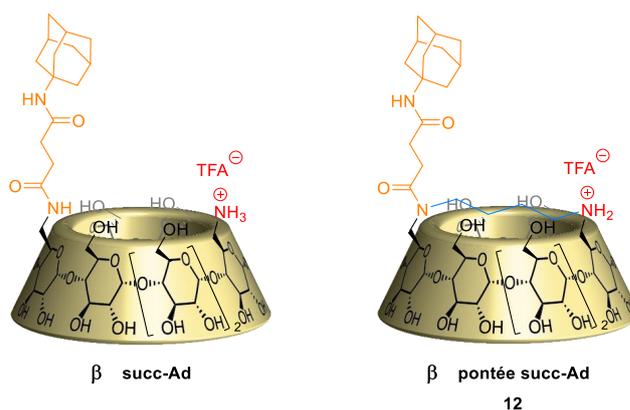


FIGURE 127 – Molécules mono chargées fonctionnalisées par un adamantane pouvant s’auto-inclure (β succ-Ad) ou non (β pontée succ-Ad).

L’autre molécule fut synthétisée en utilisant un couplage amine/acide en lieu et place d’une amination réductrice pour introduire la fonction adamantane sur la cyclodextrine (Figure 128). Après avoir synthétisé la cyclodextrine pontée par le diaminobutane, selon la méthode présentée précédemment, celle-ci réagit avec un dérivé d’acide succinique portant un adamantane, en présence d’agents de couplage peptidique et de base. Le mélange obtenu (cyclodextrine di-fonctionnalisée, cyclodextrines mono fonctionnalisées et produit de départ) est difficile à séparer. Il est seulement possible d’isoler le produit di-fonctionnalisé, et il est nécessaire de faire réagir le reste du mélange avec du Boc_2O afin de pouvoir séparer les différents produits. Cela nous donne accès aux deux régioisomères dont seul l’un sera utilisé dans la suite. Après déprotection du Boc en présence de TFA puis déprotection de la cyclodextrine sous atmosphère de H_2 en présence de palladium sur charbon et d’acide trifluoroacétique, nous obtenons le composé β pontée succ-Ad.

CARACTÉRISATION DE L’ESPÈCE β PONTÉE SUCC-AD Afin de vérifier que notre molécule pontée était capable de former des assemblages supramoléculaires, nous avons conduit des expériences de ROESY et de DOSY.

TROESY La TROESY de la molécule déprotégée montre des contacts entre les différents protons de l’adamantane et ceux de la cavité (Figure 129). On peut en particulier identifier deux corrélations entre H_c de l’adamantane et H_5 de la cavité. La corrélation est d’intensité assez faible, ce qui peut laisser supposer une inclusion peu profonde dans la cavité. Les autres corrélations sont difficiles à identifier, mais la présence du pont empêchant l’auto-inclusion permet de confirmer qu’un dimère supramoléculaire au minimum existe en solution.

DOSY La DOSY de la molécule déprotégée montre une diminution du coefficient de diffusion lorsque la concentration augmente (Figure 130). On atteint une valeur de $D = 1,17 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à une concentration de 10 mM, ce qui représente environ 8 unités polymérisées en utilisant les formules du chapitre précédent.

Ces deux expériences montrent que la molécule synthétisée est capable de former un polymère supramoléculaire en solution. La comparaison de son comportement

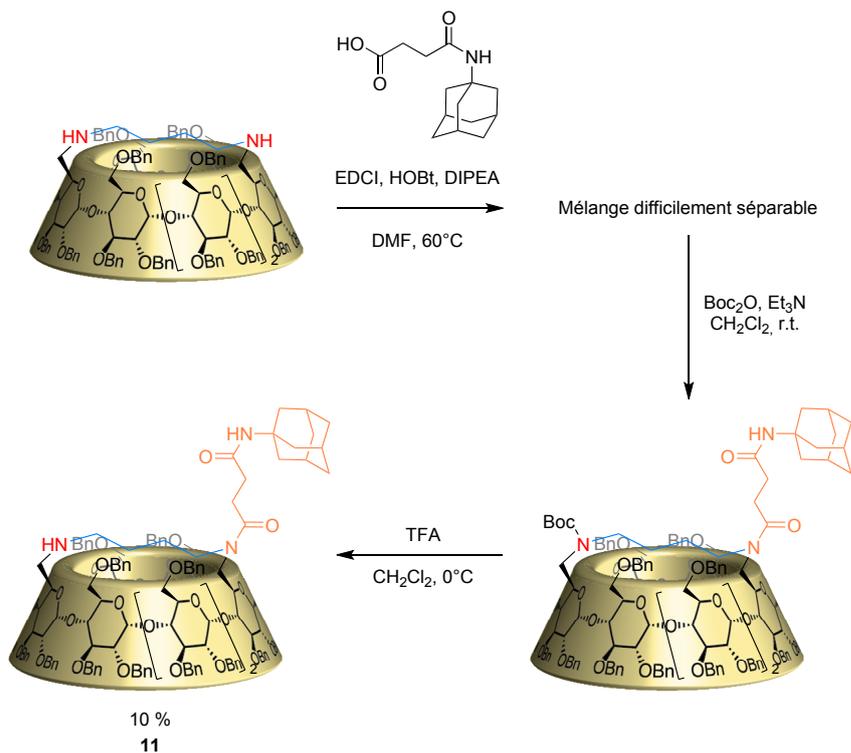


FIGURE 128 – Schéma de synthèse de l'analogue ponté de la cyclodextrine pouvant s'auto-inclure

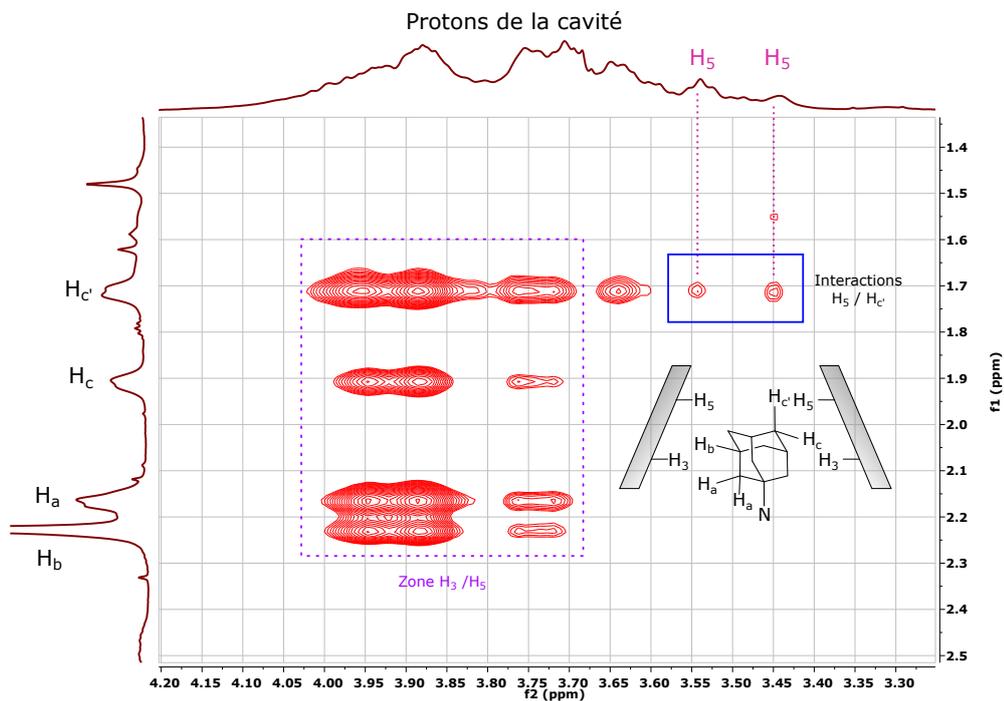


FIGURE 129 – ROE entre protons de l'adamantane et de la cavité de la cyclodextrine β pontée succ-Ad à 8 mM(D₂O, 600 MHz, 300 K)

avec celui de la molécule présentant l'auto-inclusion peut donc permettre de déterminer le rôle de l'interaction hôte-invité dans la compaction.

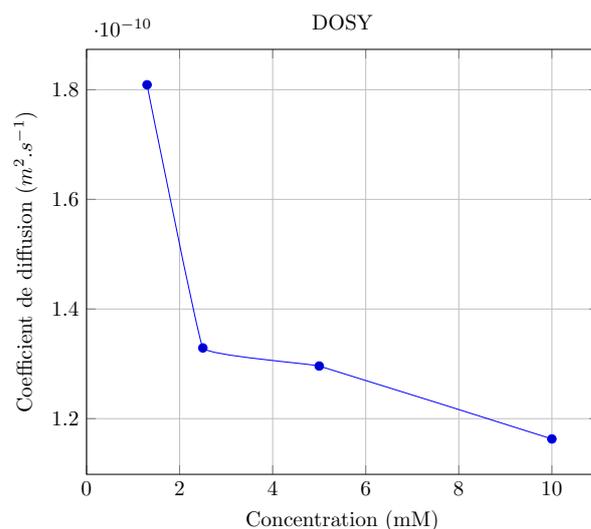


FIGURE 130 – Coefficient de diffusion en fonction de la concentration en cyclodextrine β pontée succ-Ad

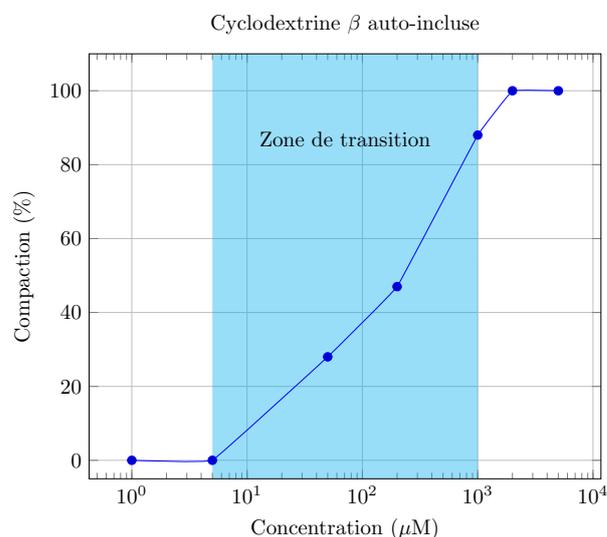


FIGURE 131 – Courbe de compaction de la cyclodextrine β succ-Ad

COMPORTEMENT EN COMPACTION Contrairement aux autres molécules testées, la molécule β succ-Ad possède une large gamme de coexistence entre des globules et des chaînes (Figure 131). La transition d'un état non compact à compact s'étale sur deux ordres de grandeur en concentration et la C_{50} se situe autour de 100 μM . Ce comportement particulier nous laisse penser que le mode de compaction n'est pas analogue à celle d'une cyclodextrine mono- NH_2 .

Sans ADN, à toutes les concentrations, la forme auto-incluse devrait être favorisée entropiquement car elle procure la même stabilisation à la fonction hydrophobe que lors de la formation de polymère supraoléculaire, sans nécessiter la mobilisation de plusieurs molécules. Toutefois, en présence d'ADN, certaines molécules pourraient être pré-organisées par l'interaction de leur amine avec les phosphates présents sur la chaîne. Cette stabilisation des cyclodextrines sur l'ADN pourrait augmenter localement (à la surface de l'ADN) leur concentration et favoriser leur association, le coût

entropique étant en partie compensé par la stabilisation électrostatique des amines par les phosphates (Figure 132). La large gamme de concentration pour la transition entre états chaîne et globule correspondrait alors à la compétition entre l'auto-inclusion (ne permettant pas la compaction) et l'interaction inter-cyclodextrines.

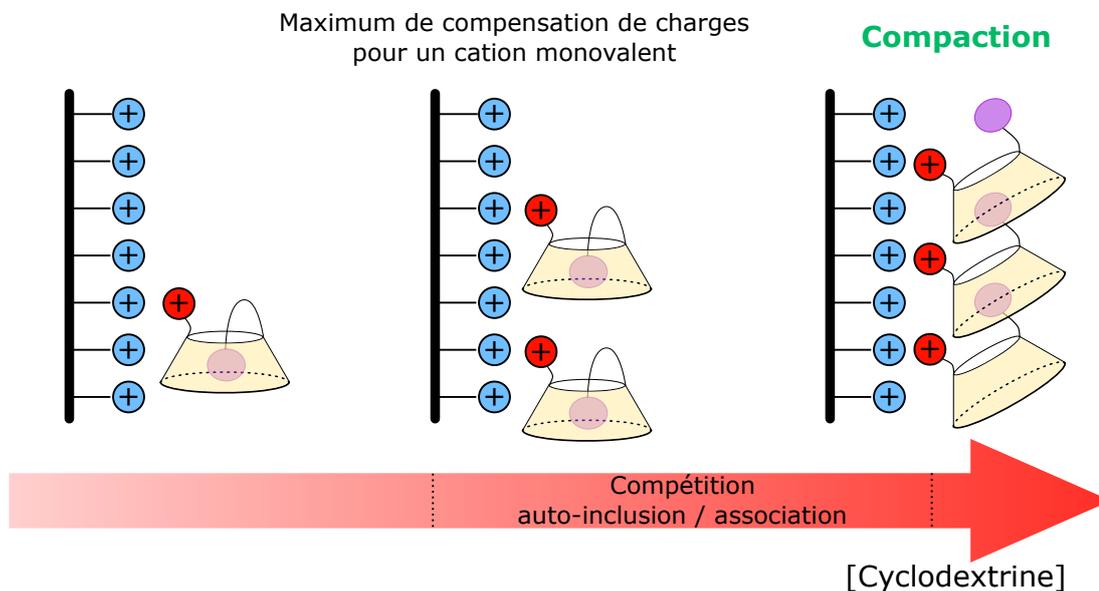


FIGURE 132 – Hypothèse du mécanisme de compaction par les cyclodextrines β succ-Ad

Si cette hypothèse est valide, la molécule β pontée succ-Ad devrait avoir un comportement différent, et une transition classique sur une gamme de concentrations réduite.

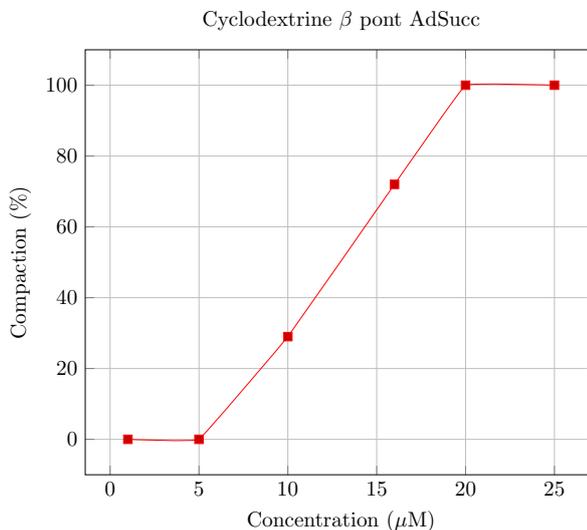


FIGURE 133 – Courbe de compaction de la cyclodextrine β pontée succ-Ad

La cyclodextrine pontée n'a pas la gamme de transition importante précédemment observée. En ajoutant un pont, la C_{50} est divisée par 10 environ (Figure 133). La formation d'un assemblage supramoléculaire reposant sur des interactions hôte-invité semble donc ici impliqué dans la compaction de l'ADN.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons voulu voir l'effet de l'ajout d'acétate d'adamantane sur la compaction de l'ADN. Celui-ci joue le rôle de compétiteur, inhibant la formation de polymères supramoléculaires. Diverses mesures sont faites à une concentration constante de 20 μM en cyclodextrine β pontée succ-Ad (100 % de compaction) et en présence d'un nombre d'équivalents variable d'acétate d'adamantane (Figure 134).

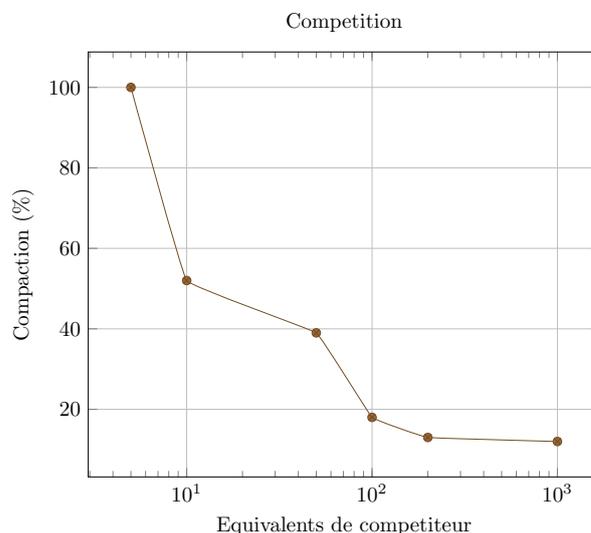


FIGURE 134 – Effet de l'ajout d'acétate d'adamantane sur la compaction de l'ADN par la cyclodextrine β pontée succ-Ad (20 μM)

On observe que l'ajout de compétiteur aboutit à une baisse de l'efficacité de la compaction, ce qui prouve que des interactions hôte-invité sont impliquées. A 1000 équivalents de compétiteur ajoutés, on atteint environ 10 % de compaction. Cette valeur est proche de celle mesurée à 20 μM pour la cyclodextrine β succ-Ad, très majoritairement sous forme auto-incluse, ce qui est cohérent (Figure 135).

3.5 CONCLUSION

Le but de cette partie était d'étudier si le polymère supramoléculaire précédemment formé pouvait interagir avec un ADN. Les expériences menées montrent que des interactions hôte-invité intermoléculaires assistent la compaction de l'ADN par des molécules mono- ou di-chargées. Cet effet est coopératif positif, car aux concentrations utilisées (de l'ordre du μM), les molécules étudiées sont sous forme monomère. La présence d'ADN induit la formation d'assemblages supramoléculaires dont la forme et la taille ne sont malheureusement pas accessibles avec les techniques utilisées. Ces assemblages permettent une compaction d'ADN qui ne devrait pas avoir lieu en théorie, avec des molécules mono- ou di-chargées.

Parallèlement, nous avons découvert que certaines cyclodextrines mono- ou di-chargées pouvaient compacter l'ADN, sans l'aide d'interactions de type hôte-invité. Cette compaction repose sur un autre mécanisme mettant en jeu des reconnaissances entre cyclodextrines, potentiellement par leurs cols secondaires. Nous avons aussi montré que l'espacement entre les charges et leur degré de liberté jouaient un rôle

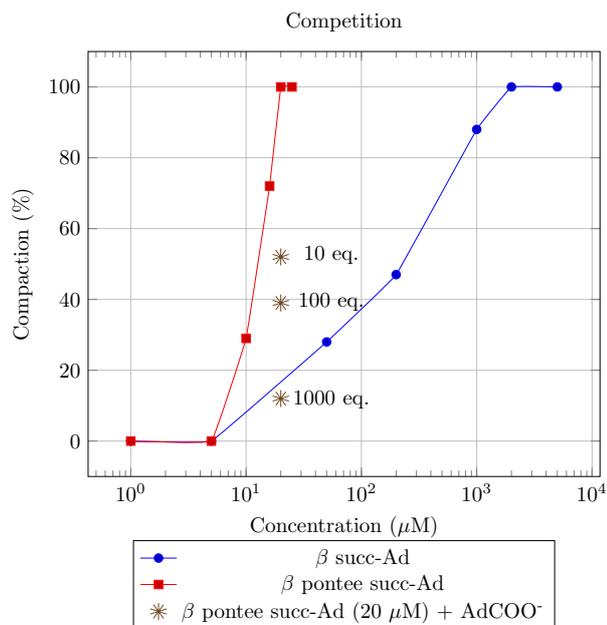


FIGURE 135 – Comparaison des courbes de compaction des espèces β succ-Ad et β pontée succ-Ad, et influence de l'ajout de compétiteur sur la compaction

important dans la compaction, les molécules où les charges sont contraintes compactant mieux l'ADN.

Nous avons donc rempli notre second objectif en formant des complexes où les interactions hôte-invité et amine / phosphate sont à l'origine de la structuration mutuelle de l'ADN et des monomères. La troisième étape est maintenant de voir si ce type d'assemblage peut remplir une fonction analogue à celle d'un virus : le transfert d'ADN à une cellule cible.

TRANSFERT DE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE PAR UN ASSEMBLAGE CYCLODEXTRINES / ADN

Une fois l'ADN compacté, nous avons voulu savoir s'il était possible que le complexe formé permette son internalisation puis son expression par des cellules. L'ensemble de ces étapes porte le nom de transfection. Celle-ci comporte de nombreux intérêts thérapeutiques dans le cadre de thérapies géniques. Contrairement aux virus, le matériel génétique transfecté code généralement pour une unique protéine manquant à la cellule cible. La transfection n'est pas aisée car la durée de vie de molécules d'ADN dans le système circulatoire est courte (environ 10 minutes pour un ADN plasmidique) en raison de la présence d'endonucléases pouvant les cliver.[113] Il est donc nécessaire de les protéger pour leur permettre d'être internalisées par les cellules cibles.

Cette protection se fait au moyen de vecteurs qui sont souvent des molécules (ou assemblages moléculaires) capables de compacter l'ADN. En effet, l'ADN compacté est beaucoup moins sensible à la dégradation par des endonucléases que l'ADN natif sous forme allongée.[114] La compaction augmente sa durée de vie et lui donne la possibilité de rester suffisamment longtemps dans le système circulatoire pour être internalisé par des cellules.

Nous verrons d'abord le mécanisme cellulaire général de la transfection, puis les différents vecteurs synthétiques existant. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus avec certaines des molécules synthétisées dans le cadre de cette thèse.

4.1 TRANSFECTION D'ADN

La transfection permet d'induire la production d'une protéine *via* l'internalisation d'un ADN plasmidique compacté par un vecteur polycationique. Celle-ci se déroule en trois phases pour aboutir à l'arrivée du plasmide dans le noyau, permettant une production pérenne de la protéine encodée (Figure 136).

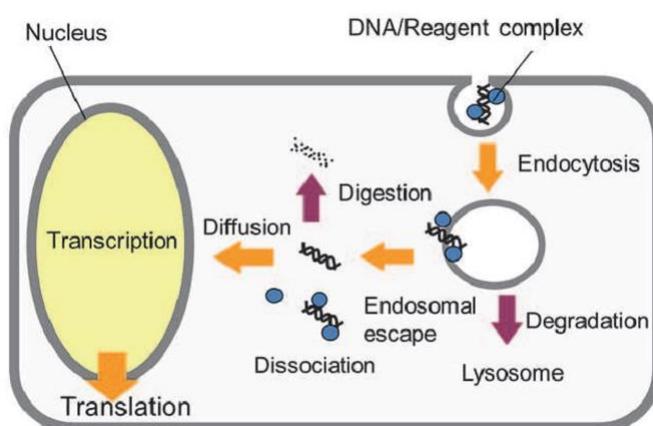


FIGURE 136 – Schéma général de la transfection d'un ADN plasmidique.[115]

La première phase consiste à passer la membrane cellulaire par une des voies endocytotiques possibles. Dans le cas d'une vectorisation sans ligands ciblant des récepteurs à la surface cellulaire, il y a d'abord une interaction de type électrostatique entre la membrane de la cellule et le complexe cationique comprenant l'ADN plasmidique compacté.[116] En effet, la surface cellulaire est globalement chargée négativement en raison de la présence de nombreux protéoglycanes riches en sulfates.

Une fois cette première interaction faite, le complexe peut-être internalisé par la cellule. La vésicule endocytotique en résultant va alors fusionner avec un organelle appelé endosome. Celui-ci a pour particularité d'être plus acide que le cytosol (le pH estimé dans l'endosome est de 5 contre 7,4 pour le cytosol).[117] Si le complexe ne s'échappe pas de l'endosome, il est finalement dégradé par le lysosome. Plusieurs stratégies, reposant sur la modification du caractère chimique des vecteurs utilisés, ont été mises au point afin d'amplifier la sortie endosomale du complexe.[118]

Il est possible de favoriser la formation de pores dans la membrane endosomale, aboutissant à l'éclatement de l'endosome. Cette stratégie repose sur l'utilisation de composés amphiphiles cationiques. Une fois dans l'endosome, les fonctions hydrophobes vont interagir favorablement avec la membrane de celui-ci. Elles peuvent alors stabiliser la formation de pores destabilisant l'endosome jusqu'à son éclatement.

Une autre possibilité est de tirer profit des pompes à protons à l'origine du faible pH au sein de l'endosome. L'internalisation de composés basiques dans l'endosome conduit à une augmentation du pH. Les pompes à protons induisent alors l'internalisation de H^+ et de Cl^- , ainsi que d'eau par osmose. La pression osmotique au sein de l'endosome augmente alors jusqu'à ce que sa membrane rompe, permettant la libération du complexe. Les composés permettant ce phénomène sont appelés éponges à protons (Figure 137).

