



**HAL**  
open science

# Polyrotaxanes de cyclodextrines pour des applications biomédicales

Jérémy Scelle

► **To cite this version:**

Jérémy Scelle. Polyrotaxanes de cyclodextrines pour des applications biomédicales. Chimie thérapeutique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066630 . tel-01629058

**HAL Id: tel-01629058**

**<https://theses.hal.science/tel-01629058>**

Submitted on 6 Nov 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

École doctorale de Chimie Moléculaire Paris Centre – ED 406

*Institut Parisien de Chimie Moléculaire – UMR 8232*

*Équipe Glycochimie Organique Biologique et chimie Supramoléculaire*

## **Polyrotaxanes de Cyclodextrines pour des Applications Biomédicales**

**Par Jérémy Scelle**

**Thèse de Doctorat de Chimie**

Dirigée par : Dr. Guillaume Vives & Pr. Bernold Hasenknopf

Soutenue publiquement le 4 Novembre 2016

Devant un jury composé de :

Mme. Florence	DJÉDAÏNI-PILARD	Professeure – Université de Picardie Jules Verne	Rapporteuse
Mme. Angélique	SOUR	Chargée de recherche – Université de Strasbourg	Rapporteuse
Mme. Clotilde	POLICAR	Professeure – École Normale Supérieure de Paris	Examinatrice
Mme. Jutta	RIEGER	Chargée de recherche – UPMC	Invitée
M. Guillaume	VIVES	Maître de conférences – UPMC	Invité
M. Bernold	HASENKNOPF	Professeur – UPMC	Directeur de thèse





## Remerciements

Nous voilà aux termes d'une aventure qui a duré trois ans ! Je souhaite profiter de cette occasion qui m'est donnée pour remercier publiquement toutes les personnes qui m'ont côtoyé, entouré, encadré, épaulé et porté pendant ces trois années.

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, de m'avoir permis de partager voire de confronter, nos résultats, idées, et approches. Merci à Angélique Sour et Florence Djédaïni-Pilard d'avoir scruté mon manuscrit en détail, pour leurs corrections et leur investissement dans ce travail de rapportrices. Je souhaite particulièrement remercier Clotilde Policar d'avoir accepté de présider ce jury ; cela vient symboliquement clore ma scolarité. Merci à Jutta Rieger pour sa participation à ce jury, pour l'intéressante discussion que nous avons pu partager et pour son regard sur ce projet dont elle est partenaire.

Ce travail étant le fruit de belles collaborations, je souhaite partager le mérite de ces résultats avec Célia Bonnet, Eva Tóth, Grégory Ramniceanu et Bich-Thuy Doan que je remercie pour leur investissement, leur apport significatif aux caractérisations *in vitro* et *in vivo* de nos composés et leur suivi du projet.

J'aimerais aussi adresser mes plus sincères remerciements à mes deux encadrants. Berni, tu es impressionnant ! Par ton envergure et cette barbe que je te jalouse tant, mais surtout par tes qualités humaines. J'ai aimé partager mon point de vue politique, sociétal et mes voyages avec toi. Tu as mentionné des regrets quant à la distance qui s'était installée entre la recherche et toi, je me dois de te rappeler que l'ensemble du concept développé dans cette thèse est le fruit de ta virtuose imagination, que tu as su me suivre par le biais de Guillaume tout au long de ce travail, et que l'idée des phosphates, c'est encore toi ! Je te suis reconnaissant de m'avoir proposé ce financement de thèse à l'issue de mon stage de master et souhaite t'assurer du plaisir que j'ai eu de pouvoir travailler à tes côtés ces trois années durant.

Guillaume, Guigui, tel un coach sportif tu as eu une emprise sur moi indéniable. Mon perfectionnisme associé à ton exigence m'ont fait m'investir considérablement dans ce travail

de thèse, y passer des soirées, des weekends. Je ne regrette absolument pas mon dévouement à ce projet pendant ces trois dernières années et souhaite te remercier d'avoir réussi à faire ressortir de ma personnalité cette rigueur, motivation, et exigence de moi-même. Tu as su t'adapter à mon caractère, partager tes connaissances avec moi. Tu as bien essayé de faire de moi un prodige de *Blender*, ... désolé de te décevoir mais après trois ans je crois pouvoir dire que ce n'est pas pour moi ... J'ai vraiment apprécié pouvoir interagir directement avec toi, partager le bureau (un peu moins le labo, on ne va pas se mentir), et que tu sois autant disponible pour répondre à mes interrogations (à partir de 10h30).

Je voudrais tous les deux vous remercier de m'avoir laissé une grande liberté dans mes démarches et ma gestion du projet, de m'avoir permis d'exposer mes travaux lors de congrès et école d'été et souhaite vous rassurer quant à ma décision de quitter le monde académique : vous n'y êtes pour rien ! Je vous souhaite une très belle continuation et j'espère que vous saurez poursuivre ce projet dans les prochaines années.

À mon arrivée dans l'équipe Supra, j'ai bénéficié d'un cadre de travail excellent avec une ambiance, un dynamisme et une cohésion d'équipe extra'. Je me suis réellement épanoui à vos côtés et je souhaite vous remercier. Valérie pour ton suivi maternel de tous les étudiants. Nathalie, Wilfried, Benjamin, Elodie et Pierre pour tous les bons moments partagés au bureau, au labo, au bar. En particulier, Wilfried je te suis réellement reconnaissant de m'avoir aussi bien formé et transmis tes connaissances sur le projet, j'espère que trois ans plus tard, tu es fier du résultat. Elodie et Benjamin, j'ai été heureux de pouvoir partager mes deux premières années avec vous, vous avez la faculté de travailler sérieusement en chantant du Clo'clo, Balavoine et Cabrel et j'espère que c'est une qualité appréciée des suisses et des australiens. Pierre, un grand merci pour ces presque trois années, j'ai apprécié ta compagnie au bureau et labo (qui sont de suite devenus plus calmes après le départ des deux lurons), j'ai pris plaisir à préparer la fête de la science avec toi, à partager nos idées du monde, et à développer mon humour noir. Je voudrais aussi remercier l'ensemble des stagiaires qui sont passés dans l'équipe, en particulier Lorien et Caroline pour qui j'ai beaucoup d'affection et à qui je souhaite une très belle thèse et beaucoup de réussite. Merci aussi à mes stagiaires, Guillaume, Ghozlane et Margaux de s'être investis sur ce projet, merci pour votre patience à l'égard de mon encadrement et pour votre volonté de toujours bien faire.

À tous ceux qui ont partagé avec moi l'expérience Supra : je vous dis merci, et vous souhaite beaucoup de bonheur pour la suite.

Il y a eu l'avant déménagement et l'après ; je souhaite remercier ici l'ensemble des collègues de l'ex-4<sup>ème</sup> étage du bâtiment F, les équipes E-POM, ERMES et ARC. Merci pour les repas de Noël tous ensemble, les sorties entre doctorants, la fraîcheur des thésards et le rire d'Amina !

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres de l'équipe GOBS qui nous ont chaleureusement accueillis, Berni, Guillaume, et moi au cours de ma thèse. En particulier, je remercie Mickaël Ménand et Matthieu Sollogoub pour leur collaboration sur ce projet. Merci à tous de vous être intéressés aux thématiques que nous développons deux étages plus hauts, de nous avoir transmis votre expertise sur la fonctionnalisation des cyclodextrines et de nous avoir inclus dans la vie de l'équipe. En particulier, je remercie Dmitri pour son dynamisme, Pinglu pour sa bonne humeur et Sha pour sa joie de vivre communicative. Julien, si je ne manquerai pas de te faire un clin d'œil au paragraphe suivant, je voudrais te remercier ici pour ces bons moments passés avec toi, enfermés dans un bureau/sauna tout l'été, une fois sur deux déconnectés du monde. Ta présence et ton tempérament calme m'ont beaucoup aidé à relativiser les différentes vagues de corrections. Je souhaite beaucoup de courage mais surtout de plaisir aux nouveaux étudiants GOBS qui auront le privilège d'être encadré par Guillaume, il est rude mais fondamentalement juste !

Un très grand merci à toute ma famille pour m'avoir soutenu, pour m'avoir offert ce climat serein et reposant et pour tous les bons moments passés avec elle. En particulier, je voudrais remercier mes parents pour les valeurs qu'ils m'ont inculqué et l'amour qu'ils véhiculent autour d'eux. Merci aussi à l'ensemble de la famille d'Alexandra de m'avoir accueilli à bras ouverts, pour sa générosité et sa bienveillance.

J'ai eu la chance d'être soutenu de près par une armée de thésards et avant tout amis pendant ma thèse, je souhaite les remercier pour tout, des plus petites attentions, jusqu'aux voyages de groupe. Merci pour leur générosité, leur joie de vivre et de partager, leurs conseils et leurs trolls. Merci d'avoir tous été là pour moi, de m'avoir coucouné. Pour terminer, je voudrais rendre hommage à mon trépied de choc, celui qui me maintien en équilibre et sans qui, plus d'une fois j'aurais trébuché. Samuel, Boris et Alexandra, vous avez pris soin de moi avant et pendant ma thèse, vous m'apportez un sentiment de plénitude que je ne saurais décrire mais que je tâcherai, pendant ces belles années qui nous attendent, de vous rendre !



## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	13
INTRODUCTION	15
I. Chimie supramoléculaire : des concepts aux architectures complexes	17
1. Interactions, liaisons et effets mis en jeu en chimie supramoléculaire	17
a. Interactions et liaisons faibles	17
b. Effet hydrophobe	19
2. Synthèse des premières architectures supramoléculaires	20
a. Caténanes et nœuds moléculaires	21
b. Rotaxanes	22
II. Polyrotaxanes de cyclodextrines	25
1. Caractéristiques des cyclodextrines	26
2. Voies de synthèse des polyrotaxanes	27
a. Les pionniers dans la synthèse des PR-CDs	28
b. Extension aux différentes CDs	30
III. Applications des polyrotaxanes de cyclodextrines	32
1. Utilisation des PR-CDs comme matériaux	33
a. Les nanotubes de CDs	33
b. Les gels	34
2. Hydrogels à base de PR-CDs	35
a. Hydrogels pour la reconstruction osseuse et cartilagineuse	35
b. Hydrogels pour le relargage de principe actif	37
3. PR-CDs biodégradables pour le transport de principe actif	39
a. Les PR-CDs biodégradables	40
b. Les PR-CDs pour le transport de principe actif	44
c. Les PR-CDs pour la transfection d'ADN	47
4. PR-CDs pour le ciblage (reconnaissance membranaire)	50
5. Des PR-CDs pour l'imagerie aux PR-CDs multimodaux	51
a. PR-CDs pour la microscopie de fluorescence	52
b. PR-CDs comme agents de contraste pour l'IRM	54
6. Conclusion de l'apport des PR-CDs au domaine biomédical	55
IV. Conceptualisation du projet de thèse	56

1. PR-CDs pour l'imagerie bimodale	57
a. Approche synthétique de sondes multimodales	57
b. PR-CDs pour l'imagerie bimodale	58
2. Résultats antérieurs	60
a. Choix de la cyclodextrine	60
b. Choix du polymère	61
3. Perspectives et objectifs de la thèse	63
CHAPITRE 1 : CYCLODEXTRINES FONCTIONNALISEES POUR L'IMAGERIE MEDICALE	65
I. Imagerie médicale	67
1. L'imagerie par résonance magnétique	68
a. Principe de l'IRM	68
b. Les agents de contraste	69
2. La microscopie de fluorescence	74
a. Le principe de la fluorescence	74
b. Les fluorophores organiques	75
c. La microscopie de fluorescence <i>in vivo</i>	78
II. Création d'une bibliothèque de cyclodextrines fonctionnalisées	79
1. Synthèse des cyclodextrines mono- et bis-azoture	79
2. Cyclodextrines fonctionnalisées développées au laboratoire	81
a. CDs fonctionnalisées pour l'IRM	81
b. CDs fonctionnalisées pour la microscopie de fluorescence	83
3. Étude cinétique d'enfilage sur un monomère modèle dicationique	85
III. Étude de nouveaux fluorophores hydrosolubles	88
1. Préparation de cyanines 5 hydrosolubles	88
a. Stratégie de synthèse	88
b. Synthèse de Cy5.5-(SO <sub>3</sub> )	89
c. Synthèse d'une Cy5.5 hydrosoluble	90
d. Synthèse de Cy5-(SO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	94
2. Synthèse des CD-Cyanine 5	96
3. Étude des propriétés optiques des cyanines et CD-Cy	97
4. Étude d'enfilage des cyclodextrines cyanines	99
V. Conclusion	100

CHAPITRE 2 : ROTAXANES ET PPs DE CYCLODEXTRINES POUR L'IMAGERIE MEDICALE	101
I. [3]Rotaxanes fonctionnalisés pour l'IRM	103
1. Synthèse de [3]rotaxanes	104
a. [3]Rotaxane modèle	104
b. [3]Rotaxanes fonctionnalisés	107
c. Caractérisation des rotaxanes par RMN	108
d. Caractérisation des rotaxanes par spectrométrie de masse	109
2. Études des propriétés d'imagerie des agents de contraste	111
a. Étude <i>in vitro</i>	111
b. Étude en imagerie <i>in vivo</i>	113
3. Conclusion	117
II. Pseudopolyrotaxanes fonctionnalisés pour l'imagerie multimodale	118
1. Synthèse des PPRs de CDs fonctionnalisées	118
a. Synthèse de l'axe polymérique	118
b. Synthèse des pseudopolyrotaxanes	119
c. Caractérisation des PPRs	121
2. Étude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des pseudopolyrotaxanes	121
a. Étude <i>in vitro</i> des propriétés optiques	121
b. Mesures de relaxivité <i>in vitro</i> des PPRs	122
c. Étude <i>in vivo</i> des pseudopolyrotaxanes	125
3. Conclusion	128
CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE PSEUDOPOLYROTAXANES POLYANIONIQUES	129
I. Synthèse et étude d'axes modèles diphosphates	132
1. Synthèse des axes modèles phosphatés	132
2. Étude de la formation des complexes d'inclusion en conditions acides	134
a. Ajout dosé de CD sur l'axe C <sub>6</sub> à pH 6	135
b. Ajout dosé de CD sur l'axe C <sub>8</sub> à pH 1	136
c. Étude générale des alcanes diphosphates à pH 1 et 6	138
3. Étude cinétique d'enfilage de CD sur les axes modèles à pH 10	141
a. Étude d'enfilage de CD sur l'axe C <sub>6</sub> à pH 10	141
b. Étude d'enfilage de CD sur l'axe C <sub>10</sub> à pH 10	142
c. Étude générale des axes modèles à pH 10	143
4. Caractérisation des pseudo-[2] / [3]rotaxanes diphosphatés	147
a. Caractérisation du pseudo-[2]rotaxane (C <sub>6</sub> )	148



b. Caractérisation du <i>pseudo</i> -[3]rotaxane (C <sub>8</sub> )	150
c. Caractérisation des <i>pseudo</i> -[3]rotaxanes (C <sub>10</sub> et C <sub>12</sub> )	151
d. Étude des <i>pseudo</i> -[3]rotaxanes par diffraction des rayons X	152
5. Mise à profit des <i>pseudo</i> -bouchons sensibles au pH pour la synthèse de rotaxanes	156
a. Purification des <i>pseudo</i> -[3]rotaxanes	156
b. Synthèse contrôlée de <i>pseudo</i> -[2]rotaxanes	157
c. Caractérisation par RMN DOSY <sup>1</sup> H	159
6. Mise en perspective de l'étude des monomères diphosphates	159
7. Étude préliminaire de <i>pseudo</i> -[n]rotaxane avec l'hexadécane-diphosphate	161
a. Caractérisation par spectrométrie de masse	162
b. Ajout dosé de CD sur l'axe C <sub>16</sub> à pH 6	163
c. Suivi cinétique d'enfilage de CD sur l'axe C <sub>16</sub> à pH 10	165
d. Caractérisation par RMN DOSY <sup>1</sup> H	166
8. Conclusion	167
II. Synthèse de PPRs polyanioniques	168
1. Synthèse du poly(alkylène phosphate)	168
a. Stratégie de synthèse	168
b. Synthèse d'un poly(hexylène phosphite)	168
c. Synthèse du poly(hexylène phosphate)	171
2. Enfilage de CDs sur le polyphosphate	172
a. Ajout dosé de CD sur le polyanion	172
b. Caractérisation RMN du PPR de CD	173
III. Conclusion	175
CHAPITRE 4 : VERS L'AMELIORATION DES SYSTEMES POLYROTAXANES	177
I. <i>Post</i> -fonctionnalisation des PPRs de CDs pour l'imagerie médicale	179
1. PEGylation de <i>pseudopolyrotaxanes</i> de cyclodextrines	179
a. Concept de PEGylation	179
b. Étude préliminaire sur les PPRs	181
2. Ajout d'une cyclodextrine spécifique pour la PEGylation	184
a. <i>Post</i> -fonctionnalisation par CuAAC	185
b. CDs hexa-fonctionnalisées pour la PEGylation par couplage peptidique	187
3. Conclusion	192
II. Enfilage pH-contrôlé de CD(NH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	193
1. Étude préliminaire	193

2. Exemples d'enfilage/désenfilage de cyclodextrines contrôlés	194
3. Cycles d'enfilage/désenfilage de CD(NH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> sur l'axe modèle	196
4. Étude du sens d'enfilage/désenfilage de CD(NH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	197
5. Conclusion	201
III. Polymérisation de <i>pseudo</i> -rotaxanes	202
1. État de l'art	202
2. Polymérisation par métathèse de diène	204
a. Objectifs	204
b. Synthèse des monomères et bouchon alcène	204
c. Étude RMN du complexe d'inclusion	205
d. Polymérisation des complexes d'inclusion	208
3. Tests de copolymérisation	210
4. Polymérisation par couplage de phosphate	211
a. État de l'art	211
b. Polymérisation du monomère modèle par couplage de phosphate	212
c. Tentatives de polymérisation de <i>pseudo</i> -rotaxanes d'alcanediphosphate	215
5. Conclusion	217
IV. Conclusion	217
CONCLUSION GENERALE	219
EXPERIMENTAL SECTION	225
General Analytical and Synthetic Methods	227
NMR analysis	227
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> contrast agent analysis	228
Crystallography	230
Syntheses	234
LISTE DES ABREVIATIONS	301
ANNEXES	305
Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse d'une cyanine 5.5	307
Spectre de masse du [3]Rot-CD (68)	308
Spectre RMN DOSY <sup>1</sup> H de RotLa <sub>4</sub> (71)	309
Spectre RMN TROESY <sup>1</sup> H de RotLa <sub>4</sub> (71)	310
Concentration résiduelle en gadolinium 40 après l'injection de RotGd <sub>2</sub> et RotGd <sub>4</sub>	310
Spectres RMN du <i>pseudo</i> -[3]rotaxane 86 (C <sub>10</sub> )	311
Spectres RMN du <i>pseudo</i> -[3]rotaxane 88 (C <sub>12</sub> )	312

Spectres RMN du <i>pseudo</i> -[2]rotaxane 85 (C <sub>10</sub> )	313
Spectres RMN du <i>pseudo</i> -[2]rotaxane 87 (C <sub>12</sub> )	314
Spectre RMN DOSY <sup>1</sup> H du <i>pseudo</i> -[2]rotaxane 85 (C <sub>10</sub> )	315
Suivi de l'enfilage et du désenfilage de CD(NH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> (105) sur le 1,12-diammonium dodécane <i>per</i> -méthylé (24) par RMN DOSY <sup>1</sup> H	316
BIBLIOGRAPHIE	317

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

*« Au-delà de la chimie moléculaire, fondée sur la liaison covalente, s'étend un domaine qu'on peut nommer supramoléculaire : la chimie des interactions moléculaires, des associations de deux ou plusieurs espèces chimiques, les complexes, et de la liaison intermoléculaire »*

C'est ainsi que Jean-Marie Lehn, père de la chimie supramoléculaire et prix Nobel de chimie en 1987 pour ses travaux réalisés sur l'étude de la reconnaissance moléculaire, définit ce nouveau domaine lors de sa conférence inaugurale au collège de France (1980). L'étude de systèmes supramoléculaires ne consiste donc plus à déterminer la composition et la structure d'une molécule, mais plutôt à comprendre ce qui se passe lorsque des molécules se rencontrent ; c'est l'étude d'une société de molécules qui interagissent ensemble. Il parle de « sociologie moléculaire ».

Depuis les années 1960 et les premières publications rapportant la synthèse d'édifices dits « supramoléculaires », c'est-à-dire, issus de liaisons et interactions dites « faibles », la chimie supramoléculaire s'est considérablement développée. Une cinquantaine d'années ont suffi pour passer de structures relativement simples comme les caténanes, les rotaxanes, les nœuds, carrés et cages moléculaires, à des systèmes tridimensionnels, réseaux et gels encore plus complexes, eux-mêmes basés sur des briques supramoléculaires.

Ces systèmes de plus en plus complexes, fascinants au premier abord pour leur structure, ont vu leur intérêt croître grâce à leurs propriétés chimiques et physiques. Ainsi, de nombreuses applications ont pu leur être associées, en particulier dans le milieu biomédical.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit concernent le développement de polyrotaxanes de cyclodextrines fonctionnalisées pour des applications biomédicales, et plus particulièrement, pour une utilisation comme agent d'imagerie bimodale.



---

# **INTRODUCTION**

---



L'introduction débutera par la description des multiples architectures supramoléculaires que la communauté scientifique sait maintenant synthétiser en rappelant sur quels liaisons, interactions et effets elles reposent. Elle s'orientera ensuite de façon plus détaillée sur les polyrotaxanes de cyclodextrines avec une description des voies de synthèse et des associations axes/cyclodextrines connues dans la littérature. Quelques domaines d'application seront succinctement décrits avant de passer en revue les différentes applications possibles dans le domaine biomédical (imagerie, thérapie, ciblage, etc). Les avantages de l'approche supramoléculaire pour la synthèse de plateformes multimodales seront détaillés pour développer le concept du projet et terminer sur ses objectifs.

## **I. Chimie supramoléculaire : des concepts aux architectures complexes**

Depuis les années 1960,<sup>[1]</sup> des chimistes de plus en plus nombreux ont mis de côté la chimie des interactions fortes et des liaisons covalentes, dite « chimie moléculaire », pour s'intéresser de plus près à la chimie des interactions entre molécules, dite « chimie supramoléculaire ». Ils cherchent à comprendre comment certaines molécules peuvent spontanément s'organiser en solution, pourquoi elles se reconnaissent, s'agrègent, s'auto-assemblent, se complexent, et tout cela de façon réversible, dynamique et non covalente.

On peut dresser la liste des différentes interactions et liaisons faibles qui peuvent être mises à contribution pour l'élaboration de structures complexes et les classer par ordre de grandeur d'énergie.

### **1. Interactions, liaisons et effets mis en jeu en chimie supramoléculaire**

#### **a. Interactions et liaisons faibles**

La boîte à outils de la chimie supramoléculaire est constituée d'interactions faibles et non covalentes ayant des énergies allant de quelques  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour les interactions de van der Waals à plusieurs dizaines de  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour les interactions ioniques (Figure 1). On considère, arbitrairement, que les interactions sont dites « fortes » à partir de la centaine de  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Voici un récapitulatif des interactions et de leurs origines :<sup>[2]</sup>

- Interactions de van der Waals : de nature électrostatique, elles sont de faibles intensités et interviennent entre molécules ou atomes. Pouvant être attractives ou répulsives, elles sont non directionnelles et de faibles portées. Elles résultent de la



polarisation d'un nuage électronique par la proximité d'un autre atome/molécule induisant l'interaction entre :

- i) un dipôle permanent et un dipôle induit (Debye ;  $<5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
  - ii) deux dipôles induits (London ;  $0,5 - 30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
  - iii) deux dipôles permanents (Keesom ;  $0,5 - 50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Les interactions dipôle-dipôle de Keesom sont elles directionnelles.
- Interactions  $\pi$  ( $<80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : interactions entre molécules aromatiques, ou entre une molécule riche en électron et un métal, un anion, une autre molécule, elles sont de nature électrostatique
  - Liaisons hydrogène ( $4 - 120 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : interactions dipolaires entre la charge partielle positive d'un atome d'hydrogène lié à un atome très électronégatif et la charge partielle négative d'un autre atome très électronégatif portant au moins un doublet non liant, elles sont directionnelles et de longueurs variables
  - Liaisons halogène ( $5 - 180 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : interactions électrostatiques entre un halogène partiellement déficient en électron et polarisable et un atome riche en électron jouant le rôle de nucléophile. De longueurs variables, elles sont directionnelles
  - Interactions ion/dipôle ( $50 - 200 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : interactions provenant de l'attraction d'un ion par une charge partielle opposée, de nature électrostatique
  - Interactions ioniques (ion-ion) ( $100 - 350 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : interactions entre deux molécules ou atomes de charges opposées, de nature électrostatique
  - Liaisons de coordination ( $>20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) : liaison dative entre un acide de Lewis (métal) et une base de Lewis (ligand)

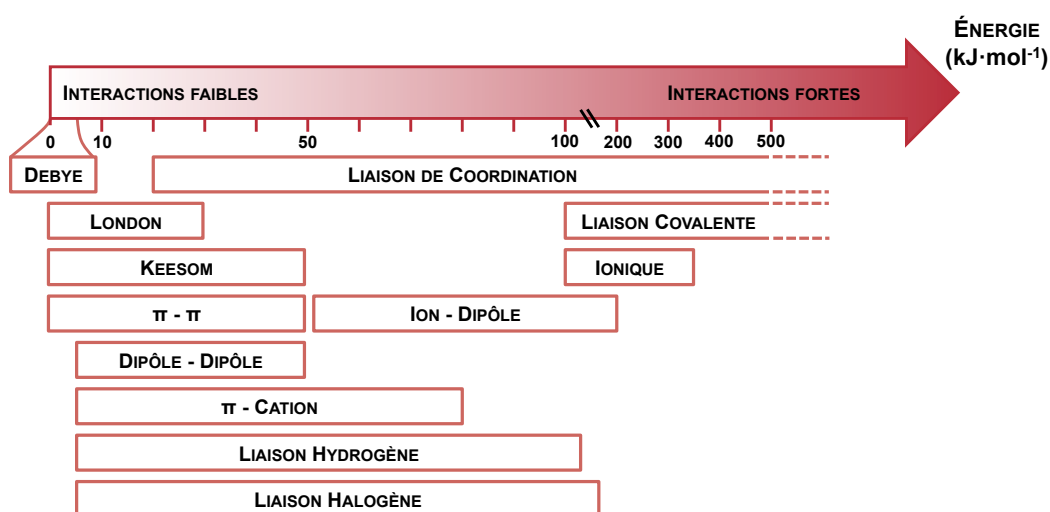


Figure 1 : Classement des interactions en fonction de leur énergie

Ces interactions permettent d'expliquer de nombreuses structures supramoléculaires telles que les empilements  $\pi$ - $\pi$  entre molécules aromatiques, le repliement de protéines ou l'hélicité de l'ADN (grâce aux liaisons hydrogène entre bases azotés), ou encore la complexation d'un substrat par un récepteur qui combine souvent les interactions de van der Waals, les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques de plus fortes énergies.<sup>[3]</sup> Néanmoins, la chimie supramoléculaire compte de nombreux exemples de complexes d'inclusion dans lesquels un invité est encapsulé ou imbriqué dans un hôte et dont les forces motrices, outre les interactions mentionnées précédemment, sont des effets thermodynamiques dits « effets hydrophobes ».

### b. Effet hydrophobe

De considération thermodynamique, l'effet hydrophobe peut être séparé en deux catégories suivant sa contribution enthalpique ou entropique. Prenons l'exemple d'une molécule A très hydrophobe, et d'une molécule B hydrophile, possédant une cavité hydrophobe compatible, en terme de volume, avec la molécule A. Lorsqu'on plonge ces deux espèces dans une solution aqueuse, spontanément, les molécules A et B vont former un complexe d'inclusion  $A \subset B$  (Figure 2).

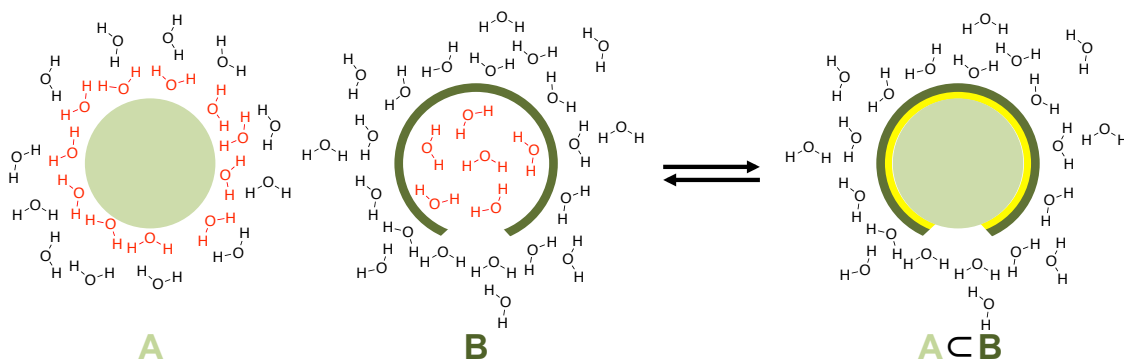


Figure 2 : Formation d'un complexe d'inclusion par effet hydrophobe<sup>[2]</sup>

Intéressons-nous aux détails des différents effets mis en jeu dans chacune des contributions thermodynamiques :

- Contribution enthalpique : la formation du complexe d'inclusion permet à toutes les interactions et liaisons faibles entre la cavité de la molécule B et la molécule A de se faire si elles sont possibles (partie jaune). Elle diminue la répulsion entre les molécules d'eau (rouge) et la molécule hydrophobe A et leur permet de se lier librement par liaison hydrogène avec les autres molécules d'eau, ce qui constitue en général un gain enthalpique. Cet effet est parfois décrit comme défavorable enthalpiquement car les

liaisons hydrogène entre la première sphère de solvation (rouge) et les autres molécules sont plus fortes lorsque les molécules d'eau sont immobilisées. De plus, la formation du complexe d'inclusion provoque l'éjection des molécules d'eau de la cavité hydrophobe de la molécule B (rouge), et annihile donc la répulsion associée.

- Contribution entropique : le relargage de plusieurs molécules d'eau de la cavité contre la complexation d'une unique molécule A et la libération des molécules d'eau qui servaient à « solvater » la molécule A, et qui ne sont donc plus « figées » à la surface de la molécule A, sont deux effets favorables entropiquement. L'immobilité de A dans B, et la rigidification de la cavité de B et de A dans cette même cavité sont eux défavorables.

Ainsi, l'effet hydrophobe vient compléter la liste des interactions et liaisons faibles induisant la formation de structures complexes auto-assemblées. Intéressons-nous maintenant aux premiers exemples d'architectures supramoléculaires rapportés dans la littérature.

## 2. Synthèse des premières architectures supramoléculaires

L'ensemble des interactions, liaisons faibles et effet hydrophobe permettent à notre société de molécules présentes en solution d'interagir ensemble, de s'auto-organiser, de s'auto-assembler. Cette organisation ou pré-organisation peut, directement ou indirectement, donner naissance à des architectures dites « topologiquement complexes » constituées de briques élémentaires entrelacées mécaniquement entre elles. Cela signifie qu'il faudra rompre une liaison covalente si l'on veut dissocier ou défaire l'assemblage. Les structures les plus étudiées sont les caténanes, les nœuds moléculaires, et les rotaxanes (Figure 3).

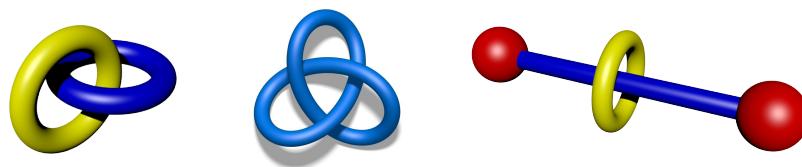


Figure 3 : Structures topologiquement complexes (de gauche à droite : [2]caténane, nœud de trèfle, [2]rotaxane)

Les caténanes sont constitués d'au moins deux macrocycles imbriqués l'un dans l'autre. Ils ne sont dissociables que par rupture de liaison covalente. Les nœuds moléculaires sont quant à eux constitués d'un seul macrocycle entrelacé sur lui-même formant des croisements. Rotaxane vient du latin « *rota* » signifiant roue et « *axane* » signifiant axe, soit

une structure composée d'un macrocycle enfilé autour d'un axe. On nomme alors *pseudorotaxanes*, les complexes d'inclusion  $\text{Axe} \subset \text{Macrocycle}$  pouvant se déenfiler, et rotaxane, ces complexes d'inclusion possédant des bouchons à chaque extrémité de l'axe, rendant donc impossible le déenfilage du macrocycle.

### a. Caténanes et nœuds moléculaires

Les caténanes sont constitués de macrocycles imbriqués les uns dans les autres. Le plus souvent, ils sont synthétisés à partir d'un macrocycle et d'un axe (Figure 4a). Par des interactions faibles et/ou effet template à l'aide d'un ion (parfois métallique), on forme intermédiairement un *pseudo*-rotaxane qui va permettre la pré-organisation du caténane. Il ne reste plus qu'à faire réagir les extrémités de l'axe entre elles pour le cycliser et obtenir le [2]caténane. Une autre approche consiste à utiliser un template entre deux axes en pré-organisant l'assemblage de façon à ce que les extrémités d'un même axe réagissent ensemble (b).

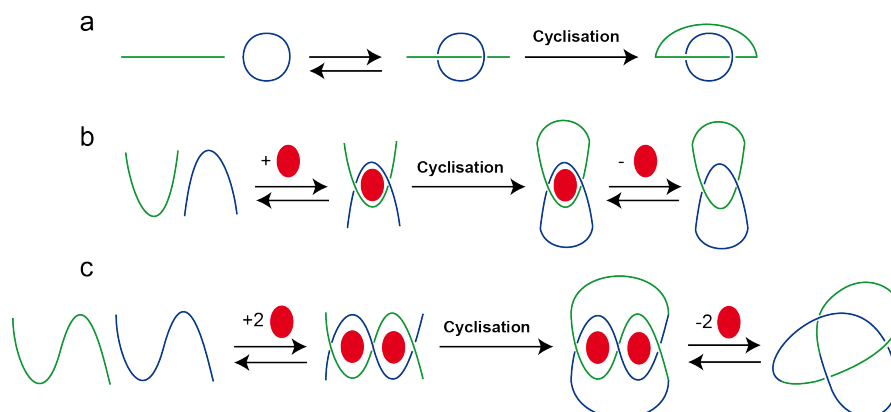
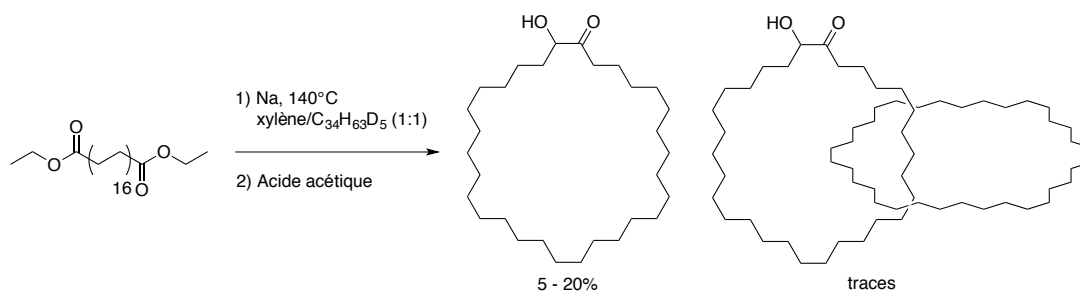


Figure 4 : Voies de synthèse des caténanes et nœuds moléculaires<sup>[1c]</sup>

Si dès les années 1950, les groupes de Mark<sup>[4]</sup> et Derst<sup>[5]</sup> suggéraient déjà la présence de macrocycles entrelacés de polysiloxanes ou de polymère de chlorure de phosphonitrile, ce n'est qu'en 1960 que le groupe de Wasserman publie le premier caténane isolé et caractérisé à partir de la condensation acyloïne intramoléculaire réalisée dans un mélange de solvants composé de xylène et d'un alcane monocyclique à 34 carbones (Figure 5).<sup>[1a]</sup>

Figure 5 : [2]Caténane de Wasserman (1960)<sup>[1a]</sup>

Les deux macrocycles sont alors imbriqués l'un dans l'autre et seule une rupture de liaison covalente peut permettre de les séparer. La formation de ce [2]caténane est uniquement basée sur une probabilité non nulle que la cyclisation se produise lorsque l'acyloïne est enfilée dans l'alcane cyclique, ce qui explique le faible rendement. En utilisant l'ensemble des liaisons et interactions faibles décrites précédemment, en particulier l'effet template, les rendements de synthèses de ce type d'architecture vont être considérablement améliorés.

Les nœuds moléculaires sont eux aussi le plus souvent issus d'une pré-organisation d'au moins un axe « linéaire » entrelacé par effet template avant d'être cyclisé. Le groupe de Jean-Pierre Sauvage a rapporté en 1989 leur méthodologie quant à la synthèse de nœuds moléculaires en forme de trèfle (Figure 4c).<sup>[1c]</sup> En étendant leur méthode de synthèse de caténane par l'utilisation de deux brins templétés par un métal de transition, ils ont élaboré des brins plus longs possédant deux sites de coordination, chacun pour un métal de transition. L'utilisation des liaisons de coordination et de l'effet template pour la pré-organisation des assemblages a permis de considérablement augmenter les rendements des synthèses d'architectures topologiquement complexes, passant de l'état de traces à des rendements parfois quantitatifs. Par cette approche, l'équipe de J.-P. Sauvage parvient à obtenir en solution des hélicates, c'est-à-dire, deux brins en hélice autour des deux métaux permettant la cyclisation intermoléculaire des extrémités des axes. Après démétallation des ions Cu<sup>+</sup>, ils obtiennent un nœud constitué d'un seul axe linéaire entrelacé sur lui-même.

## b. Rotaxanes

L'une des structures entrelacées les plus étudiées ces cinquantes dernières années est celle du rotaxane. On parle de [2]rotaxane lorsque ce dernier n'est composé que de 2 unités (l'axe et le macrocycle), et par extension de [n]rotaxane lorsqu'il est composé de n constituants. Ainsi lorsque l'axe devient polymérique et qu'on ne connaît plus exactement le

nombre de macrocycles enfilés, on parle de *pseudopolyrotaxane* (PPR) ou de *polyrotaxane* (PR) en fonction des axes bouchonnés ou non (Figure 6).

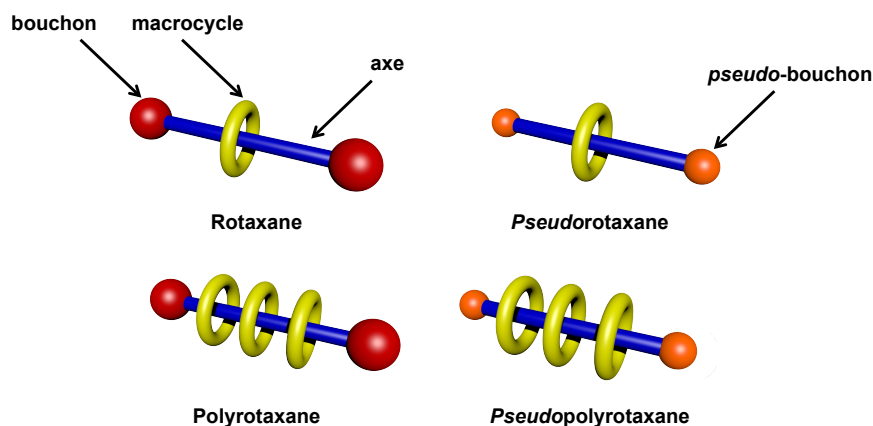


Figure 6 : Représentation des différents rotaxanes

De très nombreux macrocycles peuvent être utilisés pour la synthèse de rotaxanes : les éthers couronnes,<sup>[6]</sup> cyclodextrines (CD),<sup>[7]</sup> calixarènes,<sup>[8]</sup> cucurbituriles,<sup>[9]</sup> pillararènes<sup>[10]</sup> et cyclophanes<sup>[11]</sup> sont les plus courants (Figure 7).

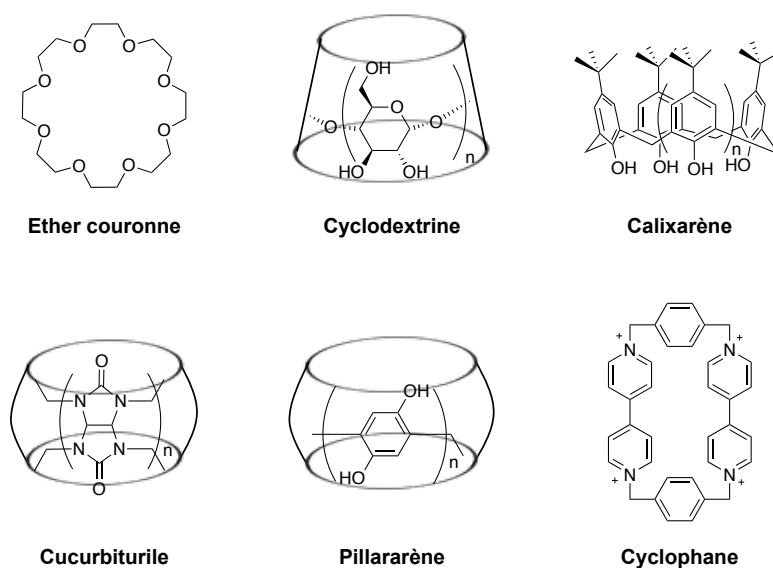
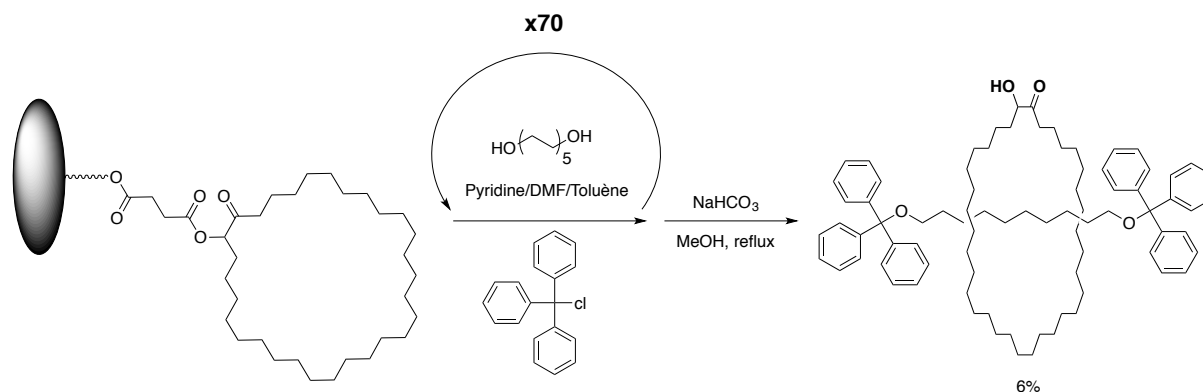


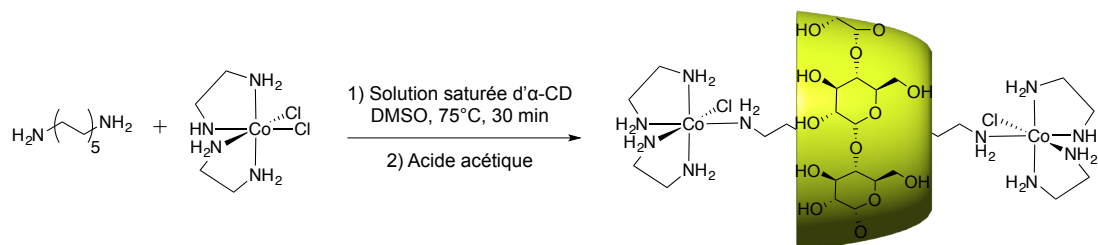
Figure 7 : Exemples de macrocycles utilisés pour la synthèse de rotaxanes

La synthèse du tout premier rotaxane fut réalisée en 1967 par Harrison *et al.*,<sup>[1b]</sup> soit moins de dix ans après celle du premier caténane de Wasserman. Il est formé d'un axe long de dix carbones bouchonné par des groupements triphénylméthyle ester et d'un macrocycle hydroxycyclotriacontanone (Figure 8). Il est obtenu avec un rendement de seulement 6% après 70 passages d'une solution de décanediol et de chlorure de triphénylméthyle sur une résine fonctionnalisée par le macrocycle suivi du relargage des macrocycles.

Figure 8 : Synthèse du premier rotaxane de Harrison *et al.*<sup>[1b]</sup>

On peut noter qu'ici, aucune réelle interaction n'est attendue entre le macrocycle et l'axe. C'est donc uniquement un jeu de probabilité de bouchonnage de l'axe lorsqu'il se trouve enfilé dans le macrocycle. Ceci explique le rendement extrêmement faible de chaque passage.

Il est intéressant de citer la publication du tout premier rotaxane de cyclodextrine : synthétisé en 1980 par l'équipe d'Hiroshi Ogino au Japon,<sup>[12]</sup> il est obtenu par enfilage d' $\alpha$ - ou  $\beta$ -CD sur le 1,10-diaminodécane ou le 1,12-diaminododécane, puis bouchonné par un complexe de Cobalt(III) (*cis*-[CoCl<sub>2</sub>(en)<sub>2</sub>]Cl) (Figure 9). Dans cette publication, seul des [2]rotaxanes sont obtenus avec des rendements de 2,4 à 19%. C'est la première synthèse de rotaxanes chiraux publiée, introduisant, en plus, des complexes métalliques jouant le rôle de bouchons.

Figure 9 : Synthèse du premier rotaxane de cyclodextrine<sup>[12]</sup>

En comparaison de la première synthèse de rotaxane, l'approche d'Ogino est intéressante dans l'utilisation de la cyclodextrine comme hôte pour cet axe alcane. Néanmoins, l'utilisation du DMSO comme solvant pour la formation du complexe d'inclusion n'est pas le plus favorable car il reste un assez bon solvant pour l'alcanediamine. Ceci peut expliquer les rendements encore assez faibles obtenus.

Les caténanes, nœuds moléculaires et rotaxanes ont intrigué depuis les années 60 de nombreux groupes de recherche. Des avancées notables sur le contrôle, l'optimisation et la

diversité des synthèses ont permis de développer des applications basées sur la structure et les propriétés de ces architectures (Figure 10).<sup>[13]</sup>



Figure 10 : Chronologie de l'avancée de la recherche sur les molécules mécaniquement imbriquées<sup>[13]</sup>

Dans la partie suivante, nous allons nous intéresser aux polyrotaxanes de cyclodextrines.

## II. Polyrotaxanes de cyclodextrines

Une fois les premiers rotaxanes de cyclodextrines obtenus, la communauté scientifique s'est intéressée à la synthèse d'architectures encore plus grandes et plus complexes, à savoir les polyrotaxanes. La Figure 11 présente le nombre de publications par année depuis 1993 répondant à la recherche « Polyrotaxane » (en bleu) puis en restreignant aux « Cyclodextrines » (en rouge) sur la base de données *Web of Science*. Comme nous pouvons le constater, depuis le début des années 90, le nombre de travaux rapportés concernant les polyrotaxanes ne fait que croître, et celui concernant les polyrotaxanes de cyclodextrines augmente petit à petit, avec en moyenne une trentaine de publications par an depuis 2005. Celui-ci contribue pour la moitié des publications concernant les polyrotaxanes.



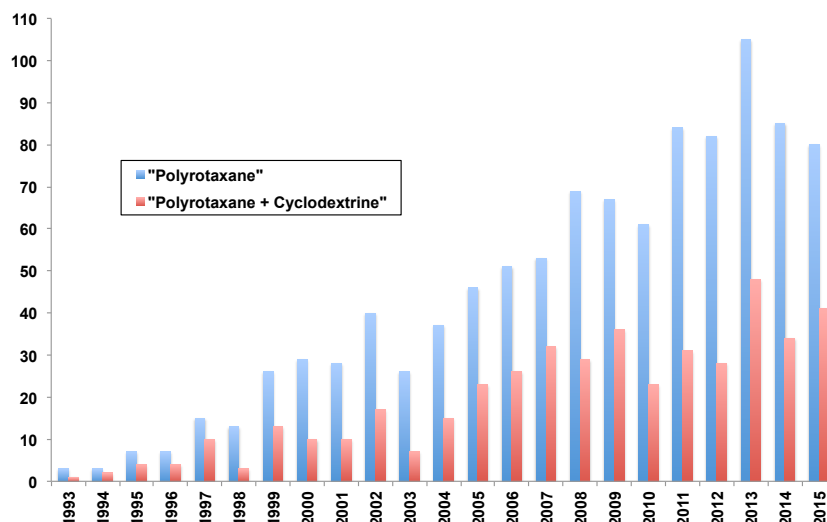


Figure 11 : Nombre de publications en fonction du temps (Source : *Web of Science*)

Nous allons nous intéresser aux différentes voies de synthèse ainsi qu'aux différentes associations possibles axe/CD pour la synthèse de polyrotaxanes. Enfin, nous verrons les applications possibles de ces structures nanoscopiques.

## 1. Caractéristiques des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides monocycliques possédant 6, 7 ou 8 unités glucopyranose ( $n$ ) reliées entre elles en  $\alpha$ -(1,4) (Figure 12). Elles sont respectivement nommées  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines. Elles sont en forme de cône tronqué avec une cavité hydrophobe et deux couronnes d'hydroxyles leur conférant une certaine solubilité dans l'eau. On parle de couronne primaire et secondaire en fonction de la classe des alcools portés.

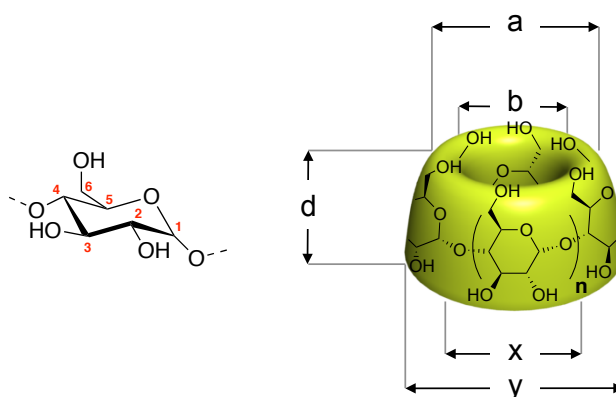


Figure 12 : Représentation schématique et numérotation des CDs

Tableau 1 : Mesures caractéristiques des cyclodextrines (longueurs en Å).<sup>[3]</sup>

	n	a	b	d	x	y	Volume de la cavité (Å <sup>3</sup> )	Hydrosolubilité (g·L <sup>-1</sup> )
$\alpha$ - CD	1	13,2	4,5	7,8	5,7	13,7	174	145
$\beta$ - CD	2	14,9	6,1	7,8	7,8	15,3	262	18,5
$\gamma$ - CD	3	16,1	7,7	7,8	9,5	16,9	427	232

Le Tableau 1 redonne l'ensemble des dimensions et solubilité des trois cyclodextrines.<sup>[3]</sup> Comme la synthèse du premier rotaxane de CD, les premiers polyrotaxanes de CDs ont été obtenus par association de la CD possédant la plus petite cavité ( $\alpha$ -CD) et de polymères linéaires. Plus tard, de nouveaux polymères ont été développés pour la synthèse de PRs de  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines.

## 2. Voies de synthèse des polyrotaxanes

D'une manière générale, lorsque l'on envisage la synthèse d'un rotaxane, les trois principales voies réactionnelles sont : la formation du complexe d'inclusion suivi d'une réaction de bouchonnage (*rotaxation*) ; la cyclisation du macrocycle autour d'un axe préalablement bouchonné (impossible avec la cyclodextrine) ; l'enfilage « forcé » d'un macrocycle par le bouchon d'un axe bouchonné, rendu possible par un stimulus extérieur (souvent une augmentation de température), suivi d'un retour à des conditions cinétiques permettant le maintien de la structure (Figure 13).<sup>[7a,14]</sup>

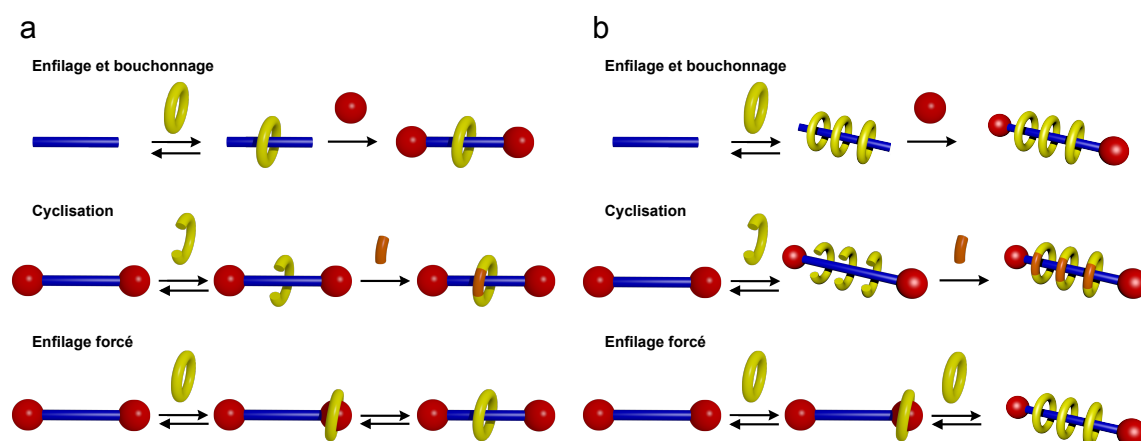


Figure 13 : Voies de synthèse des rotaxanes (a) et polyrotaxanes (b)

Théoriquement, l'extension de ces trois voies réactionnelles pour la synthèse de polyrotaxanes est possible ; en pratique, la première (*rotaxanation*) et la dernière (enfilage forcé) sont les plus utilisées (on peut citer par exemple les travaux de Gibson sur la synthèse de PR par la poly-cyclisation de tetralactames).<sup>[15]</sup> Transposée à la synthèse de polyrotaxanes de cyclodextrines, l'une ou l'autre des voies pourra être envisagée suivant l'application souhaitée. Une autre voie de synthèse, élégante mais encore assez peu développée, est la polymérisation de *pseudo*-rotaxanes. Cette approche sera introduite et développée dans le chapitre 4.

Dès la publication des premiers *pseudopolyrotaxanes* et polyrotaxanes de cyclodextrines dans la littérature au début des années 90, on trouve les deux approches proposées par Akira Harada<sup>[16]</sup> d'une part (*rotaxanation*) et Gerhard Wenz<sup>[17]</sup> d'autre part (enfilage forcé).

#### a. Les pionniers dans la synthèse des PR-CDs

Les travaux d'Akira Harada commencent à être publiés dès 1990 avec deux publications relatant la synthèse de *pseudopolyrotaxanes* d' $\alpha$ -CDs enfilées sur un axe poly(éthylène glycol) (PEG).<sup>[18]</sup> Ils observent la formation d'un précipité lors d'ajout de PEG dans une solution saturée d' $\alpha$ -CDs qu'ils caractérisent par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et diffraction des rayons X sur poudre. Ils en concluent que deux unités éthylène glycol sont incluses dans chaque cavité de l' $\alpha$ -CD et que le polyrotaxane est cristallin. Leurs essais avec la  $\beta$ -CD ne donnent, avec cet axe, aucun précipité.

Deux ans plus tard, le groupe japonais publie le premier polyrotaxane d' $\alpha$ -CDs.<sup>[16a]</sup> Il utilise un PEG-bisamine, qui, après enfilage de la CD, sera bouchonné par le 2,4-nitrofluorobenzène, suffisamment volumineux pour retenir l' $\alpha$ -CD sur le polymère (Figure 14).

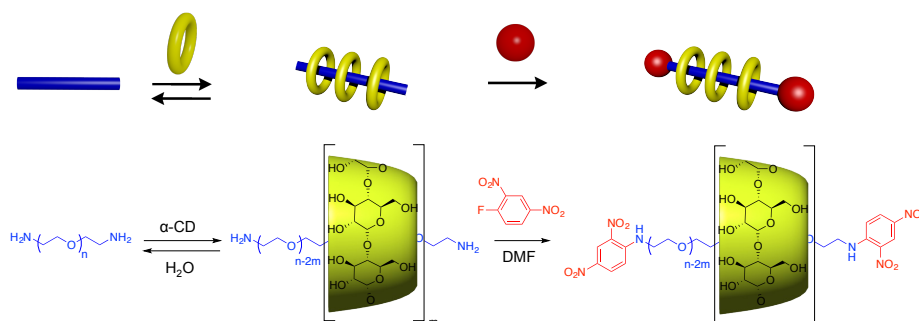


Figure 14 : Synthèse du premier polyrotaxane d' $\alpha$ -CD par enfilage puis bouchonnage<sup>[16a,19]</sup>

Dans le même temps, c'est le groupe allemand de Gerhard Wenz qui rapporte la synthèse du premier *pseudopolyrotaxane* d' $\alpha$ -CD obtenu par enfilage sur un axe

polyamine.<sup>[20]</sup> Ils étudient l'enfilage de la cyclodextrine à différentes concentrations en fonction du temps. Conscients de l'obtention d'un *pseudopolyrotaxane*, ils réalisent ensuite des purifications par dialyse afin de retirer l'excès de CD libre. L'équilibre étant alors modifié, ils observent le désenfilage des CDs enfilées sur l'axe au cours du temps. A la suite de ce travail, ils proposent une post-fonctionnalisation de l'axe par l'utilisation de chlorure de nicotinoyle permettant le bouchonnage statistique du PPR et donc l'obtention d'un PR de CDs (Figure 15).