Enfin, il est possible d'ajouter des photosensibilisateurs se liant spécifiquement à la membrane endosomale dans la formulation contenant le complexe.[120] Une fois irradiés à la longueur d'onde adéquate, ceux-ci vont induire la production d'oxygène singulet 1O_2 . Celui-ci est très réactif et provoque la destruction de la membrane de l'endosome en réagissant sur ses composants.

Le complexe libéré doit ensuite pouvoir transférer le plasmide au noyau cellulaire. Il est probable que cette internalisation par le noyau nécessite la dissociation du complexe, libérant le vecteur dans le cytoplasme. Cependant, les mécanismes permettant le passage du cytosol au noyau pour l'ADN plasmidique sont encore méconnus.

4.1.1 Vecteurs utilisables

Plusieurs vecteurs permettant de protéger l'ADN sont utilisés dans des expériences de transfection. Nous nous concentrerons ici sur les différentes familles de systèmes non-viraux existant, en mettant l'accent sur quelques-uns employant des dérivés de cyclodextrines.

4.1.1.1 Utilisation de polymères covalents polychargés : exemple du PEI

Parmi les molécules capables de compacter l'ADN, des polymères polychargés comme le PEI (Polyéthylèneimine) ont été étudiés de manière extensive dans des expé-

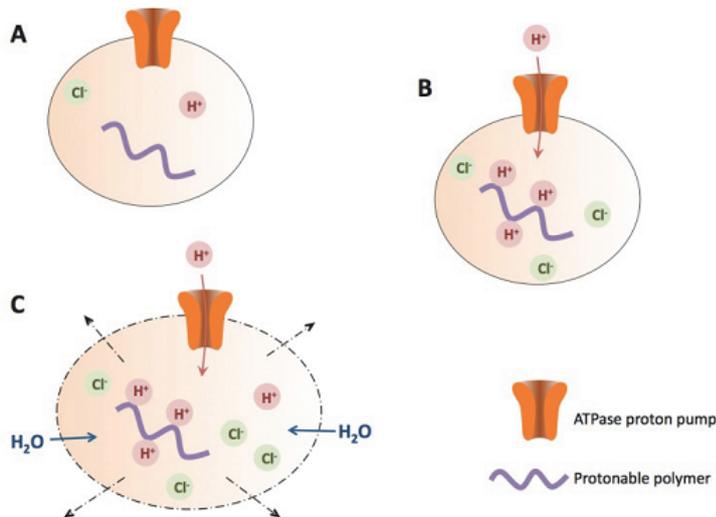


FIGURE 137 – Schéma du fonctionnement d'éponges à protons.[119]

A : Le complexe cationique comprenant des éponges à protons est internalisé par l'endosome

B : Par équilibre acido-basique, le pH augmente au sein de l'endosome. Des pompes à protons rétablissent un pH acide en internalisant des protons et des ions chlorure

C : De l'eau entre aussi dans l'organite par effet osmotique. Cela aboutit à une augmentation de la pression provoquant l'éclatement de l'endosome.

riences de transfection. Celui-ci a donné des résultats encourageants sur des modèles murins et plusieurs formulations pharmaceutiques sont à l'essai.[113]

Un des problèmes avec les dérivés du PEI concerne leur toxicité *in vivo*.[121] En effet, leur charge élevée peut conduire à des interactions avec des protéines du sérum chargées négativement et résulter en une précipitation d'agrégats de grande taille pouvant boucher les vaisseaux sanguins. De plus, la libération du PEI une fois l'ADN internalisé peut aussi provoquer des interactions indésirables avec des protéines du milieu intracellulaire. Enfin, en raison de sa taille importante, le PEI est mal dégradé par la machinerie cellulaire.

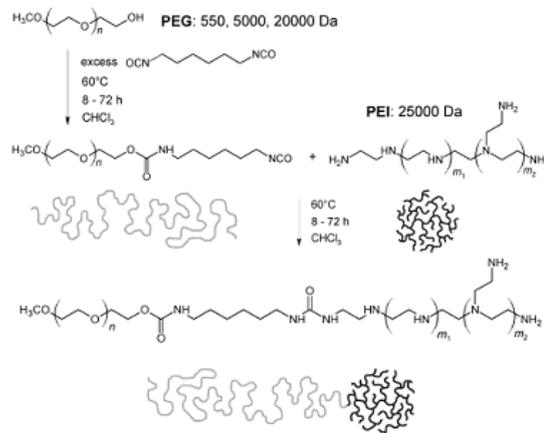


FIGURE 138 – Co-polymérisation d'un PEI avec un PEG en vue de diminuer sa toxicité.[122]

Il est donc nécessaire, lors de la conception d'un agent de transfection, de trouver une molécule ne présentant pas de toxicité aigüe pour l'organisme visé. Il est par exemple possible de copolymériser les PEI avec des PEG (PolyEthyleneGlycol) qui permettent de masquer partiellement leur charge (Figure 138).[122].

4.1.1.2 Utilisation de cyclodextrines fonctionnalisées

Afin de diminuer la toxicité du complexe, il est possible d'utiliser des molécules connues pour être biocompatibles, et de greffer sur celles-ci des charges permettant de compacter l'ADN afin qu'elles deviennent utilisables en transfection.

Parmi les molécules biocompatibles, les cyclodextrines sont facilement métabolisées par l'Homme et présentent une bonne solubilité dans l'eau. De plus, elles sont déjà présentes dans de nombreuses formulations pharmaceutiques, souvent afin de solubiliser certains médicaments par formation d'un complexe d'inclusion. Ce sont donc des molécules de choix qui ont été utilisées dans plusieurs formulations ayant pour but la transfection. Celles-ci peuvent combiner cyclodextrines et polymères cationiques, ou ne reposer que sur des cyclodextrines.

Les travaux de Davis ont permis de montrer que des polymères de cyclodextrine polychargés (Figure 139) permettaient de transférer de l'ADN plasmidique avec une efficacité comparable à celle des PEI ou de la lipofectamine®¹, mais avec une toxicité réduite *in vitro*. [123]

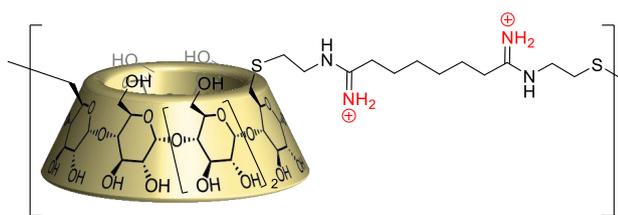


FIGURE 139 – Polymère de cyclodextrine chargé permettant la transfection d'ADN

Malgré les bons résultats préliminaires obtenus avec ce polymère, celui-ci a tendance à s'agréger facilement dans les conditions physiologiques. Cette tendance résulte de la haute densité de charge du complexe ADN/cyclodextrine provoquant son interaction avec des protéines du sérum ou de la cellule. D'autres systèmes plus perfectionnés ont été conçus par le même groupe afin de minimiser cet effet, en mettant à profit la capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion.

Des complexes cyclodextrine/ADN peuvent ainsi être couverts de PEG liés à une molécule invitée afin d'augmenter leur stabilité dans les conditions cellulaires. Cela se fait toutefois au prix d'une diminution de l'efficacité d'internalisation.[124] Il est aussi possible d'ajouter des molécules de ciblage à la surface des complexes par ce moyen, afin de changer le mode d'internalisation du complexe dans la cellule.[125]

Une autre possibilité consiste à utiliser des dendrimères cationiques comprenant des cyclodextrines. Celles-ci peuvent être greffées à la périphérie d'un dendrimère existant, ou constituer son centre en fonctionnalisant les cols de la cyclodextrine par des poly-amines branchées.

1. La lipofectamine® est un composé de référence en transfection, qui permet de former des liposomes cationiques au sein desquels sont compactées des molécules d'ADN

La première stratégie a été exploitée par les groupe de Uekama et d'Ortiz-Mellet afin de diminuer la toxicité de dendrimères montrant des résultats prometteurs en transfection.[126] L'utilisation de cyclodextrines α mono tosylées en position 6 permet leur incorporation à la périphérie d'un dendrimère de type PAMAM (Polyamidoamine) (Figure 140). La capacité à transférer un ADN est environ cent fois supérieure pour ces molécules que pour le PAMAM seul. Un des désavantages de ces systèmes est qu'une fois l'ADN libéré, une molécule de haut poids moléculaire et densité de charge est relarguée dans la cellule, ce qui peut entraîner des réactions non voulues avec ses composants.

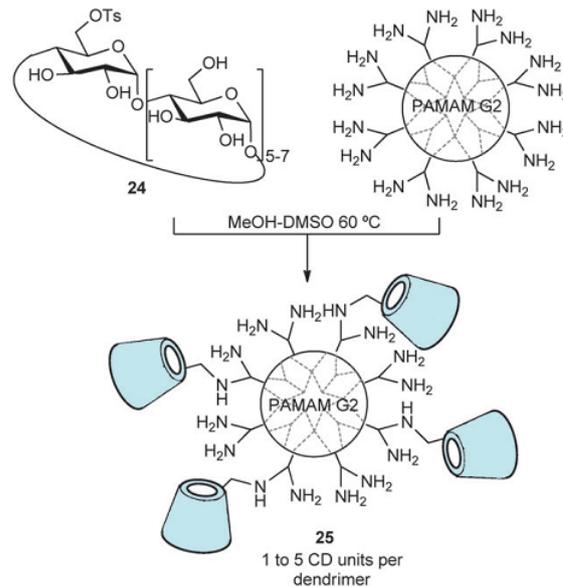


FIGURE 140 – Système conjuguant les propriétés du dendrimère PAMAM et la faible toxicité des cyclodextrines.[127]

L'utilisation d'assemblages supramoléculaires reposant sur des cyclodextrines permet de contourner ce problème. Les grandes familles composant ces systèmes ont été présentées dans le chapitre précédent, concernant la compaction d'ADN. Nous nous intéresserons donc ici à quelques exemples choisis, où la fonctionnalisation apporte des propriétés de transfection intéressantes.

Ainsi, l'équipe de Yui a pu synthétiser un polyrotaxane de cyclodextrines cationiques où le désenfilage est favorisé dans le milieu cellulaire.[128] Celui-ci repose sur l'utilisation de bouchons liés à l'axe du polyrotaxane par des ponts disulfure. Le milieu intracellulaire étant plus réducteur que le milieu extracellulaire, ces liaisons sont clivées lorsque le complexe est internalisé. Cela facilite la libération de cyclodextrines monomères peu chargées (une charge par unité) qui sont en théorie facilement métabolisées (Figure 141). Les tests *in vitro* montrent que la présence de ces bouchons clivables augmente de manière significative la transfection par rapport à des polyrotaxanes figés.

Il est possible d'aller plus loin en concevant des systèmes où des cyclodextrines monomères s'associent à l'ADN sans la contrainte d'un axe. L'équipe de Garcia Fernández a ainsi étudié l'influence de plusieurs paramètres structuraux sur la capacité de transfection de cyclodextrines amphiphiles polycationiques.[129] Elle montre que la

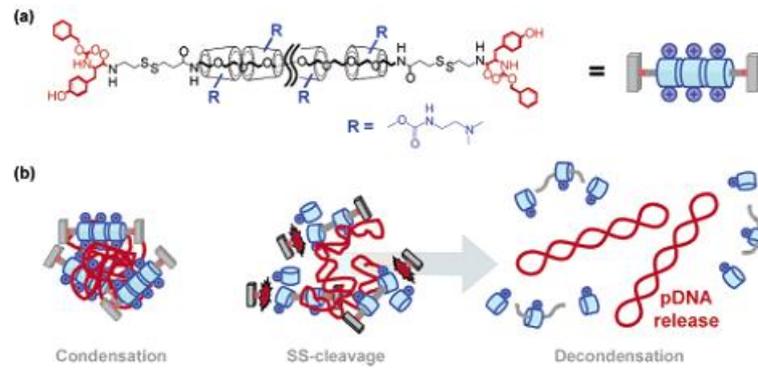


FIGURE 141 – (a) Polyrotaxane utilisé en transfection comprenant deux bouchons clivables (b) : Ce polyrotaxane peut compacter l'ADN pour former un complexe cationique. Le clivage des bouchons en milieu intracellulaire facilite la libération du matériel génétique et son internalisation par le noyau.[128]

présence de thiourées à proximité des sites protonés permet d'améliorer la capacité à compacter l'ADN (Figure 142). L'effet constaté repose, selon les auteurs, sur une double interaction avec les phosphates de l'ADN : électrostatique par les amines protonées et de type liaison hydrogène avec les thiourées. La structure observée en microscopie électronique à transmission serait due à un arrangement en "sandwich" du complexe, alternant des couches d'ADN et de dimères de cyclodextrines associées par leurs cols secondaires hydrophobes.

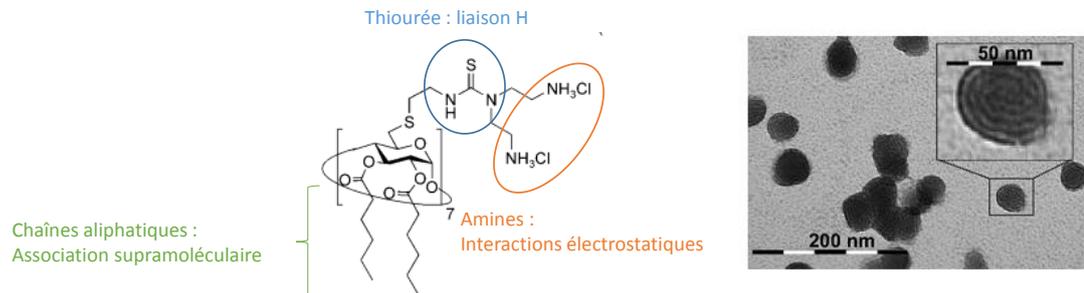


FIGURE 142 – Cyclodextrine utilisée en transfection interagissant avec les phosphates de l'ADN par liaisons hydrogène et interactions électrostatiques (gauche) et structure de l'ADN compacté par cette molécule vue en microscopie électronique à transmission (droite)

Les cyclodextrines sont donc des molécules de choix, qui ont déjà été utilisées avec succès, sous diverses formes, dans la transfection de matériel génétique. Les interactions liant les cyclodextrines peuvent être de type covalent ou supramoléculaire. Dans tous les cas, les motifs utilisés sont en général hautement chargés. Comme évoqué précédemment, cette charge importante peut constituer un frein à la transfection en induisant des interactions défavorables avec d'autres molécules que l'ADN *in vivo*.

Notre système reposant sur des monomères faiblement chargés capables de compacter l'ADN pourrait donc être une alternative en transfection permettant de faibles niveaux de toxicité.

nous avons utilisé la microscopie de fluorescence afin d'observer la compaction du plasmide.

Nous avons donc étudié le comportement de trois molécules aux propriétés différentes : la cyclodextrine β di-NH₂, la cyclodextrine β pontée di-NH, ainsi que la cyclodextrine β pontée Ad. En raison de la taille réduite du plasmide (6,8 kbp contre 166 kbp pour l'ADN de phage T₄), il est difficile de distinguer les espèces compactées des autres à partir de leur taille apparente au microscope. L'estimation de la compaction en direct est donc difficile. Nous avons donc opté pour la capture de vidéos pour chaque expérience, puis leur exploitation via le logiciel ImageJ. La compaction provoquait précédemment une diminution de la taille des particules ainsi qu'une augmentation de la densité de fluorescence. Pour chaque molécule et chaque concentration, ces deux grandeurs ont donc été mesurées. Il est important de mentionner que les tailles indiquées sont des tailles apparentes, qui ne reflètent pas la taille réelle des molécules en solution. Nous nous attacherons donc à commenter la tendance de l'évolution des tailles, plutôt que la valeur absolue de celles-ci. Comme précédemment, chaque point correspond à la mesure d'au moins 100 particules en solution.

4.2.2.1 Cyclodextrine β di-NH₂

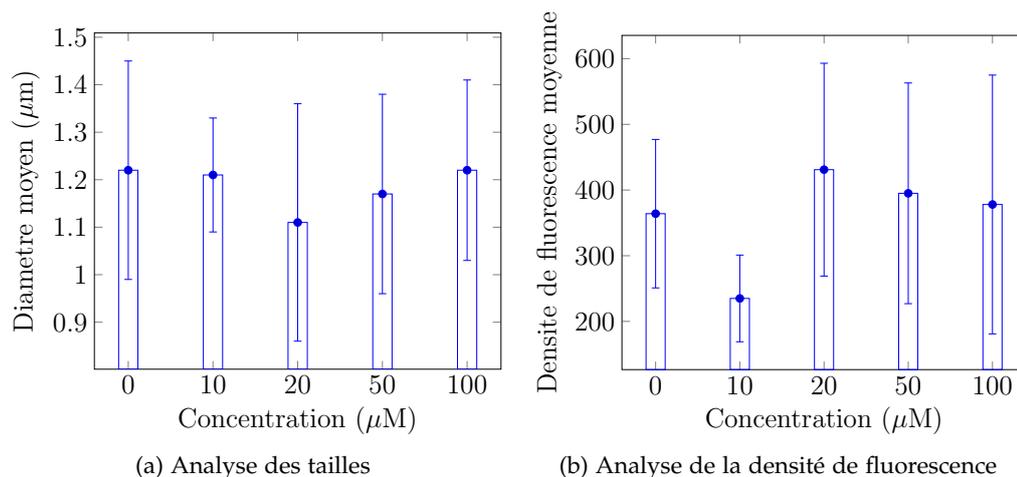
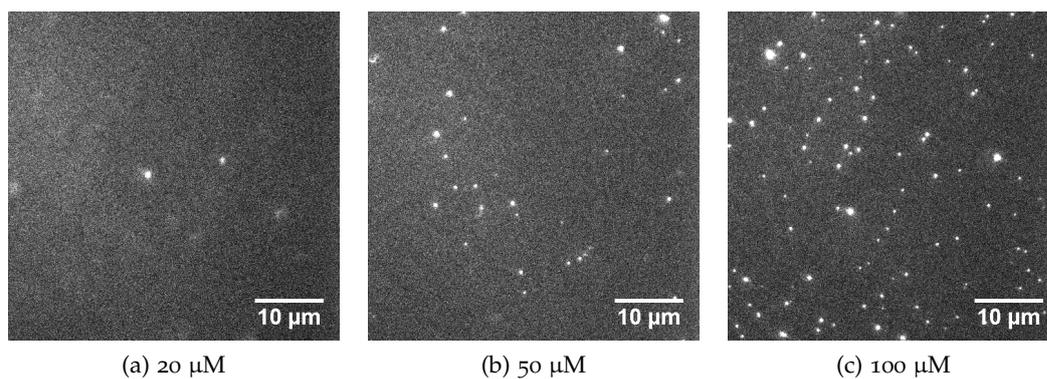
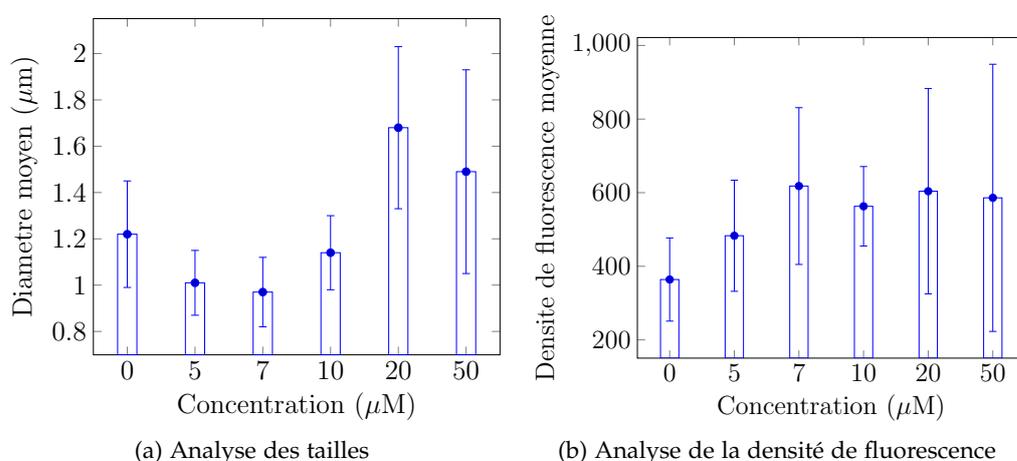


FIGURE 145 – Morphologie de plasmides en présence de cyclodextrine β di-NH₂

En présence de cyclodextrine β di-NH₂, la taille moyenne des particules en solution reste constante, et la densité de fluorescence varie peu (Figure 145). Cependant, en analysant la surface de la lame de verre, on constate qu'un nombre croissant de plasmides reste fixé lorsque la concentration en cyclodextrine dans le milieu augmente (Figure 146). La fixation repose sur l'interaction entre des complexes cyclodextrines/ADN chargés positivement et des silanols ionisés de la surface de verre chargés négativement. Ainsi, bien que la structure fine du complexe plasmide/cyclodextrines ne soit pas établie, on peut dire qu'au moins une partie des plasmides présents dans le milieu est neutralisée, et donc liée à des cyclodextrines cationiques.

FIGURE 146 – Surface de la lame en présence de cyclodextrine β di-NH₂FIGURE 147 – Morphologie de plasmides en présence de cyclodextrine β pontée di-NH

4.2.2.2 Cyclodextrine β pontée diamine

Pour la cyclodextrine β pontée di-NH, on observe d'abord une diminution de la taille des particules jusqu'à 7 μM , puis une augmentation de celle-ci. En parallèle, la fluorescence augmente avec la concentration. Le fait le plus remarquable est l'augmentation notable de l'écart type en taille et densité de fluorescence lors de l'augmentation de la concentration en cyclodextrine (Figure 147). Cette augmentation résulte de la présence de diverses populations de particules dans l'échantillon lorsque la concentration en cyclodextrine est élevée. En effet, dans ces conditions, il est possible d'observer des particules de petite taille ($d < 1\mu\text{m}$) et d'autres de diamètre 2 à 3 fois supérieur (Figure 148). Cela pourrait résulter de l'agrégation de plusieurs plasmides *via* leurs interactions avec les cyclodextrines du milieu. Ces particules de taille supérieure sont aussi visibles sur la surface de la lame et sont donc bien chargées positivement.

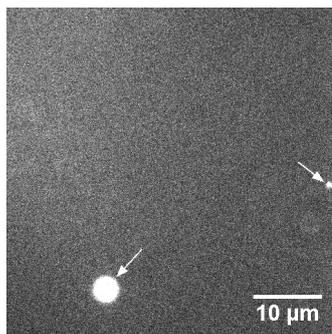
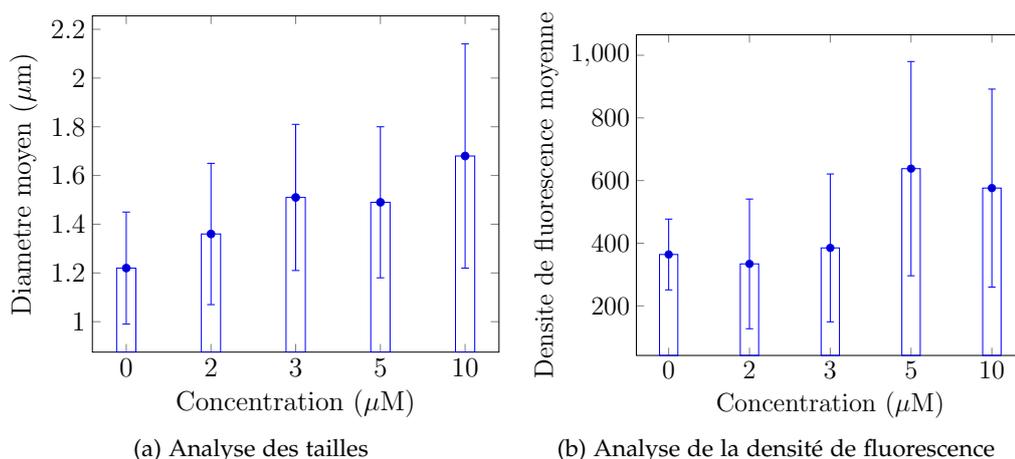


FIGURE 148 – Populations de particules présentes en solution

FIGURE 149 – Morphologie de plasmides en présence de cyclodextrine β di-NH pontée Ad

4.2.2.3 Cyclodextrine β pontée diamine adamantane

Un comportement similaire est observé pour les cyclodextrines β pontées Ad (Figure 149). Cependant, la concentration à laquelle les deux populations sont présentes est plus faible. Cela pourrait provenir de leur association plus forte avec l'ADN.

Des expériences d'AFM ont été conduites sur ce composé, afin de confirmer la formation d'un complexe cyclodextrine / plasmide de manière qualitative. Pour ce faire, une lame de mica est traitée avec de la spermine, afin de rendre sa surface cationique. Une solution contenant le plasmide seul, ou mélangé avec de la cyclodextrine β pontée Ad (20 μM) est mise en contact avec la surface qu'on peut ensuite observer.