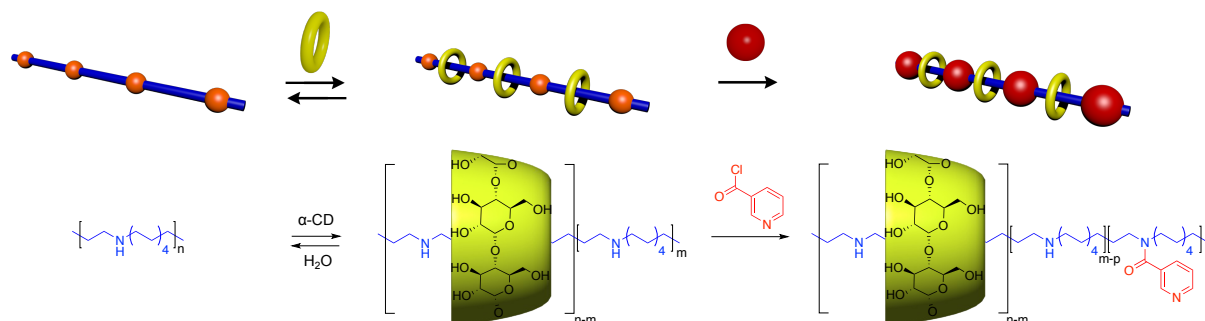


Figure 15 : Premier PR du groupe de G. Wenz<sup>[20]</sup>

A la suite de ces travaux, le groupe de Wenz s'intéresse à la synthèse de PPR d' $\alpha$ -CD stable à température ambiante.<sup>[17]</sup> Par méthylation du polyamine, ils obtiennent un polyammonium perméthylé soluble dans l'eau possédant sur chaque motif monomérique un *pseudo*-bouchon (motif ammonium diméthylé). Celui-ci va permettre le passage de l' $\alpha$ -CD à chaud (et donc l'enfilage des CDs successives sur le polymère) mais empêcher leur désenfilage à température ambiante (Figure 16). Ils réalisent alors des cinétiques d'enfilage en fonction de la température ainsi que l'étude sur le monomère diammoniumdécane perméthylé pour l'étude du complexe d'inclusion de stœchiométrie 1:1 ([2]rotaxane).<sup>[17b]</sup> C'est la première publication relatant la synthèse d'un PPR d' $\alpha$ -CD obtenu par enfilage forcé.

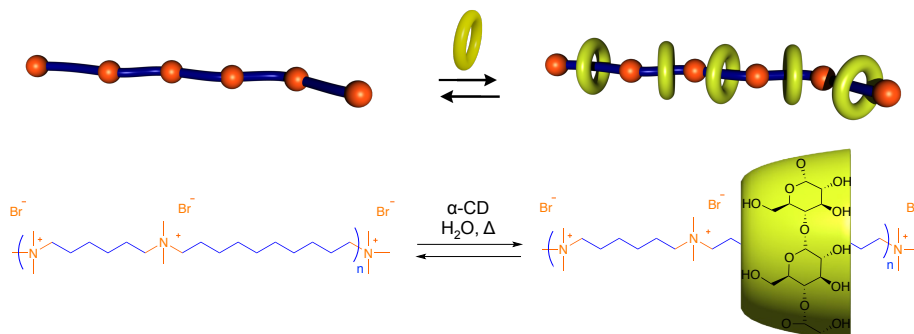


Figure 16 : Voie de synthèse du PPR-CD du groupe Wenz<sup>[17b]</sup>

Si les premiers exemples de PRs et PPRs de cyclodextrines sont obtenus avec l'alpha-CD, les CDs  $\beta$  et  $\gamma$ , possédant respectivement 7 et 8 unités glucopyranoses, ont aussi été utilisées pour leur synthèse.

### **b. Extension aux différentes CDs**

Comme nous avons pu le voir dans la première partie de ce chapitre, les interactions et effet hydrophobe gouvernant la formation du complexe d'inclusion sont d'autant plus favorables que la cavité de la cyclodextrine utilisée est adaptée à la taille de l'axe du fait de leur faible portée. Ainsi, depuis les années 1990 et les premiers PPRs et PRs d' $\alpha$ -CDs utilisant des axes linéaires non ramifiés (PEG et polyalkylamine), de nombreuses nouvelles associations axe/CD ont été développées et rapportées dans la littérature. Le Tableau 2 est une compilation de quatre revues publiées récemment.<sup>[7b,21]</sup>

Le choix de l'axe polymérique pour la synthèse de polyrotaxane doit tenir compte de la taille de la cavité de la CD, doit être assez soluble dans l'eau pour réagir et s'enfiler mais suffisamment peu pour être stabilisé par effet hydrophobe dans la cavité de la CD. Il ne doit pas former d'agrégats avec les CDs, et doit posséder des *pseudo*-bouchons ou des fonctions réactives pour permettre l'ajout de bouchon. Parmi les axes présentés ci-après, on trouve des polymères neutres, des polycations, des polymères sensibles au pH (polyamine). On peut cependant noter l'absence de polymères polyanioniques. Cette absence peut être due à la plus faible quantité de polyanions commerciaux ou à une difficulté de synthèse des PRs associés plus élevés. La difficulté lors du choix du polymère, c'est d'évaluer la solubilité du PR final. Quand on regarde le PR-CDs de PEG d'Harada, on aurait pu s'attendre à un PR final hydrosoluble. Néanmoins, la reconnaissance des cols primaires et secondaires des CDs entraîne la formation d'un tube compact réduisant les liaisons hydrogène avec le solvant, ce qui cause la précipitation du PR.<sup>[18a]</sup>

Ainsi, en fonction des CDs et axes polymériques utilisés, les utilisations de ces PRs divergent. Intéressons-nous maintenant à leurs domaines d'applications.

Tableau 2 : Revue des associations CD/axe rapportées dans la littérature<sup>[7b,21]</sup>

Axe	Formule	CD	Axe	Formule	CD
Polyéther		R = H; n = 1 (α; β; γ); 1,5 (α); 2 (α; β) R = CH <sub>3</sub> ; n = 1 (α; β; γ)	Poly(diméthyl siloxane)		β; γ
Poly(1,3-dioxolane)		α; β; γ	Poly(diméthylsililane)		β; γ
Polyalcane		R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = H (α) R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub> (β; γ) R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub> (β; γ) R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = CN (γ) R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (γ) R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = OH (γ) R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> (γ) R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = OC(O)CH <sub>3</sub> (γ)	Poly(adipate)		α; γ
Polybutadiène		α; β; γ	Polyester		R = CH <sub>3</sub> (α) R = H (α; γ)
Polycarbonate		γ	Polylysine		α
Polytéréphthalate d'éthylène		γ	Polyamide		n = 5 (α; β) n = 10 (α)
Oligotetrafluoroéthylène		β	Polyamine		α; β; γ
Oligo(hexafluoroéthylène glycol)		γ	Poly(viologène)		α; β
Oligo(CF2-CF2-O-CF2-O)		β; γ	Polyaniline		β
Fibroïne		γ			

### III. Applications des polyrotaxanes de cyclodextrines

Les PR-CDs sont principalement utilisés dans trois domaines : le biomédical, les matériaux conducteurs et les matériaux élastiques (Figure 17a). Ils sont utilisés :

- Sous leur forme linéaire (PR, nanotube)
- Dans des nanostructures (nanoparticules,<sup>[22]</sup> polymersomes et micelles<sup>[23]</sup>)
- Sous forme d'hydrogels de PR-CDs (enchevêtré ou réticulé)
- Dans des structures hybrides (couplage avec des nanoparticules (de Fer<sup>[24]</sup> ou d'Or<sup>[25]</sup>), des Quantum Dots,<sup>[26]</sup> des dendrimères<sup>[27]</sup>)

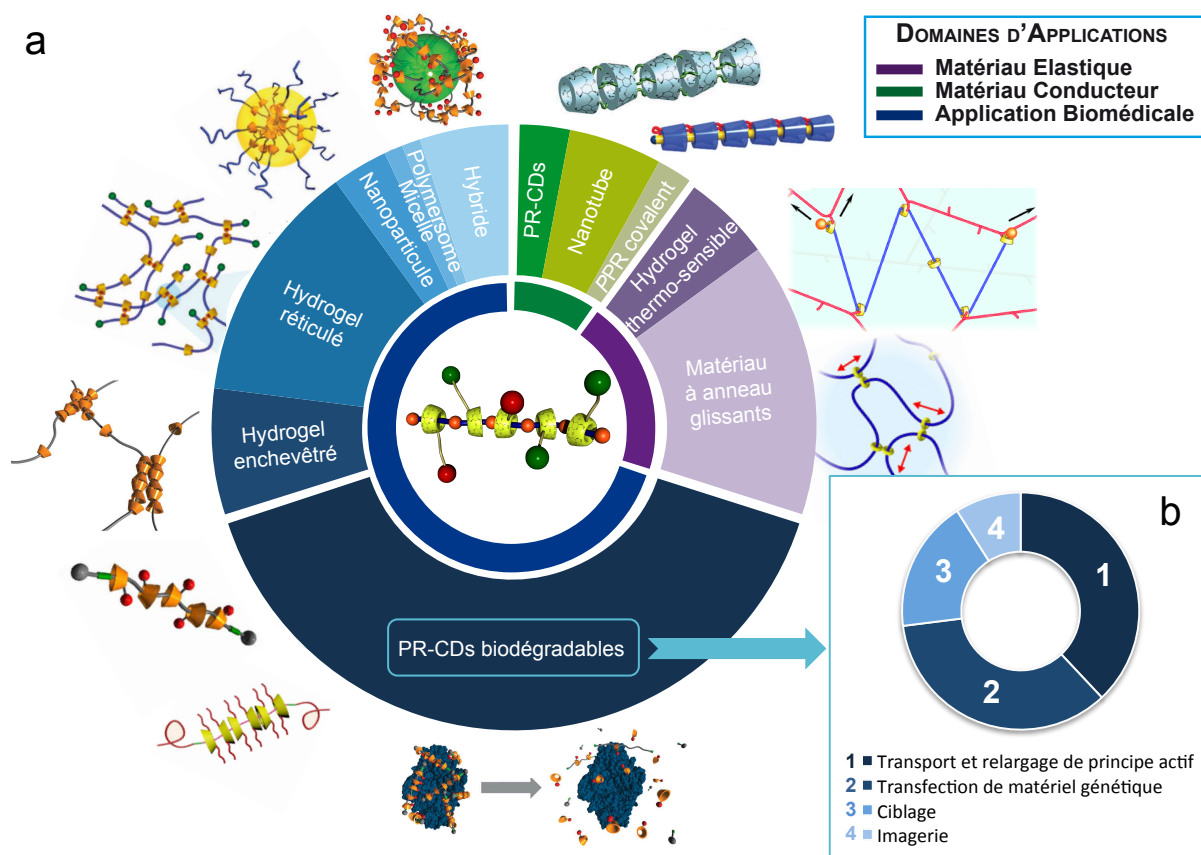


Figure 17 : a) Proportions approchées\* des domaines d'application des PR-CDs sous différentes formes ; b) Proportions approchées\* des utilisations de PR-CDs biodégradables dans le domaine biomédical. \* Déterminées par recherches de mots clés sur la base de données « SciFinder ».

Le domaine biomédical est très largement développé, particulièrement pour le transport et relargage de principes actifs (anticancéreux, traitement de la maladie de Niemann-Pick, ...) et la transfection de matériel génétique (Figure 17b). Nous allons maintenant décrire succinctement les applications liées aux propriétés physiques des PRs de CDs puis détailler de

façon plus approfondie le développement des PR-CDs et hydrogels associés pour le domaine biomédical.

## 1. Utilisation des PR-CDs comme matériaux

### a. Les nanotubes de CDs

Les PRs peuvent être intéressants de par leurs propriétés, ou tout simplement vus comme une pré-organisation pour parvenir à d'autres structures complexes. En effet, lorsque les polymères sont suffisamment recouverts par les CDs, on peut imaginer utiliser le PR comme un support pour réaliser des réactions entre CDs, ainsi le polymère serait vu comme un template pour la pré-organisation des CDs. En imaginant un couplage simple des CDs les unes aux autres, suivi du rejet du polymère, on obtiendrait un tube moléculaire d'un diamètre égal à celui des CDs utilisées (Figure 18).

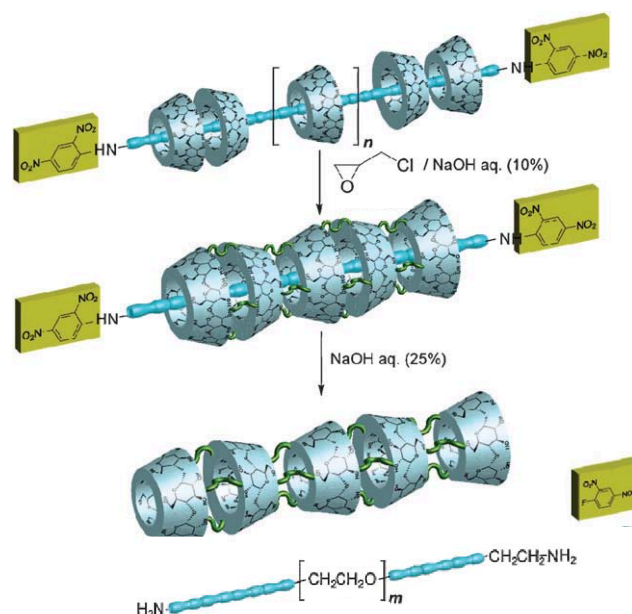


Figure 18 : Voie de synthèse de nanotubes de CDs par A. Harada<sup>[19]</sup>

Cette approche a, par exemple, été utilisée par le groupe français de Pelta pour des études mimétiques de canaux ioniques.<sup>[28]</sup> Elle peut aussi être intéressante pour l'enfilage *a posteriori* de polymères conducteurs et leur utilisation comme « fil conducteur isolé » (*Insulated Molecular Wires*) pour la conception de nanomatériaux électroniques.<sup>[29]</sup> Une autre voie de synthèse de fil conducteur isolé a été développée par l'équipe de Terao. Elle consiste en la synthèse d'une cyclodextrine fonctionnalisée par un monomère pouvant s'auto-inclure



dans la CD. Ce monomère, une fois enfilé dans la cavité de la CD, peut être polymérisé de part et d'autre (Figure 19).<sup>[30]</sup>

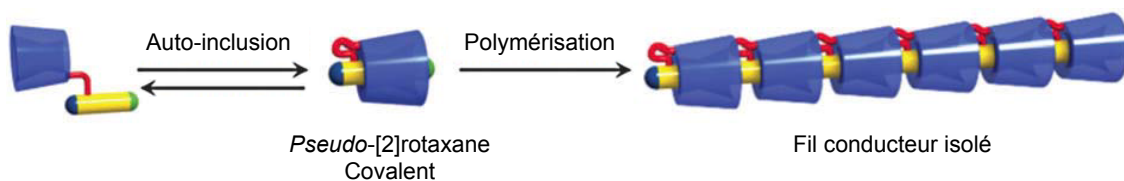


Figure 19 : Voie de synthèse de fil conducteur isolé développée par J. Terao<sup>[30e]</sup>

Ainsi, on pourrait imaginer rompre le lien entre la CD et le monomère pour obtenir un PR totalement couvert (donc totalement isolé).

## b. Les gels

Une autre application possible des PR-CDs est liée à leurs propriétés physiques. En effet, l'avantage des PRs comparés aux polymères covalents classiques vient de leur « souplesse ». Les cyclodextrines pouvant coulisser le long du polymère (dans le cas du PEG par exemple), on peut s'attendre à des réponses plus amorties sous des contraintes mécaniques par des effets de poulie (Figure 20).<sup>[31]</sup> En particulier, l'élaboration de gels (macroscopiques) de PR-CDs synthétisés par couplage intermoléculaire entre CDs de différents PRs, par synthèse de PR à partir de dimères de CDs, par enfilage de deux polymères par cavité, ou encore par simple enchevêtrement de macromolécules de PRs a donné naissance à des matériaux très intéressants pour leurs propriétés mécaniques : élastique,<sup>[32]</sup> absorbant,<sup>[33]</sup> résistant,<sup>[34]</sup> isolant,<sup>[35]</sup> conducteur,<sup>[33]</sup> thermo-<sup>[36]</sup> et pH-sensible.<sup>[37]</sup>

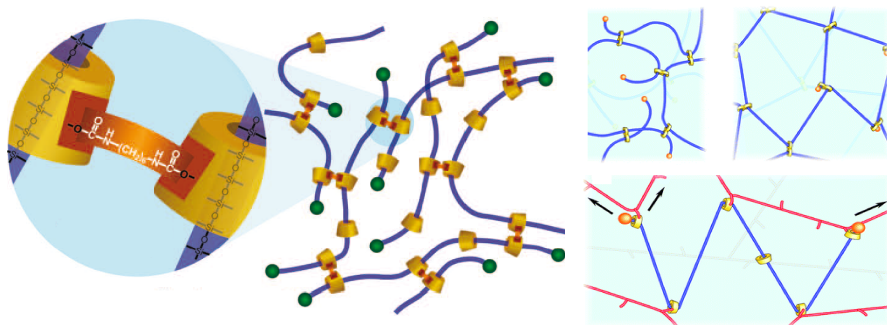


Figure 20 : Gels formés par couplage intermoléculaire de PR-CDs<sup>[21c,32a]</sup>

Outre l'utilisation de ces gels pour des applications mécaniques, leurs propriétés d'élasticité et de changement de viscosité sous contrainte ont inspiré différents groupes de recherche pour des applications biomédicales. Les premiers PR-CDs étant à base de PEG et d' $\alpha$ -CDs, tous

deux des composés biocompatibles approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA),<sup>[38]</sup> leur utilisation pour la synthèse d'hydrogels a été explorée afin de concevoir des biomatériaux pour la reconstruction osseuse ou cartilagineuse (échafaudage), ou comme plateforme pour le relargage de principes actifs. De plus, le développement de PR-CDs biodégradables *in vivo* permet d'obtenir des composés à haute valeur ajoutée pour des applications thérapeutiques.

Sous leurs différentes formes, les PR-CDs ont pu être étudiés pour le transport et relargage de principe actif, la transfection, l'imagerie, le ciblage, l'inhibition et la reconstruction cellulaires. Des avancées notables ont été réalisées ces vingt dernières années et ont déjà fait l'objet de revues<sup>[21a,39]</sup> et chapitres de livres<sup>[38,40]</sup> dont je vous propose ici une vue d'ensemble.

## 2. Hydrogels à base de PR-CDs

Les hydrogels, constitués d'une matrice polymérique gorgée d'eau, sont des composés intéressants pour l'encapsulation et l'administration de principe actif. Plus particulièrement, les hydrogels de PR-CDs ont des propriétés de gélification thermosensible, de thixotropie (changement de viscosité en réponse à une contrainte mécanique), et de biocompatibilité pertinentes pour ce type d'application. Qui plus est, leur biodégradabilité lente, permettant un relargage sur une longue période, en fragments de faibles poids moléculaires permet une élimination aisée par l'organisme. Ainsi, la thixotropie permet l'injection de l'hydrogel (liquide sous pression) et évite donc la pose d'un implant, et la biodégradabilité évite qu'on ait besoin de le retirer.

### a. Hydrogels pour la reconstruction osseuse et cartilagineuse

L'utilisation d'hydrogels de PR-CDs à base de PEG et d' $\alpha$ -CDs pour la reconstruction d'os, de cartilages, de tissus, repose évidemment sur les propriétés mentionnées plus haut mais également sur la constatation faite par le groupe de Yui que la prolifération et l'adhésion cellulaire au sein des hydrogels se font très efficacement, faisant alors de l'hydrogel un échafaudage intéressant pour la reconstruction cellulaire.<sup>[41]</sup>

A la suite des premières publications relatant la synthèse de PPR et PR d' $\alpha$ -CDs enfilées sur du PEG, le groupe de Yui a développé la synthèse de PRs d' $\alpha$ -CDs biodégradables. Ils sont synthétisés par l'enfilage de CDs sur un axe PEG-bisamine suivi du

bouchonnage par couplage peptidique avec le L-Phénylalanine protégé. Le bouchon est finalement déprotégé par hydrogénation catalytique pour obtenir le PR-CD dégradable par voie enzymatique (Figure 21).<sup>[42]</sup>

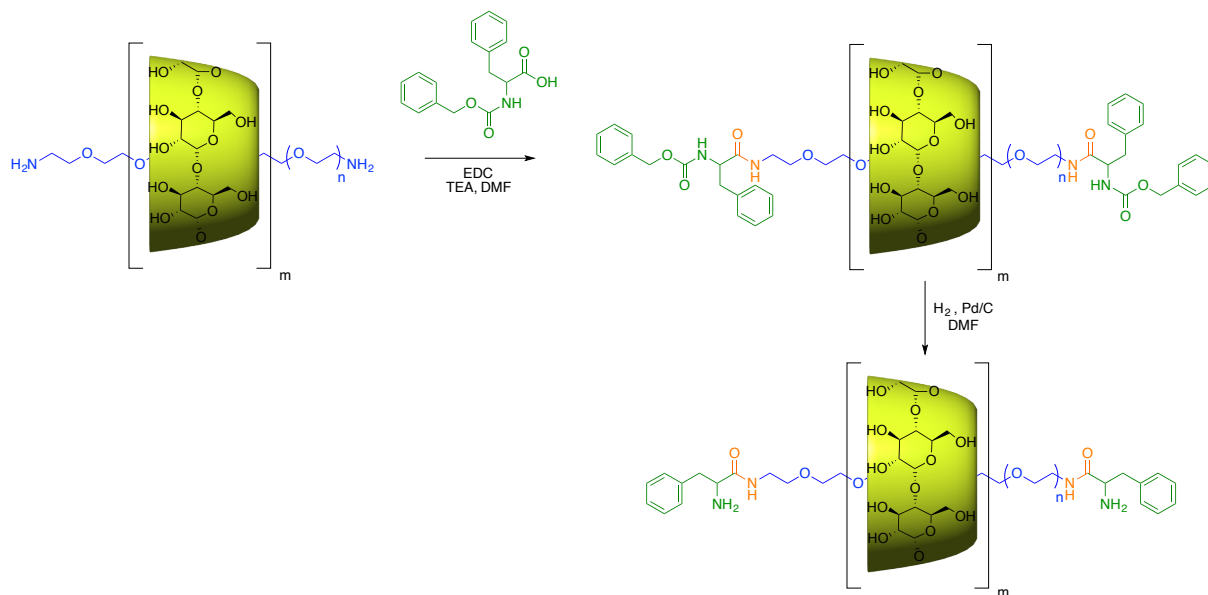


Figure 21 : Synthèse du premier PR-CDs biodégradable<sup>[42]</sup>

Le groupe de Yui a par la suite étudié la synthèse d'hydrogel à partir de ce type de PR-CDs biodégradables. Dans la Figure 22, l'hydrogel est réalisé par couplage statistique entre CDs de PRs différents. Le col primaire de la CD est statistiquement activé avant de réagir avec du PEG-bisamine. Le PEG peut alors réagir avec des CDs de différents PRs et ainsi réticuler l'ensemble pour former l'hydrogel.<sup>[43]</sup>

En 2002, l'équipe de Yui décrit son étude sur l'utilisation d'un tel hydrogel pour la reconstruction tissulaire.<sup>[41a]</sup> En effet, elle s'intéresse à l'adhésion et à la prolifération des fibroblastes (cellules des tissus conjonctifs) au sein du gel. En comparant un gel de polymère à l'hydrogel de PR-CDs décrit plus haut, elle parvient à mettre en évidence que l'adhésion et la prolifération se font plus efficacement sur l'hydrogel réticulé par couplage entre des PR-CDs et du PEG. Son explication suggère que les cellules reconnaissent le caractère hétérogène lié à la structure hydrophobe des PRs et hydrophile du PEG. De plus, elle constate une prolifération d'autant plus élevée que le PEG-bisamine est court et que le taux de réticulation est élevé. Ces travaux permettent d'envisager l'utilisation de tels hydrogels pour soigner certaines blessures nécessitant une reconstruction locale de tissu, d'os, ou de cartilage. De plus, la haute rétention d'eau de ces hydrogels pourrait leur donner un intérêt pour le soin lié à des brûlures importantes.

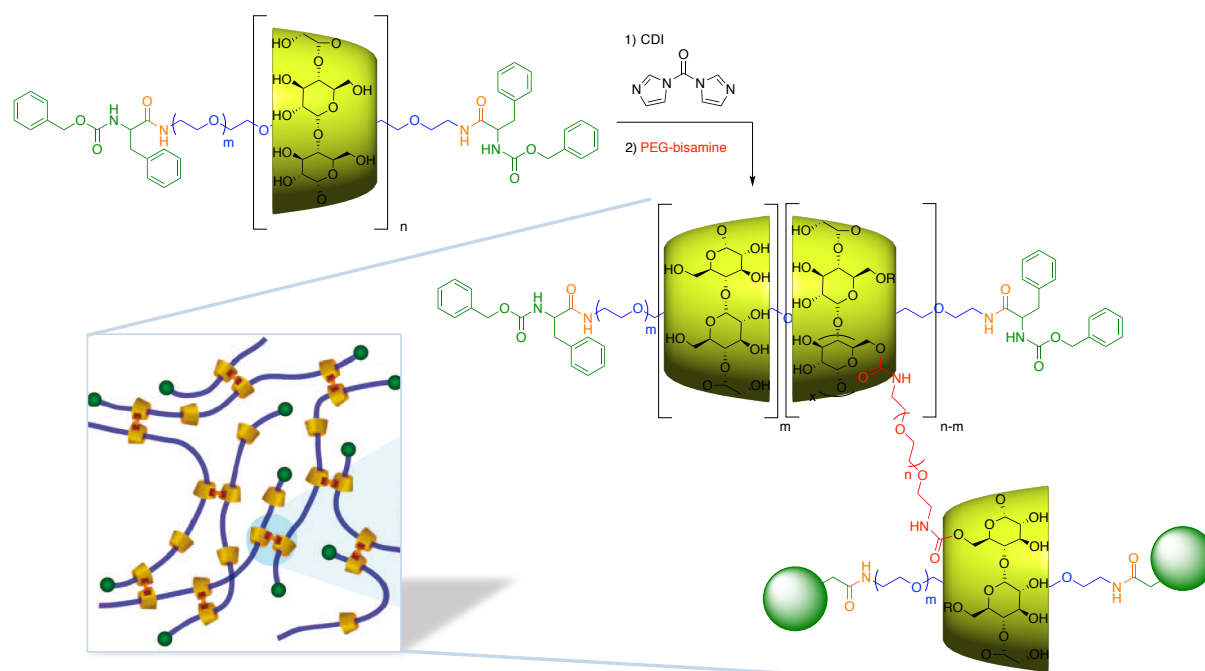


Figure 22 : Couplage intermoléculaire de PR-CDs pour l'obtention d'hydrogels<sup>[43]</sup>

En 2003, ce sont des tests sur la prolifération de chondrocytes (cellules composant le cartilage) qui sont effectués avec des hydrogels similaires par cette même équipe.<sup>[44]</sup> Ils mettent en avant la possibilité d'effectuer de l'ingénierie pour la reconstruction cartilagineuse en fonction de la porosité de l'hydrogel, mettant en avant la modulation possible de leur élasticité. L'année suivante, ils s'intéressent à l'incorporation de cholestérol sur le PR-CDs, non seulement pour augmenter la prolifération mais aussi pour contrôler la rapidité de la décomposition de l'hydrogel.<sup>[41b]</sup> Cette dégradation progressive du gel est très intéressante car elle permet la reconstruction du tissu, cartilage, os (2005),<sup>[41c]</sup> autour du gel, puis, progressivement le remplacement total de ce dernier. L'an dernier, le groupe de Yingjun Wang, en Chine, a rapporté l'utilisation d'un hydrogel formé de collagène et de PR-CDs pour améliorer les propriétés mécaniques du collagène et promouvoir la prolifération cellulaire sur la base d'un hydrogel biodégradable pour accélérer le processus de cicatrisation.<sup>[45]</sup>

### b. Hydrogels pour le relargage de principe actif

Lorsque l'on envisage l'utilisation d'hydrogel pour le relargage de principe actif, il s'agit soit de l'encapsulation/adsorption d'un principe actif au sein du gel, soit de la fonctionnalisation des CDs par ce principe actif. Ainsi, dans les deux cas, la décomposition de l'hydrogel au fur et à mesure du temps est nécessaire pour entraîner le relargage lent et contrôlé du principe actif.

Dans l'étude modèle réalisée par Jun Li *et al.*,<sup>[46]</sup> de l'isothiocyanate de fluorescéine-dextrane (FITC-dextrane) est encapsulé dans un hydrogel d' $\alpha$ -CDs enfilé sur du PEG. La formation du gel, ici, est uniquement due à l'enchevêtrement des macromolécules de polymères (PEG libre) et des PR-CDs en pelote. Après avoir étudié les propriétés thixotropiques des gels et validé la possibilité de réaliser leur injection, ils s'intéressent à la vitesse de décomposition de ces derniers. Ils parviennent à moduler la vitesse de libération du composé encapsulé en fonction du poids moléculaire du PEG libre utilisé pour l'enchevêtrement (pour une taille et un recouvrement du PR constants) (Figure 23).

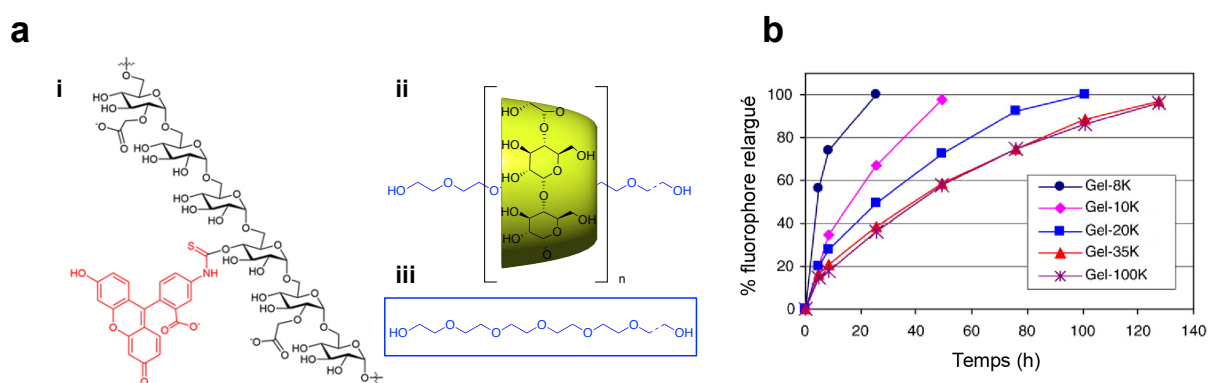


Figure 23 : a) Composants de l'hydrogel enchevêtré : i) FITC-dextrane ; ii) PR- $\alpha$ -CDs ; iii) PEG libre de différentes tailles. b) Pourcentage de fluorophore (FITC-dextrane) relargué en fonction du temps (hydrogel à base de PEG libre de poids moléculaire allant de 8k à 100k).<sup>[46]</sup> Plus le PEG libre a un poids moléculaire élevé, plus la dégradation de l'hydrogel est lente.

Ainsi, il semblerait que la décomposition du gel soit modulable en fonction de la longueur du PEG libre utilisé pour sa formation. Cela permet d'envisager le relargage contrôlé et continu de principes actifs. De plus, le mélange PEG libre/PR-CDs apporte des propriétés de thixotropie très intéressantes pour l'utilisation de ces hydrogels comme alternative à la pose d'implants thérapeutiques.

Dans une publication de 2009, les équipes chinoises de Wang, Luo et Zhang ont mis en évidence l'utilisation d'un hydrogel de PR-CDs pour un traitement anti-tumoral (Figure 24).<sup>[47]</sup> La formation de cet hydrogel provient de l'auto-assemblage d' $\alpha$ -CDs, de Doxorubicine (DOX, médicament anticancéreux) et de PEG modifié. C'est la formation du PR et son enchevêtrement qui permettent l'encapsulation de DOX et donc la formation de l'hydrogel chargé. Ainsi, « l'érosion » de ce dernier va permettre le relargage de la DOX.

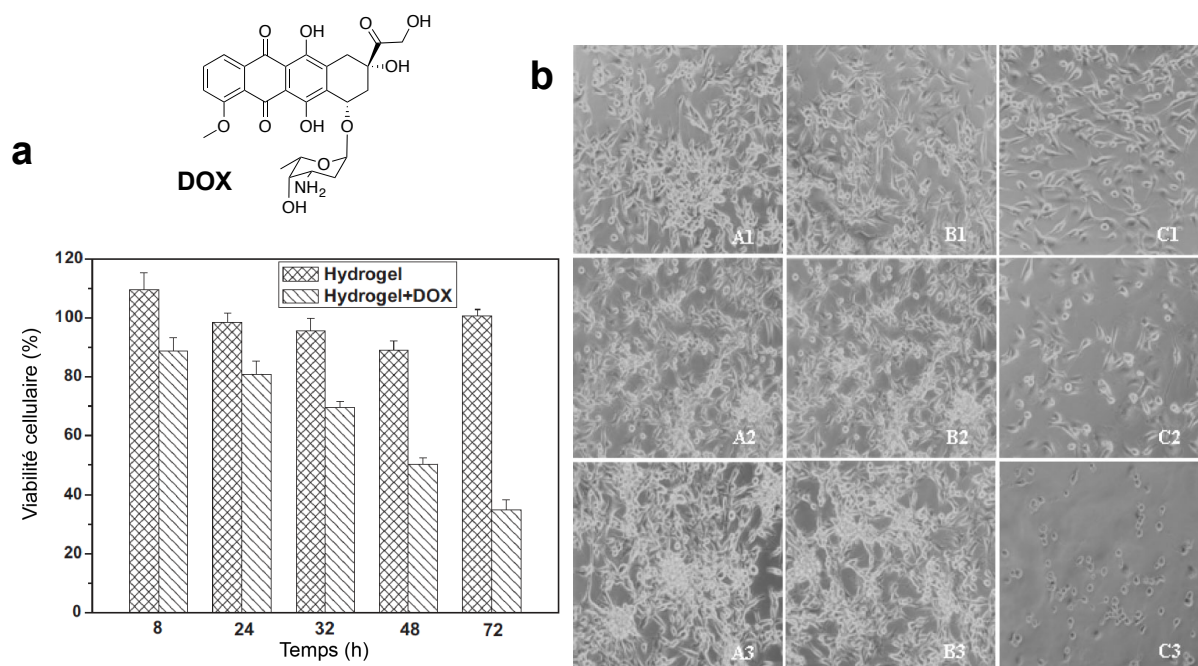


Figure 24 : a) Viabilité cellulaire en fonction du temps montrant une nette diminution de la viabilité cellulaire en présence d'hydrogel chargé en DOX. b) Morphologie des cultures de cellules cancéreuses (U87MG) sur polystyrène (A) ; hydrogel (B) ; hydrogel+DOX (C) après 24h (1) ; 48h (2) ; 72h (3). Les cellules cancéreuses prolifèrent dans les séries A et B en fonction du temps mais diminuent progressivement dans la série C.

Dans cet exemple, c'est l'utilisation de l'hydrogel comme réservoir d'un anti-cancéreux qui est intéressante. Son érosion progressive par la dissociation lente des CDs enfilées sur le PEG *pseudo*-bouchonné permet un relargage continu et contrôlé de la DOX et donc un traitement de la prolifération cellulaire sur plus long terme.

Ces exemples montrent les avantages apportés par l'utilisation de PR-CDs pour la synthèse d'hydrogels à visée thérapeutique : biodégradabilité modulable permettant le relargage lent, progressif mais surtout contrôlable d'un principe actif. De plus, l'utilisation conjointe de PR et polymère permet d'obtenir des propriétés mécaniques intéressantes pour l'injection d'hydrogels réservoirs de principe actif ou pour la reconstruction cellulaire.

### 3. PR-CDs biodégradables pour le transport de principe actif

Comme nous venons de le voir, les hydrogels à base de PR-CDs biodégradables peuvent avoir des applications aussi bien dans la reconstruction osseuse, cartilagineuse et tissulaire, que dans le relargage de principe actif. Néanmoins, ces structures ne sont plus à l'échelle de la molécule mais bien des nanostructures ou réseaux tridimensionnels pouvant être plus ou moins poreux. Ainsi, ils sont limités pour des applications de ciblage et de

relargage subcellulaire de principe actif et matériel génétique. C'est pourquoi il est intéressant de regarder les avancées qui ont été réalisées sur la synthèse de PR-CDs biodégradables pour des applications plus sélectives.

### a. Les PR-CDs biodégradables

Pour rendre un PR-CDs biodégradable, il suffit d'utiliser au moins un bouchon clivable aux extrémités de l'axe. Une fois ce bouchon retiré, la dilution et l'équilibre thermodynamique feront le travail de désenfilage des CDs. Ainsi, il est intéressant d'introduire une liaison covalente pouvant être rompue par une hydrolyse (ester, hydrazone, cétal), ou par voie enzymatique (liaison peptidique, pont disulfure). Voici quelques exemples :

- PR dégradé par voie enzymatique :

Comme décrit dans la partie des hydrogels biodégradables, Yui a publié en 1995 le premier PR-CDs possédant des bouchons clivables par voie enzymatique.<sup>[42]</sup> L'étude de désenfilage des CDs est réalisée en présence ou non de papaïne (protéase qui catalyse le clivage des liaisons peptidiques) (Figure 25).

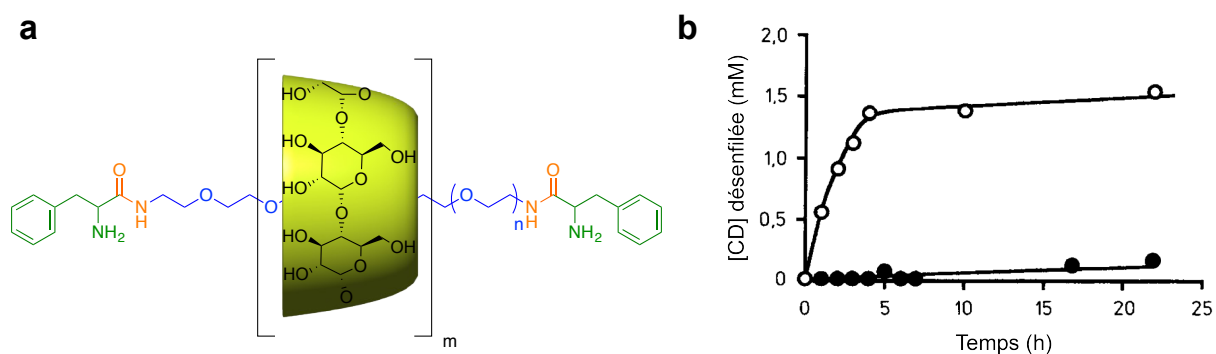


Figure 25 : a) PR biodégradable par voie enzymatique ; b) Concentration en CDs libres en fonction du temps (en présence de papaïne (o) ; en l'absence de papaïne (•))<sup>[42]</sup>. La papaïne permet bien un relargage de la CD étalé sur les 5 premières heures d'incubation.

Grâce à cette preuve de concept, il valide la possibilité de libérer un composé qui serait lié à la CD de la structure PR en présence d'une enzyme particulière par clivage des bouchons.

Une approche différente du groupe de Ritter consiste à utiliser cette fois une amyloglucosidase (enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons 1,4- $\alpha$ -D-glucose) pour venir



directement dé-cycliser la CD et donc libérer de la structure PR le principe actif qui serait lié à la CD.<sup>[48]</sup>

- PR dégradable en condition acide :

En 2005, le groupe de Yui propose la synthèse d'un PR de  $\beta$ -CDs biodégradable obtenu par enfilage de la CD sur un polymère tri-blocs PEG-PPG-PEG (PPG : poly(propylène glycol)).<sup>[49]</sup> Trois étapes de pré-fonctionnalisation sont réalisées sur l'axe afin d'obtenir des fonctions hydrazide en bout de chaîne. Après enfilage de la  $\beta$ -CD, le PPR est bouchonné par de l' $\alpha$ -CD-monoaldéhyde. Enfin, une étape de post-fonctionnalisation est réalisée sur les CDs afin d'accroître la solubilité du PR (Figure 26).

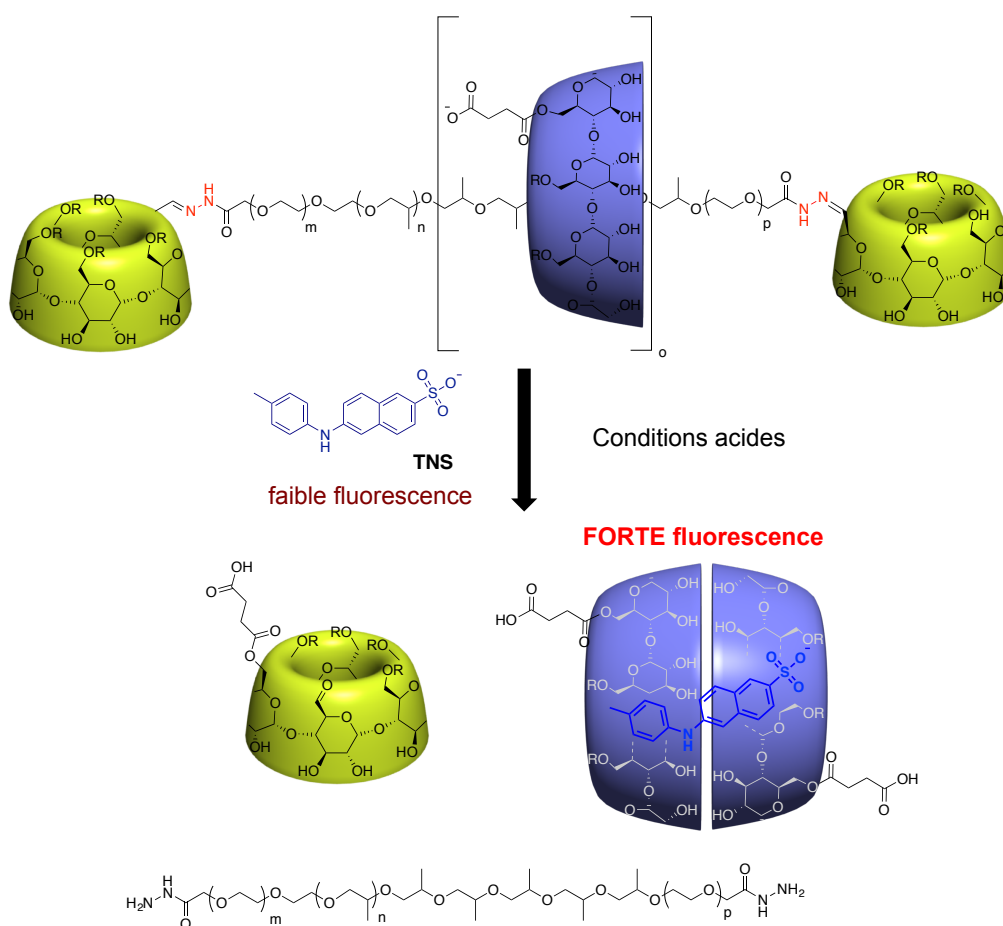


Figure 26 : PR de  $\beta$ -CDs biodégradable.<sup>[49]</sup>  $\alpha$ -CDs (en jaune),  $\beta$ -CDs (en bleu), R = H ou acide succinique. Les liaisons hydrazones (en rouge) peuvent être clivées en condition acide permettant le désenfilage des  $\beta$ -CDs et l'encapsulation du TNS (fluorophore à base de naphthalène). La formation du complexe d'inclusion est détectée par spectroscopie de fluorescence et valide le caractère biodégradable du PR.



Cet exemple est intéressant car il met en évidence le caractère compétitif de l'inclusion. Ici, une fois le polymère débouchonné en condition acide, le  $\beta$ -CD peut, soit rester enfilé dessus, soit former le complexe d'inclusion  $\text{TNS} \subset (2\beta\text{-CD})$ . S'il est thermodynamiquement plus stable de former le complexe avec le TNS, alors l'équilibre de complexation sera déplacé vers celui-ci. Cela permet d'envisager l'utilisation des PR-CDs comme des transporteurs pour venir libérer les CDs localement et permettre la complexation (voir l'extraction) de molécules accumulées ou agrégées à cet endroit. Nous verrons un exemple de ce type de PR pour le traitement de la maladie de Niemann-Pick.

Un PR similaire a été rapporté plus récemment.<sup>[50]</sup> Toujours basé sur un polymère triblocs (PEG-PPG-PEG), l'équipe réalise le couplage d'un dérivé cétal-bisamine à chaque extrémité de l'axe, enfle les  $\beta$ -CDs, bouche par un dérivé de triphénylméthylamine le PR, puis post-fonctionnalise les CDs (Figure 27a).

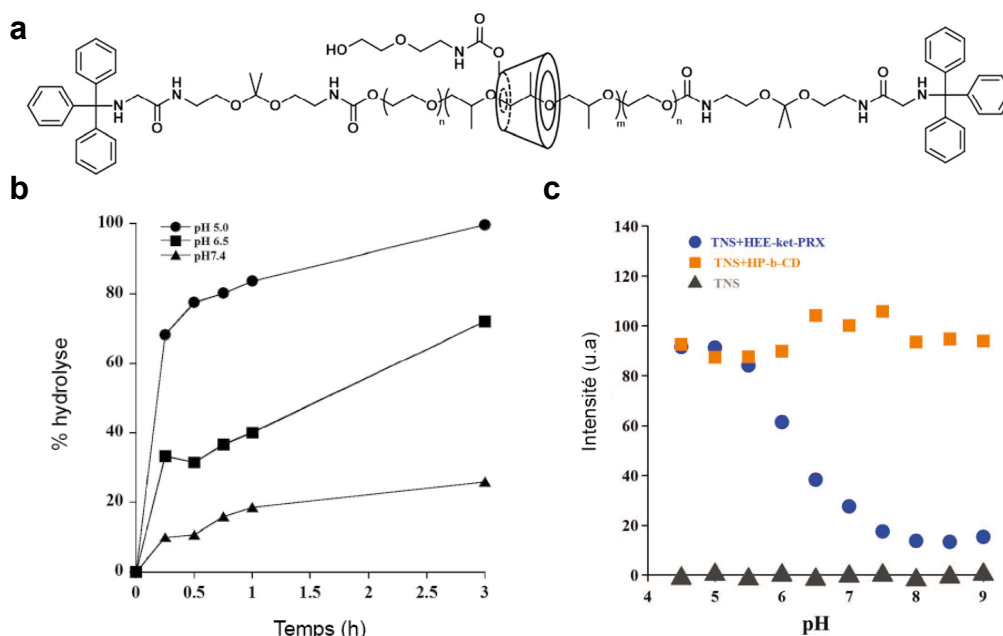


Figure 27 : a) PR-CDs biodégradable par hydrolyse de la fonction cétal ; b) Cinétique d'hydrolyse du PR à différents pH ; c) Intensité de fluorescence à 440 nm en fonction du pH (TNS seul, TNS+dérivé de  $\beta$ -CD, TNS+PR).<sup>[50]</sup> La figure c est en accord avec les courbes d'hydrolyse (figure b). A partir de pH 7 on détecte l'augmentation de fluorescence due au relargage de  $\beta$ -CDs et à la formation du complexe d'inclusion avec le TNS. Ce relargage s'intensifie en diminuant le pH.

De la même façon que précédemment, la dégradation du PR est étudiée indirectement par l'intensification de la fluorescence due à la formation du complexe d'inclusion  $\text{TNS} \subset (2\beta\text{-CD})$  (Figure 27c). Il est intéressant de noter que l'ajustement du pH entre 5 et 7,4 permet de

moduler la cinétique de décomposition du PR et donc de contrôler la vitesse de relargage de la  $\beta$ -CD (Figure 27b).

- PR dégradable en condition réductrice :

L'équipe d'Hideyoshi Harashima, s'est orientée vers l'introduction de ponts disulfure sur les extrémités de l'axe.<sup>[51]</sup> Ainsi, par ajout d'un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT), le PR perd ses deux bouchons et les CDs peuvent se désenfiler (Figure 28).

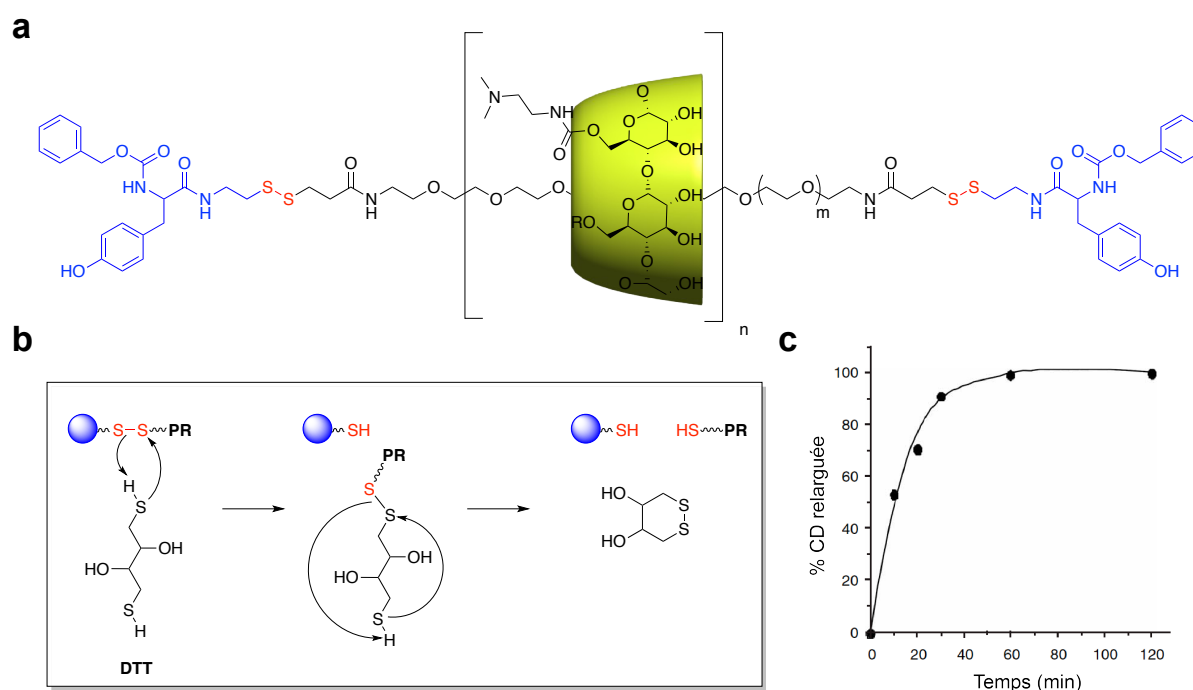


Figure 28 : a) PR-CDs dégradables par réduction du DTT. Le PR final est composé d' $\alpha$ -CDs enfilées sur du PEG. La CD est fonctionnalisée par des groupes diméthylaminoéthyl (DMAE) pour obtenir un PR polycationique. Le PR est bouchonné par du benzyloxycarbonyl-tyrosine via un couplage peptidique, le pont disulfure ayant été préalablement introduit en position intermédiaire ; b) Mécanisme de réduction d'un pont disulfure par le DTT ; c) Cinétique de relargage de la CD en présence de DTT.<sup>[51a,b]</sup>

Dans leur étude, ils suivent le relargage de CD-(DMAE) en fonction du temps par RMN du proton en condition réductrice (Figure 28c). La synthèse et l'utilité des PRs polycationiques seront discutées dans la partie transfection de matériel génétique.

Le développement de PRs biodégradables possédant des bouchons clivables sous différentes conditions permet le développement de plateformes pour le transport, l'internalisation et le relargage de principes actifs. Dans les applications thérapeutiques, outre

les quelques exemples de PRs utilisés comme anticoagulants<sup>[52]</sup> que l'on ne détaillera pas ici, on compte de nombreuses publications relatant leur utilisation comme plateforme de transfection,<sup>[51,53]</sup> inhibiteur,<sup>[54]</sup> anticancéreux,<sup>[22a,55]</sup> pour le traitement de la maladie de Niemann-Pick,<sup>[56]</sup> la malaria,<sup>[57]</sup> de certains cas d'infarctus et de paralysie,<sup>[58]</sup> et d'infections fongiques.<sup>[59]</sup>

Intéressons-nous à quelques exemples concernant le domaine thérapeutique.

### b. Les PR-CDs pour le transport de principe actif

Dans le *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, on trouve un récapitulatif de tous les principes actifs ayant été relargués par des PRs ou PPRs de CDs jusqu'en 2013 (Tableau 3).<sup>[39d]</sup> Nous allons voir plus en détails des exemples de PR-CDs pour le traitement tumoral ou la maladie de Niemann-Pick.

Tableau 3 : Principes actifs relargés par des PRs et PPRs de CDs

<b>Anticancéreux</b>	Doxorubicine, Cisplatine, Paclitaxel, Méthotrexate, <sup>[22a]</sup> Scutellarine, <sup>[58]</sup> Artésunate <sup>[57]</sup>
<b>Anti-inflammatoires</b>	Indométhacine, Prednisolone, Triamcinolone
<b>Antifongiques</b>	Ciclopirox, Amphotéricine B

- PR-CDs pour le traitement de cancer :

En 2014, l'équipe de recherche chinoise de Gu a publié dans *Nano-Micro Letters* leur étude sur le traitement de cellules cancéreuses par des nanoparticules (NPs) de PR-CDs.<sup>[22a]</sup> Par auto-assemblage, les macromolécules de PR-CDs s'organisent en pelotes ou NPs, l'ajout de Méthotrexate (MTX, anti-cancéreux) permet, par des interactions de van der Waals et des liaisons hydrogène, de charger les NPs pour des traitements anticancéreux (Figure 29a).

L'équipe démontre ici la possibilité d'utiliser les PR-CDs sous la forme de nanostructures de type NPs. Ici, le principe actif n'est pas covalamment couplé aux CDs mais, à l'image des hydrogels, chargé dans des pelotes polymériques. La baisse des IC<sub>50</sub> semble être due à la solvation du MTX par les NPs, et à leur relargage plus ciblé, impliquant des concentrations locales plus élevées en anti-cancéreux.

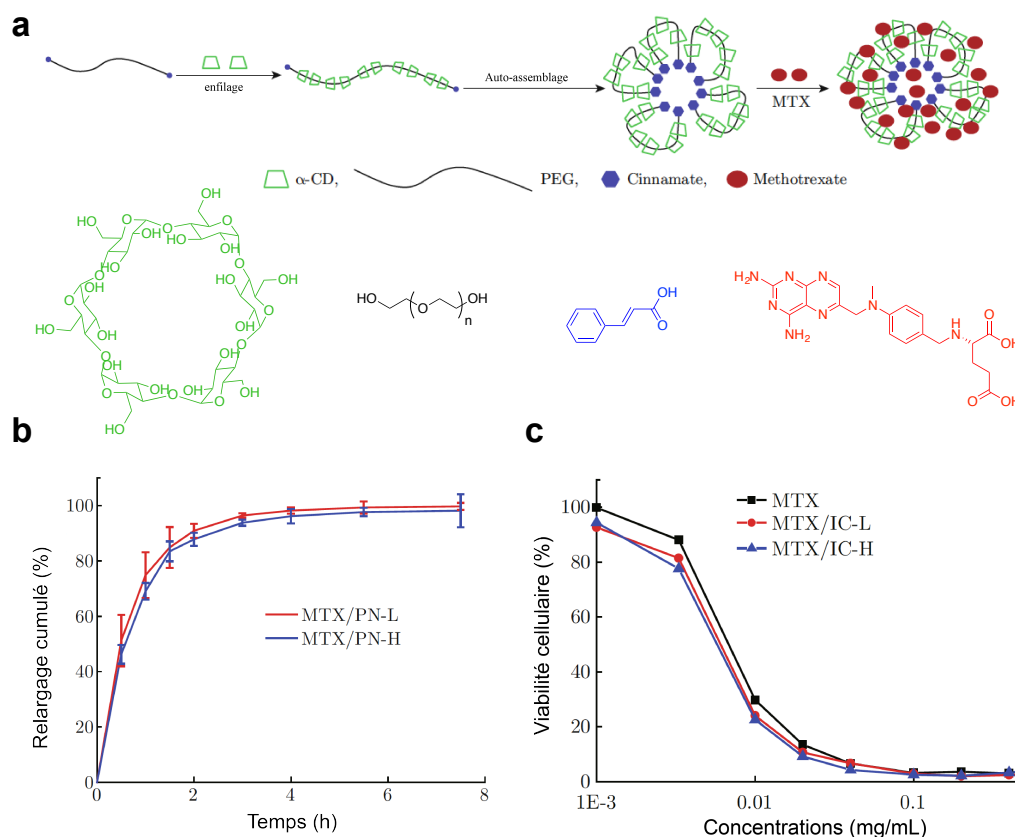


Figure 29 : a) Schéma de synthèse des nanoparticules de PR-CDs encapsulant le méthotrexate. Le PEG est fonctionnalisé par de l'acide cinnamique puis enfilé de force dans les  $\alpha$ -CDs sous ultrasons. Il s'auto-assemble en solution sous forme de pelotes de PR-CDs et permet l'encapsulation du MTX pour donner des nanoparticules de PR-CDs chargées en MTX; b) Cinétique de relargage du MTX. Les NPs PN-L et PN-H (PN-H étant deux fois plus chargée que PN-L) présentent des relargages similaires et le MTX est totalement relargué après 4h ; c) Viabilité cellulaire en fonction de la concentration en anticancéreux après 72h d'incubation. Les courbes sont similaires mais donnent accès à un IC<sub>50</sub> inférieur pour PN-L et PN-H (6,1 ; 5,5 ng·mL<sup>-1</sup> respectivement) par rapport au MTX seul (7,0 ng·mL<sup>-1</sup>).<sup>[22a]</sup>

- PR-CDs pour le traitement de la maladie de Niemann-Pick

La maladie de Niemann-Pick de type C est une maladie génétique lysosomale. La mutation du gène NPC1 (et/ou NPC2) conduit à la production de protéines impliquées dans le transport de molécules hydrophobes vers le lysosome, ce qui provoque l'accumulation de cholestérol et lipides dans ce dernier. Cette accumulation peut, à terme, provoquer des troubles neurologiques et une augmentation du volume du foie et de la rate. Benny Liu a publié en 2012 une étude démontrant l'efficacité de la 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD pour le traitement de la maladie de Niemann-Pick.<sup>[60]</sup> En effet, la cavité de cette CD permet la

complexation et l'externalisation du cholestérol.<sup>[61]</sup> Les obstacles à son utilisation sont principalement la toxicité et leur temps de vie très court dans le sang avant leur filtration et leur excrétion par les reins.