En l'absence de cyclodextrine, on voit sur la surface un grand nombre de plasmides, sans organisation particulière. Par contre, lorsque de la cyclodextrine est préalablement mélangée au plasmide, aucun signal n'est détecté par AFM (Figure 150). Cela confirme l'association des cyclodextrines avec les plasmides, et la formation d'un complexe cationique, qui ne peut s'associer avec la surface chargée positivement. En utilisant une surface non traitée, chargée négativement, des espèces de petite taille ($d < 100$ nm) sont visibles (Figure 151). Leur aspect n'est cependant pas analogue à celui généralement observé pour des plasmides compactés où la taille est plus grande. Il est donc difficile d'attribuer ces formes à de l'ADN compacté.

Nous avons montré qu'il était possible de former des complexes entre cyclodextrines fonctionnalisées et plasmides, à concentration réduite. Ces complexes sont

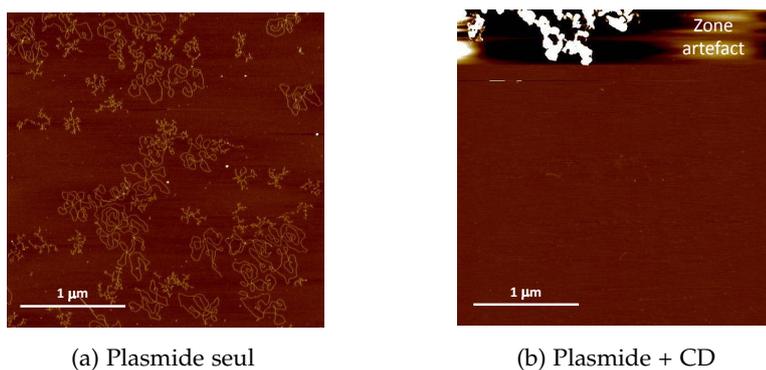


FIGURE 150 – Topologie de la surface traitée par la spermine par AFM

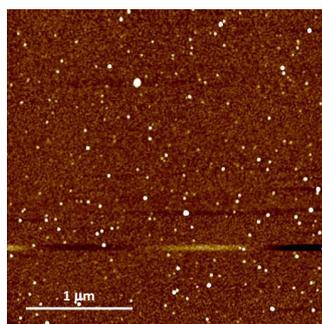


FIGURE 151 – Topologie de la surface non traitée par AFM

globalement cationiques mais de densité de charge faible. Les trois molécules précédentes ont ensuite été testées dans des expériences de transfection *in vitro*.

4.2.3 Transfection

Afin de tester l'efficacité de nos composés en transfection de plasmides, nous avons utilisé un kit CPRG β galactosidase. Les expériences ont été réalisées conjointement par P. Evenou et A. Gothland dans le cadre d'une collaboration entre notre équipe et l'IPLESP (Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique). Des cellules humaines de la lignée HeLa sont d'abord cultivées dans des plaques 96 puits puis mises en présence de mélanges plasmide / cyclodextrines à différentes concentrations. Des blancs sont aussi faits pour chaque puits, avec cellules et plasmide sans agent de transfection ou cellules seules. Des puits sont aussi préparés avec de la lipofectamine® afin d'avoir un contrôle positif. Parallèlement, une plaque 96 puits est faite dans les mêmes conditions mais sert à mesurer la toxicité des composés. Après 48 h d'incubation à 37 °C, les cellules sont lysées. Des mesures d'absorbance en présence de CPRG sont faites afin d'évaluer la quantité de β -galactosidase produite et donc l'efficacité de la transfection. Des mesures de l'ATP présent dans le milieu sont faites afin d'estimer la viabilité cellulaire et donc la toxicité des composés.

Aucune des cyclodextrines testées en transfection n'a donné de résultat positif (Figure 152). Cela n'est pas dû à la toxicité des cyclodextrines car celles-ci restent inertes pour la cellule jusqu'à des concentrations de l'ordre du mM (Figure 153).

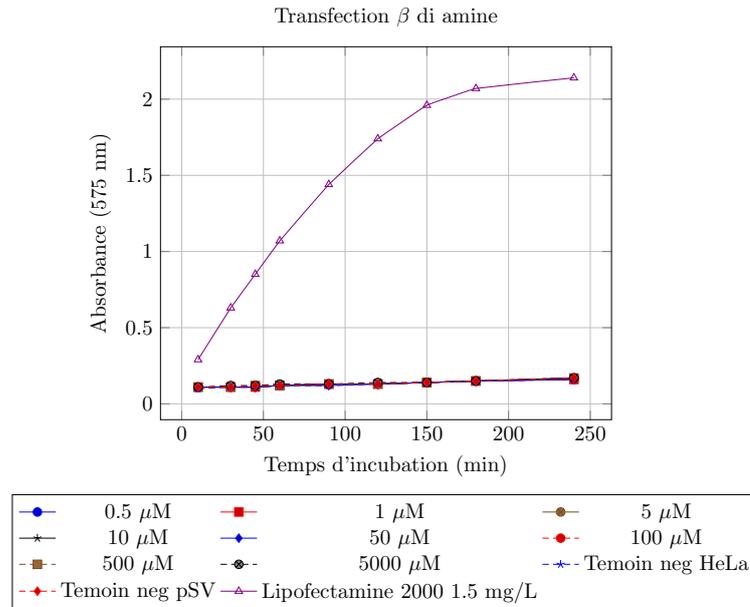


FIGURE 152 – Efficacité de la transfection *in vitro* par la cyclodextrine β di-NH₂. Les courbes des cyclodextrines β pontée di-NH et pontée Ad sont identiques (pas de transfection).

Malgré la formation d'un complexe cyclodextrine / plasmide, celui-ci ne permet pas l'internalisation puis la libération et l'incorporation du matériel génétique dans les cellules testées. Il est difficile d'émettre des hypothèses sur la raison précise de cette inactivité, les mécanismes et facteurs affectant la transfection étant encore largement méconnus. Toutefois, le manque de charge, bien qu'il soit un avantage pour la toxicité, pourrait ici être un inconvénient aboutissant à la non-internalisation de nos complexes ADN / cyclodextrines.

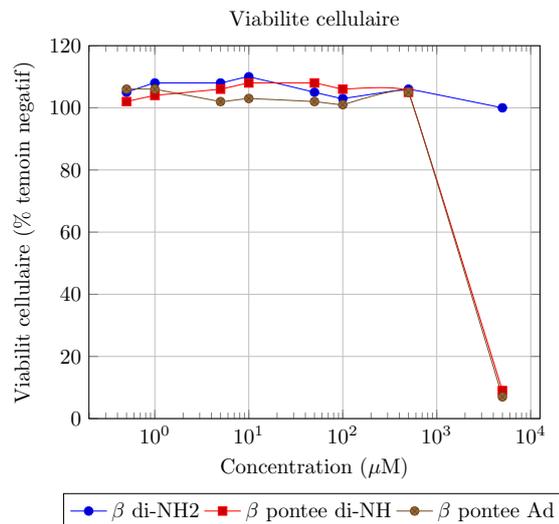


FIGURE 153 – Viabilité des cyclodextrines testées en transfection

4.3 CONCLUSION

Notre but initial était d'utiliser les molécules précédemment étudiées pour transférer de l'ADN dans des cellules cibles. Le plasmide choisi, portant le gène de la β -galactosidase, interagit avec les cyclodextrines pour former des complexes cationiques. Ceux-ci ont été caractérisés par microscopie de fluorescence. A haute concentration en cyclodextrine, des formes agrégées sont visibles, résultant potentiellement de l'association de plusieurs plasmides au sein d'un complexe. Les complexes formés sont cependant inefficaces dans la transfection du plasmide, mais ne montrent pas de signe de toxicité. On peut supposer que le manque de charge ne leur permet pas une internalisation efficace, ce qui inhibe la transfection.

Troisième partie

CONCLUSION

RÉSULTATS OBTENUS ET PERSPECTIVES

5.1 RÉSULTATS

Cette thèse visait à synthétiser des structures supramoléculaires et à étudier leurs interactions avec l'ADN.

Nous avons, dans un premier temps, réussi à synthétiser des polymères supramoléculaires de cyclodextrines reposant sur l'interaction entre un adamantane et une cyclodextrine β . L'utilisation d'un monomère AB ponté nous a permis d'éviter la formation de l'espèce auto-incluse, tout en augmentant la solubilité de nos espèces. Les espèces synthétisées ont été caractérisées par différentes techniques (ROE, ITC, DOSY, SANS), confirmant la formation d'espèces cylindriques polymères de degré de polymérisation autour de 20. Nous avons aussi montré qu'une position centrale de l'adamantane favorisait l'association entre monomères.

Nous avons ensuite utilisé ces molécules dans la compaction de l'ADN et mis à jour un comportement particulier des cyclodextrines di chargées sur le col primaire, leur permettant de compacter l'ADN sans la présence d'interactions hôte-invité. Parallèlement, nous avons montré que l'interaction hôte-invité permettait une compaction de l'ADN plus efficace, et coopérative.

Enfin, des complexes entre nos molécules et de l'ADN plasmidique ont été testés dans la transfection de cellules humaines. Malgré leur capacité à interagir avec les plasmides, nos molécules ne permettent pas une transfection efficace du matériel génétique ici.

5.2 PERSPECTIVES

Le système obtenu ne permet pas une transfection efficace d'ADN. L'ajout de charges améliore en général l'efficacité en transfection, et pourrait être un moyen de rendre notre système efficace. Toutefois, il faudrait veiller à ce que ces charges ne perturbent pas les interactions hôte-invité qui sont à l'origine de son originalité.

Il est aussi possible de s'inspirer d'autres structures comme le collagène, mentionné en introduction, qui se compose de fibres entrelacées. L'association de plusieurs polymères supramoléculaires linéaires pourrait permettre d'approcher cette structure. L'amine libre restante sur les structures pontées par une diamine nous permet de fonctionnaliser la cyclodextrine formant un polymère supramoléculaire facilement. Plusieurs interactions pourraient alors être utilisables pour lier les chaînes entre elles.

INCORPORATION D'UNE FONCTION HYDROPHOBE SUPPLÉMENTAIRE En poursuivant notre projet biomimétique, il est possible de s'inspirer de structures dites "glissières à leucine", présentes *in vivo*. Ces structures protéiques contrôlent l'accès à certaines séquences d'ADN. Une partie de celles-ci est riche en acides aminés chargés positivement pouvant interagir avec l'ADN. Une autre est riche en résidus leu-

cine, pouvant interagir entre eux de manière favorable (par effet hydrophobe) afin de fermer la glissière.

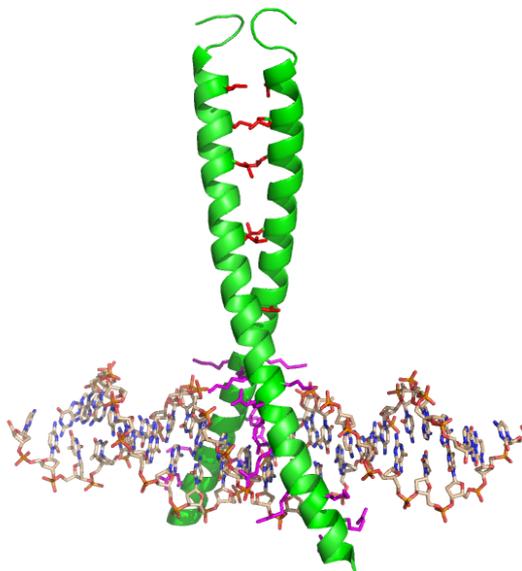


FIGURE 154 – Exemple de glissière à leucines (complexe bZIP-CREB). Les leucines et arginines/lysines sont mises en évidence.[130]

Ainsi, en introduisant un motif leucine sur l'amine libre, il serait envisageable d'obtenir une interaction entre plusieurs polymères supramoléculaires. Le risque serait que la chaîne latérale de la leucine agisse comme compétiteur de l'adamantane pour la cavité de la cyclodextrine et diminue le D_p du polymère.

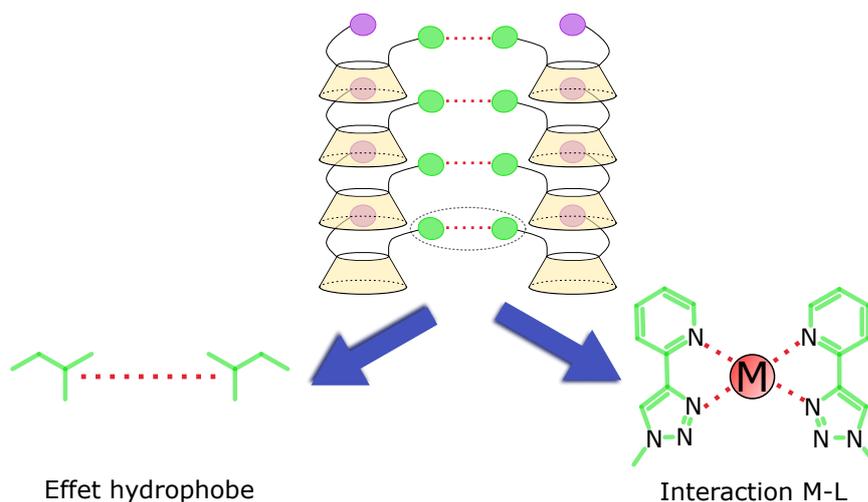


FIGURE 155 – Interactions secondaires envisagées

COMPLEXATION D'UN METAL Nous avons aussi vu, avec le VMT, que la complexation de cations pouvait être un facteur structurant dans le vivant. Il est envisageable de faire de même avec des métaux ayant des géométries de coordination

définies. En incorporant sur la cyclodextrine des groupements capables de coordonner ces métaux, ceux-ci pourraient servir d'intermédiaires dans la structuration d'un nouvel assemblage. L'introduction de ligand bidenté sur la cyclodextrine pourrait permettre l'association de chaînes linéaires en utilisant des métaux tétra ou hexavalents. En particulier, les structures de type bipyridine et trizole-pyridine semblent adéquates (Figure 155).

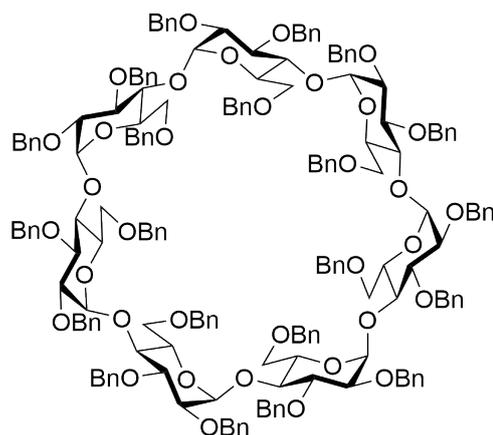
Quatrième partie

EXPERIMENTAL PART

EXPERIMENTAL PART

6.1 SYNTHESIS

GENERAL INFORMATION Dichloromethane was freshly distilled from P_2O_5 , THF from sodium/benzophenone. DMF was dried over molecular sieves. Reactants were purchased from commercial sources and used without further purification. HRMS were recorded on a Bruker micrOTOF spectrometer, using Agilent ESI-L Low Concentration Tuning-Mix as reference. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II 600 MHz or Bruker AM-400 MHz using residual solvent signal as internal reference. Assignments were aided by COSY, HSQC, NOESY, ROESY, TOCSY, J-Res and HMBC experiments.



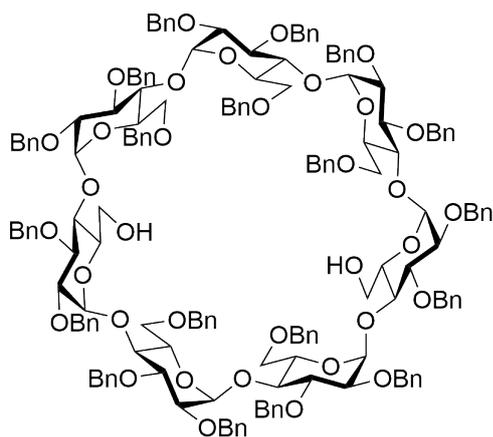
Molecular Weight: 3027,61

1

Protocol: *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, pp 2960-2971

β -cyclodextrin (4.26 g, 3.75 mmol) was lyophilised overnight before use. NaH (6.3 g, 158 mmol, 42 eq.) was added portionwise to a stirred mixture of β -cyclodextrin in DMSO (80 mL) at r.t. under argon. Benzyl chloride (18.2 mL, 158 mmol, 42 eq.) was added dropwise over 2 h and the reaction mixture was stirred overnight. MeOH (20 mL) was carefully added, and the mixture was diluted with water (200 mL) and extracted with Et₂O (3 x 150 mL). The combined organics were washed with brine (200 mL), dried with MgSO₄, and concentrated. The obtained residue was purified by silica gel chromatography (2 % EtOAc in cyclohexane then 25 % EtOAc in cyclohexane) to give molecule **1** (10.2 g, 90 % yield) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K) : δ = 7.25 - 7.05 (m, 105 H, H_{arom}), 5.16 (d, ³J=3.5 Hz, 7 H, H1), 5.04 (d, ²J=11 Hz, 7 H, CHPh), 4.74 (d, ²J=11 Hz, 7 H, CHPh), 4.47, 4.44 (ABq, ²J_{AB}=12 Hz, 14 H, CHPh), 4.37, 4.33 (ABq, ²J_{AB}=12 Hz, 14 H, CHPh), 4.05 - 3.90 (m, 28 H, H3, H4, H5, H6), 3.53 (d, ²J=10.4 Hz, 7 H, H6), 3.45 (dd, ³J_{1,2}=3.5 Hz, ³J_{2,3}=9,3 Hz, 7 H, H2).



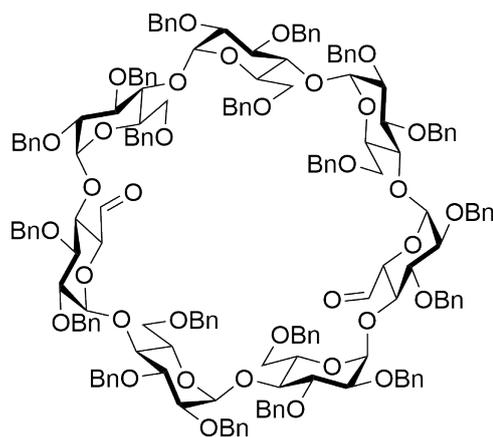
Molecular Weight: 2847,36

2

Protocol: *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, pp 2960-2971

To a stirred solution of **1** (3 g, 1 mmol) in toluene (6.6 mL) was added DIBAL-H (25 wt. % in toluene, 13.2 mL, 19.4 mmol, 19.4 eq.) dropwise. The mixture was heated to 60 °C and put under a nitrogen flux. The reaction was monitored by TLC (25 % EtOAc in cyclohexane). After completion, the reaction mixture was poured in an ice / water bath (100 mL). EtOAc (200 mL) and 1M HCl solution (100 mL) were then added. The mixture was stirred for 3 hours and then extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined organics were washed with brine (100 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated. The obtained residue was purified by silica gel chromatography (25 % EtOAc in cyclohexane) to give diol **2** (2.88 g, 80 % yield) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K): δ = 7.34 - 6.91 (m, 95 H, H_{arom}), 5.51 (d, ³J=3.8 Hz, 1 H, H1), 5.47 (d, ³J=3.9 Hz, 1 H, H1), 5.25 - 5.09 (m, 4 H, CHPh), 5.02 - 4.90 (m, 5 H, 4 x H1, CHPh), 4.83 (d, ³J=3.3 Hz, 1 H, H1), 4.81 - 4.32 (m, 33 H, CHPh), 4.10 - 3.50 (m, 37 H, 2 x H2, H3, H4, H5, H6), 3.47 - 3.34 (m, 5 H, H2), 2.67 - 2.52 (m, 2 H, OH).



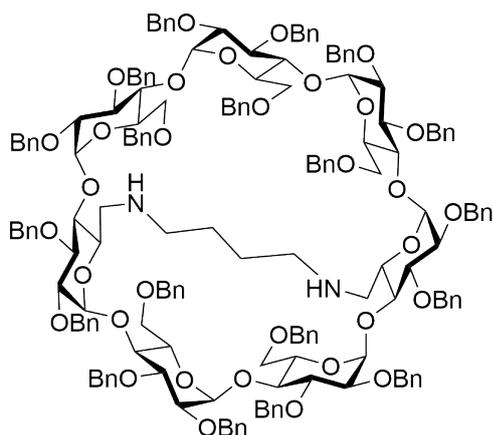
Molecular Weight: 2843,33

3

Protocol : *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 24, pp 2880-2885

A solution of oxalyl chloride (2.9 mL, 33.4 mmol, 10 eq.) in dichloromethane (40 mL) was stirred at -78 °C under argon. A solution of DMSO (4.7 mL, 66.8 mmol, 20 eq.) in dichloromethane was added dropwise over 20 minutes. The mixture was stirred for 1 hour. A solution of diol **2** (9.5 g, 3.34 mmol) in dichloromethane (100 mL) was added over 20 minutes. The mixture was stirred for 2 hours and triethylamine (9.3 mL, 66.8 mmol, 20 eq.) was added. Cooling was turned off and the mixture was stirred overnight. Water (150 mL) was added and the mixture was extracted with Et₂O (3 x 150 mL). The combined organics were dried with MgSO₄, filtered and concentrated. The obtained residue was purified by silica gel chromatography (25 % EtOAc in cyclohexane) to give dialdehyde **3** (7.6 g, 80 % yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K) : δ = 9.60 - 9.45 (m, CHO, 60 %), 7.33 - 7.01 (m, 95 H, H_{arom}), 5.25 - 4.23 (m, 45 H, H1, CHPh), 4.13 - 3.71 (m, 26 H, H3, H4, H5, 5 x H6), 3.69 - 3.35 (m, 12 H, H2, 5 x H6).