L'équipe de Yui ayant développé des PRs de  $\beta$ -CDs biodégradables à des fins de relargage de principe actif s'est alors penchée sur le problème.<sup>[56c,d]</sup> En effet, l'utilisation d'un PR biodégradable pour cette application permet de masquer la toxicité de la CD, de retarder la clairance rénale et donc d'augmenter la durée de circulation du composé dans le sang (du fait du poids moléculaire élevé du PR), et de relarguer par désenfilage à l'endroit choisi une grande quantité de CD (Figure 30).

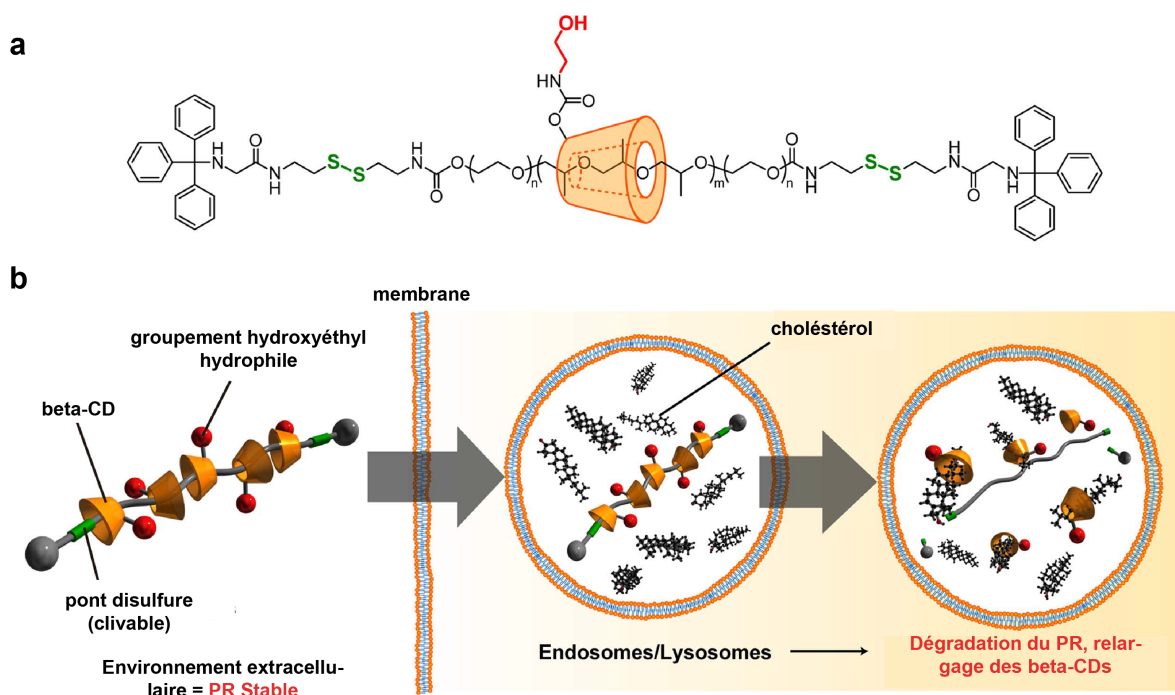


Figure 30 : a) PR-CDs biodégradable pour le traitement de la maladie de Niemann-Pick. Bouchons clivables par réduction du pont disulfure par action du tripeptide L-glutathione responsable du maintien du potentiel redox dans le cytoplasme ; b) Schéma de l'internalisation et de la dégradation du PR-CDs permettant la formation de complexe d'inclusion entre la CD et le cholestérol.<sup>[56c]</sup>

Yui *et al.* parviennent dans cet exemple à utiliser le PR comme transporteur pour décharger les  $\beta$ -CDs sélectivement dans le lysosome et permettre la complexation du cholestérol (Figure 30b). Si le mécanisme d'extraction du complexe d'inclusion cholestérol $\subset$  $\beta$ -CD n'est pas encore totalement élucidé, leur étude leur permet d'affirmer une concentration efficace médiane de leur PR 107 fois plus faible que la 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD.

### c. Les PR-CDs pour la transfection d'ADN

La thérapie génique consiste à traiter une pathologie en faisant pénétrer du matériel génétique dans les cellules. Conceptualisée depuis une cinquantaine d'année,<sup>[62]</sup> cette approche nécessite un niveau technologie très élevé. Au début des années 2000, Alain Fisher démontre, comme preuve de concept sur des cas d'immunodéficience sévère, l'intérêt croissant et atteignable de la technique. De très nombreuses pathologies sont concernées par ces avancées (maladie oculaire, neurologique, mono-génique, cardiovasculaire), en particulier, les maladies cancéreuses font l'objet de nombreux essais cliniques de thérapie génique. L'une des principales difficultés de la thérapie génique est le transport et l'internalisation du matériel génétique dans les cellules. Dans un premier temps, le développement de virus génétiquement modifiés pour qu'ils soient non pathogènes et qu'ils portent les séquences du gène thérapeutique a été étudié. Deux difficultés surgissent alors, celle de trouver un virus universel pour le transport de n'importe quel gène thérapeutique et la difficulté de production, manipulation et stockage de ces virus modifiés.

Avant les PR-CDs, ce sont les polycations qui ont été envisagés comme alternative non-virale pour la transfection.<sup>[63]</sup> Néanmoins, en comparant la structure d'un polymère polycationique à un PR-CDs polycationique (où les charges seraient portées par les CDs), on peut assez intuitivement comprendre le caractère adaptatif du PR. En effet, grâce au coulisement des CDs le long du polymère, on favorise les interactions électrostatiques entre les cations du PR et les phosphates du gène contrairement à la structure plus « rigide » du polymère polycationique. Ainsi, la formation du polyplex (assemblage du matériel génétique avec le PR) est favorisée et la compaction du matériel génétique plus efficace pour la transfection. Les équipes de Fu-Jian Xu,<sup>[53c]</sup> Jianhai Chen,<sup>[64]</sup> Jun Li,<sup>[65]</sup> David Thompson,<sup>[53b,d,66]</sup> Gerhard Wenz,<sup>[67]</sup> et Nobuhiko Yui<sup>[51a,b,53a,e,68]</sup> ont développé différents PR-CDs biodégradables pour des applications de transport et relargage de matériel génétique.

Ils cherchent donc à synthétiser des PR-CDs possédant des bouchons clivables dans les cellules pour entraîner le désenfilage des CDs (cationiques) entraînant le relargage du matériel génétique par désassemblage du polyplex (Figure 31 : travaux de Fu-Jian Xu).<sup>[53c]</sup>

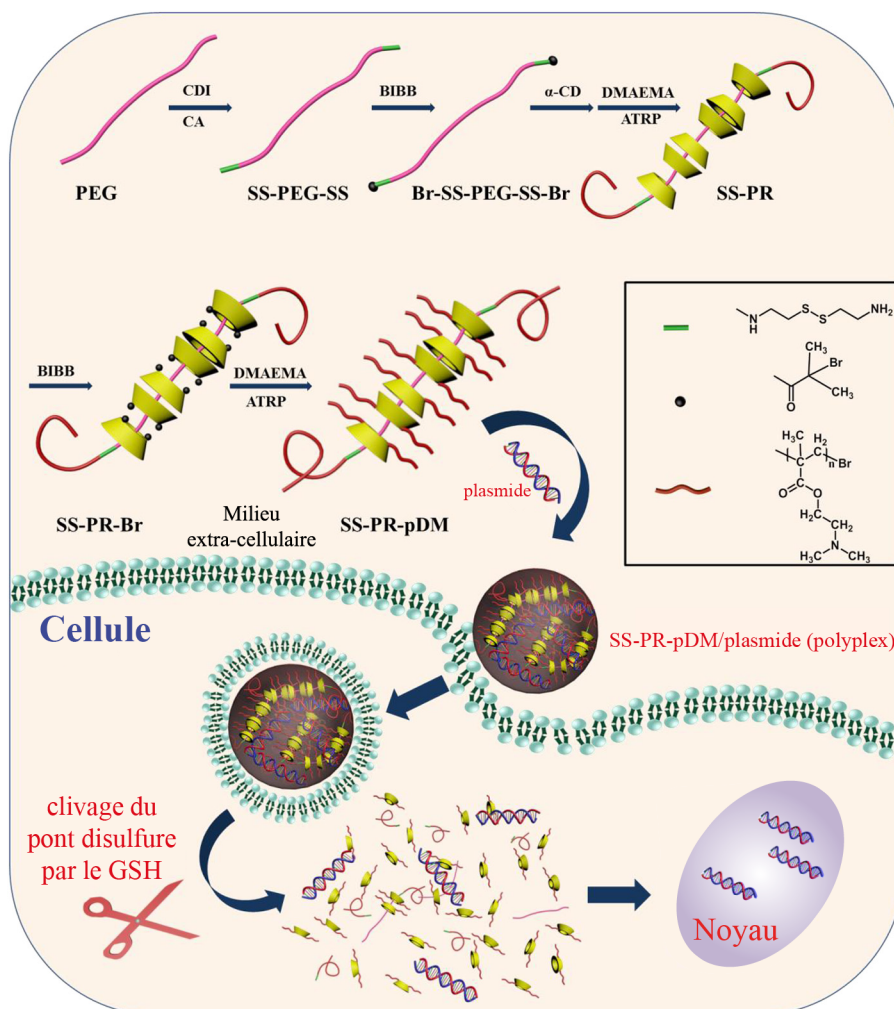


Figure 31 : Schéma de la préparation du polyplex et du relargage de plasmide de l'équipe de Xu.<sup>[53e]</sup> Le PEG est fonctionnalisé par du cystamine (introduction des ponts disulfure), puis du 2-bromoisobutyryl (BIBB) en bouts de chaîne pour permettre l'amorçage de la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP). L' $\alpha$ -CD est enfilée, suivi de la polymérisation *in situ* par le méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyl (DMAEMA) pour boucher le PPR. Enfin, les CDs sont post-fonctionnalisées par BIBB et ATRP pour obtenir le PR-CDs branché (SS-PR-pDM). Trois temps de réaction différents pour la 2<sup>e</sup> polymérisation donnent trois PRs : SS-PR-pDM 1, 2 et 3 possédant respectivement 10, 14 et 21 motifs monomériques par CD.

Les études de ces PR-CDs pour la transfection se décomposent en plusieurs étapes : la synthèse du PR-CDs biodégradable, la caractérisation de la formation du polyplex, les tests de sa cytotoxicité, de son internalisation, et de sa dégradation entraînant la libération du matériel génétique.

La formation du polyplex, c'est-à-dire la condensation du matériel génétique par le PR polycationique sous forme de nanoparticules, lui permet de passer la membrane cellulaire



chargée négativement pour atteindre le noyau cellulaire. Plus ces nanoparticules sont de petite taille, mieux elles pénétreront dans les cellules (Figure 32).

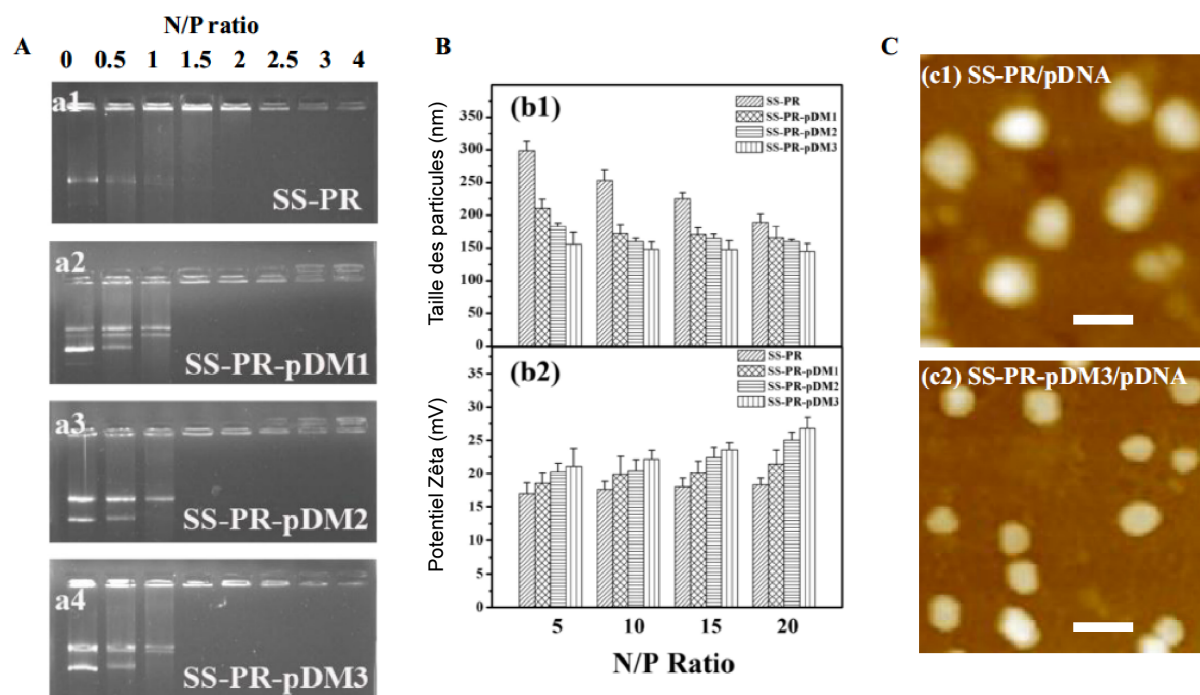


Figure 32 : A) Gels d'électrophorèse des complexes plasmide et SS-PR ou SS-PS-pDMs pour différents ratio d'azote/phosphore (N/P). La post-fonctionnalisation des CDs permet de réduire la quantité de PR nécessaire pour condenser l'ensemble du matériel génétique ; B) Taille des particules (b1) et leur potentiel Zêta (b2). Plus la post-fonctionnalisation est importante, plus les polyplexes sont chargés, donc plus les NPs sont petites ; C) Image par Microscopie à Force Atomique (AFM) des complexes plasmide et SS-PR ou SS-PR-pDM3 (N/P = 20) (barre d'échelle : 200 nm). Validation par microscopie de la taille moyenne des NPs plus petites et condensées avec le SS-PR-pDM3.<sup>[53c]</sup>

Les travaux de Xu *et al.* permettent de facilement contrôler la taille et la charge des polyplexes par l'ajustement du temps de réaction de la post-fonctionnalisation par polymérisation, et donc de contrôler l'internalisation du plasmide. Ils ont démontré une augmentation de la stabilité, de la pénétration cellulaire et de l'expression du gène en augmentant la charge globale du polyplex.

Les études de ces dernières années ont montré des résultats concrets de transfection de gène (luciférase, lacZ, GFP, p53), ainsi que d'extinction de gène par le relargage de petits ARN interférents (inhibition de la production de luciférase ou de GFP).<sup>[39d]</sup> Comme mis en évidence précédemment, l'utilité du PR polycationique pour réaliser la condensation du matériel génétique vient de la grande mobilité des CDs enfilées sur le polymère. C'est la



flexibilité et l'adaptabilité du PR qui sont mis à profit. On peut imaginer utiliser cette propriété pour créer des ligands multivalents à partir de PRs.

#### 4. PR-CDs pour le ciblage (reconnaissance membranaire)

Les PR-CDs montrés jusqu'ici ont souvent été post-fonctionnalisés. Ces réactions, souvent statistiques, peuvent être utilisées pour l'introduction sur les CDs de ligands complémentaires de récepteurs. La Figure 33 représente schématiquement ce concept pour deux types de substrats multivalents. A gauche, on représente l'approche d'un PR-CDs fonctionnalisé par des ligands complémentaires des récepteurs membranaires. A droite, un polymère covalent réticulé par ces mêmes ligands. L'adaptabilité de l'orientation de chacune des CDs du PR ainsi que la distance les séparant permet de complexer chacun des récepteurs tandis que pour le polymère, si sa synthèse n'a pas été suffisamment ajustée, seuls quelques ligands pourront se complexer. Ainsi, on peut voir là un effet chélate et coopératif du PR, d'où un équilibre plus fortement déplacé vers la complexation de chacun des récepteurs dans le cas du PR.

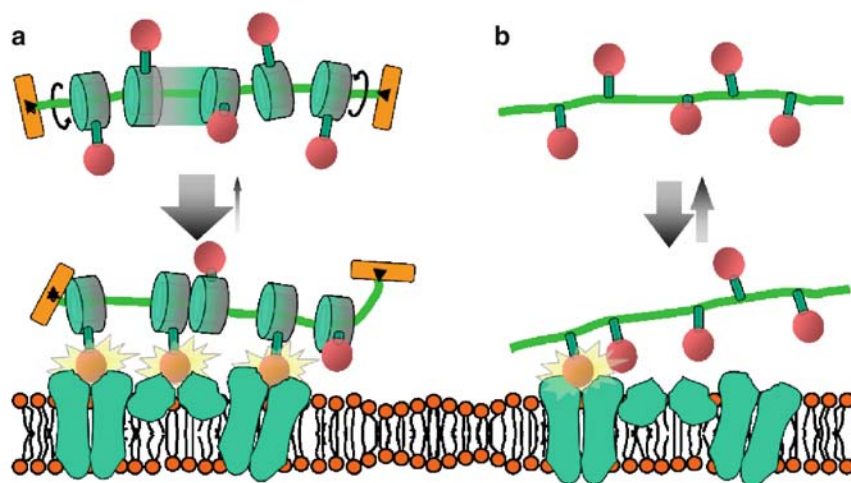
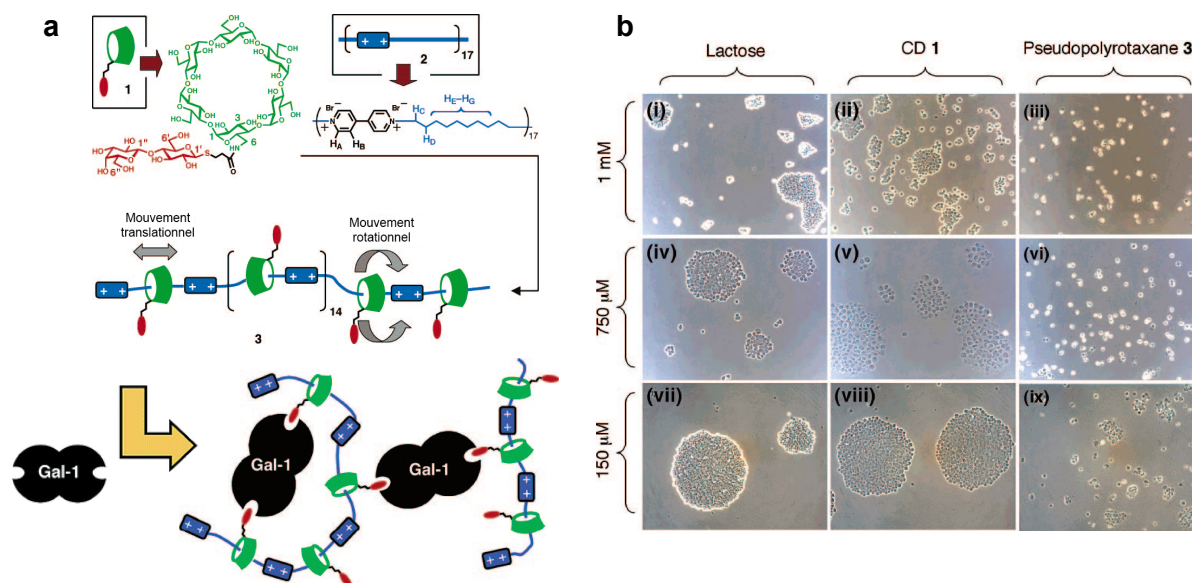


Figure 33 : Schéma de l'interaction multivalente entre une membrane cellulaire et un PR (a), un polymère covalent (b)<sup>[69]</sup>

Cette approche a donné lieu à plusieurs preuves de concepts<sup>[70]</sup> et est intéressante pour des applications en ciblage thérapeutique,<sup>[71]</sup> inhibition,<sup>[54,72]</sup> et activation de processus biologiques.

Intéressons-nous à un exemple d'inhibition de la Galectine-1 (*Gal1*) rapporté par l'équipe de Stoddart en 2004.<sup>[72]</sup> La Galectine-1 est une protéine surexprimée par de nombreux cancers qui participe au phénomène d'agglutination des cellules cancéreuses

entraînant la formation des tumeurs. Le lactose étant un bon ligand pour les récepteurs de *Gall*, le groupe de Stoddart s'est intéressé à l'étude de l'inhibition de ce phénomène en présence de *Gall* et d'un PPR d' $\alpha$ -CDs fonctionnalisées par du lactose (Figure 34).



L'interaction des lactoses portés par le PPR avec plusieurs *Gall* permettant d'inhiber la participation de la protéine à la formation d'agrégats cellulaires a été proposée (Figure 34a). Le caractère multivalent et l'adaptabilité du PR fonctionnalisé en font un ligand de choix pour l'inhibition de cette protéine.

L'interaction des lactoses portés par le PPR avec plusieurs *Gall* permettant d'inhiber la participation de la protéine à la formation d'agrégats cellulaires a été proposée (Figure 34a). Le caractère multivalent et l'adaptabilité du PR fonctionnalisé en font un ligand de choix pour l'inhibition de cette protéine.

## 5. Des PR-CDs pour l'imagerie aux PR-CDs multimodaux

Comme nous avons pu le démontrer plus haut, la synthèse de polyrotaxanes de cyclodextrines, leur caractérisation, leur application, en particulier dans le domaine biomédical se font de plus en plus fréquentes. Quand on s'intéresse au domaine biomédical, on pense diagnostic et thérapeutique, on parle d'ailleurs de théranostique lorsque ces deux applications sont réunies. Si de nombreux exemples de PR-CDs thérapeutiques ont été décrits précédemment, les exemples d'utilisation pour le diagnostic par l'imagerie médicale sont rares. Qui plus est, la majorité des exemples thérapeutiques sont réalisés sur des cultures cellulaires et ne vont quasiment jamais jusqu'aux tests *in vivo* sur le petit animal.

### a. PR-CDs pour la microscopie de fluorescence

Dans la littérature, on trouve quelques exemples de PR-CDs développés pour l'imagerie médicale. Certains développés sur des cultures cellulaires comme dans l'étude de Nobuhiko Yui de 2014,<sup>[73]</sup> où il rapporte la synthèse de PRs d' $\alpha$ -CDs fonctionnalisés par l'AF-545 (fluorophore de la famille des rhodamines dont le maximum d'absorbance est à 545 nm) pour quantifier son internalisation. Il le compare à celle d'un polymère covalent fonctionnalisée lui aussi par ce fluorophore. Ainsi, la microscopie de fluorescence permet de valider, au niveau cellulaire, la meilleure internalisation du PR par rapport au polymère covalent (Figure 35).

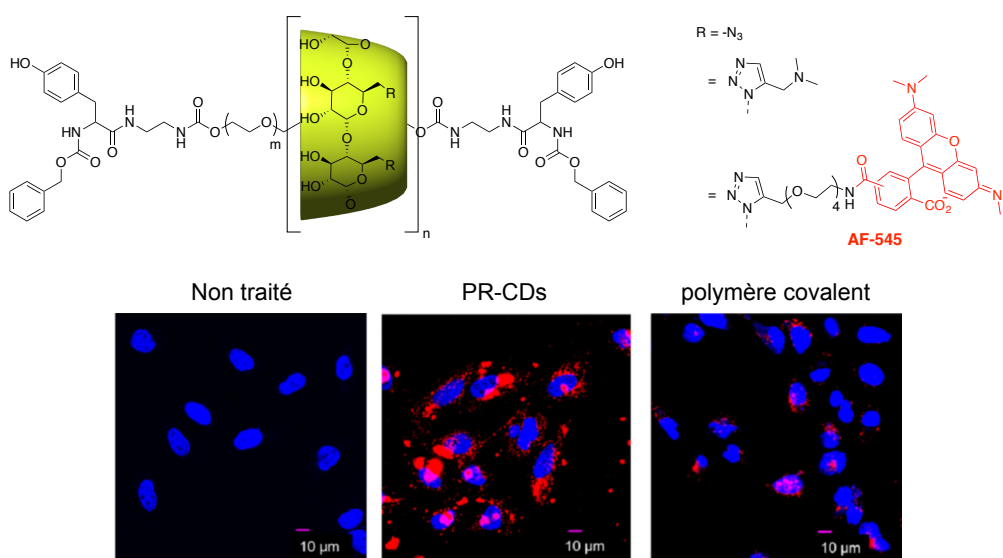


Figure 35 : Images prises au microscope confocal de cellules cancéreuses (HeLa) après 4h d'incubation avec le PR-CDs ou le polymère covalent (500 nM) à 37°C (en rouge le signal de fluorescence de la rhodamine, en bleu les noyaux cellulaires marqués au Hoechst 33342)<sup>[73]</sup>

De son côté, le groupe de Yu en 2015 publie un PR de  $\beta$ -CDs fluorescent pour le ciblage tumoral chez le petit animal (Figure 36).<sup>[55e]</sup> Il démontre *in vivo* la possibilité d'utiliser un PR-CDs pour le ciblage de tumeurs. Celui-ci semble préférentiellement s'y accumuler, présentant un grand intérêt pour le relargage localisé d'anticancéreux et donc un traitement spécifique de la tumeur. On peut considérer ce PR comme bi-fonctionnel car il permet l'imagerie par microscopie de fluorescence et le ciblage de la tumeur.

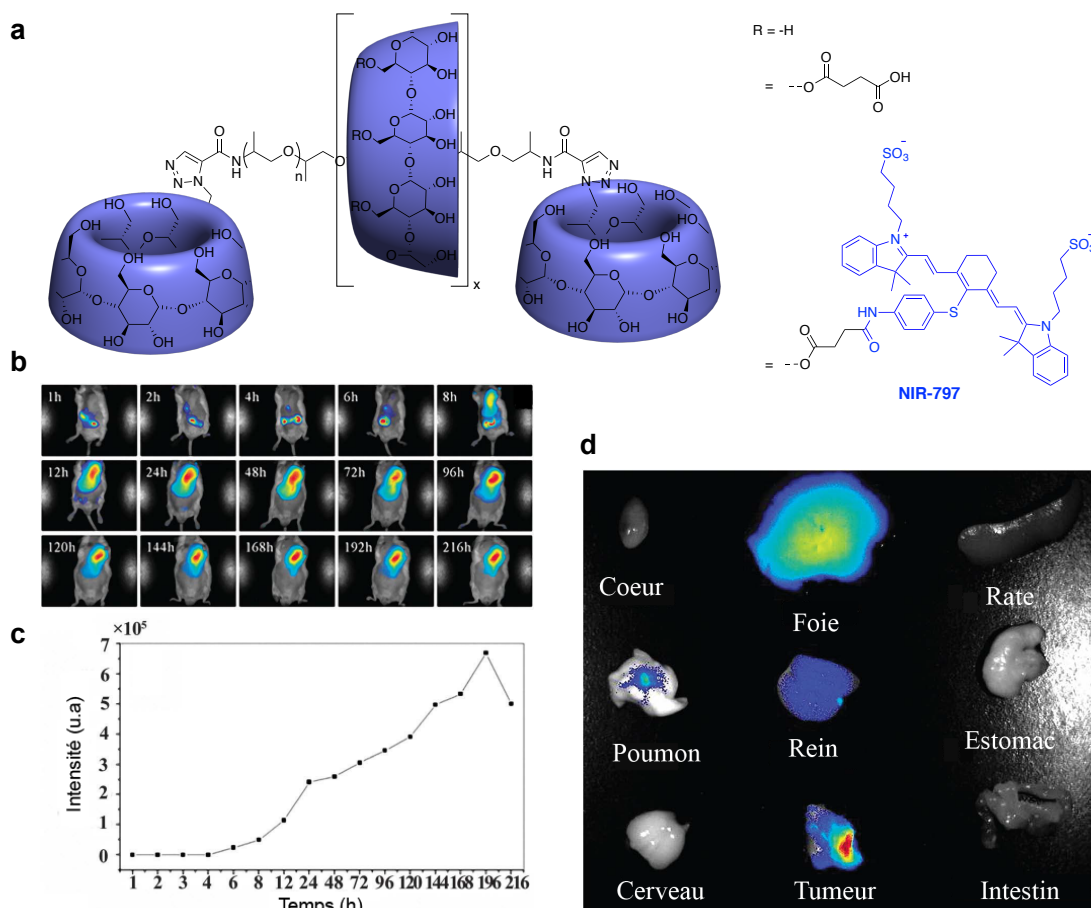


Figure 36 : a) PR de  $\beta$ -CDs fonctionnalisées par de l'acide succinique et partiellement marqué par le NIR-797 (fluorophore de la famille des cyanines émettant dans le proche infrarouge). b) Microscopie de fluorescence proche infrarouge sur une souris portant une tumeur en fonction du temps après injection du PR-fluorescent ; c) Intensité de fluorescence dans la région de la tumeur en fonction du temps ; d) Microscopie de fluorescence proche infrarouge des différents organes de la souris portant la tumeur sacrifiée 216 h après l'injection du PR-fluorescent<sup>[55e]</sup>

L'équipe de Wang a récemment développé une synthèse de PR-CDs bi-fonctionnels par copolymérisation.<sup>[74]</sup> Dans leur étude, ils s'intéressent à l'incorporation de fluorophore (rhodamine) pour l'imagerie et d'alendronate (ALN) pour le ciblage et le traitement de l'ostéoporose (maladie osseuse) (Figure 37). L'efficacité du greffage du PR sur le fémur et sa détection par microscopie de fluorescence permettent de valider l'approche du groupe de Wang pour la synthèse de PRs bi-fonctionnels par copolymérisation. Ces deux derniers exemples ouvrent la voie au suivi médical. Le PR, jouant à la fois le rôle d'agent thérapeutique, de ciblage, et d'imagerie permet à la fois de traiter et de suivre l'évolution et l'efficacité du traitement.