Molecular Weight: 2899,49

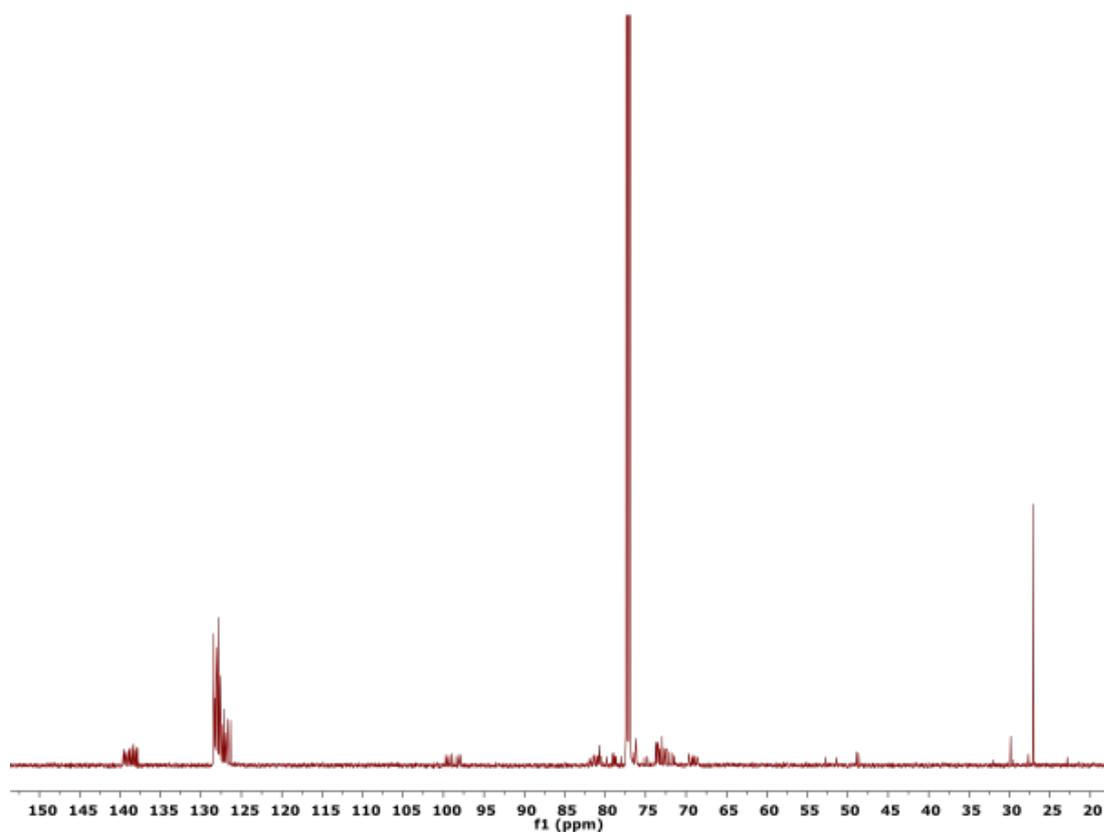
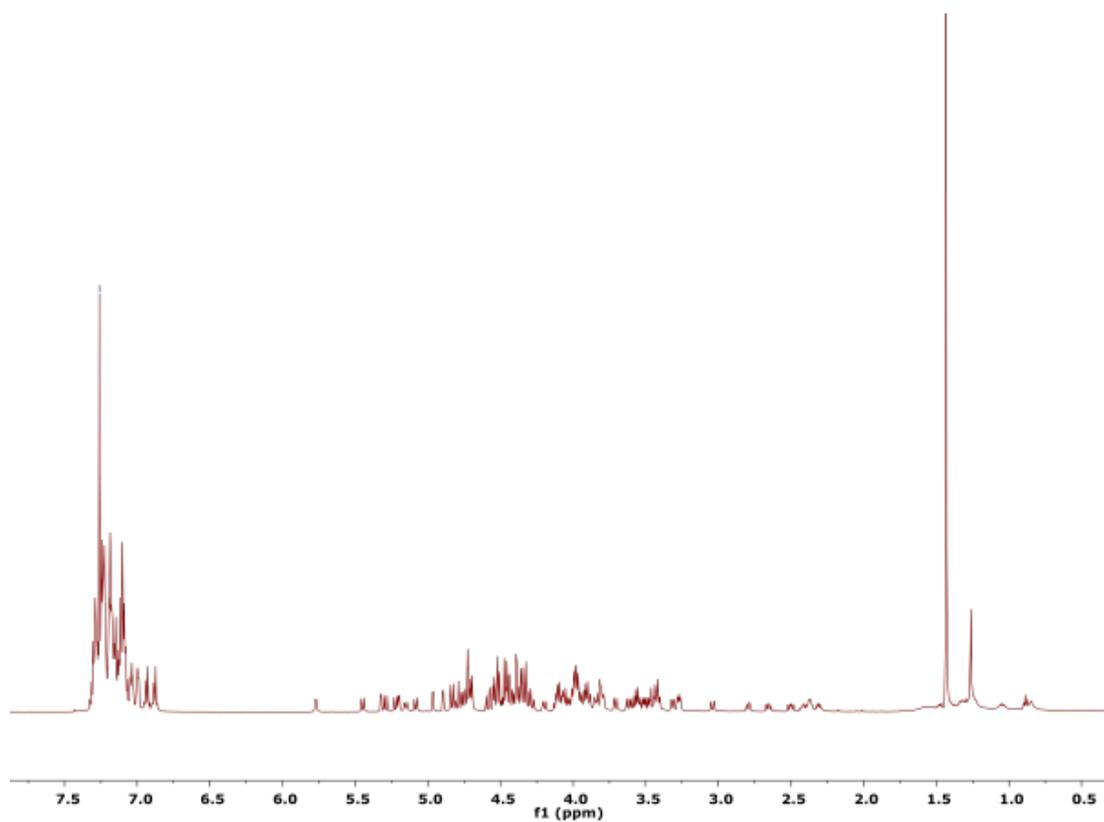
4

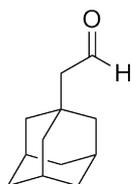
Protocol : Dialdehyde **3** (385 mg, 0.136 mmol) was dissolved in dichloromethane (14 mL). Putrescine (13.6 μ L, 0.136 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred for 2 hours. NaBHOAc₃ (288 mg, 1.36 mmol, 10 eq.) was added and the mixture was stirred for 3 hours. A saturated solution of NaHCO₃ (40 mL) and EtOAc (40 mL) were added and the mixture was stirred for 30 minutes. The organic phase was washed with a saturated solution of NaHCO₃ (2 x 20 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and concentrated. The obtained residue was purified by silica gel chromatography (40 % EtOAc in cyclohexane) to give bridged diamine **4** (170 mg, 43 % yield) as a white foam.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K) : δ = 7.35 - 6.84 (m, 95 H, H_{arom}), 5.77 (d, ³J=4.1 Hz, 1 H, H1), 5.45 (d, ²J=10.6 Hz, 1 H, CHPh), 5.32 (d, ³J=3.8 Hz, 1 H, H1), 5.29 (d, ²J=10.7 Hz, 1 H, CHPh), 5.24 - 5.18 (m, 2 H, H1, CHPh), 5.15 (d, ²J=10.8 Hz, 1 H, CHPh), 5.08 (d, ²J=11.1 Hz, 1 H, CHPh), 4.96 (d, ³J=3.4 Hz, 1 H, H1), 4.89 (d, ³J=3.4 Hz, 1 H, H1), 4.86 - 4.67 (m, 10 H, 2 x H1, 8 x CHPh), 4.61 - 4.25 (m, 25 H, CHPh), 4.20 (dd, ²J=11.1 Hz, ³J=2.8 Hz, 1 H, H6), 4.15 - 3.75 (m, 24 H, 7 x H3, 5 x H4, 7 x H5, 5 x H6), 3.71 (d, ²J=10.5 Hz, 1 H, H6), 3.65 - 3.38 (m, 11 H, 5 x H2, 2 x H4, 4 x H6), 3.31 (dd, J_{1,2}=3.2 Hz, J_{2,3}=9.6 Hz, 1 H, H2), 3.29 - 3.25 (m, 2 H, H4, H2), 3.04 (d, ³J=12.8 Hz, 1 H, H6), 2.80 (dd, ²J=12.3 Hz, ³J=3.0 Hz, 1 H, H6), 2.65 (dd, ²J=12.1 Hz, ³J=7.8 Hz, 1 H, H6), 2.50 (dd, ²J=13.1 Hz, ³J=9.3 Hz, 1 H, H6), 2.45 - 2.27 (m, 4 H, bridge CH₂NH), 1.51 - 1.45 (m, 1 H, bridge CH₂), 1.37 - 1.19 (m, 2 H, bridge CH₂), 1.10 - 0.99 (m, 1 H, bridge CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃, 300 K) : δ = 139.68, 139.66, 139.62, 139.57, 139.54, 139.40, 139.22, 138.92, 138.83, 138.57, 138.56, 138.48, 138.47, 138.40, 138.37, 138.33, 138.22, 138.01, 137.83 (19 x C-Ar^{quat.}), 128.58 - 126.20 (95 x C-Ar^{tert.}), 99.73, 99.55, 99.29, 98.92, 98.40, 98.15, 97.89 (7 x C1), 81.91 (C4), 81.50 (C3), 81.40 (C4), 81.31, 81.00 (2 x C3), 80.83 (C3, C4), 80.70 (2 x C3, 2 x C4), 80.53 (C3), 80.24, 79.80, 79.09, 78.98, 78.81, 78.65, 78.07 (7 x C2), 77.36 (C4), 76.52, 76.27 (2 x CH₂Ph), 76.16 (CH₂Ph, C4), 75.17, 74.80, 73.77, 73.74, 73.65, 73.58, 73.49, 73.47, 73.40, 73.23, 72.97 (3C), 72.72, 72.51, 72.39 (16 x CH₂Ph), 72.08, 72.05 (2C), 71.95, 71.47, 69.71, 69.62 (7 x C5), 69.28, 69.13, 68.90, 68.65, 68.54, 52.73, 51.39 (7 x C6), 48.96, 48.65 (bridge CH₂NH), 27.65, 27.07 (bridge CH₂).

HMRS (ESI) : calc. for C₁₇₉H₁₉₃N₂O₃₃⁺ ([M+H]⁺) : 2898.3480 ; Found 2898.3412





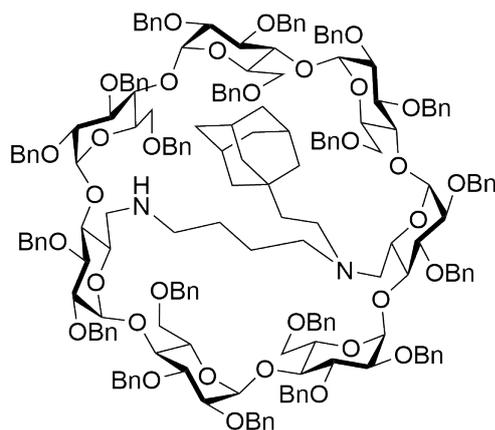
Molecular Weight: 178,27

A

Protocol : *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127(24), pp 8826-8828

To a flask containing 2-adamantyl-1-ethanol (500 mg, 2.77 mmol) in dichloromethane (15 mL) was added TEMPO (44 mg, 0.28 mmol, 0.1 eq.) followed by iodobenzene diacetate (980 mg, 3.05 mmol, 1.1 eq.). The reaction was stirred for 3 hours and then diluted with dichloromethane (10 mL). Saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL) was added and extracted with dichloromethane (3 x 5 mL). The combined organics were washed with saturated aqueous NaHCO₃ (5 mL) and brine (5 mL), dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (5 % Et₂O in cyclohexane) to provide adamantylacetaldehyde **A** (433 mg, 88 % yield) as a colorless oil that was stored at -20 °C under argon to prevent any further oxidation.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K) : δ = 9.87 (t, ³J=3.3 Hz, 1 H, CHO), 2.12 (d, ³J=3.3 Hz, 2 H, CH₂CHO), 1.99 (br. s, 3H, H_b), 1.80 - 1.60 (m, 12 H, H_a and H_c).



Molecular Weight: 3061,76

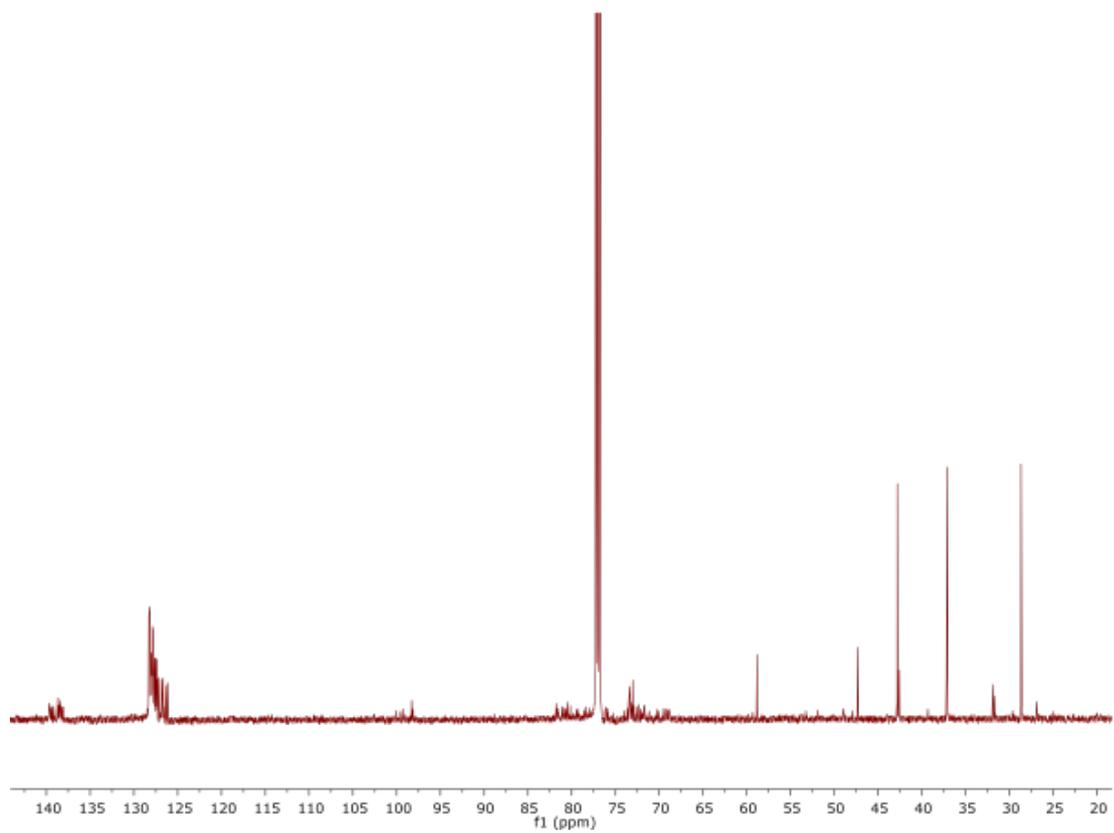
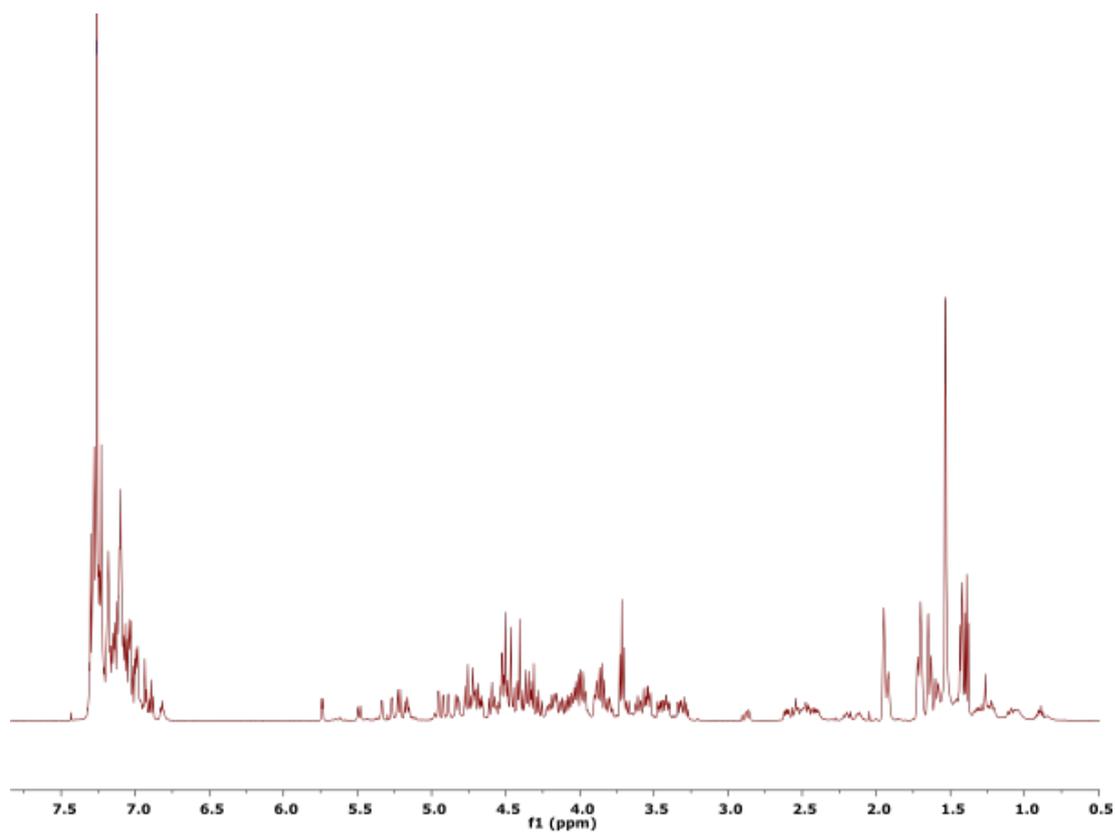
5

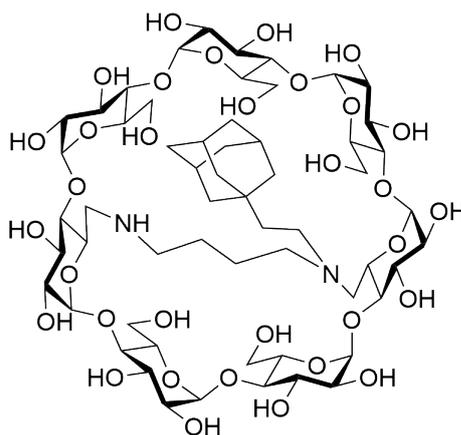
Protocol : To a solution of bridged diamine **4** (2.6 g, 0.89 mmol) in CH_2Cl_2 (250 mL) was added dropwise a solution of adamantaneacetaldehyde **A** (159 mg, 1 eq.) in CH_2Cl_2 (100 mL). $\text{NABH}(\text{OAc})_3$ (948 mg, 5 eq.) was then added and the mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The organic phase was washed with a solution of NaOH 1M (2 x 100 mL) and brine (100 mL). After concentration, the crude was purified by silica gel column chromatography (10 then 15 % EtOAc in cyclohexane) to give **5** (690 mg, 25 % yield) as a white foam.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , 300 K) : 7.35 - 6.77 (m, 95 H, H_{arom}), 5.74 (d, $^3\text{J}=4.1$ Hz, 1 H, H1), 5.49 (d, $^2\text{J}=10.5$ Hz, 1 H, CHPh), 5.34 (d, $^3\text{J}=4.0$ Hz, 1 H, H1), 5.27 (d, $^3\text{J}=3.7$ Hz, 1 H, H1), 5.22 (d, $^2\text{J}=10.9$ Hz, 2 H, 2 x CHPh), 5.19 - 5.14 (m, 2 H, CHPh), 4.96 (d, $^3\text{J}=3.5$ Hz, 1 H, H1), 4.92 (d, $^3\text{J}=3.4$ Hz, 1 H, H1), 4.89 (d, $^3\text{J}=2.9$ Hz, 1 H, H1), 4.85 - 4.80 (m, 2 H, 2 x CHPh), 4.79 - 4.64 (m, 8 H, 1 x H1, 7 x CHPh), 4.64 - 4.24 (m, 26 H, 26 x CHPh), 4.24 - 3.96 (m, 14 H, 7 x H3, 2 x H4, 2 x H5, 3 x H6), 3.92 - 3.77 (m, 9 H, 3 x H4, 5 x H5, 1 x H6), 3.74 - 3.52 (m, 8 H, 2 x H2, 1 x H4, 5 x H6), 3.49 - 3.38 (m, 3 H, 3 x H2), 3.34 - 3.26 (m, 3 H, 2 x H2, 1 x H4), 2.87 (dd, $^2\text{J}=12.5$ Hz, $^3\text{J}=3.3$ Hz, 1 H, H6), 2.64 - 2.36 (m, 7 H, 3 x H6, 4 x CHN), 2.24 - 2.08 (m, 2 H, 2 x CHN), 1.92 (br. s, 3 H, H_b), 1.74 - 1.62 (m, 6 H, H_c), 1.53 (br. s, 6 H, H_a), 1.45 - 1.41 (m, 2 H, 2 x $\text{CH}_{\text{bridge}}$), 1.35 - 1.19 (m, 3 H, 2 x $\text{CH}_{\text{bridge}}$, 1 x $\text{CH}_{\text{linker}}$), 1.13 - 1.06 (m, 1 H, $\text{CH}_{\text{linker}}$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3 , 300 K) : 139.83, 139.78, 139.75, 139.58, 139.47, 139.45, 139.29, 138.88, 138.84, 138.77, 138.73, 138.60, 138.54, 138.49, 138.45, 138.40, 138.30 (19 x $\text{C-Ar}^{\text{quat}}$), 128.84 - 125.95 (95 x $\text{C-Ar}^{\text{tert}}$), 100.27, 99.74, 99.42, 99.39, 98.46, 98.42, 98.26 (7 x C1), 81.89 (C3), 81.86, 81.77 (2 x C4), 81.76 (C3), 81.67 (2C, C3, C4), 81.25 (C4), 81.18, 81.03, 80.97, 80.81 (4 x C3), 80.48 (C2), 80.28 (C4), 79.89, 79.49, 79.34, 78.70 (4 x C2), 78.43 (2C, 2 x C4), 78.42, 78.09 (2 x C2), 76.38, 76.27, 76.20, 76.05, 75.48, 74.15, 73.82, 73.60, 73.55, 73.49, 73.48, 73.34, 73.15 (3C), 73.01, 72.66, 72.40 (18 x CH_2Ph), 72.14, 72.06, 71.83, 71.80 (4 x C5), 71.74 (CH_2Ph), 71.19, 70.32, 70.09 (3 x C5), 69.61, 69.35, 69.04, 68.90 (2C), 59.47 (6 x C6), 53.30 (CH_2NH), 51.96 (C2), 49.05 (CH_2NH), 47.92 ($\text{CH}_2\text{NH}^{\text{Ad}}$), 42.93 (CH_2), 42.73 (C_a), 39.35 (CH_2), 37.32 (C_c), 37.24 (CH_2), 31.82 ($\text{C}^{\text{quat. Ada}}$), 28.80 (C_b)

HMRS (ESI) : calc. for $\text{C}_{191}\text{H}_{211}\text{N}_2\text{O}_{33}^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) : 3060.4889 ; Found 3060.4843





Molecular Weight: 1349,3870

6

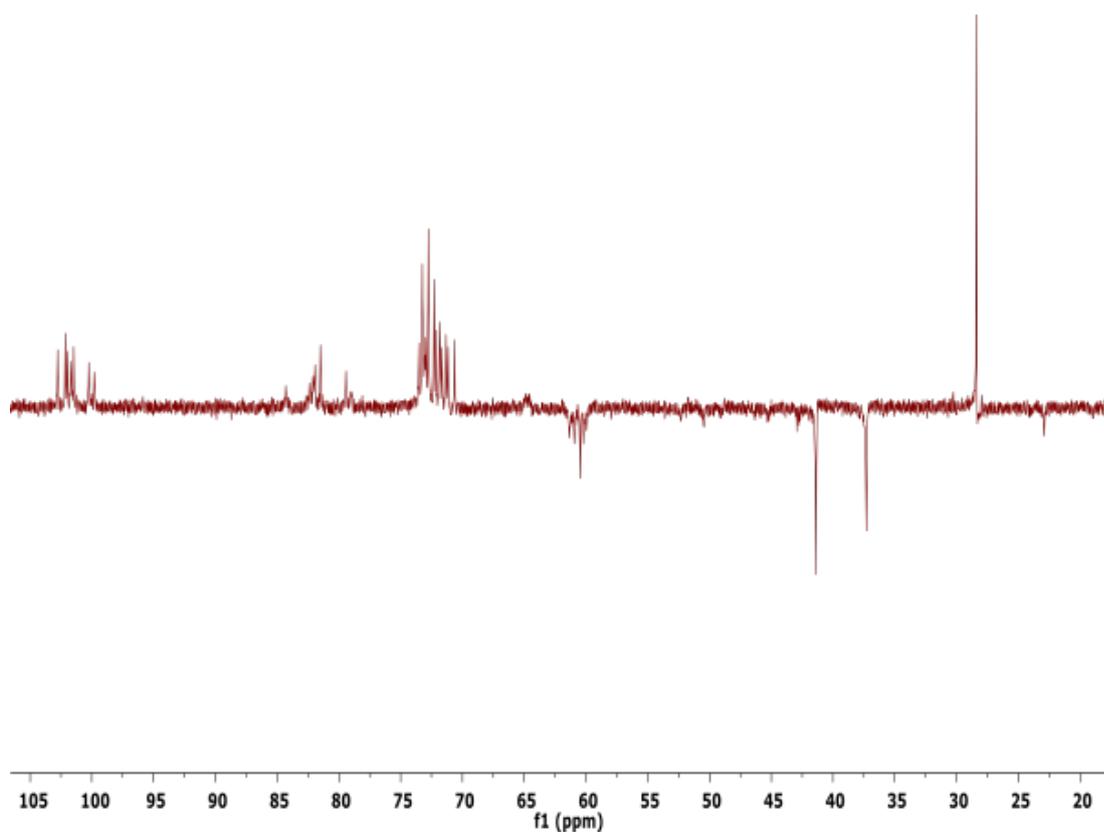
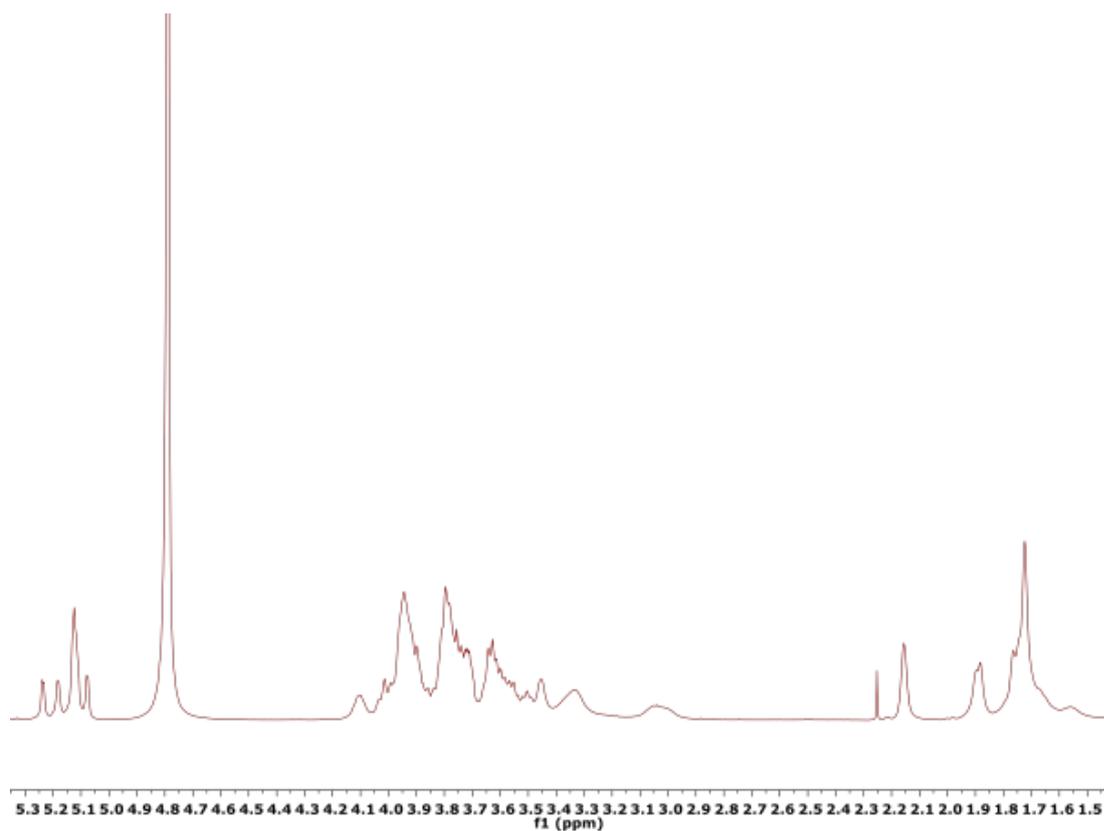
Protocol : General deprotection protocol

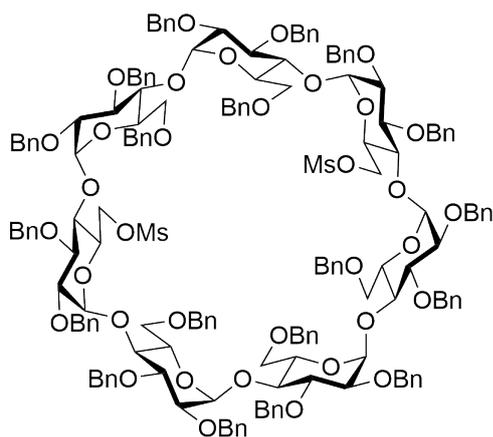
5 (147 mg, 0.048 mmol) was dissolved in THF / H₂O (3 :1, 16 mL). TFA (50 μ L, 14 eq.) and Pd/C (200 mg, 1.4 mass eq.) were added. The mixture was purged 3 times with argon, and 3 times with hydrogen. It was then stirred overnight at room temperature under hydrogen. The completion was checked by MS, and the mixture filtered through 0.2 μ m pore filter and concentrated. H₂O (5 mL) was added to the crude which was purified by RP-HPLC to give **6** (30 mg, 40 % yield) after freeze drying.

¹H NMR (600 MHz, D₂O, 300 K) : δ = 5.24 (d, ³J_{1,2}=3.8 Hz, 1 H, H1), 5.18 (d, ³J_{1,2}=3.9 Hz, 1 H, H1), 5.15-5.09 (m, 4H H1), 5.08 (d, ³J_{1,2}=3.7 Hz, 1 H, H1), 4.17-2.92 (m, 62 H, H CD + CH₂-N), 2.16 (s, 3H, Hb), 1.96-1.48 (m, 16 H, Ha, Hc, H bridge).

¹³C NMR (151 MHz, D₂O, 300 K) : δ = 102.76, 102.15, 101.99, 101.69, 101.47, 100.25, 99.82 (7xC1), 84.32, 82.39, 82.05, 81.93, 81.49, 79.42, 78.97 (7xC4), 73.84-70.13 (C2, C3, 6xC5), 64.90 (C5), 61.34 (2C), 60.92, 60.47 (2C), 60.20, 59.95 (7xC6), 50.44 (Cbridge,NH), 49.19 (CAdaNH), 42.91 (CbridgeNCH₂), 41.39 (Ca), 37.34 (Cc,CH₂Ada), 31.91 (CquatAda), 28.45 (Cb), 22.92 (2xCbridge).

HMRS (ESI) : calc. for C₅₈H₉₇N₂O₃₃⁺ ([M+H]⁺) : 1349.5968 ; Found 1349.5960





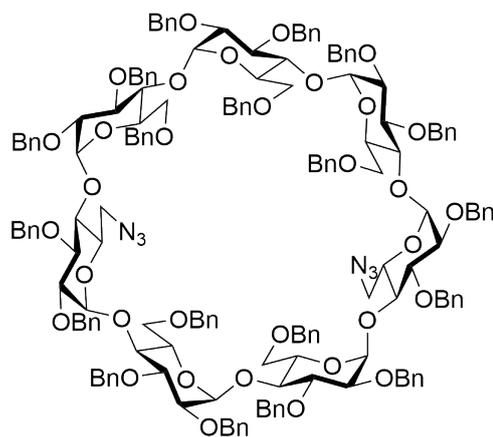
Molecular Weight: 3003,5320

7

Protocol : *ACIE*, **2013**, 52, pp 7213-7218

Diol **2** (2.66 g, 0.934 mmol) was solubilised in CH_2Cl_2 (30 mL). The mixture was cooled to 0 °C and triethylamine (521 μL , 4 eq.) and mesyl chloride (521 μL , 4 eq.) were sequentially added. The mixture was stirred at r.t. and the reaction was followed by TLC (25 % EtOAc in cyclohexane). After completion, the reaction was quenched with water (75 mL). The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 40 mL), and the organics were dried with MgSO_4 . After concentration, the crude product was purified by silica gel column chromatography (20 % EtOAc in cyclohexane) to give **7** (2.67 g, 95 % yield) as a white foam.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 300 K) : δ = 7.35 - 6.95 (m, 95H, H_{arom}), 5.54 (d, $^3\text{J} = 3.9$ Hz, 1 H, H1), 5.31 - 5.19 (m, 4 H, 2 x H1, 2 x CHPh), 5.14 (d, $^2\text{J} = 10.6$ Hz, 1 H, CHPh), 5.09 (d, $^2\text{J} = 10.8$ Hz, 1 H, CHPh), 5.04 (d, $^3\text{J} = 3.0$ Hz, 1 H, H1), 5.02 - 4.98 (m, 2 H, CHPh, H1), 4.96 (d, $^3\text{J} = 3.4$ Hz, 1 H, H1), 4.94 (d, $^3\text{J} = 3.5$ Hz, 1 H, H1), 4.89 - 4.63 (m, 10 H, 10 x CHPh), 4.60 - 3.70 (m, 50 H, 21 x CHPh, 7 x H3, 6 x H4, 6 x H5, 10 x H6), 3.68 - 3.41 (m, 11 H, 5 x H2, H4, H5, 4 x H6), 3.40 - 3.33 (m, 2H, 2 x H2), 2.72 (s, 3 H, CH_3), 2.69 (s, 3 H, CH_3)

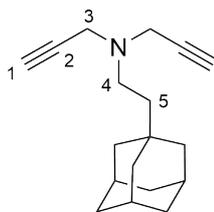


Molecular Weight: 2897,3900

8

Protocol: To a solution of **7** (2.67 g, 0.89 mmol) in DMF (63 mL) was added NaN₃ (579 mg, 10 eq.). The mixture was heated at 80 °C under argon overnight. EtOAc (200 mL) and water (200 mL) were added and the organic phase was washed with brine (3 x 200 mL) and dried with MgSO₄. After concentration, the crude product was purified by silica gel column chromatography (15 % EtOAc in cyclohexane) to afford **8** (2.24 g, 87 % yield) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K) : δ = 7.35 - 7.00 (m, 95H, H_{arom}), 5.29 (d, ³J_{1,2} = 3.8 Hz, 1 H, H1), 5.20 - 5.04 (m, 9 H, 5 x H1, 4 x CHPh), 5.02 - 4.92 (m, 2 H, H1, CHPh), 4.87 - 4.69 (m, 9 H, 9 x CHPh), 4.63 - 4.55 (m, 2 H, 2 x CHPh), 4.54 - 4.35 (m, 22 H, 22 x PhCH), 4.15 - 3.80 (m, 25 H, H3, H4, H5, 4 x H6), 3.75 - 3.35 (m, 17 H, H2, 10 x H6).



Molecular Weight: 255,4050

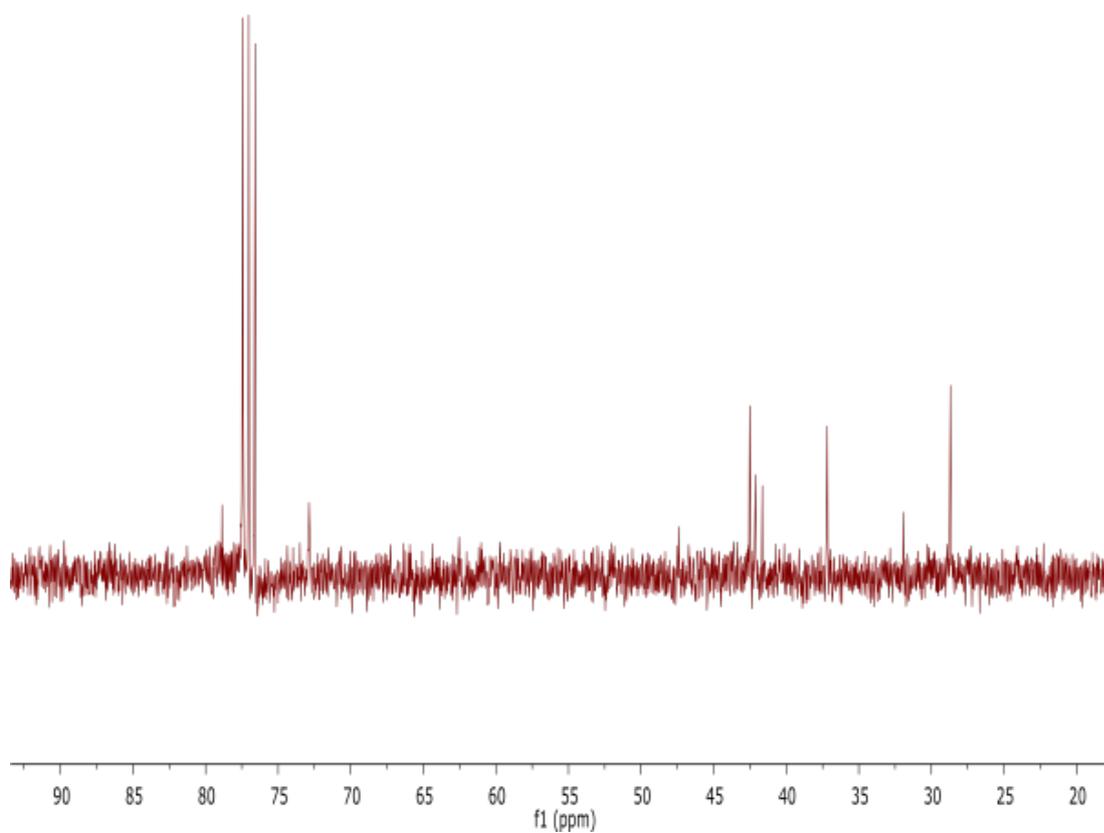
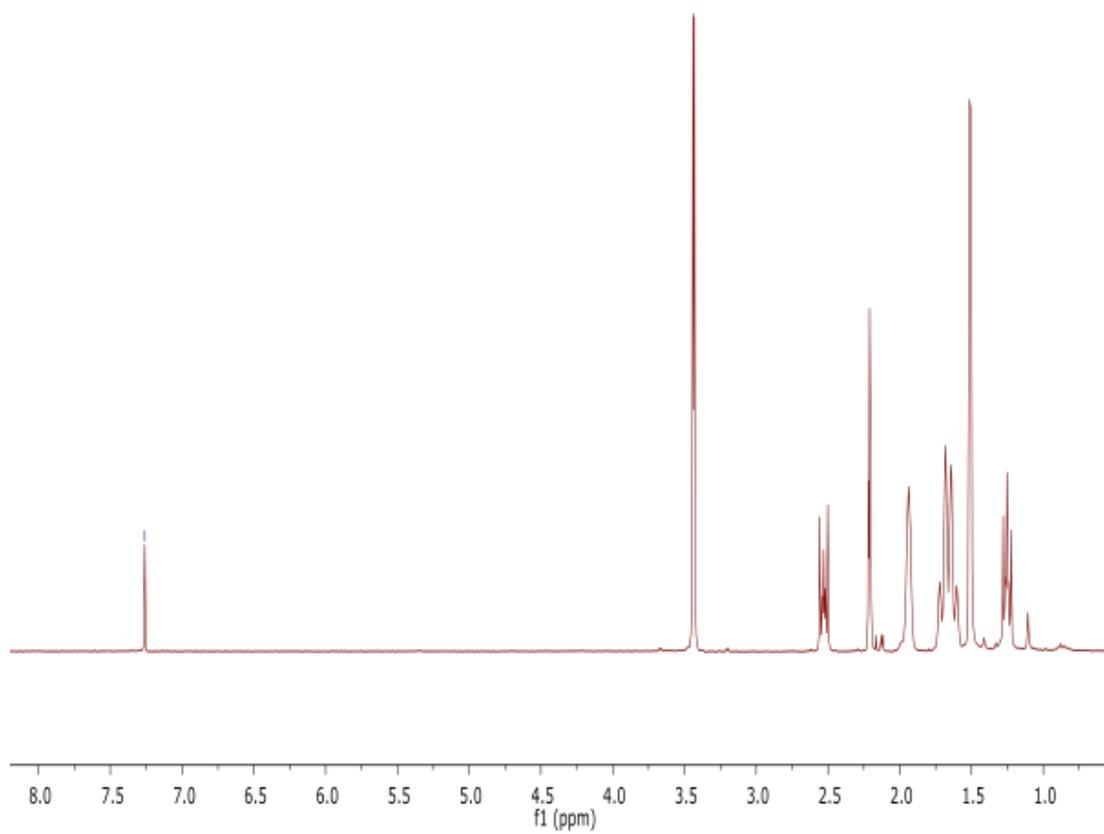
B

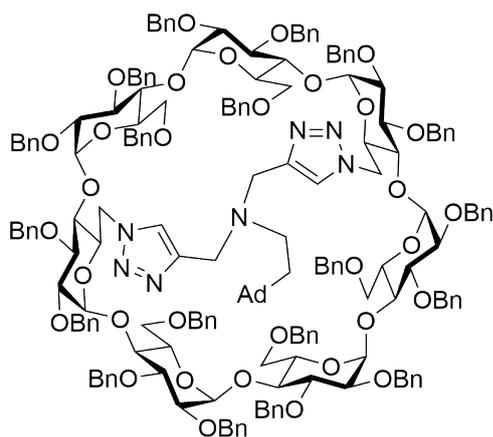
Protocol : To a solution of adamantylacetaldehyde (178 mg, 1 mmol) in 10 mL CH_2Cl_2 was added dipropargylamine (103 μL , 1 eq.). $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (318 mg, 1.5 eq.) was then added. The mixture was stirred at r.t. for two hours. EtOAc (25 mL) was then added, and the mixture was washed with a saturated solution of NaHCO_3 (2 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL). The organic phase was dried with MgSO_4 and concentrated. After purification by silica gel chromatography (10 % EtOAc in cyclohexane), the pure product **B** was obtained (229 mg, 90 % yield) as a pale oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 300 K) : δ = 3.44 (d, $^4J_{1,3}=2.4$ Hz, 4 H, H3), 2.53 (m, 2 H, H4), 2.21 (t, $^4J_{1,3}=2.4$ Hz, 2 H, H1), 1.94 (br. s, 3 H, Hb), 1.66 (m, 6 H, Hc), 1.51 (m, 6 H, Ha), 1.25 (m, 2 H, H5).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 300 K) : δ = 78.87 (C2), 72.86 (C1), 47.39 (C4), 42.52 (Ca), 42.13 (C3), 41.65 (C5), 37.17 (Cc), 31.95 (Cquat), 28.69 (Cb).

HMRS (ESI) : calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) : 256.2060 ; Found 256.2060





Molecular Weight: 3152,7950

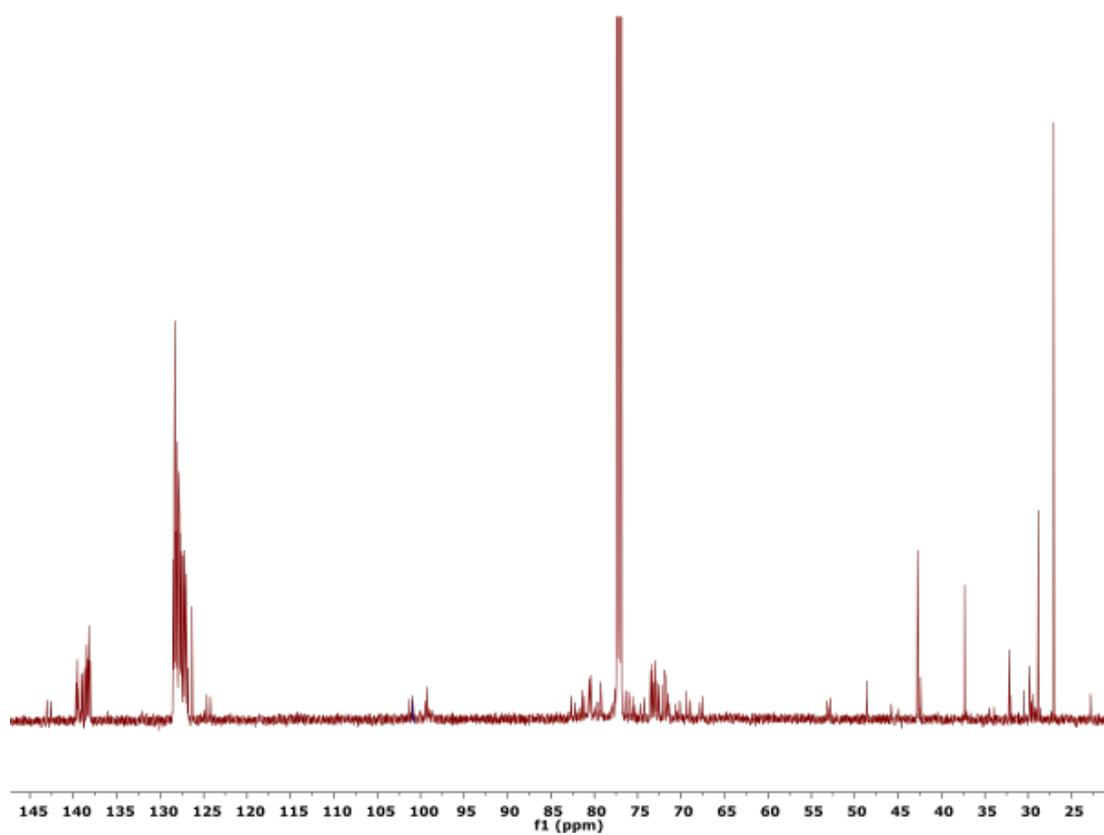
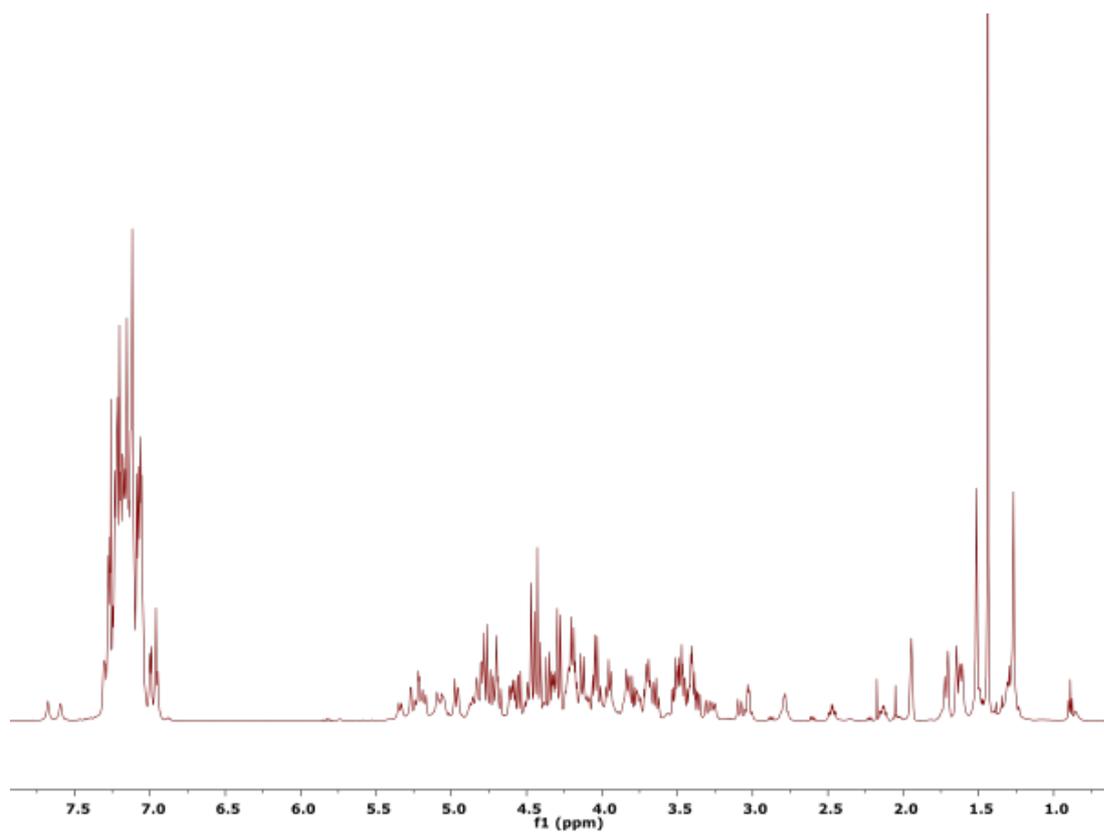
9

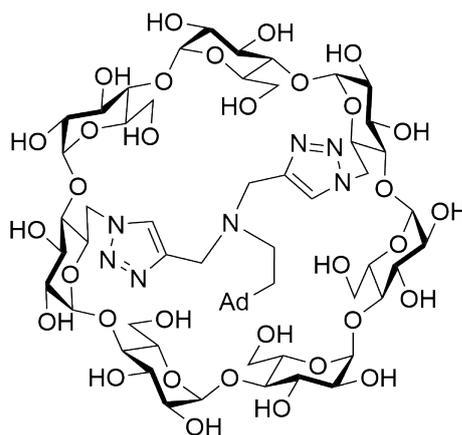
Protocol : To a solution of **8** (1.2 g, 0.414 mmol) in DMF (12 mL) was added **B** (106 mg, 1 eq.). DIPEA (22 μ L, 0.4 eq.) was added. A mixture of TBTA (88 mg, 0.4 eq.) and $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$ (62 mg, 0.4 eq.) in DMF (1 mL) was then added. The flask was purged with argon and put to microwave at 150 $^\circ\text{C}$ for 1 h. Et_2O (100 mL) was then added, and the organic phase was washed with a mixture of H_2O brine (1 :1) (2 x 100 mL), HCl 1M (100 mL) and saturated NaHCO_3 (100 mL). The organic phase was dried with MgSO_4 and concentrated. After silica gel column chromatography (30 % EtOAc in cyclohexane), the pure product **9** (455 mg, 35 % yield) was obtained as a white foam.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , 300 K) : δ = 7.68 (br. s, 1 H, H_{triazA}), 7.59 (br. s, 1 H, H_{triazD}), 7.35-6.91 (m, 95 H, H_{Ph}), 5.37-5.15 (m, 6 H, 2xH1, H6, 3xCHPh), 5.14-5.00 (m, 3 H, 2xH1, 1xCHPh), 4.99-4.92 (m, 2 H, 2xCHPh), 4.91-4.64 (m, 14 H, 3xH1, 11xCHPh), 4.63-4.53 (m, 4 H, 1xH5, 3xCHPh), 4.52-4.26 (m, 17 H, 1xH5, 1xH6, 15x CH_2Ph), 4.25-3.87 (m, 14 H, 7xH3, 1xH4, 2xH5, 2xH6, 2x CH_2Ph), 3.86-3.60 (m, 12 H, 4xH4, 3xH5, 5xH6), 3.54-3.33 (m, 11 H, 7xH2, 2xH4, 2x CH_2triaz), 3.32-3.22 (m, 2 H, 1xH6, 1x CH_2triaz), 3.09 (d, $^2\text{J}=14.2$ Hz, 1 H, CH_2triaz), 3.02 (m, 2 H, 2xH6), 2.79 (m, 2 H, 2xH6), 2.47 (td, $^2\text{J}=11.8$ Hz, $^3\text{J}=5.0$ Hz, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ad}$), 2.13 (td, $^2\text{J}=11.8$ Hz, $^3\text{J}=4.7$ Hz, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ad}$), 1.95 (s, 3 H, Hb), 1.74-1.61 (m, 6 H, Hc), 1.55-1.46 (m, 7 H, Ha, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ad}$), 1.26 (m, 1 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ad}$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3 , 300 K) : δ = 143.05 (C_{triazA}), 142.57 (C_{triazD}), 139.70, 139.60, 139.57, 139.55, 139.52, 139.48, 139.09, 138.91, 138.68, 138.49 (2 C), 138.47, 138.41, 138.34, 138.22 (2 C), 138.15, 138.06, 138.03 (19 x C_{quatBn}), 128.64-126.25 (95xC_{Ar}), 124.62 (C_{triazA}), 124.20 (C_{triazD}), 101.36, 100.93, 99.80, 99.52, 99.08, 99.04, 98.57 (7xC₁), 82.66 (C₂), 82.64 (C₄), 81.41 (C₄), 81.13 (C₄), 80.61 (C₃), 80.59 (C₃), 80.43 (C₃), 80.42 (C₃,C₄), 80.35 (C₃), 79.98 (2xC₃), 79.57 (C₂), 79.27 (C₂), 79.26 (C₂), 79.22 (C₂,C₄), 77.87 (C₂), 77.84 (C₂), 77.61 (C₂), 76.40 (2C), 76.04, 75.98, 75.58, 75.38, 74.71, 74.28, 73.53, 73.49, 73.33, 73.22, 73.13, 72.98, 72.94 (2C), 72.84, 72.55, 72.21 (19x CH_2Bn), 71.79 (C₅), 71.40 (C₅), 71.78 (2xC₅), 71.53 (C₄), 71.38 (2xC₅), 70.62 (C₅), 48.62 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ad}$), 45.81 (CH_2triazA), 44.94 (CH_2triazD), 42.76 (Ca), 42.42 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ad}$), 37.41 (Cc), 32.20 (C_{quatAd}), 28.96 (Cb).