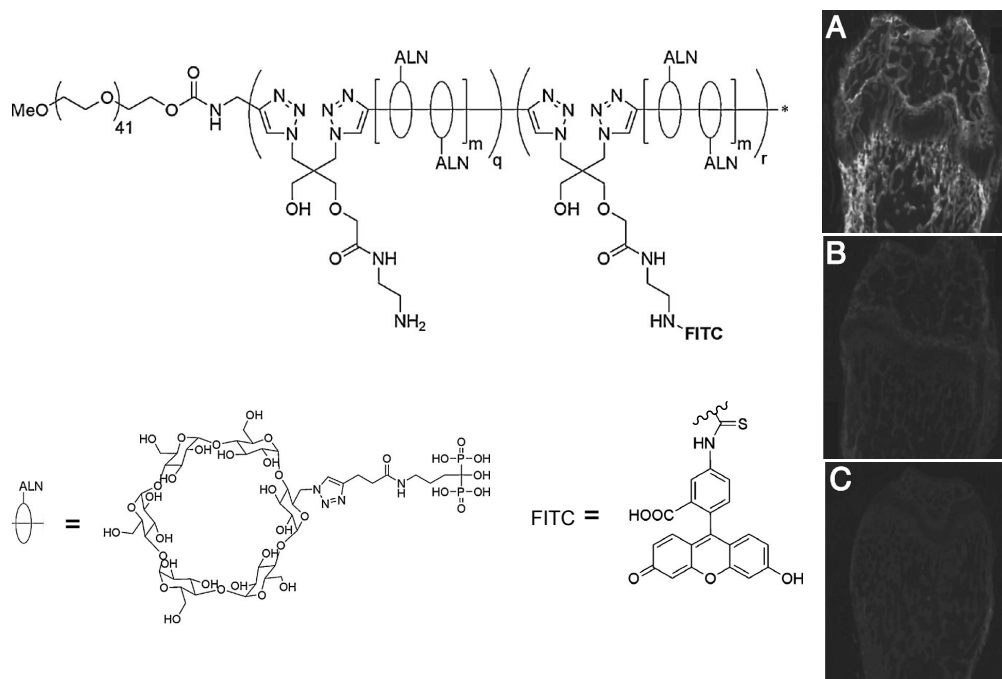


Figure 37 : PR bi-fonctionnel pour le traitement et le suivi de cas d'ostéoporose obtenu par copolymérisation entre un PPR d' $\alpha$ -CDs fonctionnalisées par l'ALN et un monomère post-fonctionnalisable par un fluorophore (FITC) ; fémurs de souris observés par microscopie de fluorescence après injection du PR bimodal (A), d'un copolymère fluorescent sans CDs (B), de solution saline (C). Aucun signal de fluorescence lors de l'injection de solution saline ou du copolymère fluorescent n'est détecté tandis qu'on observe un signal lors de l'injection du PR bi-fonctionnel. Le PR se fixe donc bien sur le fémur.<sup>[74]</sup>

## b. PR-CDs comme agents de contraste pour l'IRM

D'autres groupes de recherche s'essayent à la synthèse de PR-CDs fonctionnalisés par des agents de contraste (AC) pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM).<sup>[75]</sup> En 2015, Thompson *et al.* publient leurs travaux sur l'intérêt d'utiliser ces structures supramoléculaires pour l'IRM. Ils obtiennent un composé biocompatible ayant comme propriétés intéressantes pour l'imagerie : une meilleure efficacité de l'AC (relaxivité par mole d'AC augmentée), une augmentation du temps de résidence dans le sang, et une furtivité de l'AC qui lui confère une biodistribution totale (Figure 38).

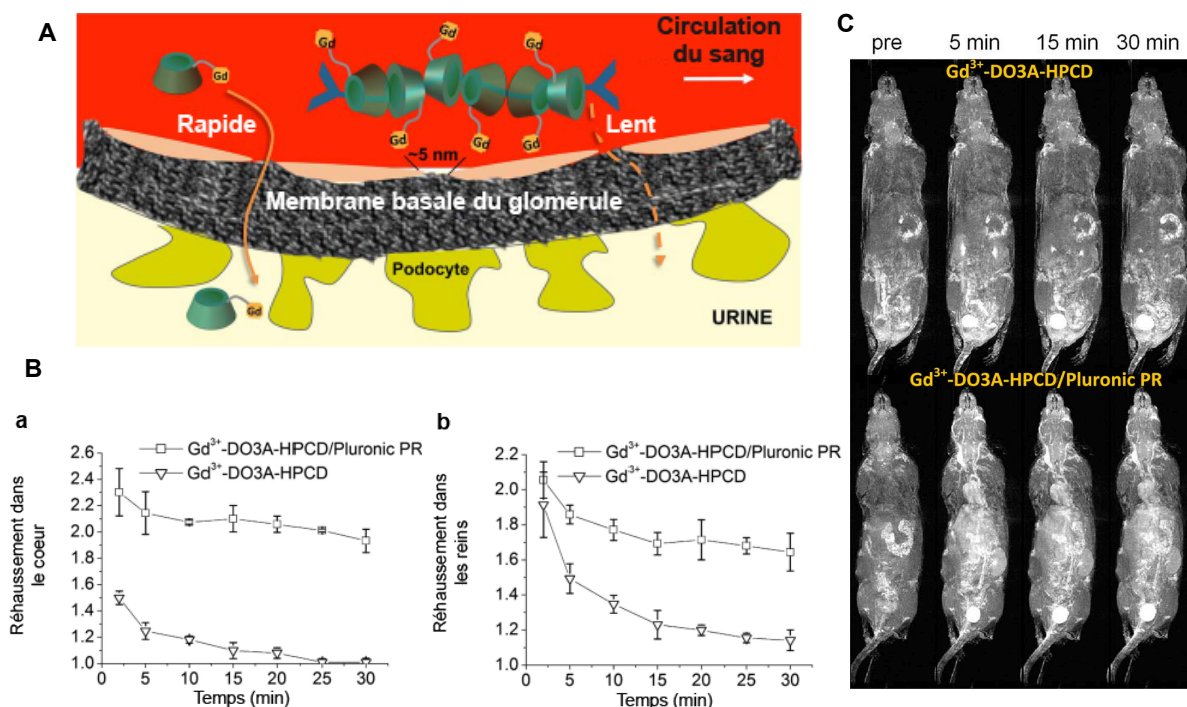


Figure 38 : A) Schéma de filtration de l'AC par le rein. Alors que la CD-AC est rapidement filtrée par la membrane basale glomérulaire des reins, le PR-AC poursuit sa circulation dans le sang ; B) Rehaussement du contraste dans le cœur (a) et dans les reins (b) en fonction du temps après l'injection de la CD-AC ou de son PR associé. Après 25 minutes, la CD-AC ne circule plus dans le sang (plus de rehaussement dans le cœur). Elle a rapidement été filtrée par le rein, puis elle en est excrétée vers la vessie ou dégradée. Le PR-AC reste dans le sang, son rehaussement reste constant dans le cœur jusqu'à 30 minutes après l'injection ; C) IRM d'une souris avant et 5, 15 et 30 min après injection de l'un des ACs. Une plus grande biodistribution est observée pour le PR-AC qui semble passer dans tous les organes de la souris.<sup>[75]</sup>

## 6. Conclusion de l'apport des PR-CDs au domaine biomédical

Cette partie a permis de détailler le panel d'applications possibles des PR-CDs sous différentes formes (structure linéaire, nanoparticules, et hydrogels) biodégradables ou non. Tantôt échafaudage pour la reconstruction de tissus, transporteur et réservoir pour le relargage de principe actif, matériel génétique ou hôte pour l'externalisation cellulaire, jusqu'à leur utilisation comme ligand multivalent, les PRs de CDs offrent de nombreux avantages récapitulés sur la Figure 39.



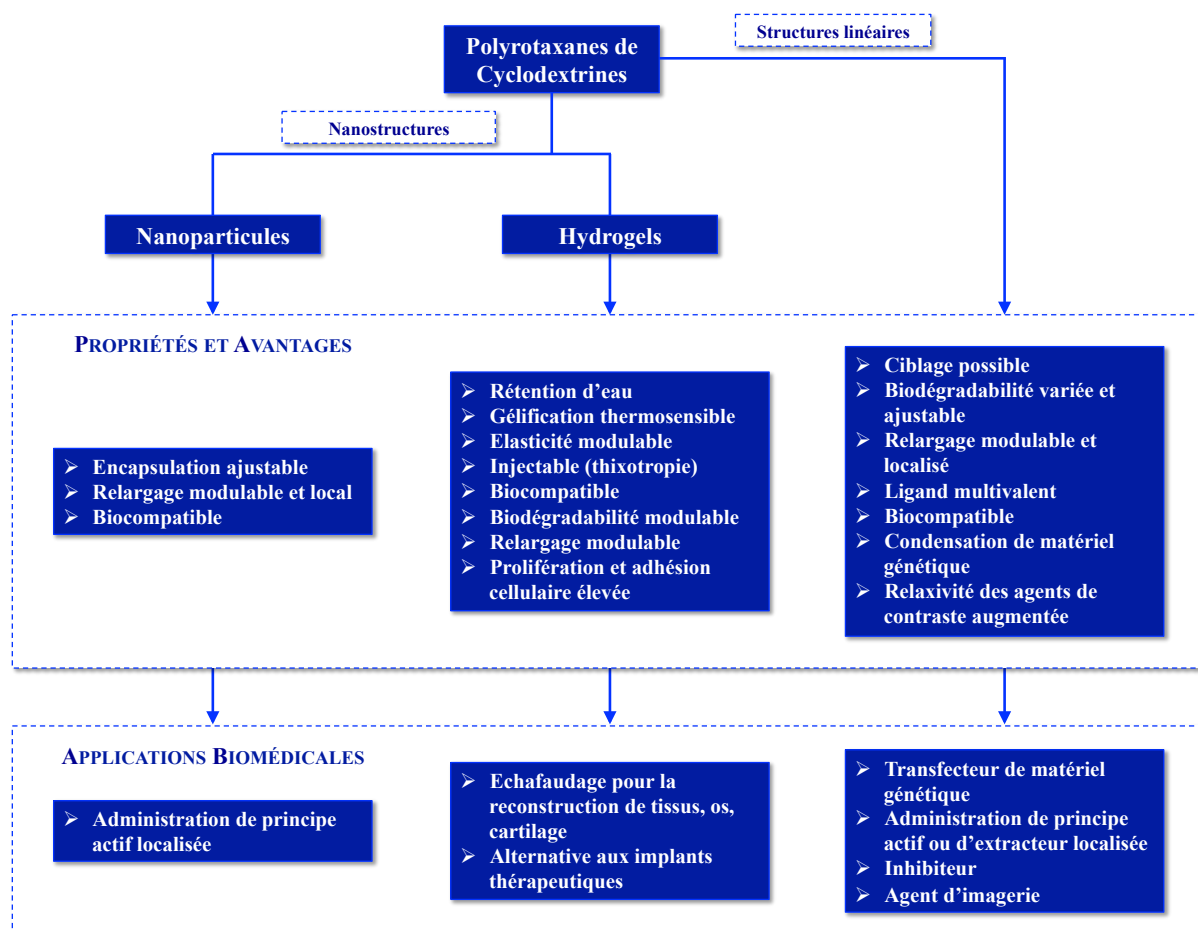


Figure 39 : Schéma bilan des avantages et applications biomédicales des PR-CDs sous leurs différentes formes

#### IV. Conceptualisation du projet de thèse

Les polyrotaxanes de cyclodextrines sont donc des architectures très attractives pour des applications dans le domaine biomédical. Depuis les années 1990, la communauté scientifique a su développer la synthèse de polyrotaxanes avec différents axes, bouchons, cyclodextrines (fonctionnalisées ou non), par différentes voies de synthèses, développer les réactions de post-fonctionnalisation, introduire de la biodégradabilité et de la biocompatibilité pour, enfin, aboutir à des domaines d'applications variés.

S'inscrivant dans une volonté de développer l'utilisation de polyrotaxanes de cyclodextrines multimodaux pour des applications biomédicales, nous souhaitons développer leur synthèse par enfilage de cyclodextrines fonctionnalisées. Le défi est alors de trouver une approche synthétique adaptée à la création d'une bibliothèque de CDs fonctionnalisées et de trouver un axe polymérique permettant leur auto-assemblage pour l'obtention de PRs multimodaux.

## 1. PR-CDs pour l'imagerie bimodale

Le projet est donc de synthétiser des PRs de CDs multimodaux. Comme preuve de concept, la synthèse d'un PR bimodal pour l'imagerie médicale, qui combinera des sondes fluorescentes pour l'imagerie de fluorescence et des agents de contraste pour l'IRM sera réalisée. L'imagerie bimodale permet de combiner les avantages de techniques complémentaires<sup>[76]</sup> et donc d'améliorer les outils de diagnostic ou d'analyse de mécanismes biologiques.<sup>[77]</sup> Les avantages des deux imageries sont : une très bonne résolution spatiale pour l'IRM et une grande sensibilité pour la microscopie de fluorescence. L'imagerie bimodale permet aussi : de réaliser des imageries à deux niveaux (à l'échelle du corps humain comme à l'échelle subcellulaire), et de confirmer la non-dissociation des sondes après injection.

### a. Approche synthétique de sondes multimodales

Pour faire de l'imagerie bimodale, il suffit de combiner deux sondes de deux techniques différentes. Cela est possible à l'échelle moléculaire en couplant simplement deux sondes préparées préalablement et séparément (Figure 40).<sup>[78]</sup>

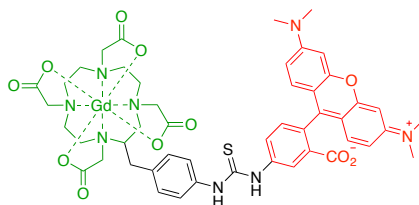


Figure 40 : Sonde bimodale pour l'IRM (agent de contraste paramagnétique en vert) et l'imagerie de fluorescence (fluorophore de la famille des rhodamines en rouge).<sup>[78]</sup>

Néanmoins, il est difficile de réaliser la synthèse linéairement si l'on envisage l'ajout de sondes supplémentaires. De plus, cette approche ne tient pas compte de la sensibilité des différentes techniques qui, étant différente, ne nécessite pas l'introduction de sondes dans les mêmes quantités. Ainsi, si on souhaite ajouter de la modularité au système, on peut imaginer réaliser la synthèse de sondes comme des monomères, pour en réaliser la copolymérisation conduisant à un polymère covalent multimodal (Figure 41).<sup>[78]</sup> Cette approche rend aisée l'introduction d'une nouvelle sonde et l'ajustement des fonctions en différentes proportions.



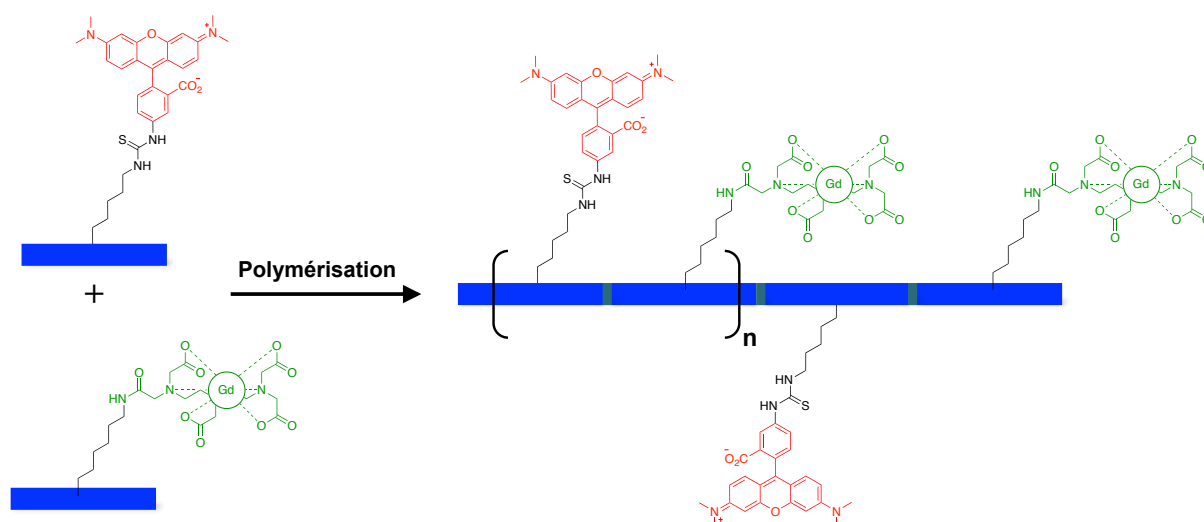


Figure 41 : Copolymérisation de monomères fonctionnalisés pour l'obtention de polymères bimodaux (imagerie de fluorescence et IRM)<sup>[78]</sup>

Une alternative, moins « linéaire », est de passer par un dendron permettant d'incorporer des « couches » de chacune des sondes pour obtenir un dendrimère multimodal.<sup>[79]</sup>

Enfin, une approche plus supramoléculaire, consiste en la formulation de structures nanoscopiques par auto-assemblage. Par exemple, par la formulation de liposomes permettant l'encapsulation de sondes, l'auto-assemblage en micelles de lipides fonctionnalisés, ou encore le greffage électrostatique de sondes ou d'agents de ciblage en surface de nanoparticules permettant l'obtention d'objets moléculaires multimodaux pour le domaine biomédical.<sup>[79]</sup>

### b. PR-CDs pour l'imagerie bimodale

La voie de synthèse la plus utilisée dans la littérature pour l'obtention de PRs fonctionnalisés consiste à former le PR puis à post-fonctionnaliser les CDs par réactions statistiques. Cette méthode a de nombreux inconvénients : le manque de contrôle du nombre de fonctionnalités introduites et leur proportion en fonction de la réactivité de chacune ; une caractérisation difficile du PR fonctionnalisé ; la nécessité de trouver des conditions réactionnelles en accord avec le PR, aussi bien pour la réaction que pour sa purification.

Une autre approche consiste à synthétiser une bibliothèque de cyclodextrines fonctionnalisées, puis d'obtenir un PR par auto-assemblage de ces briques élémentaires avec un polymère. Ce PR sera alors composé de CDs bien définies et caractérisées qui seront toutes fonctionnalisées par un agent particulier (Figure 42).

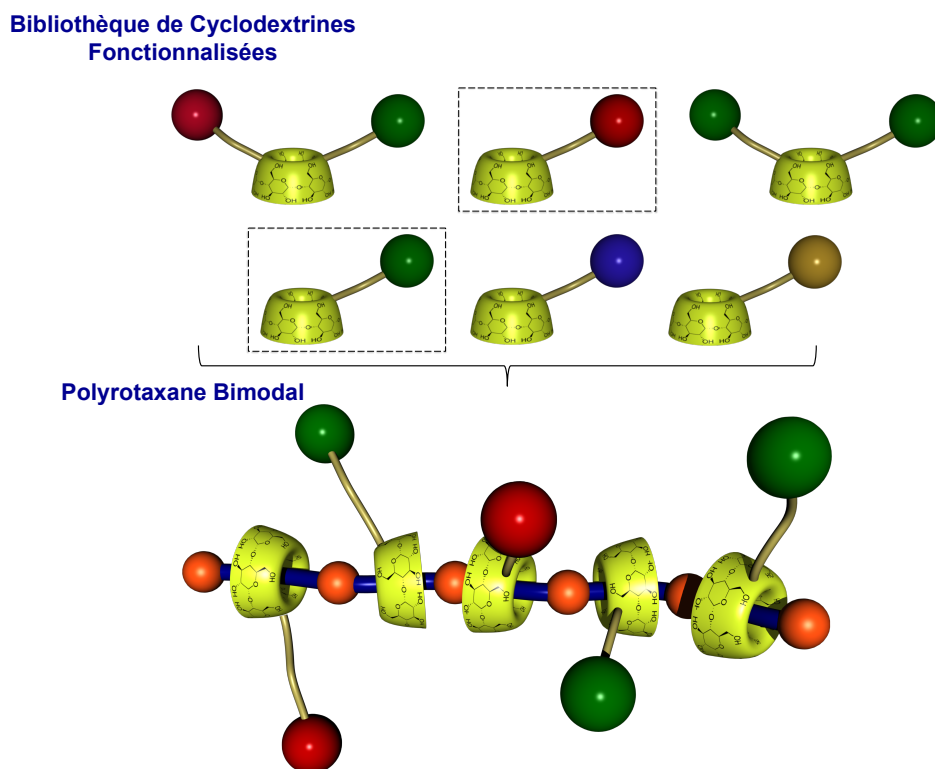


Figure 42 : Bibliothèque de CDs fonctionnalisées et exemple de PR bimodal synthétisable

Afin de permettre une **flexibilité** quant à la synthèse des différentes sondes pour l'imagerie (choix des fluorophores et agent de contraste, fonctionnalisation, optimisation des rendements, des propriétés et de l'hydrosolubilité), nous avons choisi d'effectuer le couplage avec la cyclodextrine à la dernière étape, juste avant l'enfilage de ces CDs fonctionnalisées sur l'axe. Pour ce faire, nous synthétisons l' $\alpha$ -CDs mono- ou bis-azoture d'une part, et des sondes pour l'imagerie ou agent de contraste possédant des alcynes terminaux d'autre part. Nous pouvons alors aisément générer une bibliothèque de CDs fonctionnalisées par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au Cuivre (CuAAC). Cette approche, très flexible, permet d'ajouter très simplement une fonction supplémentaire à notre bibliothèque en synthétisant son dérivé alcyne, cette synthèse et ses propriétés pouvant être optimisées et analysées séparément.

Les propriétés d'enfilage de ces CDs fonctionnalisées sont ensuite étudiées sur des axes modèles afin de trouver celui qui permettra l'enfilage efficace de chacune d'entre elles.

Enfin, une fois l'axe compatible avec chacune des CDs trouvé, la synthèse des PRs multimodaux peut démarrer. L'enfilage des CDs sur le polymère est réalisé dans l'eau et peut être suivi par RMN au cours du temps. Ainsi, en une seule étape de synthèse, on parvient à combiner l'ensemble des agents désirés. Cette approche est très **ajustable** car on peut choisir la proportion de chacun des agents sur le PR final, choisir le taux d'enfilage global, ainsi que

la longueur du PR (par le choix du polymère). Cette approche **modulaire** permet la génération de PRs multimodaux et s'adapte parfaitement à une synthèse à la demande.

La **biocompatibilité** du PR est espérée par l'utilisation de sondes/agents déjà utilisés pour des applications biomédicales ainsi que des CDs approuvées par la FDA. Enfin, comme on a pu le voir dans la partie bibliographique, la **biodégradabilité** du PR est possible par ajout de liaisons clivables. Nous avons choisi dans un premier temps de ne pas en introduire en espérant une dissociation lente des CDs *in vivo*, une capture rénale des CDs fonctionnalisées et hépatique du polymère pour leur excrétion.

## 2. Résultats antérieurs

Le projet « Polyrotaxane de Cyclodextrines pour l'Imagerie Bimodale » a démarré en 2010 avec la thèse de Jean Wilfried Fredey et le post-doc d'Aurélie Guénet. Si les objectifs du projet ont toujours été les mêmes, les voies de synthèse et axes utilisés ont évolué durant les premières années. Cette sous-partie permet de revenir sur les choix qui ont été faits initialement et sur l'avancée du projet avant mon arrivée.

### a. Choix de la cyclodextrine

L' $\alpha$ -CD possède une assez bonne solubilité dans l'eau (Tableau 1), elle peut être associée à de nombreux axes pour des complexes d'inclusion (Tableau 2), et elle est biocompatible.<sup>[38]</sup> Initialement, la synthèse du PR bimodal devait se faire par enfilage d' $\alpha$ -CDs sur du PEG suivi de son bouchonnage. De nombreuses publications rapportant la synthèse de tels assemblages avaient déjà été publiées et mettaient surtout en avant la possibilité de post-fonctionnaliser les CDs du PR. Dans une optique de contrôle de la synthèse et de l'enfilage des CDs fonctionnalisées, le défi était de fonctionnaliser les CDs puis d'effectuer leur enfilage sur le PEG. Ainsi, la bibliothèque de CDs fonctionnalisées a été amorcée. Le constat se faisant que ces CDs ne s'enfilaient pas ou très peu sur le PEG, il a été décidé de changer l'axe polymérique mais de conserver la bibliothèque de CDs.

Cette bibliothèque de CDs, générée par CuAAC, a démarré par la synthèse des  $\alpha$ -CDs mono- et bis-azoture. Celles-ci ont ensuite permis l'obtention des CDs fonctionnalisées par l'agent de contraste (monoamide-DO3A-Gd) et des fluorophores de type BODIPY, Cyanine 7, ou complexe d'Europium (Figure 43).

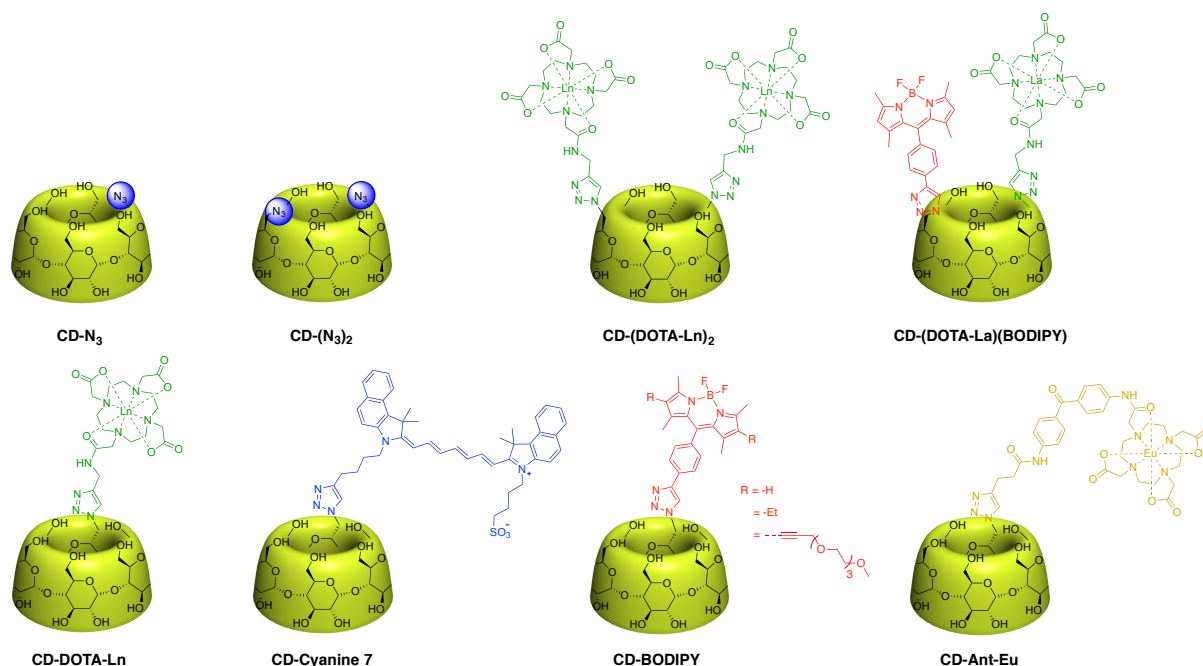


Figure 43 : Bibliothèque de CDs fonctionnalisées

## b. Choix du polymère

Pour la synthèse du PR d' $\alpha$ -CD, deux familles d'axes sont utilisables. Un axe linéaire, sans *pseudo*-bouchon intermédiaire, permettant le coulisement total des CDs sur l'axe, qui serait uniquement bouchonné aux extrémités. Ou, l'utilisation d'un axe polymérique qui posséderait un motif répétitif avec un *pseudo*-bouchon permettant l'enfilage des CDs sous stimuli et les retenant en l'absence de stimuli. Si la stratégie de synthèse a d'abord été d'utiliser un polymère de type PEG, le projet a finalement basculé vers l'utilisation d'un polymère possédant des *pseudo*-bouchons et ceci pour plusieurs raisons :

- i. Il a été décrit que lorsque les CDs sont libres de coulisser sur l'axe, elles peuvent, en solution aqueuse, former un nanotube par reconnaissance des cols primaires entre eux et secondaires entre eux, ceci conduisant à la précipitation du PR.<sup>[16a]</sup> Même si on imagine que les fonctionnalités covalentement liées à la CD permettront d'annihiler ces réseaux de liaisons hydrogène, l'utilisation d'un polymère possédant un motif *pseudo*-bouchonné permet de limiter l'enfilage sur chaque station à une seule cyclodextrine (en fonction de la longueur du motif), et donc de les espacer pour limiter leur interaction.
- ii. Pour des applications biologiques, il peut être nécessaire d'accroître la solubilité de notre PR final, on peut donc utiliser ce *pseudo*-bouchon comme groupement solubilisant.