HMRS (ESI) : calc. for $\text{C}_{193}\text{H}_{207}\text{N}_7\text{O}_{33}\text{Na}^+$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) : 3173.4633 ; Found 3173.4758





Molecular Weight: 1440,4200

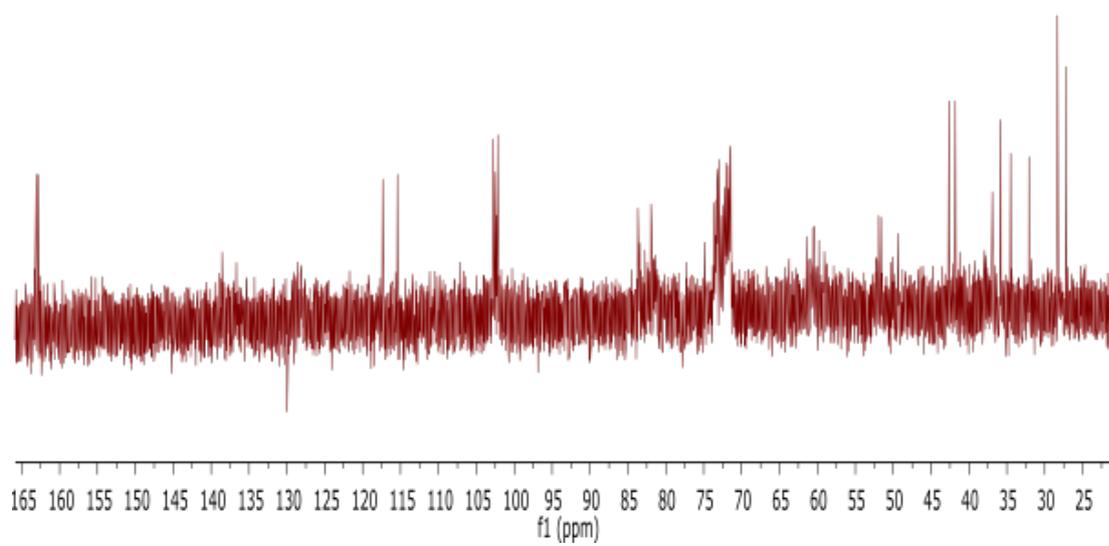
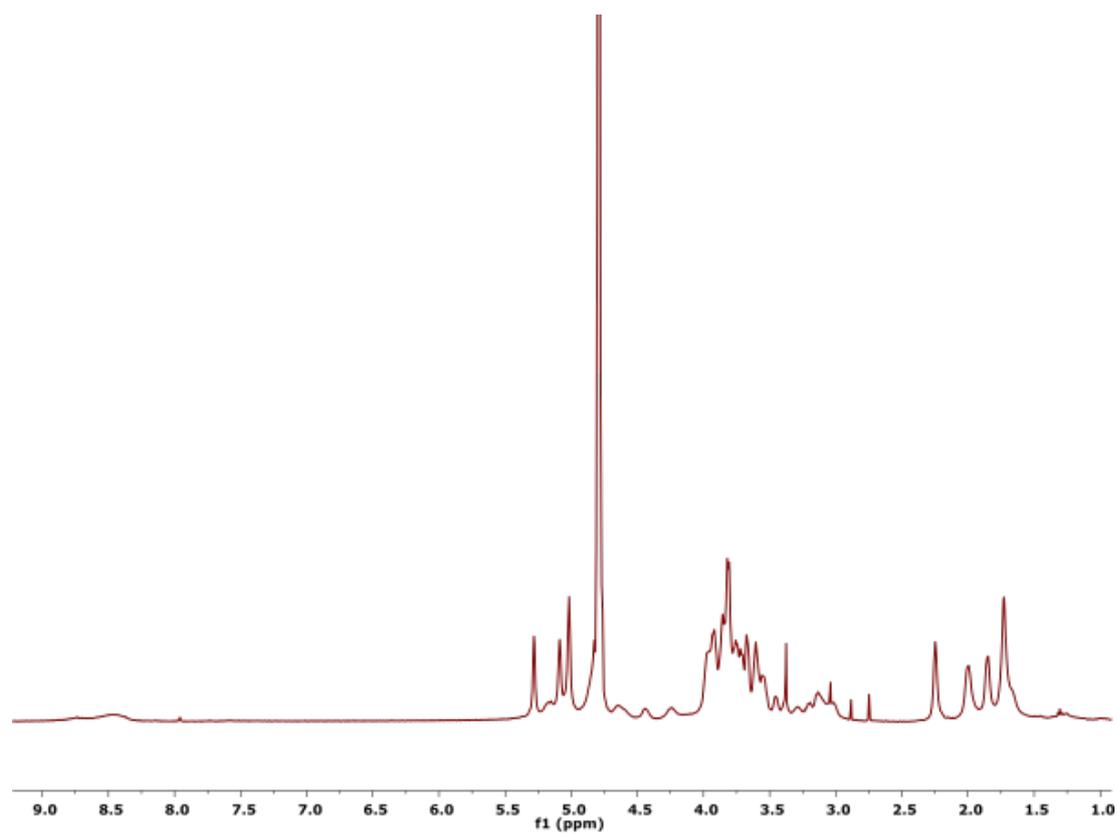
10

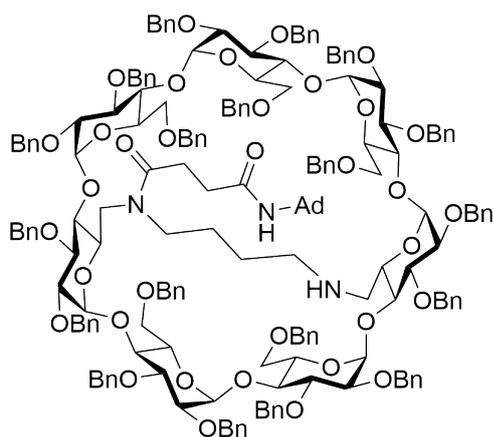
Protocol : General deprotection protocol. Yield : 60 %

¹H NMR (400 MHz, D₂O, 300 K) : δ = 8.95-8.25 (br. m, 2 H, Htriaz), 5.33-4.94 (m, 7 H, 7xH1), 4.02-3.42 (m, HCD), 3.24-2.95 (m, 6 H, 2xCH₂triaz, 1xN-CH₂-CH₂-Ad), 2.25 (s, 3 H, Hb), 1.99 (s, 3 H, Hc'), 1.85 (s, 3 H, Hc), 1.77-1.55 (m, 5 H, Ha, 1xCH₂-Ad).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O, 300 K) : δ = 138.41, 136.63 (2xCquattriaz), 128.51, 124.25 (2xCHTriaz), 102.75 (2C), 102.48, 102.29, 102.16(2C), 102.09 (7xC1), 83.68, 83.42, 82.74, 82.45, 81.96, 81.88, 81.64 (7xC4), 73.69-71.40 (7xC2,7xC3,7xC5), 61.44, 61.23, 60.53, 60.45, 59.88, 52.19 (6xC6), 51.92(C6,CH₂Triaz), 51.64 (CH₂ triaz), 49.25 (NCH₂CH₂Ada), 41.80 (Ca,NCH₂CH₂Ada), 37.07 (Cc), 32.08 (Cquat ada), 28.32 (Ca).

HMRS (ESI) : calc. for C₆₀H₉₄N₇O₃₃⁺ ([M+H]⁺) : 1440.5887 ; Found 1440.5859





Molecular Weight: 3132,7970

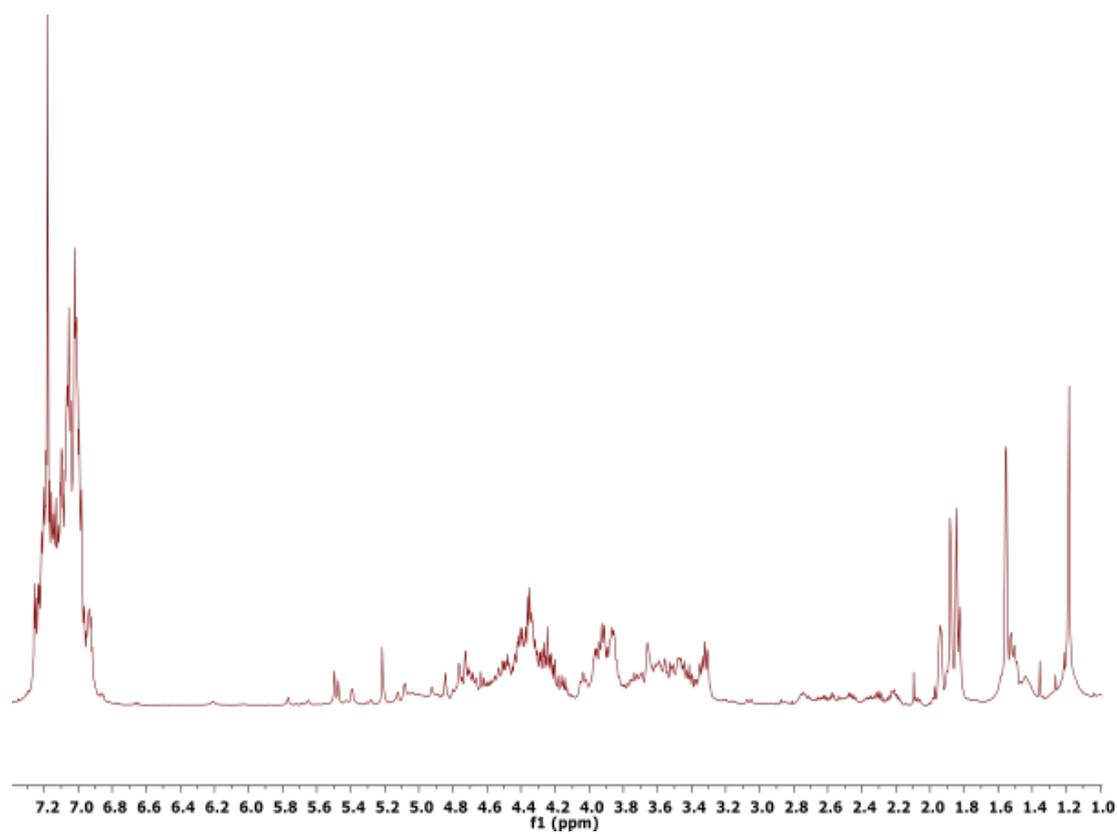
11

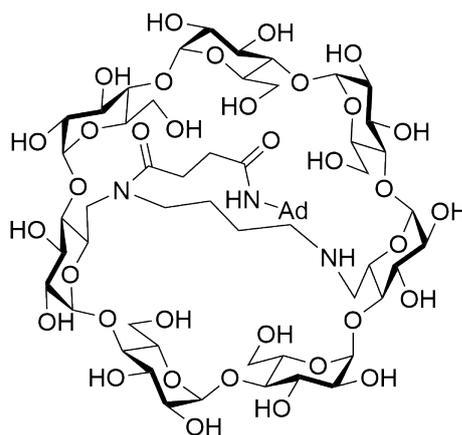
Protocol : To a solution of acid (87 mg, 0.345 mmol) in DMF (25 mL) were added EDCI (79 mg, 1.2 eq.) and HOBt (56 mg, 1.2 eq.). The mixture was stirred for 15 minutes. A solution of cyclodextrin (1 g, 1 eq.) in DMF (50 mL) and DIPEA (90 μ L, 1.5 eq.) were added. The mixture was stirred at room temperature overnight. Et₂O (250 mL) was added and the mixture was washed with brine/H₂O (1 :1, 2 x 250 mL), H₂O (250 mL) and brine (250 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and concentrated. The crude mixture was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL). Boc₂O (634 μ L, 8 eq.) and Et₃N (385 μ L, 8 eq.) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. H₂O (100 mL) was added, and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 100 mL) and washed with brine (100 mL). After drying with MgSO₄, the crude mixture was concentrated. After purification by silica gel column chromatography (25 to 30 % EtOAc in cyclohexane), one regioisomer was isolated. This product (40 mg, 0.012 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (4 mL) at 0 °C. TFA (0.1 mL, 108 eq.) was slowly added. The mixture was stirred at r.t. until completion (followed by MS). The mixture was concentrated to give 11 (37 mg, 10 % yield).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K) : Multiple rotamers are present in the spectrum.

δ = 7.44-6.76 (m, 95 H, Harom), 6.21 (br. s, 1 H, Hamide), 5.65 (br. s, 1 H, Hamide), 5.53-4.10 (m, 45 H, 7xH1, 38xCHPh), 4.08-3.80 (m, 17 H, 7xH3, 3xH4, 2xH5, 5xH6), 3.77-3.25 (m, 23 H, 7xH2, 4xH4, 3xH5, 9xH6), 2.79-2.15 (m, 8 H, 2xN-CH₂bridge, 2xN-CO-CH₂), 1.94 (s, 3 H, Hb), 1.91-1.79 (m, 6 H, Hc), 1.55 (s, 6 H, Ha), 1.53-1.38 (m, 4 H, 2xCH₂bridge).

HMRS (ESI) : calc. for C₁₉₃H₂₁₂N₃O₃₅⁺ ([M+H]⁺) : 3131.4896 ; Found 3131.4732





Molecular Weight: 1420,4220

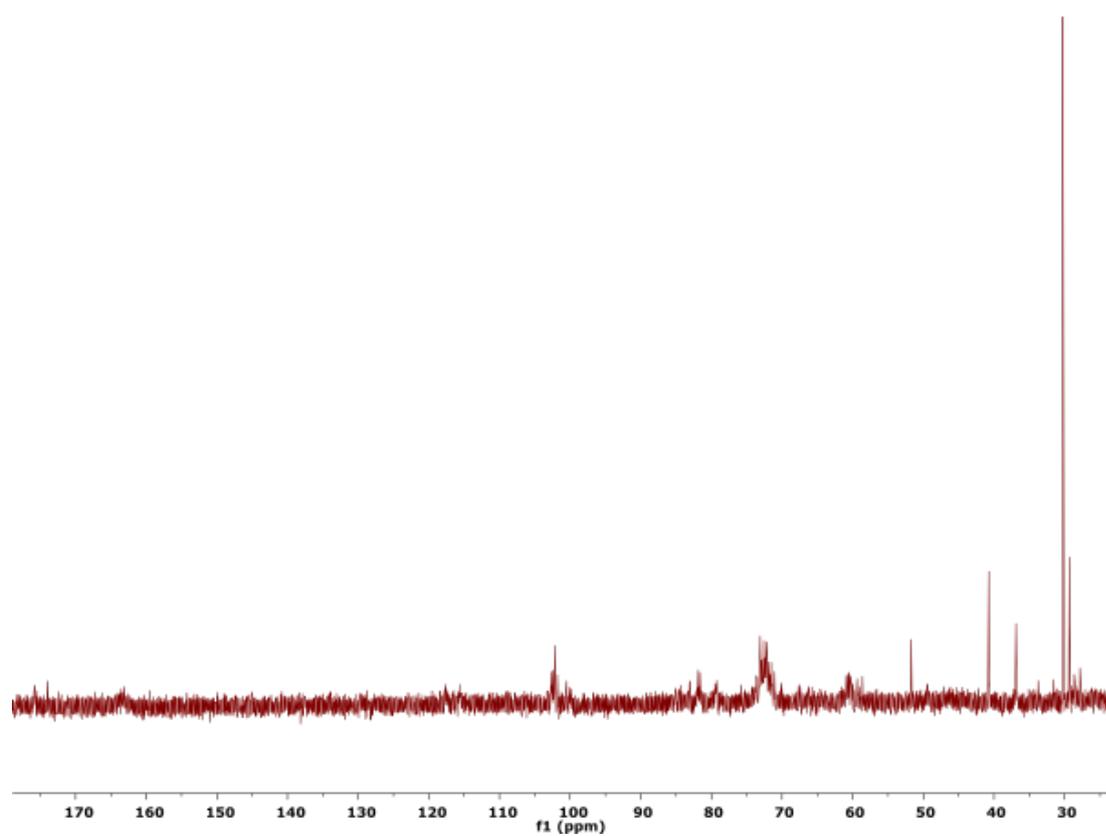
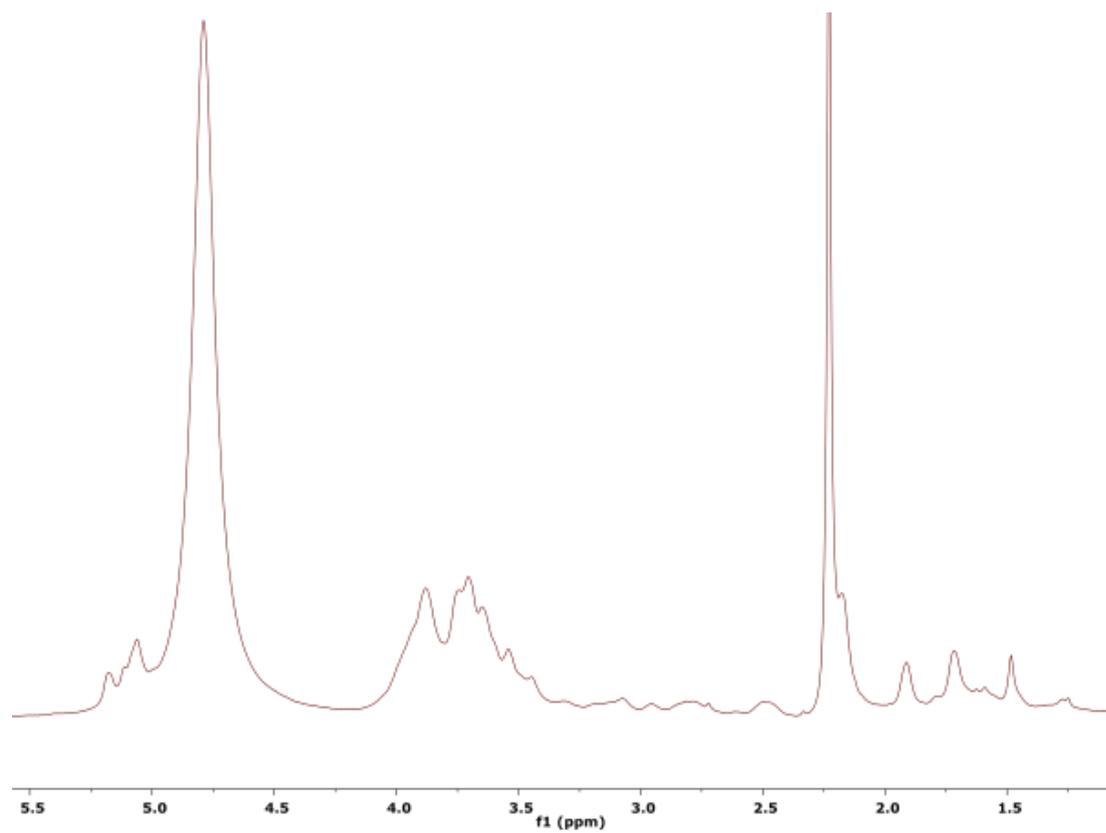
12

Protocol : General deprotection procedure. Yield : 70 %

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O , 300 K) : δ = 5.22-4.95 (m, 7 H, 7xH1), 4.18-3.24 (m, 42 H, HCD), 3.21-2.36 (m, 8 H, 2xN-CO-CH₂, 2xCH₂bridge), 2.23 (s, 3 H, Hb), 2.17 (s, 6 H, Ha), 1.90 (s, 3 H, Hc), 1.80-1.52 (m, 7 H, Hc', 2xCH₂bridge).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O , 300 K) : δ = 175.75 (CONHCD), 173.95 (CONHAda), 102.61, 102.38, 102.15 (2C), 101.77, 100.54, 100.09 (7xC1), 73.54-70.50 (7xC2,7xC3,7xC5), 61.51, 60.91, 60.66, 60.50, 60.25,59.36, 58.63 (7xC6), 40.77 (Ca), 36.93 (Cc), 31.62 (AdNHCOCH₂), 29.36 (Cb), 28.81 (AdNHCOCH₂CH₂).

HMRS (ESI) : calc. for $\text{C}_{60}\text{H}_{98}\text{N}_3\text{O}_{35}^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) : 1420.5975 ; Found 1420.5944



6.2 SUPRAMOLECULAR POLYMERS CHARACTERISATION

ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY ITC measurements were carried at 20 °C with a VP-ITC instrument from Microcal Inc. The results were analysed using "Origin for ITC" software supplied with VP-ITC microcalorimeter.

DYNAMIC LIGHT SCATTERING Measurement was performed at an angle of 90 °C at 298 K, with a Zetasizer Nano S90 from Malvern using a 4 mW He-Ne laser at 633 nm. All calculations were performed using the Nano DTS software.

DIFFUSION ORDERED SPECTROSCOPY DOSY NMR diffusion coefficient measurements were carried out by using the Longitudinal EDdy current BiPolar Gradient Pulse (LEDBPGP) sequence. Sixteen spectra were acquired with gradient pulses of 4 ms ranging from 0.28 to 5.26 G/mm. A diffusion delay from 50 to 150 ms was used and the diffusion coefficient were calculated using TopSpin 3.0.

SMALL ANGLE NEUTRON SCATTERING SANS measurements were done at the LLB (CEA Saclay) or at the ESRF (Grenoble). The q values probed varied from $6.9 \cdot 10^{-3}$ to 0.37 \AA^{-1} . A light water standard was used to normalize the scattered intensities to cm^{-1} units.

6.3 MICROSCOPY

MATERIALS Bacteriophage T4 DNA was purchased from Wako Chemicals and YOYO-1 iodide from Life Technologies. Milli-Q water (Millipore) was used for all experiments. All other chemicals were purchased from Sigma. Mica (potassium aluminosilicate, Muscovite Mica) for atomic force microscopy was from Goodfellow.

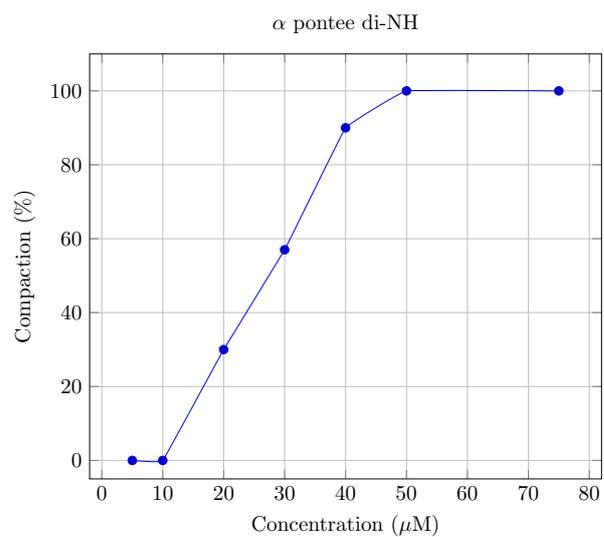
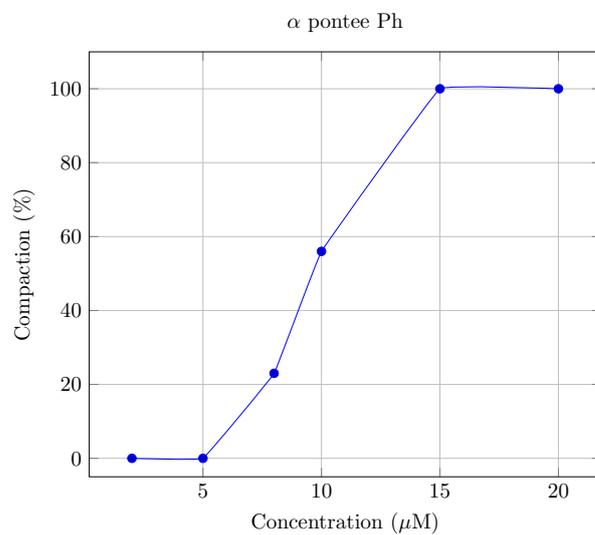
FLUORESCENCE MICROSCOPY Fluorescence microscopy was performed on a Zeiss inverted microscope equipped with a 100x oil-immersed objective and the filter set 44 from Zeiss (Exc : BP 475/40 nm ; Em : BP 530/50 nm). Images were acquired with an EMCCD camera (Photonmax 512B, Princeton Scientific) and Metavue image acquisition software (Molecular Devices).

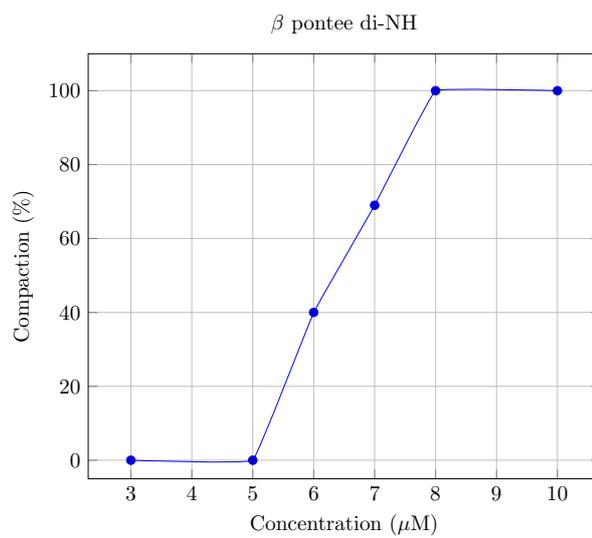
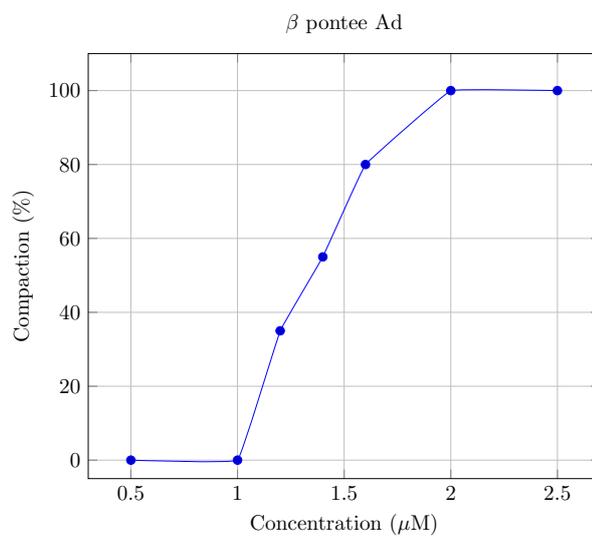
Preparation of samples : Water, Tris-HCl buffer (pH = 7.4, final concentration 10 mM), functionalized cyclodextrins, and YOYO-1 iodide (final concentration 0.01 μM) were added in this order and thoroughly mixed in a 1.5 mL Eppendorf tube. DNA was then added to give a final concentration of 0.1 μM in phosphate groups. 30 μL droplets were immediately observed with the microscope.

ATOMIC FORCE MICROSCOPY AFM measurements were performed using a 5100 atomic force microscope (Agilent Technologies-Molecular Imaging) operated in the dynamic tip deflection mode (acoustic alternating current mode, AAC). All AFM experiments were performed using silicon FORT probes (Applied NanoStructures, Inc.) in the tapping mode with a spring constant of 3 N/m at 69 kHz. The images were scanned in topography mode. A freshly cleaved mica surface was first treated with 200 μM spermine solution for 1 h, rinsed with an excess of water, and stored under a drop of water for up to a few hours. Right after removing water with filter paper (Whatman),

a 20 μL drop of a sample solution was then placed on the mica slide. After 1 h of incubation in wet atmosphere at room temperature, the mica plate was rinsed with an excess of water and dried with compressed argon. AFM imaging was then carried out. The color height scale of all AFM images ranges from -1.8 (black) to +2.2 nm (white).

6.4 DNA CONDENSATION CURVES

FIGURE 156 – Courbe de compaction de la cyclodextrine α pontée di-NHFIGURE 157 – Courbe de compaction de la cyclodextrine α pontée Ph

FIGURE 158 – Courbe de compaction de la cyclodextrine β pontée di-NHFIGURE 159 – Courbe de compaction de la cyclodextrine β pontée Ad

Cinquième partie

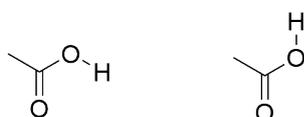
APPENDICE

APPENDICE

A.1 CATÉMÈRES

A.1.1 Formes cristallines des acides carboxyliques

A l'état solide, les acides carboxyliques peuvent se trouver sous la forme de deux conformères : le conformère *syn*, où l'hydrogène du groupe hydroxyle et l'oxygène du groupe carbonyle pointent dans la même direction, et le conformère *anti* où ces deux atomes pointent vers une direction opposée (Figure 160).

FIGURE 160 – Conformères *syn* et *anti* de l'acide acétique

La forme *syn* est énergétiquement favorisée ($\Delta E = 2 \text{ Kcal.mol}^{-1}$), on la trouve donc très majoritairement dans les structures cristallines des acides carboxyliques sous forme de dimères cycliques stabilisés par deux liaisons hydrogène intermoléculaires (Figure 161).[131]

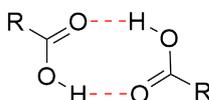


FIGURE 161 – Dimère cyclique d'acide carboxylique

D'autres structures cristallines, appelées catémères, peuvent aussi être rencontrées chez les acides carboxyliques. Ce terme fut introduit par Berney en 1973 pour décrire des chaînes moléculaires dont les membres sont liés par une relation de symétrie autre que la translation.[132] En pratique, chaque acide carboxylique participant au catémère est lié à deux voisins par deux liaisons hydrogène.

Les catémères peuvent être issus d'enchaînements de conformères *syn-syn*, *anti-anti* ou *syn-anti* (Figure 162), bien que ces deux derniers cas soient rares en raison de la présence du conformère *anti*.

A.1.2 Facteurs influençant la formation de catémères

L'étude cristallographique de séries d'acides carboxyliques permet de rationaliser la formation de catémères et les facteurs la favorisant. En particulier, la série des acides carboxyliques à chaîne aliphatique linéaire saturée nous permet de déduire certaines caractéristiques clés. Dans la littérature, trois facteurs sont généralement cités comme nécessaires à la formation de catémères :

1. Présence d'une fonction acide carboxylique

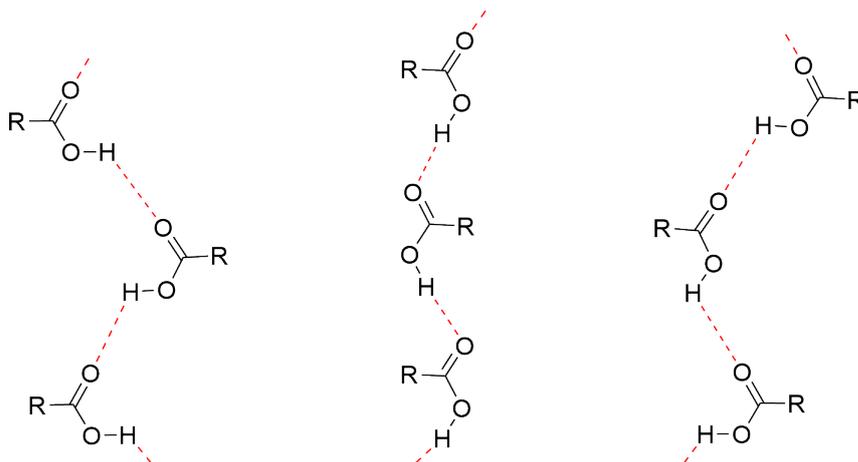


FIGURE 162 – Les différents types de catémères
De gauche à droite : *syn-syn*, *anti-anti*, *syn-anti*.^[133]

2. Présence d'un H ou CH₂ en α du carbone de l'acide
3. Encombrement stérique de la chaîne latérale faible

La fonction acide permet l'enchaînement de liaisons hydrogène à la base du catémère. Le H ou CH₂ en α interagit avec l'oxygène de la liaison C=O d'une molécule adjacente. Bien que la portée de cette interaction soit dans la gamme des liaisons hydrogène de basse énergie (entre 2,2 et 3,2 Å), il est difficile de la qualifier comme telle en raison du faible caractère donneur de l'atome de carbone en α de la liaison C=O.^[134] Elle permet de recréer partiellement le dimère cyclique observé habituellement dans les cristaux d'acides carboxyliques. Enfin, l'encombrement stérique faible de la chaîne aliphatique permet d'éviter la déstabilisation des chaînes adjacentes par contacts stériques défavorables.

Ainsi, les acides formique et acétique forment des catémères *syn-syn* (Figure 163).^[135, 136]

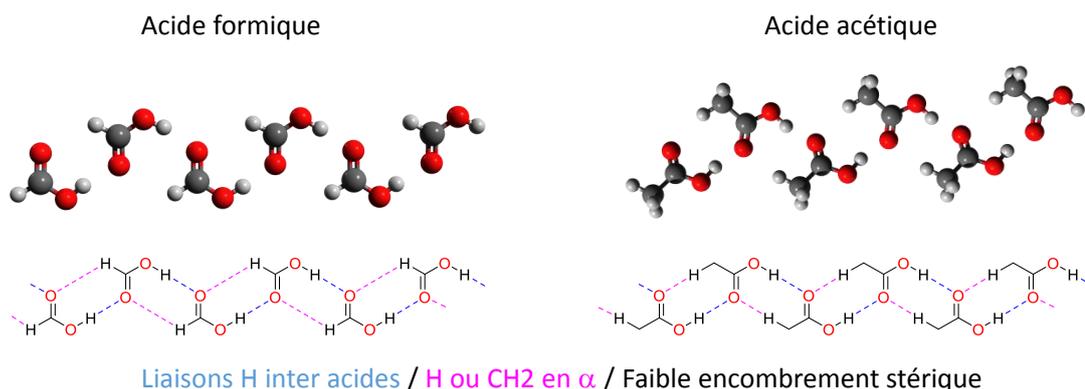


FIGURE 163 – Structure catémère des acides formique et acétique

En revanche, les acides propionique et supérieurs ne forment qu'un dimère cyclique. Ceux-ci ont bien un CH₂ en α de leur fonction acide, mais l'encombrement stérique de leur chaîne ne permet pas la formation de catémères.^[137]

A.1.3 Dérivés d'adamantane

L'oxydation spontanée de l'adamantane acétaldéhyde par l'air nous a permis d'obtenir des cristaux de l'acide correspondant. Ceux-ci s'arrangent de manière particulière, pour former des catémères *syn-syn* (Figure 164).

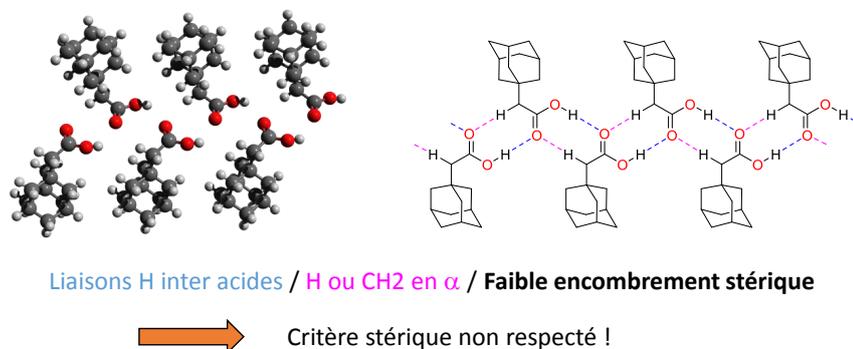


FIGURE 164 – Catémère de l'adamantane acétique

On observe comme précédemment les interactions communes aux catémères : liaisons hydrogène CO...HO et interactions CO...CH₂. Cependant, le critère stérique n'est pas rempli ici, l'adamantane étant plus volumineux que l'acide propionique qui cristallise déjà sous forme de dimère.

Afin de comprendre le phénomène mis en jeu, nous avons décidé d'étudier les modes de cristallisation d'analogues de notre molécules. L'acide adamantanoïque, qui ne possède pas de CH₂ en α de sa fonction acide, cristallise sous forme de dimère cyclique. De même, l'acide adamantane propionique, possédant un CH₂ de plus entre l'adamantane et la fonction acide, cristallise sous forme de dimère cyclique (Figure 165).

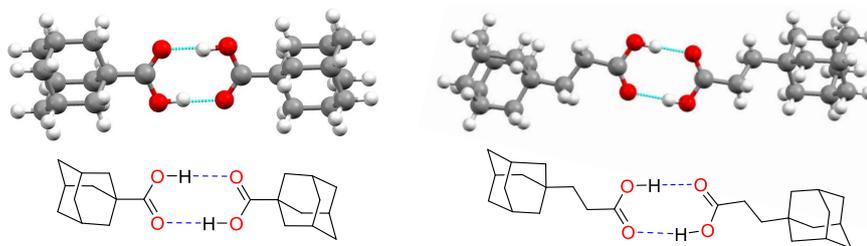


FIGURE 165 – Dimères cycliques de l'acide adamantanoïque et de l'acide adamantane propionique

Ainsi, la présence du CH₂ en α de la fonction acide semble nécessaire mais pas suffisante, car la formation du catémère ne résiste pas à l'allongement de la chaîne. En observant attentivement la structure des catémères d'acide adamantane acétique, il est possible de distinguer une troisième interaction expliquant sa formation. En effet, de nombreux contacts C-H inter-chaînes sont visibles, par l'intermédiaires d'adamantanes. Ceux-ci adoptent une conformation particulière qui donne une structure en quinconce, où la géométrie favorise les interactions de Van der Waals. Deux conformères de l'acide adamantane acétique sont visibles dans la structure (Figure 166).

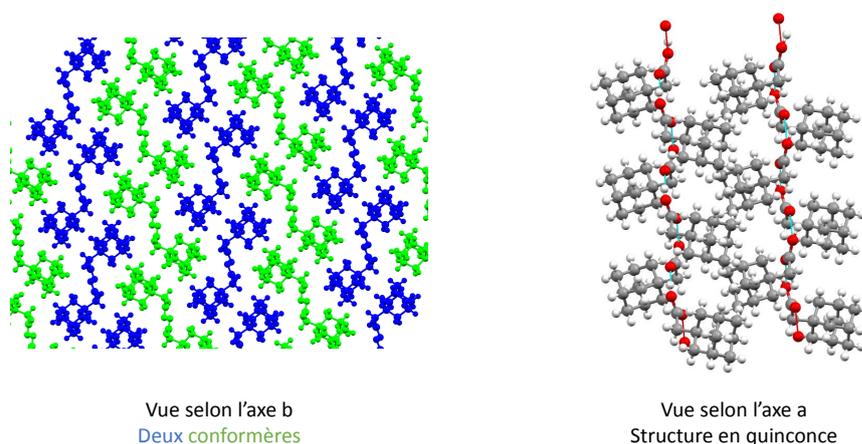


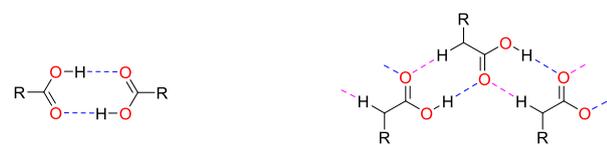
FIGURE 166 – Chaînes catémères formées et interactions entre adamantanes

Ces interactions de Van der Waals sont relativement fortes en raison de leur additivité et de la haute densité électronique de l'adamantane qui permet une grande polarisabilité des liaisons C-H.

Le nombre de positions accessibles à l'adamantane est ici restreint : deux rotations sont à prendre en compte. L'une peut se faire le long de l'axe $C_{Ad}-CH_2$ et l'autre de l'axe CH_2-COOH . La première rotation aboutit à des formes dégénérées en raison de la symétrie C_3 de l'adamantane. Les degrés de liberté de l'adamantane sont donc limités avec cette structure, ce qui peut expliquer la convergence de formes stables pouvant mener à la formation de catémères. Ce n'est pas le cas pour l'acide adamantane propanoïque, où l'ajout d'une liaison, en augmentant les degrés de liberté de l'adamantane, rend l'arrangement propice à la formation d'un catémère trop coûteux en énergie.

Dans le cas de l'acide propanoïque, les degrés de liberté sont aussi restreints que pour l'acide adamantane acétique. En revanche, la longueur de la chaîne aliphatique ne semble pas permettre des interactions de type Van der Waals assez favorables pour former le catémère. De plus, il est décrit que les alcanes branchés interagissent plus fortement que les linéaires par le biais de forces de Van der Waals.[138] L'augmentation de la taille de la chaîne pour les acides carboxyliques aliphatiques entraîne l'augmentation des interactions de Van der Waals, mais elle est couplée à une augmentation des degrés de liberté de celle-ci. Le coût entropique est en général trop élevé pour stabiliser la chaîne par la formation de catémères, d'où une cristallisation sous forme de dimère cyclique (Figure 167).

Au contraire, l'adamantane est l'équivalent d'un alcane super-branché, qui multiplie les interactions de Van der Waals sans augmenter les degrés de liberté en raison de la présence d'un axe de symétrie dans sa structure. La structure catémère obtenue avec l'acide adamantane acétique correspond à une fenêtre réduite énergétique, où les multiples interactions de Van der Waals et la symétrie de l'adamantane permettent de compenser la perte entropique liée à la formation de la chaîne catémère. Ces interactions ne se substituent pas à celles présentes habituellement dans les catémères, et notamment à la présence d'un CH_2 en α du $COOH$. On peut donc considérer qu'elles représentent une interaction tertiaire, de plus faible énergie, mais indispensable à la stabilisation des chaînes.



R =	CH ₃ CH ₂	Ad	AdCH ₂ CH ₂	AdCH ₂	CH ₃
COOH	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
CH ₂ en α	Oui	Non	Oui	Oui	Oui
Interactions supplémentaires	VdW faible Peu de DDL	x	VdW fort Nombreux DDL	VdW fort Peu de DDL	Electrostatique Peu de DDL

FIGURE 167 – Tableau des structures décrites et de leurs modes de cristallisation (les interactions supplémentaires des acides formique et acétique sont détaillées ci-dessous).

DDL : Degrés de liberté

Nous avons donc mis en évidence que le critère stérique ne semble pas le plus pertinent pour prédire la formation d'un catémère. En revanche, la présence d'interactions stabilisantes inter-chaînes semble se retrouver dans les exemples précédemment cités. Ainsi, il y a dans la structure catémère de l'acide formique de nombreux contacts C...O et dans celle de l'acide acétique des contacts CH...O stabilisants, qui pourraient assister la formation du catémère (Figure 168).

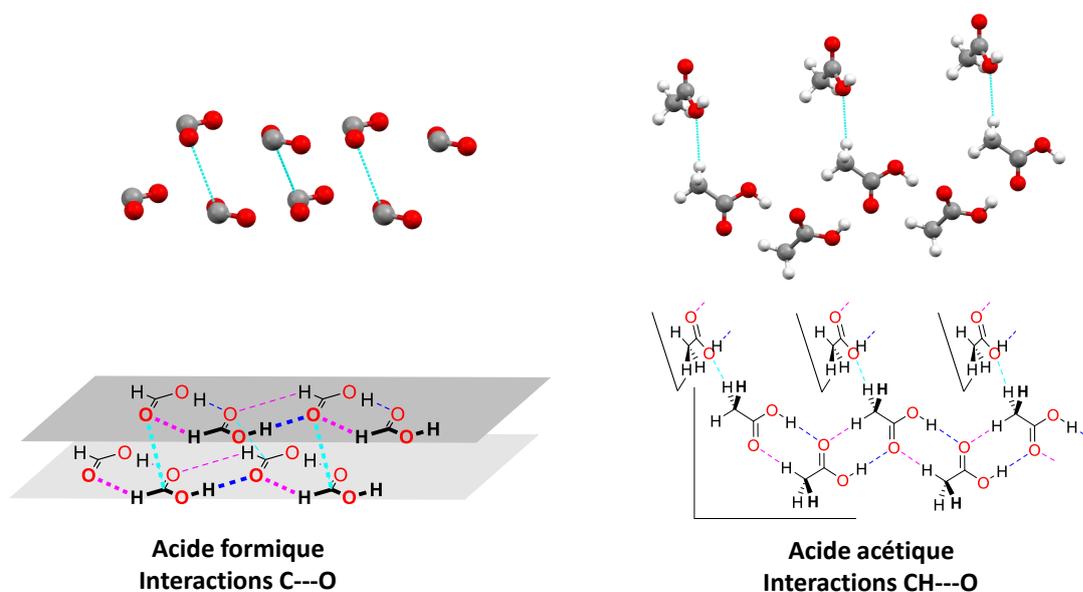
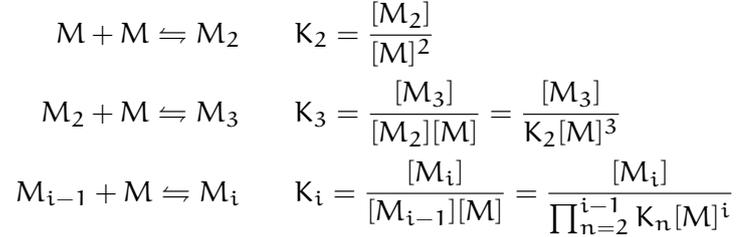


FIGURE 168 – Interactions tertiaires visibles entre les chaînes catémères des acides formique et acétique.

A.2 MODÈLE ISODESMIQUE

Nous allons ici voir comment on peut approcher le degré de polymérisation (D_p) d'un polymère supramoléculaire dans le cadre du modèle isodesmique. On notera M le monomère pouvant s'associer.



On introduit C_{tot} , la concentration totale en M à $t=0$:

$$\begin{aligned} C_{\text{tot}} &= [M]_0 = [M] + 2[M_2] + 3[M_3] + \dots \\ &= [M](1 + 2K_2[M] + 3K_2K_3[M]^2 + \dots) \\ &= [M](1 + \sum_{k=2}^{\infty} k[M]^{k-1} \prod_{n=2}^k K_n) \end{aligned}$$

On définit α_i , la fraction molaire pondérée en i -mère :

$$\alpha_i = \frac{i[M_i]}{C_{\text{tot}}}$$

Dans le cadre du modèle isodesmique, toutes les constantes d'équilibre sont égales. On introduit

$$\begin{aligned} x &= K[M] \\ L &= KC_{\text{tot}} \end{aligned}$$

On a donc

$$\begin{aligned} C_{\text{tot}} &= [M](1 + \sum_{k=2}^{\infty} k[M]^{k-1} \prod_{n=2}^k K_n) \\ L &= [M]K(1 + \sum_{k=2}^{\infty} k[M]^{k-1} K^{k-1}) \\ &= x(1 + \sum_{k=2}^{\infty} kx^{k-1}) \end{aligned}$$

Dans les systèmes étudiés, on a $x \ll 1$. Or dans ce cas on a

$$(1-x)^{-2} \stackrel{\text{D.L.}}{=} 1 + \sum_{k=2}^{\infty} kx^{k-1}$$

d'où

$$\begin{aligned} L &= \frac{x}{(1-x)^2} \\ x &= \frac{2L + 1 - \sqrt{4L + 1}}{2L} \end{aligned}$$

On peut alors exprimer α en fonction de L :

$$\begin{aligned}\alpha &= \frac{[M]}{C_{\text{tot}}} \\ &= \frac{x}{L} \\ &= (1-x)^2 \\ &= (1-\alpha L)^2\end{aligned}$$

d'où

$$\alpha = \frac{2L+1-\sqrt{4L+1}}{2L^2}$$

On a

$$\begin{aligned}\alpha_i &= \frac{i[M]^i K^{i-1}}{C_{\text{tot}}} \\ &= i\alpha x^{i-1} \\ &= i\alpha^i L^{i-1} \\ &= i \left(\frac{2L+1-\sqrt{4L+1}}{2L^2} \right)^i L^{i-1}\end{aligned}$$

La degré de polymérisation D_p correspond à la valeur de i pour laquelle α_i est maximum à K et C_{tot} fixés. Le maximum de cette fonction correspond à la valeur de i pour laquelle sa dérivée est nulle. On notera cette valeur i_{max} . Après calcul analytique, on trouve

$$i_{\text{max}} = \frac{1}{\ln(L) - \ln(2L+1-\sqrt{4L+1}) - \ln(2)}$$

On a donc exprimé D_p en fonction de $L = KC_{\text{tot}}$. Il est possible de simplifier cette expression. Pour $L \gg 1$, on a :

$$\begin{aligned}\ln(L) - \ln(2L+1-\sqrt{4L+1}) - \ln(2) &\simeq \ln(L) - \ln(2L-2\sqrt{L}) - \ln(2) \\ &= \ln(L) - \ln(2) - \ln(L-\sqrt{L}) + \ln(2) \\ &= -\ln\left(1 - \frac{1}{\sqrt{L}}\right)\end{aligned}$$

Or, si $L \gg 1$, on a $L^{-\frac{1}{2}} \ll 1$, d'où

$$\begin{aligned}D_p &\simeq \left(-\ln\left(1 - \frac{1}{\sqrt{L}}\right)\right)^{-1} \\ &\simeq (L^{-\frac{1}{2}})^{-1} \\ &\simeq \sqrt{KC_{\text{tot}}}\end{aligned}$$

Si on trace cette courbe approchée et la courbe exacte, on voit que l'approximation faite est valide.