- iii. Ce *pseudo*-bouchon permet que l'enfilage se fasse sous stimuli. Celui-ci étant lent, on pourra suivre sa progression en fonction du temps, et ainsi choisir de stopper l'enfilage au pourcentage de recouvrement désiré.
- iv. Enfin, pour une meilleure biocompatibilité et biodégradabilité de notre PR, on peut imaginer ajuster la taille du *pseudo*-bouchon pour que le PR soit stable pour son conditionnement mais se dissocie progressivement et lentement dans le temps en solution aqueuse. Cela permettrait l'excrétion des CDs fonctionnalisées d'une part. Il faudrait ensuite envisager une filtration du polymère d'un seul bloc ou bien une dégradation de ce dernier.

Le groupe s'est alors orienté vers l'utilisation du polyammonium perméthylé décrit par Gerhard Wenz<sup>[17a]</sup> pour la formation de PPR d' $\alpha$ -CDs. Les études d'enfilage des CDs fonctionnalisées étant concluantes, la synthèse de PPRs a pu être réalisée (Figure 44).

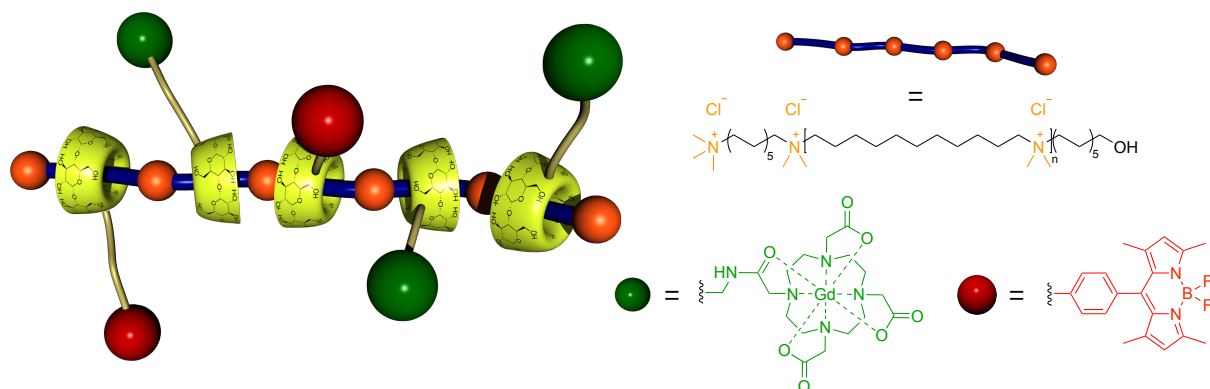


Figure 44 : PPR bimodal pour l'IRM et la microscopie de fluorescence

Ce PPR bimodal a été obtenu et caractérisé à l'issue des trois années de thèse (2013). *In vitro*, nous avons pu valider le maintien de ses propriétés de luminescence et les mesures de relaxivité élevée ont permis de conclure sur le bénéfice apporté par la structure polyrotaxane quant à l'efficacité de l'agent de contraste.<sup>[80]</sup> Cette preuve de concept vient valider la faisabilité de notre approche et permet d'envisager la synthèse contrôlée d'édifices multimodaux et multi-fonctionnels à base de polyrotaxanes de cyclodextrines pour des applications biomédicales.

### 3. Perspectives et objectifs de la thèse

La preuve de concept établie, le projet s'est naturellement orienté à mon arrivée en thèse vers les études *in vivo* de ces assemblages supramoléculaires. Pour ce faire, les objectifs étaient de synthétiser un nouveau fluorophore émettant dans le proche infrarouge afin de pouvoir réaliser l'imagerie de fluorescence à travers les tissus biologiques.<sup>[81]</sup> La synthèse des PPRs à plus grande échelle devait être réalisée afin de permettre l'injection du produit dans différentes souris. Enfin, l'étude de la biocompatibilité et de la biodistribution de ces composés *in vivo* devait permettre de conclure sur les propriétés de ce PPR bimodal pour son utilisation en imagerie médicale.

Le premier chapitre permettra d'introduire les concepts de sondes pour l'imagerie de fluorescence et d'agents de contraste pour l'IRM afin de pouvoir discuter des caractérisations des différents composés tout au long du manuscrit. Il s'orientera sur le développement de la synthèse de Cyanine 5 comme fluorophore pour des études dans le proche infrarouge afin d'être utilisée sur le PPR polycationique. Le chapitre 2 fera la synthèse de l'étude de [3]rotaxanes fonctionnalisés pour l'IRM et de PPRs bimodaux *in vivo*. Le développement de nouveaux axes polyanioniques pour la synthèse de PPRs et PRs d' $\alpha$ -CDs sera détaillé dans le chapitre 3. Enfin, les différentes approches permettant l'amélioration de la biocompatibilité des PPRs polycationiques, le contrôle de la taille caractéristique des assemblages et du relargage des CDs seront présentées dans le quatrième chapitre.



---

**CHAPITRE 1 :**  
**CYCLODEXTRINES FONCTIONNALISEES POUR**  
**L'IMAGERIE MEDICALE**

---





## I. Imagerie médicale

L'imagerie médicale a pour objectif de créer une représentation visuelle d'une partie ou de l'ensemble du corps humain afin de mettre en évidence une pathologie ou une anomalie médicale. Depuis l'invention de la radiographie aux rayons X en 1895, de nombreuses techniques ont vu le jour grâce à une plus grande maîtrise des phénomènes physiques et des moyens d'instrumentation (Figure 1.1).<sup>[77]</sup>

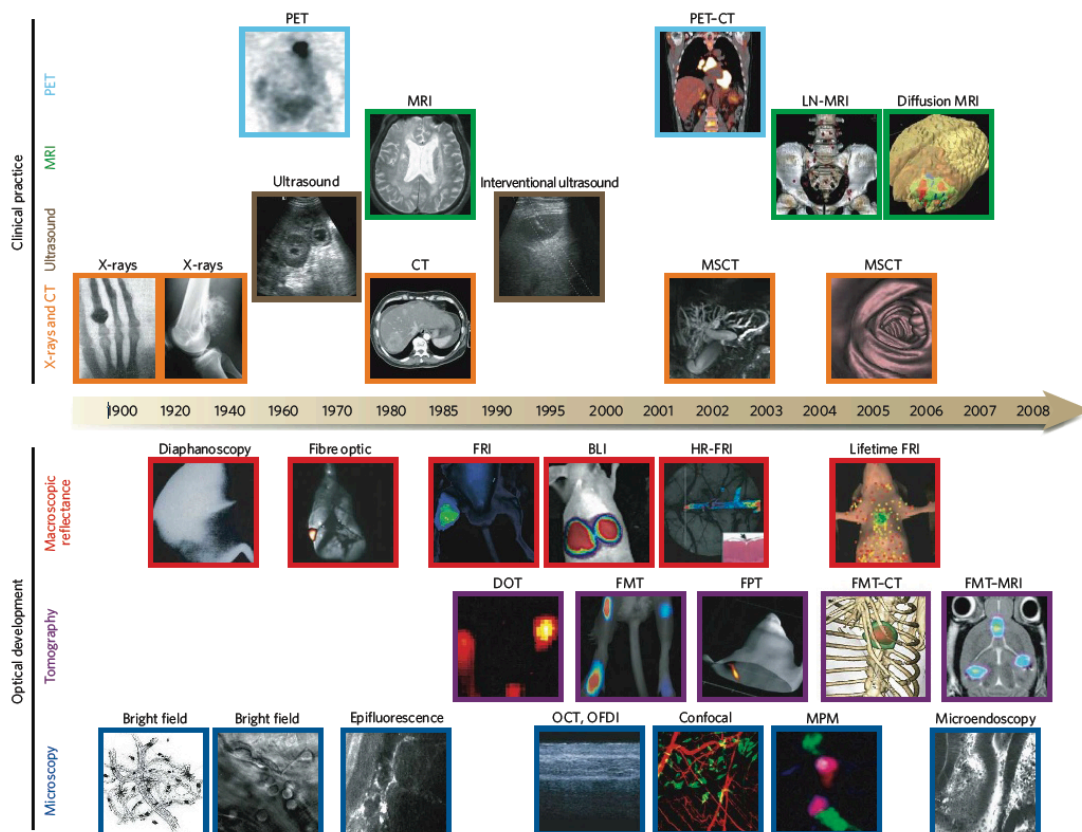


Figure 1.1 : Chronologie des techniques d'imagerie utilisées en cancérologie.<sup>[77]</sup> Techniques d'imagerie macroscopiques utilisées cliniquement en routine (au dessus de la frise). Techniques optiques pour l'étude de processus génétiques, moléculaires et cellulaires *in vivo* (en dessous de la frise). Abréviations : BLI, imagerie par bioluminescence ; CT (computed tomography), scanner ; DOT, tomographie optique ; FMT, tomographie par fluorescence moléculaire ; FPT, tomographie par protéine fluorescente ; FRI, imagerie par réflexion de fluorescence ; HR-FRI, FRI de haute résolution ; LN-MRI, IRM rehaussée par des nanoparticules ciblant les lymphomes ; MPM, microscopie multiphotonique ; MSCT, multislice CT, scanner par multi-tranches pour la reconstruction 3D ; OCT, microscopie par cohérence optique ; OFDI, imagerie de domaine de fréquence optique ; PET, tomographie par émission de positrons.

Les principales techniques d'imagerie médicale utilisées pour des examens de routine sont l'IRM, la radiographie et scanner, l'échographie, et la tomographie par émission de positrons. Elles sont respectivement basées sur l'utilisation d'un champ magnétique, de rayons X, d'ultrasons, ou de la radioactivité gamma. Les techniques optiques, en particulier la microscopie par cohérence optique, ont connu d'importants développements ces 20 dernières années et permettent aujourd'hui l'observation de milieux biologiques en surface sur quelques millimètres de profondeur sans biopsie.

Malgré la multiplicité des techniques d'imagerie, elles possèdent toutes des avantages et des inconvénients et le diagnostic d'un patient passe souvent par l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires. En effet, les techniques possédant une sensibilité élevée ont souvent une faible résolution spatiale, et inversement.<sup>[79,82]</sup> Lorsque ces techniques d'imagerie nécessitent l'introduction de sondes moléculaires *in vivo* pour des questions de sensibilité ou de contraste, il est alors intéressant d'effectuer l'injection d'un seul produit permettant d'utiliser ces différentes techniques. L'IRM, peu sensible, nécessite l'injection d'un agent de contraste, elle possède cependant une résolution spatiale et une profondeur de pénétration élevée. Ainsi, son couplage à une technique d'imagerie de sensibilité élevée est intéressant. La microscopie de fluorescence en est une, celle-ci nécessite aussi l'injection d'un fluorophore mais en faible quantité. Intéressons nous à ces deux techniques d'imagerie médicale.

## **1. L'imagerie par résonance magnétique**

### **a. Principe de l'IRM**

L'imagerie par résonance magnétique est basée sur le principe de la résonance magnétique nucléaire. Elle permet l'obtention de clichés en 2 ou 3 dimensions du corps humain par la détection des spins nucléaires des protons des molécules d'eau. Lorsqu'un patient passe un examen IRM, il est placé dans un champ magnétique homogène de 0,5 à 3 Teslas. Dans cet environnement, tous les spins nucléaires des protons de l'eau auront la même fréquence de résonance. L'application d'un gradient de champ magnétique dans les trois directions de l'espace permet de modifier cette fréquence de résonance en fonction de la position des protons et donc de reconstruire une image à 2 ou 3 dimensions. Le contraste va dépendre de la densité locale en eau et de la relaxation des protons qui varie en fonction de la nature de leur environnement chimique et donc de la zone corporelle (os, muscles, tissus, organes, ...).

L'IRM a pour avantage d'être non invasive, non radiative, de posséder une bonne résolution spatiale et temporelle, et une pénétration tissulaire élevée. Néanmoins, son inconvénient le plus notable est sa faible sensibilité. C'est la raison pour laquelle des agents de contraste doivent être injectés avant l'examen afin de rehausser le contraste des clichés IRM.<sup>[83]</sup>

### b. Les agents de contraste

De façon générale, plus un tissu est hydraté, plus le signal est intense. La relaxation des protons des molécules d'eau se fait par un mouvement de précession possédant une contribution longitudinale (relaxation spin-réseau) et transversale (relaxation spin-spin). La vitesse de relaxation longitudinale et transversale ( $R_1$  et  $R_2$  respectivement) et leur temps caractéristique ( $T_1$  et  $T_2$ ) sont inversement proportionnels (Équation 1.1).

$$R_i = \frac{1}{T_i} \quad (i = 1 ; 2) \quad \text{Équation 1.1}$$

Plus le temps de relaxation est faible, plus la vitesse de relaxation est élevée, ce qui se traduit par une augmentation du contraste  $T_1$  (croissance de l'aimantation longitudinale) et une diminution du contraste  $T_2$  (chute de l'aimantation transversale). On parle de contraste positif dans le premier cas, négatif dans le second.

L'injection d'un agent de contraste (AC) peut modifier ces temps de relaxation en interagissant avec les molécules d'eau. On peut classer en deux catégories les ACs en fonction du processus de relaxation qu'ils influencent majoritairement. Les ACs superparamagnétiques, souvent à base de nanoparticules d'oxydes de fer camouflées par des oligomères biocompatibles (PEG, oligosaccharides, siloxane) sont utilisés pour modifier le temps de relaxation transversale.<sup>[84]</sup> Tandis que les ACs paramagnétiques, le plus souvent à base de gadolinium(III) ou de manganèse(II) (de spin 7/2 et 5/2 respectivement), ont une influence sur le  $T_1$ .

La relaxation d'un proton, longitudinale ou transversale, se décompose en deux contributions. Une contribution diamagnétique ( $d$ ) et une paramagnétique ( $p$ ) (Équation 1.2).

$$R_i = r_{ip}[AC] + R_{id} \quad (i = 1 ; 2) \quad \text{Équation 1.2}$$

$R_i$  : relaxation longitudinale ( $i = 1$ ) ou transversale ( $i = 2$ ) ( $s^{-1}$ )

$r_{ip}$  : relaxivité paramagnétique ( $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ )

[AC] : concentration en agent de contraste ( $mM$ )

$R_{id}$  : relaxation diamagnétique (relaxation en l'absence d'AC, en  $s^{-1}$ )

Si la relaxation diamagnétique est une constante, on peut par contre modifier la contribution paramagnétique de la relaxation par l'utilisation d'un agent de contraste. En jouant sur une différence de vitesses de relaxation, on peut amplifier le contraste.

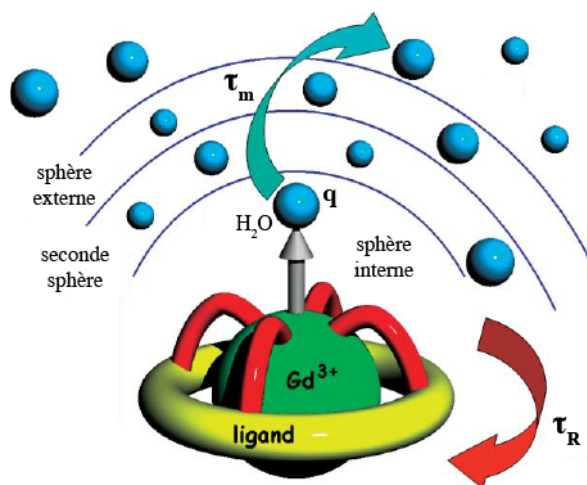


Figure 1.2 : Interactions d'un complexe de  $Gd^{3+}$  avec ses différentes sphères de solvation<sup>[85]</sup>

Le principe de fonctionnement d'un agent de contraste paramagnétique (du type complexe de Gd(III)) est basé sur son interaction avec les molécules d'eau de ses différentes sphères de solvation (Figure 1.2). L'interaction des molécules d'eau de la sphère de coordination du centre métallique avec le  $Gd^{3+}$  (interaction dipôle-dipôle entre le spin nucléaire des protons et le spin électronique du  $Gd^{3+}$ ) génère une contribution paramagnétique à leur relaxation et a pour effet de modifier leur vitesse de relaxation. La seconde sphère de solvation est composée des molécules d'eau qui interagissent avec le complexe (par liaison hydrogène par exemple), ces molécules seront elles aussi affectées par la présence de l'AC. Ainsi on peut décomposer la relaxivité paramagnétique en deux composantes (Équation 1.3). Celle de la sphère interne (« *in* ») qui correspond à la première sphère de solvation des complexes composée des molécules d'eau qui peuvent se coordonner au gadolinium. Et celle de la sphère externe (« *ex* ») constituée des molécules d'eau dont la relaxation sera plus faiblement modifiée par la présence de l'AC (incluant la seconde sphère de solvation constituée des molécules d'eau formant des liaisons hydrogènes avec l'AC). La contribution paramagnétique dans cette sphère dépend de la diffusion de l'AC et des molécules d'eau.

$$r_{1p} = r_{1p}^{in} + r_{1p}^{ex} \quad \text{Équation 1.3}$$

La relaxivité paramagnétique de la sphère interne est beaucoup plus dépendante de la nature de l'AC. C'est elle qui aura la plus grande contribution (environ 90%) dans l'Équation

1.3. Celle-ci dépend de plusieurs paramètres explicités par les équations de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) (Équation 1.4 et Équation 1.5 ; Figure 1.2).

$$r_{1p}^{in} = \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}]} \times \frac{q}{T_{1m} + \tau_M} \quad \text{Équation 1.4}$$

$[\text{H}_2\text{O}]$  : concentration de l'eau dans le solvant (=55,5 M dans l'eau pure)

$q$  : nombre de molécules coordonnées simultanément au  $\text{Gd}^{3+}$

$T_{1m}$  : temps de relaxation longitudinale des molécules d'eau liées à l'AC

$\tau_M$  : temps de résidence moyen des molécules d'eau dans la sphère interne (inversement proportionnel à leur constante de vitesse d'échange)

Cette équation permet de mettre en évidence que plus le nombre de molécules d'eau pouvant se coordonner est grand, plus la relaxivité due à la présence de l'AC sera élevée. Le temps de relaxation longitudinale des molécules d'eau liées à l'AC ( $T_{1m}$ ) possède une composante provenant de l'interaction dipôle-dipôle et une composante provenant du couplage scalaire entre les protons et le Gd. Ce dernier est néanmoins nettement inférieur au couplage dipolaire, il est négligé dans l'expression de  $T_{1m}$  (Équation 1.5).

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \times \frac{\gamma_H^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{(r_{Gd-H})^6} \times \left[ 3 \frac{\tau_{c1}}{(1 + \omega_H^2 \tau_{c1}^2)} + 7 \frac{\tau_{c2}}{(1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2)} \right] \quad \text{Équation 1.5}$$

$\gamma_H$  : rapport gyromagnétique nucléaire du proton (42,57 MHz·T<sup>-1</sup>)

$g$  : facteur de Landé de l'électron libre

$\mu_B$  : magnéton de Bohr

$S$  : spin électronique de l'AC ( $S = 7/2$  pour  $\text{Gd}^{3+}$ )

$r_{Gd-H}$  : distance entre le spin électronique du  $\text{Gd}^{3+}$  et le proton

$\omega_H$  : fréquence de Larmor du proton

$\omega_S$  : fréquence de Larmor de l'électron

$\tau_{ci}$  : ( $i = 1 ; 2$ ) temps de corrélation du procédé de relaxation (Équation 1.6)

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} \quad \text{Équation 1.6}$$

$\tau_R$  : temps de corrélation rotationnelle

$T_{ie}$  : temps de relaxation électronique de l'ion métallique

Ainsi, nous pouvons identifier à partir de ces équations les paramètres clés qui influent sur la relaxivité :

- i.  $q$  : le nombre de molécules d'eau dans la sphère interne de l'AC.

L'Équation 1.4 indique qu'on a intérêt à maximiser la valeur de «  $q$  » correspondant au nombre de molécules d'eau coordonnées simultanément au centre métallique. Néanmoins, le

Gd<sup>3+</sup> étant toxique pour l'organisme, il doit être utilisé sous forme complexée. Pour éviter tout relargage *in vivo*, les ligands utilisés sont choisis en fonction de leur constante d'association élevée pour la formation de complexes thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes. Pour autant, pour que les molécules d'eau puissent se lier au Gd, le ligand ne doit pas être trop encapsulant. Il faut donc trouver un équilibre entre stabilité, inertie chimique, et interaction avec le maximum de molécules d'eau. Les ACs autorisés par la FDA sont pour la plupart des complexes de Gd<sup>3+</sup> permettant la coordination d'une seule molécule d'eau à la fois pour des raisons de stabilité.<sup>[85]</sup>

- ii.  $\tau_M$ : inversement proportionnel à la vitesse d'échange des molécules d'eau entre la première et la deuxième sphère de solvation

L'augmentation de la vitesse d'échange des molécules d'eau qui se coordinent à l'AC permet d'augmenter le nombre de molécules dont la relaxation est affectée par la présence du complexe. Elle intervient dans l'Équation 1.4 sous la forme du temps de résidence moyen des molécules d'eau dans la sphère interne ( $\tau_M$ ). L'augmentation de la température est un paramètre permettant d'augmenter la vitesse d'échange des molécules d'eau. Néanmoins, elle a aussi pour effet de diminuer le  $\tau_R$ . Cette vitesse peut aussi être augmentée en encombrant l'environnement du Gd<sup>3+</sup> pour créer une interaction répulsive.

- iii.  $r_{Gd-H}$ : la distance entre le Gd et la molécule d'eau.

L'Équation 1.5 met en évidence la relation entre la relaxivité et la distance entre le centre métallique paramagnétique et les protons de la molécule d'eau avec une dépendance en  $1/r^6$ . La synthèse du ligand pour la formation du complexe de Gd<sup>3+</sup> peut être optimisée pour forcer une distance courte entre le Gd et l'eau, néanmoins, cela entraîne une stabilisation de la molécule d'eau et donc une vitesse d'échange réduite.

- iv.  $\tau_R$ : le temps de corrélation rotationnelle.

Le temps de corrélation rotationnelle correspond au temps nécessaire pour que le complexe formé entre l'AC et les molécules d'eau coordonnées tourne d'un radian. Ce paramètre intervient dans l'Équation 1.6. Pour une molécule sphérique, il peut être approximé en utilisant l'équation de Debye-Stokes (Équation 1.7) :

$$\tau_R = \frac{4 \pi \eta r_{eff}^3}{3 k_B T} \quad \text{Équation 1.7}$$

$\eta$  : viscosité microscopique du milieu (Pa·s)

$r_{eff}$  : rayon hydrodynamique (m)

$k_B$  : constante de Boltzmann ( $= 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ )

$T$  : température (K)

Sa modification est possible par le greffage de l'AC sur une molécule ou macromolécule de poids moléculaire élevé (nanoparticule, dendrimère, polymère, liposome). Néanmoins, si d'une part ce couplage implique des étapes de fonctionnalisation de l'agent de contraste, il a surtout pour effet de modifier la biodistribution et les voies d'élimination de l'agent de contraste en question.

Les propriétés des agents de contraste  $T_1$  sont évaluées par mesure de la relaxivité longitudinale en fonction de la fréquence de Larmor du proton. On obtient alors leur profil NMRD (*Nuclear Magnetic Resonance Dispersion*). Plus la relaxivité, à une fréquence donnée, est élevée, plus l'agent de contraste est efficace à cette fréquence. Les spectromètres RMN les plus utilisés en imagerie médicale ont un champ magnétique de 1,5 Teslas, soit une fréquence de résonance du proton d'environ 60 MHz.<sup>[86]</sup> Si on s'intéresse au temps de résidence des molécules d'eau coordonnées sur l'AC ( $\tau_M$ ) et au temps de corrélation rotationnelle ( $\tau_R$ ) en fonction de la fréquence de résonance du proton, on remarque que leur contribution est prépondérante dans la gamme de fréquences utilisée au niveau clinique.<sup>[85]</sup> Le maximum de relaxivité étant atteint à 30 MHz (0,7 T) pour un temps de résidence et un temps de corrélation rotationnelle de 10 ns. Le temps de résidence de 0,1 ns est pris comme référence basse car il correspond à la valeur du DOTA-Gd (ou Dotarem), un agent de contraste au gadolinium très largement utilisé au niveau clinique (Figure 1.4a).

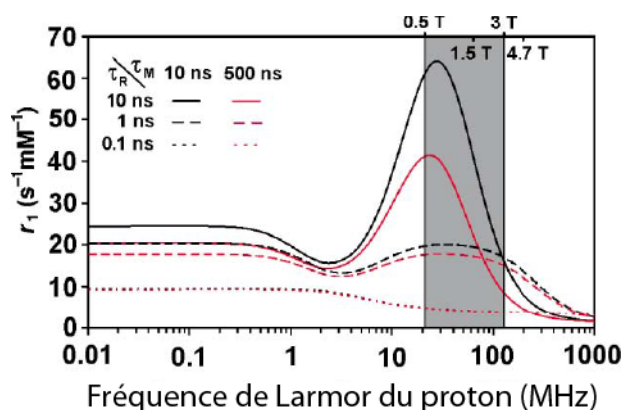


Figure 1.3 : Simulation de la relaxivité longitudinale en fonction de la fréquence de Larmor du proton pour différentes valeurs de  $\tau_M$  et  $\tau_R$  (tous les autres paramètres étant fixés).<sup>[85]</sup> La zone grisée correspond à la gamme de fréquences utilisée au niveau clinique.

Il existe donc plusieurs approches possibles pour la modification de la relaxivité des agents de contraste. Pour notre projet, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation par une fonction alcyne du DO3A (Figure 1.4b) pour obtenir un analogue du DOTA. Cet agent de contraste sera couplé à une cyclodextrine puis associé à un axe pour l'obtention d'un rotaxane



ou PPR. On espère donc une augmentation du temps de corrélation rotationnelle qui devrait se traduire par une augmentation de la relaxation longitudinale.

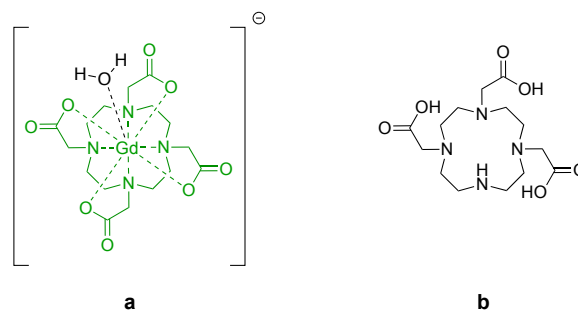


Figure 1.4 : a) DOTA-Gd, Agent de contraste paramagnétique pour l'IRM ; b) DO3A, ligand pour la synthèse d'agent de contraste au gadolinium

## 2. La microscopie de fluorescence

### a. Le principe de la fluorescence

Dans la plupart des cas, l'imagerie par fluorescence est réalisée par l'injection d'une sonde, le fluorophore. La fluorescence fait partie des processus de luminescence avec la phosphorescence. Ce sont des phénomènes physiques basés sur l'émission de photons. Un fluorophore est donc une espèce chimique qui, sous irradiation, peut absorber un ou plusieurs photons pour passer d'un état fondamental à un état excité (singlet), et qui, spontanément, se désexcite par émission de lumière pour retourner à son état fondamental (Figure 1.5). Cette désexcitation se fait à l'échelle de la nanoseconde. L'énergie mise en jeu dans ces deux transitions est donnée par l'Équation 1.8.

Juste après l'absorption d'un photon, le chromophore commence par partiellement se désexciter par relaxation vibrationnelle (thermique, non radiative) jusqu'à l'état vibrationnel fondamental de l'état singlet  $S_1$ . Il peut ensuite se désexciter par trois processus parallèles : i) par émission de fluorescence (processus radiatif). La relaxation vibrationnelle a pour effet d'abaisser l'énergie de l'émission par rapport à l'absorption, ce qui se traduit par une émission à des longueurs d'onde plus élevées. La différence entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission a été mise en évidence par George Stokes en 1852, et est appelée déplacement de Stokes. ii) Le second processus de désexcitation passe par la conversion interne jusqu'à un niveau vibrationnel de même énergie qu'un niveau vibrationnel excité de l'état singlet fondamental, suivi de la relaxation thermique jusqu'à l'état vibrationnel fondamental. iii) La troisième voie correspond au processus de désexcitation par un état triplet. La conversion inter-système (permise par un couplage spin-orbite) permet le passage

d'un état de spin électronique singulet à triplet. Après relaxation jusqu'à l'état vibrationnel fondamental, le chromophore peut se désexciter par émission de phosphorescence ou par une nouvelle conversion inter-système suivi de la relaxation non radiative. Le processus de phosphorescence est plus lent que la fluorescence et se produit à l'échelle de la microseconde.