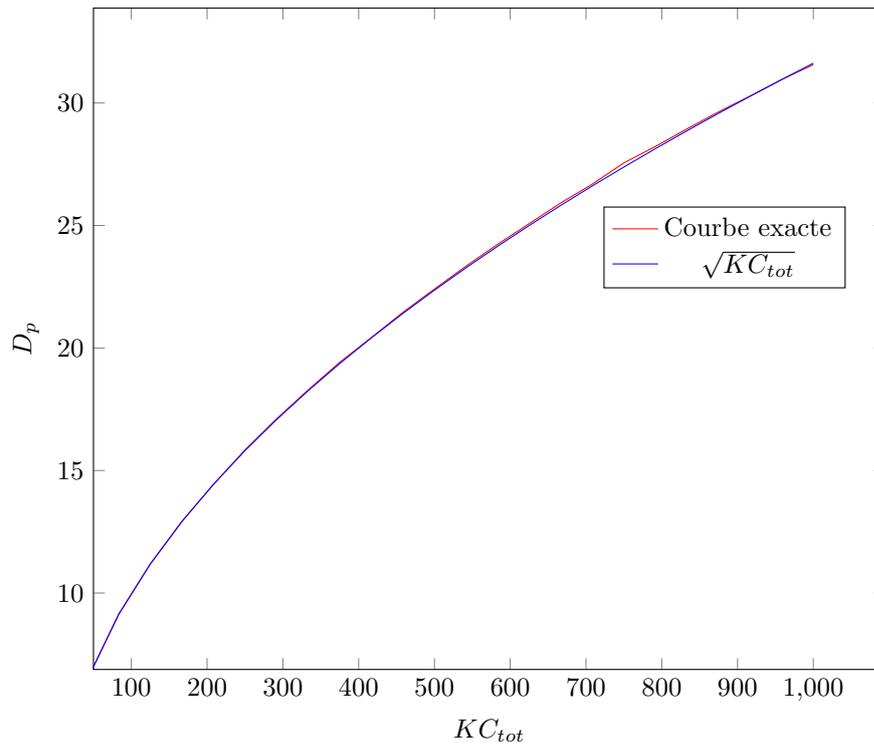


FIGURE 169 – Comparaison des courbes

A.3 CONDENSATION DE CONTRE-IONS

Afin de comprendre la compaction de l'ADN au niveau moléculaire, il est nécessaire de comprendre comment des polyélectrolytes interagissent dans un milieu donné. Cela correspond à la théorie de Debye-Hückel avec certaines modifications : cette théorie ne concerne que l'interaction entre des ions considérés comme des charges ponctuelles dans un milieu donné. Ici, l'ADN est un polymère de densité de charge donnée, qu'on peut assimiler à un cylindre, ce qui change drastiquement la manière dont il interagit avec les ions présents dans le milieu.

La théorie de Manning-Oosawa concerne l'interaction entre les ions du milieu et une chaîne polyélectrolytique hautement chargée (CPHC). En particulier, elle démontre que, contrairement à une solution d'électrolytes où la distribution des différents ions est homogène dans le milieu, une solution contenant une CPHC aura une distribution d'ions inhomogène car certains vont se placer à la surface de la CPHC. Ce phénomène est appelé condensation des contre-ions et dépend de la densité de charge de la CPHC. Il résulte d'une compétition entre enthalpie et entropie des contre-ions en solution. La condensation de ces contre-ions à la surface de la CPHC diminue le potentiel électrostatique de celle-ci. Par contre, il faut payer un coût entropique.

Plus précisément, dans le cadre de cette théorie, il nous faut introduire la longueur de Bjerrum l_B qui caractérise la distance à laquelle l'énergie d'interaction entre deux charges ponctuelles est égale à l'énergie thermique du milieu :

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon k_B T}$$

avec

- e charge élémentaire
- ϵ_0 permittivité du vide
- ϵ constante diélectrique du milieu
- k_B constante de Boltzmann
- T température

Pour l'eau, à 25 °C, on a $l_B = 0,7$ nm. Par définition, une CPHC doit avoir une distance intercharge b inférieure à l_B . Dans le cas de l'ADN, comme vu précédemment, cette distance intercharge est de 0,17 nm. Ainsi, l'ADN est bien une CPHC et on peut lui appliquer la théorie de Manning-Oosawa pour la condensation des contre-ions.

Celle-ci prédit que les contre-ions vont se condenser sur la CPHC jusqu'à ce que la grandeur ξ définie comme :

$$\xi = \frac{l_B}{b}$$

soit égale à $1/|z_i|$ où z_i est la charge du contre-ion se condensant sur l'ADN. Expérimentalement, on observe la compaction de l'ADN à partir du moment où le taux de neutralisation de la chaîne θ défini par :

$$\theta = 1 - \frac{b}{z_i l_B}$$

est supérieur ou égal à 0,89. Pour l'ADN dans l'eau pure, cela impose $z_i \geq 3$. En théorie, la compaction par un cation ne peut donc se faire que si sa charge est de 3 ou plus (en l'absence d'interactions favorables inter-cations).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BARBEROGLOU, M. *SPIE* **2009**.
- (2) SCHOLTHOF, K.-B. G. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2004**, *42*, 13–34.
- (3) KLUG, A. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1983**, *22*, 565–582.
- (4) NAMBA, K. ; PATTANAYEK, R. ; STUBBS, G. J. *Mol. Biol.* **1989**, *208*, 307–325.
- (5) ZIMMERN, D. *Cell* **1977**, *11*, 463–482.
- (6) NISHIO, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13873.
- (7) UMEZAWA, Y. ; NISHIO, M. *Bioorgan. Med. Chem.* **1998**, *6*, 493–504.
- (8) GALLIE, D. R. ; PLASKITT, K. A. ; MICHAEL, T. ; WILSON, A. *Virology* **1987**, *158*, 473–476.
- (9) CASPAR, D. *eng Adv. Protein Chem.* **1963**, *18*, 37–121.
- (10) VILLIERS, A. C. R. *Acad. Sci* **1891**, *112*, 536.
- (11) CRINI, G. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975.
- (12) VALLE, E. D. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046.
- (13) SZEJTLI, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1754.
- (14) NAIDOO, K. J. ; CHEN, J. Y.-J. ; JANSSON, J. L. M. ; WIDMARM, G. ; MALINIAK, A. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 4236–4238.
- (15) CRAMER, F. ; SAENGER, W. ; SPATZ, H.-C. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 14–20.
- (16) SAKURAI, M. ; KITAGAWA, M. ; HOSHI, H. ; INOUE, Y. ; CHÛJÔ, R. *Carbohydr. Res.* **1990**, *198*, 181–191.
- (17) CONNORS, K. A. ; LIN, S.-F. ; WONG, A. B. *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 217–222.
- (18) GUO, Q.-X. ; LUO, S.-H. ; LIU, Y.-C. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, *30*, 173–182.
- (19) ISRAELACHVILI, J. N., *Intermolecular and Surface Forces* ; Elsevier LTD, Oxford : 2011.
- (20) SHEN, X. ; BELLETÈTE, M. ; DUROCHER, G. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *298*, 201–210.
- (21) Van HELDEN, S. P. ; van DROOGE, M. J. ; CLAESSENS, A. J. ; JANSSEN, A. C. ; JANSSEN, L. H. *Carbohydr. Res.* **1991**, *215*, 251–260.
- (22) BIWER, A. ; ANTRANIKIAN, G. ; HEINZLE, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 609–617.
- (23) CARRIER, R. L. ; MILLER, L. A. ; AHMED, I. J. *Controlled Release* **2007**, *123*, 78–99.
- (24) DAVIS, M. E. ; BREWSTER, M. E. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 1023–1035.
- (25) RONG, D. ; D'SOUZA, V. T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4275–4278.
- (26) MURAKAMI, T. ; HARATA, K. ; MORIMOTO, S. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 321–324.
- (27) TERANISHI, K. ; WATANABE, K. ; HISAMATSU, M. ; YAMADA, T. *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 489–494.

- (28) KHAN, A. R. ; FORGO, P. ; STINE, K. J. ; D'SOUZA, V. T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977–1996.
- (29) UENO, A. ; BRESLOW, R. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3451–3454.
- (30) IKEDA, H. ; NAGANO, Y. ; qun DU, Y. ; IKEDA, T. ; TODA, F. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5045–5048.
- (31) AKKAYA, E. U. ; CZARNIK, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8553–8554.
- (32) TAKAHASHI, K. ; HATTORI, K. ; TODA, F. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3331–3334.
- (33) MELTON, L. ; SLESSOR, K. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 29–37.
- (34) HANESSIAN, S. ; BENALIL, A. ; LAFERRIERE, C. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4786–4797.
- (35) CORNWELL, M. J. ; HUFF, J. B. ; BIENIARZ, C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8371–8374.
- (36) FUJITA, K. ; ISHIZU, T. ; OSHIRO, K. ; ichi OBE, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 2960–2962.
- (37) FUJITA, K. ; NAGAMURA, S. ; IMOTO, T. ; TAHARA, T. ; KOGA, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3233–3235.
- (38) FUJITA, K. ; TAHARA, T. ; IMOTO, T. ; KOGA, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2030–2034.
- (39) TABUSHI, I. ; YAMAMURA, K. ; NABESHIMA, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5267–5270.
- (40) BRESLOW, R. ; CANARY, J. W. ; VARNEY, M. ; WADDELL, S. T. ; YANG, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5212–5219.
- (41) VENEMA, F. ; BASELIER, C. M. ; van DIENST, E. ; RUËL, B. H. ; FEITERS, M. C. ; ENGBERSEN, J. F. ; REINHOUDT, D. N. ; NOLTE, R. J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1773–1776.
- (42) Van DIENST, E. ; SNELLINK, B. H. M. ; von PIEKARTZ, I. ; GANSEY, M. H. B. G. ; VENEMA, F. ; FEITERS, M. C. ; NOLTE, R. J. M. ; ENGBERSEN, J. F. J. ; REINHOUDT, D. N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6537–6545.
- (43) SAKAIRI, N. ; KUZUHARA, H. ; OKAMOTO, T. ; YAJIMA, M. *eng Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 2187–2192.
- (44) TAKEO, K. ; UERAURA, K. ; MITOH, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 293–308.
- (45) PEARCE, A. ; SINAÏ, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610–3612.
- (46) LECOURT, T. ; HERAULT, A. ; PEARCE, A. J. ; SOLLOGOUB, M. ; SINAÏ, P. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2960–2971.
- (47) ARMSPACH, D. ; MATT, D. *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 129–133.
- (48) WANG, B. ; ZABOROVA, E. ; GUIEU, S. ; PETRILLO, M. ; GUITET, M. ; BLÉRIOT, Y. ; MÉNAND, M. ; ZHANG, Y. ; SOLLOGOUB, M. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5354.
- (49) KOTERA, M. ; LEHN, J.-M. ; VIGNERON, J.-P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 197.
- (50) KRIEG, E. ; BASTINGS, M. M. C. ; BESENIUS, P. ; RYBTCHINSKI, B. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2414–2477.

- (51) HUNTER, C. A. ; ANDERSON, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488–7499.
- (52) ERCOLANI, G. ; SCHIAFFINO, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1762–1768.
- (53) MENUÉL, S. ; AZAROUAL, N. ; LANDY, D. ; SIX, N. ; HAPIOT, F. ; MONFLIER, E. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3949–3955.
- (54) TRAN, D. N. et al. *Org. Chem. Front.* **2014**, *1*, 703.
- (55) HE, Y. ; FU, P. ; SHEN, X. ; GAO, H. *Micron* **2008**, *39*, 495–516.
- (56) GONZÁLEZ-GAITANO, G. ; RODRÍGUEZ, P. ; ISASI, J. R. ; FUENTES, M. ; TARDAJOS, G. ; SÁNCHEZ, M. J. *Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2002**, *44*, 101–105.
- (57) CLARIDGE, T. D. W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* ; Elsevier LTD, Oxford : 2008.
- (58) *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* ; Wiley-VCH : 2012.
- (59) MCALPINE, S. R. ; GARCIA-GARIBAY, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4269–4275.
- (60) MIRZOIAN, A. ; KAIFER, A. E. *Chem. Commun.* **1999**, 1603–1604.
- (61) HARADA, A. ; KAWAGUCHI, Y. ; HOSHINO, T. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *41*, 115–121.
- (62) MIYAUCHI, M. ; KAWAGUCHI, Y. ; HARADA, A. *J. Inclusion Phenom.* **2004**, *50*, 57–62.
- (63) MIYAUCHI, M. ; TAKASHIMA, Y. ; YAMAGUCHI, H. ; HARADA, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2984–2989.
- (64) YAMAUCHI, K. ; TAKASHIMA, Y. ; HASHIDZUME, A. ; YAMAGUCHI, H. ; HARADA, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5024–5025.
- (65) BENKOVICS, G. ; HODEK, O. ; HAVLIKOVA, M. ; BOSAKOVA, Z. ; COUFAL, P. ; MALANGA, M. ; FENYVESI, E. ; DARCSI, A. ; BENI, S. ; JINDRICH, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 97–109.
- (66) TELLINI, V. H. S. ; JOVER, A. ; GALANTINI, L. ; MEIJIDE, F. ; TATO, J. V. *Acta Crystallogr Sect B* **2004**, *60*, 204–210.
- (67) MAY, B. L. ; CLEMENTS, P. ; TSANAKTSIDIS, J. ; EASTON, C. J. ; LINCOLN, S. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 463–469.
- (68) PANOVA, I. G. ; TOPCHIEVA, I. N. *Polym. Sci. Ser. A* **2006**, *48*, 1015–1021.
- (69) MUNTEANU, M. ; CHOI, S. ; RITTER, H. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **2008**, *62*, 197–202.
- (70) DENG, W. ; YAMAGUCHI, H. ; TAKASHIMA, Y. ; HARADA, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5144–5147.
- (71) MIYAUCHI, M. ; HARADA, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11418–11419.
- (72) MIYAUCHI, M. ; HOSHINO, T. ; YAMAGUCHI, H. ; KAMITORI, S. ; HARADA, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2034–2035.
- (73) REKHARSKY, M. V. ; INOUE, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918.
- (74) BISTRÍ-ASLANOFF, O. ; BLÉRIOT, Y. ; AUZELY-VELTY, R. ; SOLLOGOUB, M. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3437.

- (75) COUTURIER, M. ; TUCKER, J. L. ; ANDRESEN, B. M. ; DUBÉ, P. ; NEGRI, J. T. *Org. Lett.* **2001**, 3, PMID : 11428040, 465–467.
- (76) THORDARSON, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1305–1323.
- (77) TORRE, J. G. D. L. ; MARTINEZ, M. C. L. ; TIRADO, M. M. *Biopolymers* **1984**, 23, 611–615.
- (78) MILLER, A. D. ; TANNER, J., *Essentials of Chemical Biology : Structure and Dynamics of Biological Macromolecules* ; JOHN WILEY & SONS INC : 2008.
- (79) WATSON, J. D. ; CRICK, F. H. C. *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- (80) LUIJSTERBURG, M. S. ; WHITE, M. F. ; van DRIEL, R. ; DAME, R. T. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 43, 393–418.
- (81) ZIMMERMAN, S. B. ; MINTON, A. P. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, 22, 27–65.
- (82) ELLIS, R. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 597–604.
- (83) ZIMMERMAN, S. B. ; MURPHY, L. D. *FEBS Letters* **1996**, 390, 245–248.
- (84) LEWIN, B., *Genes VIII*, déc. 2003.
- (85) TURNER, B. M. *Nat. Cell Biol.* **2007**, 9, 2–6.
- (86) IROBALIEVA, R. N. et al. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8440.
- (87) LAL, A. ; DHAR, A. ; TROSTEL, A. ; KOUZINE, F. ; SESHASAYEE, A. S. N. ; ADHYA, S. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 11055.
- (88) EVILEVITCH, A. ; LAVELLE, L. ; KNOBLER, C. M. ; RASPAUD, E. ; GELBART, W. M. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9292–9295.
- (89) SÃO-JOSÉ, C. ; de FRUTOS, M. ; RASPAUD, E. ; SANTOS, M. A. ; TAVARES, P. J. *Mol. Biol.* **2007**, 374, 346–355.
- (90) BALHORN, R. *Genome Biol.* **2007**, 8, 227.
- (91) MANNING, G. S. *J. Chem. Phys.* **1969**, 51, 924.
- (92) OOSAWA, F. *Biopolymers* **1970**, 9, 677–688.
- (93) ESTÉVEZ-TORRES, A. ; BAIGL, D. *Soft Matter* **2011**, 7, 6746.
- (94) DENG, H. ; BLOOMFIELD, V. A. *Biophys. J.* **1999**, 77, 1556–1561.
- (95) MOURTZIS, N. ; ELIADOU, K. ; AGGELIDOU, C. ; SOPHIANOPOULOU, V. ; MAVRIDIS, I. M. ; YANNAKOPOULOU, K. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 125–131.
- (96) YOSHIKAWA, K. ; TAKAHASHI, M. ; VASILEVSKAYA, V. V. ; KHOKHLOV, A. R. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 76, 3029–3031.
- (97) BAIGL, D. ; YOSHIKAWA, K. *Biophys. J.* **2005**, 88, 3486–3493.
- (98) OLINS, D. E. ; OLINS, A. L. *J. Mol. Biol.* **1971**, 57, 437–455.
- (99) YOSHIKAWA, Y. ; YOSHIKAWA, K. *FEBS Letters* **1995**, 361, 277–281.
- (100) KE, C.-F. ; HOU, S. ; ZHANG, H.-Y. ; LIU, Y. ; YANG, K. ; FENG, X.-Z. *Chem. Commun.* **2007**, 3374.
- (101) LIU, Y. ; YU, L. ; CHEN, Y. ; ZHAO, Y.-L. ; YANG, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10656–10657.

- (102) LIU, Y.; YU, Z.-L.; ZHANG, Y.-M.; GUO, D.-S.; LIU, Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10431–10439.
- (103) BENNEVAULT-CELTON, V.; URBACH, A.; MARTIN, O.; PICHON, C.; GUÉGAN, P.; MIDOUX, P. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2404–2414.
- (104) GALLEGO-YERGA, L.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. J.; MAYORDOMO, N.; SANTOYO-GONZÁLEZ, F.; BENITO, J. M.; MELLET, C. O.; MENDICUTI, F.; FERNÁNDEZ, J. M. G. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6622–6627.
- (105) GALLEGO-YERGA, L.; BLANCO-FERNÁNDEZ, L.; URBIOLA, K.; CARMONA, T.; MARCELO, G.; BENITO, J. M.; MENDICUTI, F.; de ILARDUYA, C. T.; MELLET, C. O.; FERNÁNDEZ, J. M. G. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12093–12104.
- (106) LERMAN, L. S. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1886–1890.
- (107) EVDOKIMOV, Y.; PLATONOV, A.; TIKHONENKO, A.; VARSHAVSKY, Y. *FEBS Letters* **1972**, *23*, 180–184.
- (108) HOU, S.; TROCHIMCZYK, P.; SUN, L.; WISNIEWSKA, A.; KALWARCZYK, T.; ZHANG, X.; WIELGUS-KUTROWSKA, B.; BZOWSKA, A.; HOLYST, R. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22033.
- (109) MEL'NIKOV, S. M.; SERGEYEV, V. G.; YOSHIKAWA, K. J. *Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2401–2408.
- (110) HAYAKAWA, K.; SANTERRE, J.; KWAK, J. C. *Biophys. Chem.* **1983**, *17*, 175–181.
- (111) MÉNDEZ-ARDOY, A.; GÓMEZ-GARCÍA, M.; MELLET, C. O.; SEVILLANO, N.; GIRÓN, M. D.; SALTO, R.; SANTOYO-GONZÁLEZ, F.; FERNÁNDEZ, J. M. G. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681.
- (112) SAENGER, W.; JACOB, J.; GESSLER, K.; STEINER, T.; HOFFMANN, D.; SANBE, H.; KOIZUMI, K.; SMITH, S. M.; TAKAHA, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1787–1802.
- (113) YIN, H.; KANASTY, R. L.; ELTOUKHY, A. A.; VEGAS, A. J.; DORKIN, J. R.; ANDERSON, D. G. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555.
- (114) ABDELHADY, H. G. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4001–4005.
- (115) SASAKI, A.; KINJO, M. in *Gene Therapy Applications*.
- (116) MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259–302.
- (117) OHKUMA, S.; POOLE, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 3327–3331.
- (118) VARKOUHI, A. K.; SCHOLTE, M.; STORM, G.; HAISMA, H. J. *J. Controlled Release* **2011**, *151*, 220–228.
- (119) LIANG, W.; LAM, J. K. W. in *Molecular Regulation of Endocytosis*.
- (120) BONSTED, A.; WAGNER, E.; PRASMICKAITE, L.; HØGSET, A.; BERG, K. in *Gene Therapy Protocols*, p. 171–181.
- (121) LV, H.; ZHANG, S.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100–109.
- (122) PETERSEN, H.; FECHNER, P. M.; MARTIN, A. L.; KUNATH, K.; STOLNIK, S.; ROBERTS, C. J.; FISCHER, D.; DAVIES, M. C.; KISSEL, T. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 845–854.
- (123) GONZALEZ, H.; HWANG, S. J.; DAVIS, M. E. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1068–1074.

- (124) MISHRA, S *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 97–111.
- (125) BELLOCQ, N. C.; PUN, S. H.; JENSEN, G. S.; DAVIS, M. E. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1122–1132.
- (126) ARIMA, H.; KIHARA, F.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 476–484.
- (127) MELLET, C. O.; FERNÁNDEZ, J. M. G.; BENITO, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1586–1608.
- (128) TOORU OOYA, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3852–3853.
- (129) DÁAZ-MOSCOSO, A. et al. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871–12888.
- (130) SCHUMACHER, M. A.; GOODMAN, R. H.; BRENNAN, R. G. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35242–35247.
- (131) LEISEROWITZ, L. *Acta Crystallogr. B* **1976**, *32*, 775–802.
- (132) BERNEY, C. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 708–716.
- (133) KUDUVA, S. S.; CRAIG, D. C.; NANGIA, A.; DESIRAJU, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1936–1944.
- (134) STEED, J. W.; ATWOOD, J. L., *Supramolecular Chemistry*; Wiley-Blackwell : 2009.
- (135) HOLTZBERG, F.; POST, B.; FANKUCHEN, I. *Acta Crystallogr.* **1953**, *6*, 127–130.
- (136) JÖNSSON, P.-G. *Acta Crystallogr. B* **1971**, *27*, 893–898.
- (137) STRIETER, F. J.; TEMPLETON, D. H.; SCHEUERMAN, R. F.; SASS, R. L. *Acta Crystallogr.* **1962**, *15*, 1233–1239.
- (138) WAGNER, J. P.; SCHREINER, P. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12274–12296.

The scientist has a lot of experience with ignorance and doubt and uncertainty, and this experience is of very great importance, I think. When a scientist doesn't know the answer to a problem, he is ignorant. When he has a hunch as to what the result is, he is uncertain. And when he is pretty darn sure of what the result is going to be, he is still in some doubt. We have found it of paramount importance that in order to progress we must recognize our ignorance and leave room for doubt. Scientific knowledge is a body of statements of varying degrees of certainty — some most unsure, some nearly sure, but none absolutely certain.

Now, we scientists are used to this, and we take it for granted that it is perfectly consistent to be unsure, that it is possible to live and not know. But I don't know whether everyone realizes this is true. Our freedom to doubt was born out of a struggle against authority in the early days of science. It was a very deep and strong struggle : permit us to question — to doubt — to not be sure. I think that it is important that we do not forget this struggle and thus perhaps lose what we have gained.

Richard P. Feynman, *The Value of Science*