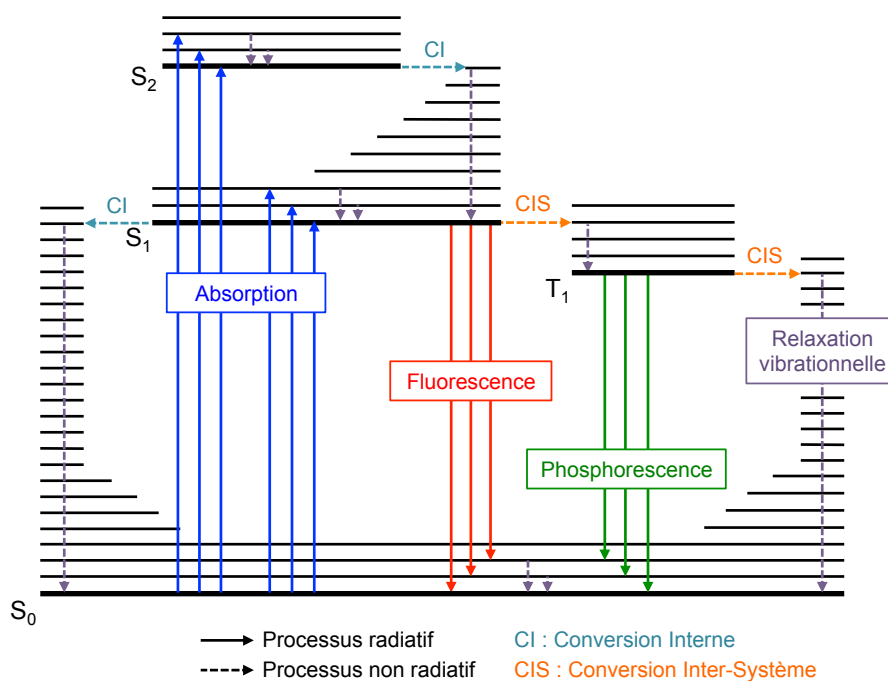


Figure 1.5 : Diagramme de Perrin-Jablonski. S<sub>i</sub> = état singulet fondamental (i = 0) et excité (i ≥ 1) ; T = état triplet excité.<sup>[87]</sup>

$$E = h \times \nu = h \times \frac{c}{\lambda} \quad \text{Équation 1.8}$$

$h$  : constante de Planck (J·s)

$\nu$  : fréquence (Hz)

$c$  : vitesse de la lumière (m·s<sup>-1</sup>)

$\lambda$  : longueur d'onde (m)

Il existe de très nombreuses sondes fluorescentes dans la littérature : protéiques, inorganiques ou organiques.<sup>[88]</sup> Nous nous intéresserons exclusivement aux chromophores organiques en détaillant quelques familles de composés.

## b. Les fluorophores organiques

Les fluorophores organiques sont la plupart du temps constitués d'un cœur aromatique permettant de créer le système conjugué. Plus cette conjugaison est étendue, plus les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont élevées. Les fluorophores peuvent être classés en différentes familles (Figure 1.6) : les polyaromatiques (pyrène, naphthalène, anthracène (**9**)), les coumarines (**10**, **11**), les dérivés du xanthène (fluorescéine (**17**, **21**),

rhodamines (**18**, **19**, **20**), les BODIPYs (bore-dipyrométhène, **24**, **25**), les cyanines (**26**, **27**, **28**), les oxazines (**30**), les porphyrines, et les squaraines. Ces familles sont illustrées ci-dessous et positionnées en fonction de leurs propriétés optiques.

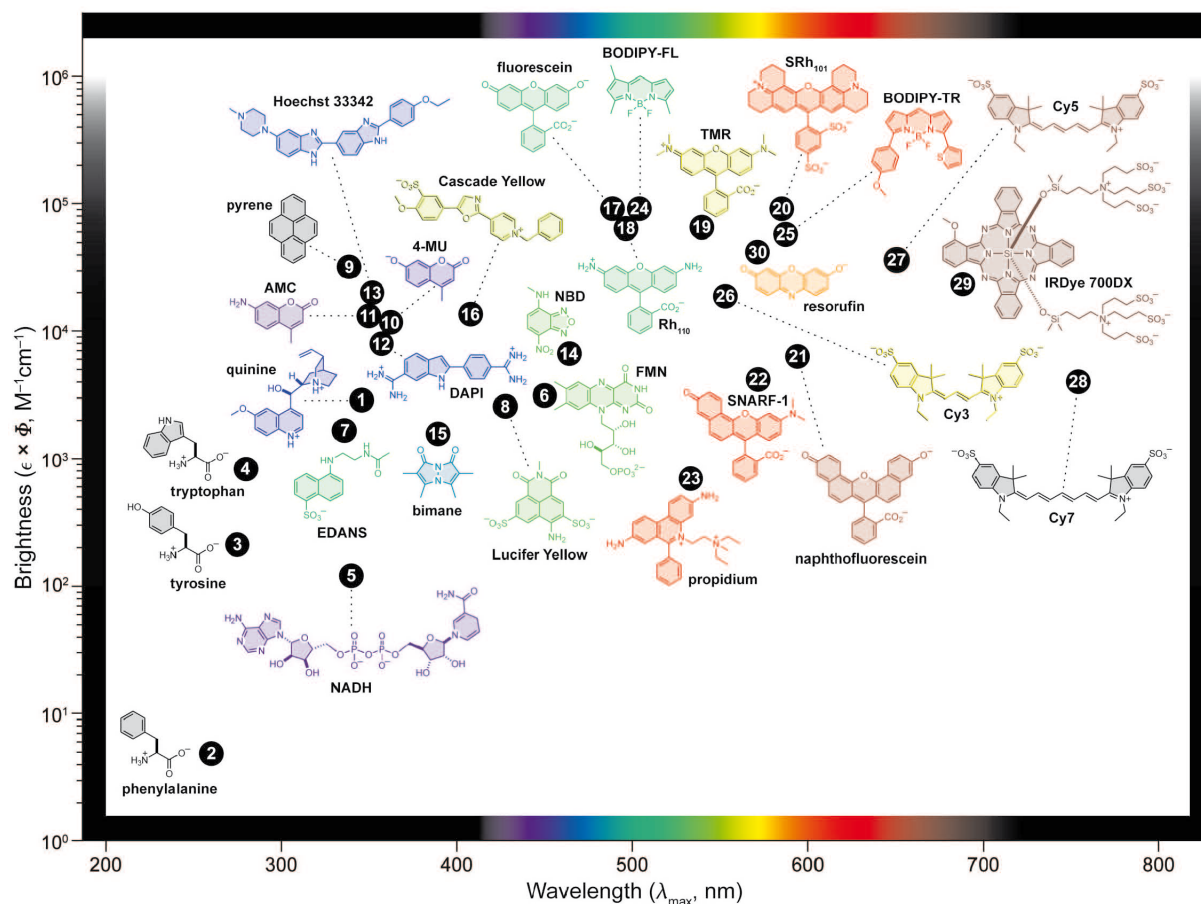


Figure 1.6 : Bibliothèque de fluorophores organiques répartis en fonction de leurs propriétés optiques ( $\lambda_{\max}$  : longueur d'onde maximale d'absorption).<sup>[88]</sup>

Les fluorophores les plus rapportés dans la littérature sont ceux de la famille des cyanines, rhodamines, et BODIPYs (Figure 1.7).

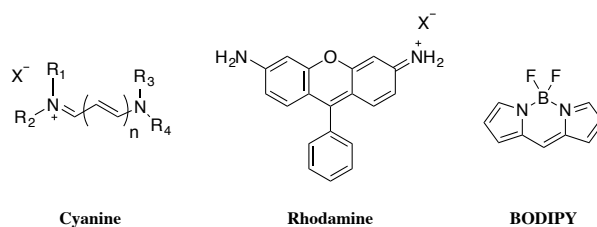


Figure 1.7 : Squelettes caractéristiques des cyanines, rhodamines et BODIPYs

Les rhodamines sont des composés hétérotricycliques dérivés de la fluorone. Utilisées comme colorants ou fluorophores, elles peuvent être solubles dans l'eau mais sont aussi

relativement toxiques. Leur émission de fluorescence se trouve généralement autour de 550 nm. Les BODIPYs, elles aussi tricycliques, sont constituées d'un cœur bore-dipyrométhène. Elles sont moins hydrosolubles, mais ont l'avantage d'avoir des rendements quantiques de fluorescence élevés. Elles sont, de plus, facilement fonctionnalisables ce qui permet de moduler la longueur d'onde de fluorescence (autour de 500 nm) et d'accroître leur stabilité et solubilité dans l'eau. Les cyanines possèdent deux atomes d'azote reliés par une chaîne polyméthine. Les azotes sont le plus souvent inclus dans des hétérocycles (pyrroles, indole, benzindole). On nomme Cy3, Cy5 et Cy7, les cyanines dont la chaîne polyméthine est longue de 3, 5 et 7 carbones. La longueur de la chaîne polyméthine est donc ajustable et permet d'obtenir des longueurs d'onde d'émission caractéristiques d'environ 550, 650, et 750 nm respectivement. L'utilisation d'indole ou de benzindole à la place du pyrrole permet d'augmenter de 30 à 60 nm les longueurs d'onde d'émission mais réduit leur hydrosolubilité. On nomme en particulier Cy5.5, les cyanines dont la chaîne polyméthine contient 5 carbones et dont les azotes sont inclus dans des benzindoles.

Les techniques d'imagerie par fluorescence sont devenues ces dernières années des outils extrêmement puissants pour la visualisation en temps réel de processus biologiques, en particulier par l'utilisation de sondes fluorescentes dans le proche infrarouge pour la détection d'espèces chimiques *in vivo* (espèce réactive oxygénée, azotée, thiol, ions, ...) (Figure 1.8).<sup>[89]</sup> Les cyanines 5 et 7 sont souvent mises à contribution. Pour leur utilisation dans des conditions physiologiques, elles sont stabilisées par des cycles au centre de la chaîne polyméthine dans le cas des Cy7 et leur hydrosolubilité est amplifiée par l'introduction de groupements solvatants (sulfonate, acide carboxylique, nitro, ...).

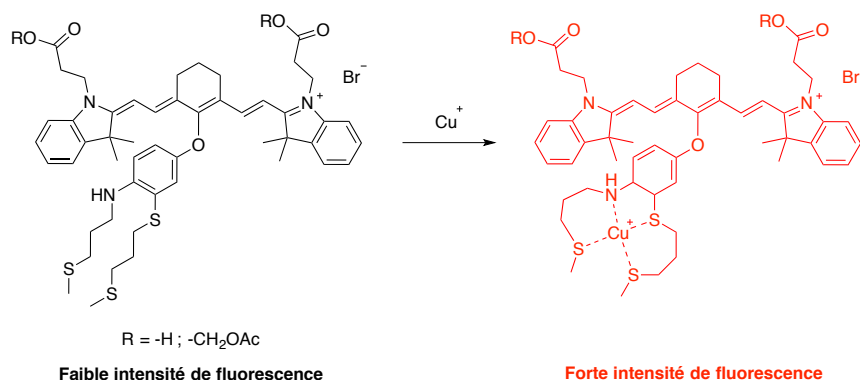


Figure 1.8 : Cyanine 7 pour la détection *in vivo* du Cu(I)<sup>[90]</sup>

### c. La microscopie de fluorescence *in vivo*

La microscopie de fluorescence bénéficie de l'avantage d'être très sensible, ce qui en fait une technique de choix pour l'imagerie médicale et l'étude de processus biologiques. Néanmoins, les tissus étant très absorbants, l'optimisation des propriétés optiques de la sonde est essentielle pour parvenir à exciter la sonde *in vivo* et être capable d'observer son émission de fluorescence.

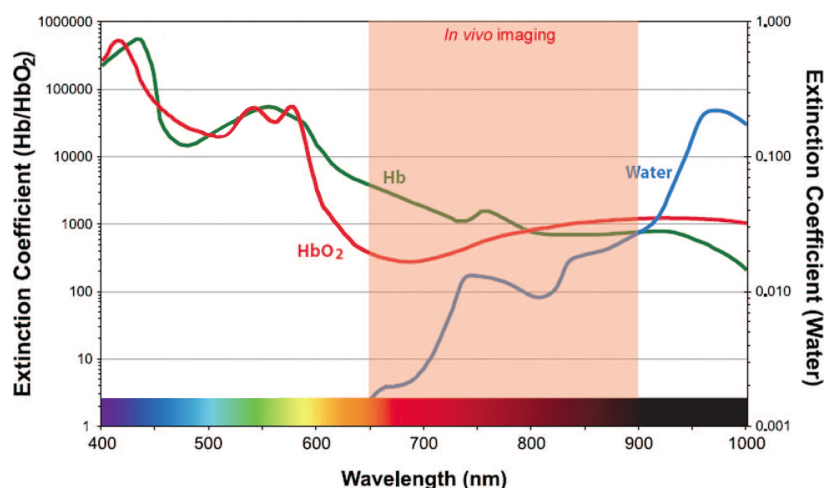


Figure 1.9 : Coefficient d'absorption ( $\text{cm}^{-1}$ ) de l'eau et de l'hémoglobine (oxygénée (Hb) et désoxygénée (HbO<sub>2</sub>)) en fonction de la longueur d'onde.<sup>[91]</sup>

La Figure 1.9 permet de mettre en évidence une fenêtre spectrale allant de 650 à 900 nm correspondant au minimum d'absorption de l'eau et de l'hémoglobine contenues dans les tissus. Cette gamme de longueurs d'onde est la fenêtre de transparence la plus propice pour l'imagerie *in vivo* et correspond au proche infrarouge. L'optimisation des propriétés optiques des sondes fluorescentes doit donc tendre vers des longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans ce domaine.

Dans la suite du chapitre nous allons détailler la synthèse de CDs fonctionnalisées pour l'imagerie par résonance magnétique et la microscopie de fluorescence. L'objectif étant de tendre vers l'utilisation de fluorophores actifs dans le proche infrarouge et d'améliorer les propriétés de l'AC par l'augmentation du temps de corrélation rotationnelle.

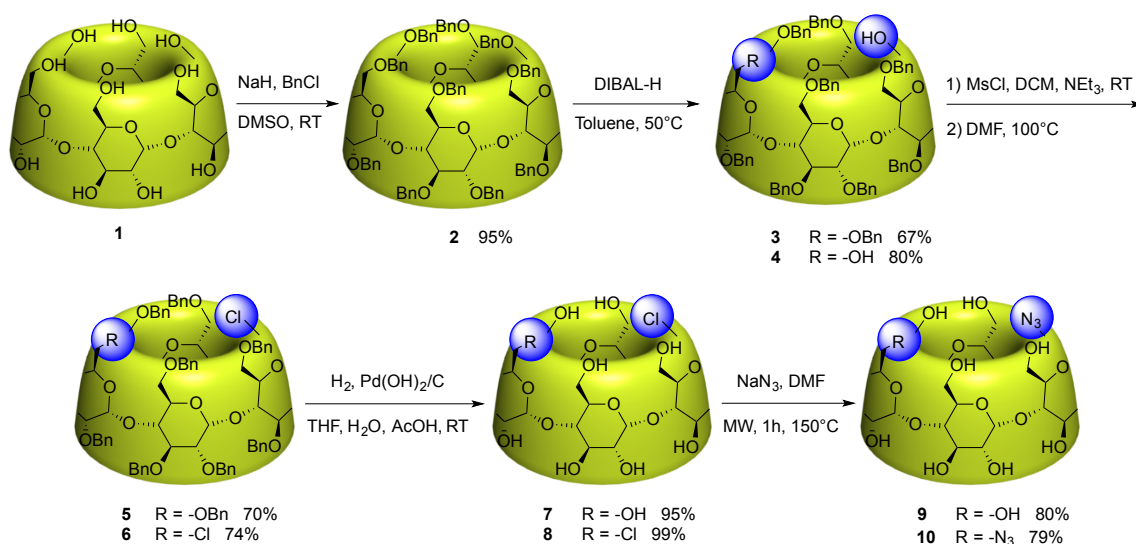
## II. Création d'une bibliothèque de cyclodextrines fonctionnalisées

La synthèse de PPR-CDs par enfilage de CDs fonctionnalisées nécessite une approche modulaire efficace pour la génération de la bibliothèque de CDs. Nous avons choisi comme réaction de couplage entre la CD et la fonctionnalité la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC).<sup>[92]</sup> Cette réaction permet la cyclisation d'un alcyne terminal avec une fonction azoture. Réalisable dans l'eau, elle nécessite l'introduction de réactifs aisément purifiables. Elle est peu sensible à l'oxygène et peut conduire à des rendements quantitatifs. Le choix a été fait d'introduire la fonction azoture sur la cyclodextrine et l'alcyne sur la sonde. En effet, la fonctionnalisation du col primaire de la CD permet un ajout aisé de la fonction azoture et la littérature rapporte déjà plusieurs exemples de synthèses de sondes fonctionnalisées par un alcyne terminal.

### 1. Synthèse des cyclodextrines mono- et bis-azoture

Dans un but de simplification de la caractérisation des architectures finales, nous cherchons tout au long de la synthèse des CDs fonctionnalisées à réduire le nombre d'isomères de position. Ainsi, nous cherchons à ce que les CDs soient toutes fonctionnalisées par le col primaire d'une part. D'autre part nous souhaitons obtenir des CDs bi-fonctionnalisées sur deux positions du col primaire face à face (cycles A et D) afin de limiter au maximum l'encombrement stérique du col primaire pour le futur enfilage de la CD sur un axe.

Dans la littérature, on peut trouver des méthodes permettant la synthèse de CD mono-fonctionnalisée passant par la mono-tosylation d'un hydroxyle primaire par exemple.<sup>[93]</sup> Néanmoins, elles ne permettent pas l'obtention de CDs poly-fonctionnalisées ou ne sont pas sélectives. D'une façon générale, nous ne souhaitons pas introduire plus de deux fonctions par CD pour ne pas trop encombrer la cavité hydrophobe de la CD et faciliter l'introduction de l'axe pour la synthèse du rotaxane. Nous utiliserons donc une stratégie de synthèse développée au laboratoire avec le passage par une CD perbenzylée et, comme étape clé, la déprotection sélective du col primaire en position 1,4 par l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) (Figure 1.10).<sup>[94]</sup> Cette synthèse peut être effectuée sur une dizaine de gramme de cyclodextrine native et permet donc d'obtenir les cyclodextrines mono- et bis-azoture en quantité suffisante pour la synthèse de PPRs.


 Figure 1.10 : Synthèse des CDs mono- et bis-azoture<sup>[80]</sup>

La synthèse des  $\alpha$ -CDs mono- et bis-azoture, à la base de notre approche modulaire, commence par la perbenzylation de la CD native.<sup>[95]</sup> La seconde étape, primordiale pour la sélectivité de notre synthèse, consiste à déprotéger une fonction hydroxyle du col primaire par action du DIBAL-H. Il est possible de poursuivre la réaction conduisant à la débenzylation d'un second hydroxyle, celle-ci se fera alors en position 1,4 (ou A - D) c'est-à-dire sur la position diamétralement opposée.<sup>[94]</sup> En effet, lorsque le premier hydroxyle est déprotégé, deux molécules de DIBAL-H peuvent se stabiliser entre ce dernier et l'oxygène endocyclique de l'unité concernée induisant un encombrement stérique important. L'approche des deux autres molécules de DIBAL-H se fait alors à l'opposé, en position 1,4.<sup>[96]</sup> Les fonctions hydroxyles sont ensuite mésylées, puis chlorées *in situ*, avant de réaliser l'hydrogénation catalytique pour obtenir les CD mono- (**7**) et bis-chlorées (**8**).<sup>[93a,97]</sup> Enfin, la substitution des chlorures par les fonctions azotures se fait sous assistance microondes.<sup>[93b,98]</sup> Les **CD(N<sub>3</sub>)** (**9**) et **CD(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** (**10**) sont obtenues après 5 étapes avec des rendements globaux de 34 et 44% respectivement (Figure 1.10). Ces deux CDs en main, nous allons nous intéresser à la synthèse des différentes sondes, d'abord pour l'IRM, puis pour la microscopie de fluorescence.

## 2. Cyclodextrines fonctionnalisées développées au laboratoire

### a. CDs fonctionnalisées pour l'IRM

Notre approche pour la synthèse de l'agent de contraste est d'utiliser un complexe de Gd(III) déjà approuvé cliniquement en y introduisant une fonction alcyne vrai (Figure 1.11).

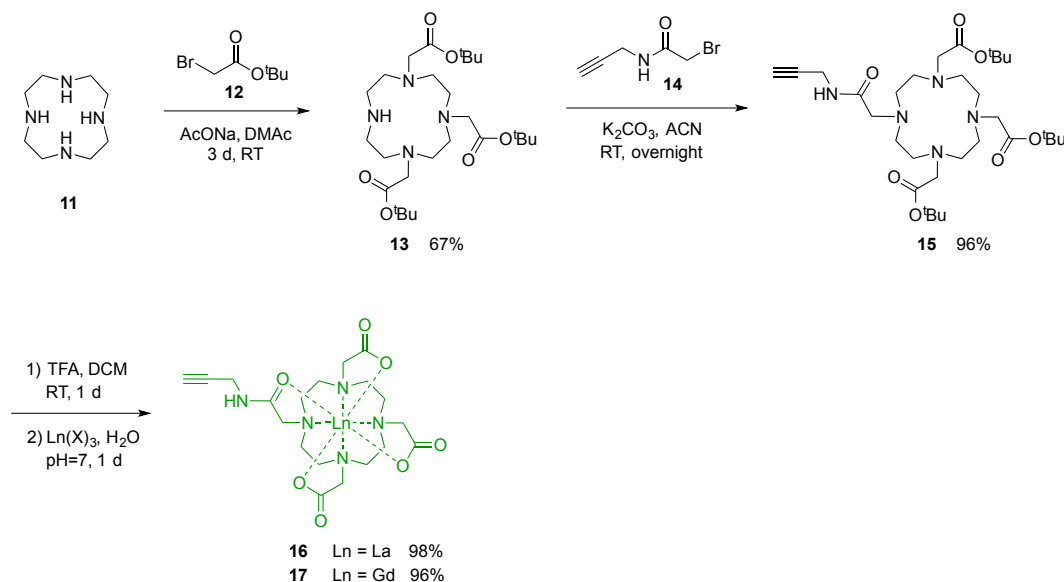


Figure 1.11 : Synthèse de l'AC monoamide-DO3A-Gd fonctionnalisé

La synthèse du DOTA-Ln fonctionnalisée, appelé monoamide-DO3A-Ln (MA-DO3A-Ln), commence par la tri-alkylation du cyclen (**11**) par le bromoacétate de *tert*-butyle (**12**).<sup>[99]</sup> Le cyclen tri-substitué (**13**) précipite spontanément dans le diméthylacétamide (DMAc) permettant de conserver une fonction amine secondaire.<sup>[100]</sup> Le produit obtenu est ensuite alkylé par un dérivé alcyne (**14**) sur cette dernière fonction amine secondaire. La déprotection des esters par l'acide trifluoroacétique permet l'obtention du ligand fonctionnalisé.<sup>[100a]</sup> Celui-ci est utilisé pour les réactions de complexation avec le lanthane(III) (MA-DO3A-La, **16**) ou le gadolinium(III) (MA-DO3A-Gd, **17**) à pH 7. L'ion La<sup>3+</sup>, contrairement au Gd<sup>3+</sup>, ne possède pas d'électron célibataire (sous-couche « 4f » vide), et est donc diamagnétique. Il sera utilisé pour la synthèse de composés modèles pour les caractérisations RMN. Les complexes de lanthanides sont obtenus avec des rendements globaux de 37%. Une molécule de solvant (ex : eau) vient compléter la sphère de coordination du lanthanide dans ce complexe, elle est volontairement omise car labile.

L'IRM étant peu sensible, il est intéressant de synthétiser les CDs avec un ou deux complexes paramagnétiques (Figure 1.12). Cette synthèse consiste en une étape 'click' par CuAAC réalisée à température ambiante, sous argon pendant une nuit. La CuAAC est réalisée



avec du sulfate de cuivre(II) en présence d'ascorbate de sodium comme agent réducteur qui permet de générer *in situ* le Cu(I) catalytiquement actif. L'atmosphère d'argon et l'excès d'ascorbate de sodium permettent d'éviter l'oxydation de ce dernier. De plus, le *N,N,N',N'',N''*-Pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) sert de ligand tridentate pour la chélation du Cu(I) permettant d'une part une meilleure solubilité et d'autre part une protection supplémentaire contre l'oxydation du cuivre(I).<sup>[101]</sup>

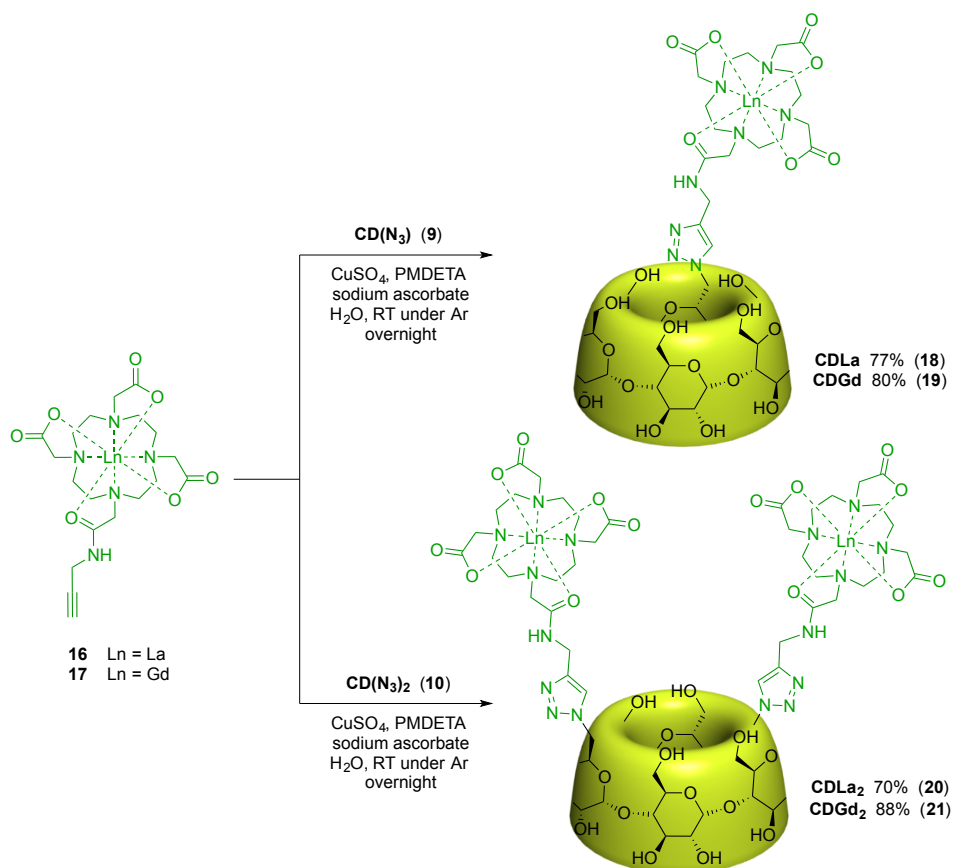


Figure 1.12 : Synthèse des CDs fonctionnalisées pour l'IRM

Les CDs **CDLa (18)**, **CDLa<sub>2</sub> (20)**, et les équivalents gadolinium (**19** et **21**) sont obtenus avec des rendements de 70 à 88%. Elles sont purifiées sur colonne chromatographique de silice avec un mélange d'éluents acétonitrile/eau. Les études d'enfilage des CDs pour déterminer leur affinité pour l'axe modèle seront effectuées sur les équivalents lanthane par RMN tandis que les **CDGd** et **CDGd<sub>2</sub>** permettront la caractérisation des propriétés d'agent de contraste.

Avant de vous présenter les nouveaux fluorophores synthétisés pendant ma thèse, je souhaite revenir sur la bibliothèque de CDs fonctionnalisées pour la microscopie de fluorescence obtenues par le laboratoire (*les noms grisés concernent les molécules que je n'ai*

ni reproduite, ni participé à synthétiser et le détail des synthèses de **22** et **23** est décrit dans la partie expérimentale).

## b. CDs fonctionnalisées pour la microscopie de fluorescence

Depuis que le projet PR pour l'imagerie multimodale a été amorcé en 2010, de nombreuses personnes ont participé à la conception de la bibliothèque de CDs fonctionnalisées pour la microscopie de fluorescence qui est présentée ci-dessous (Figure 1.13).

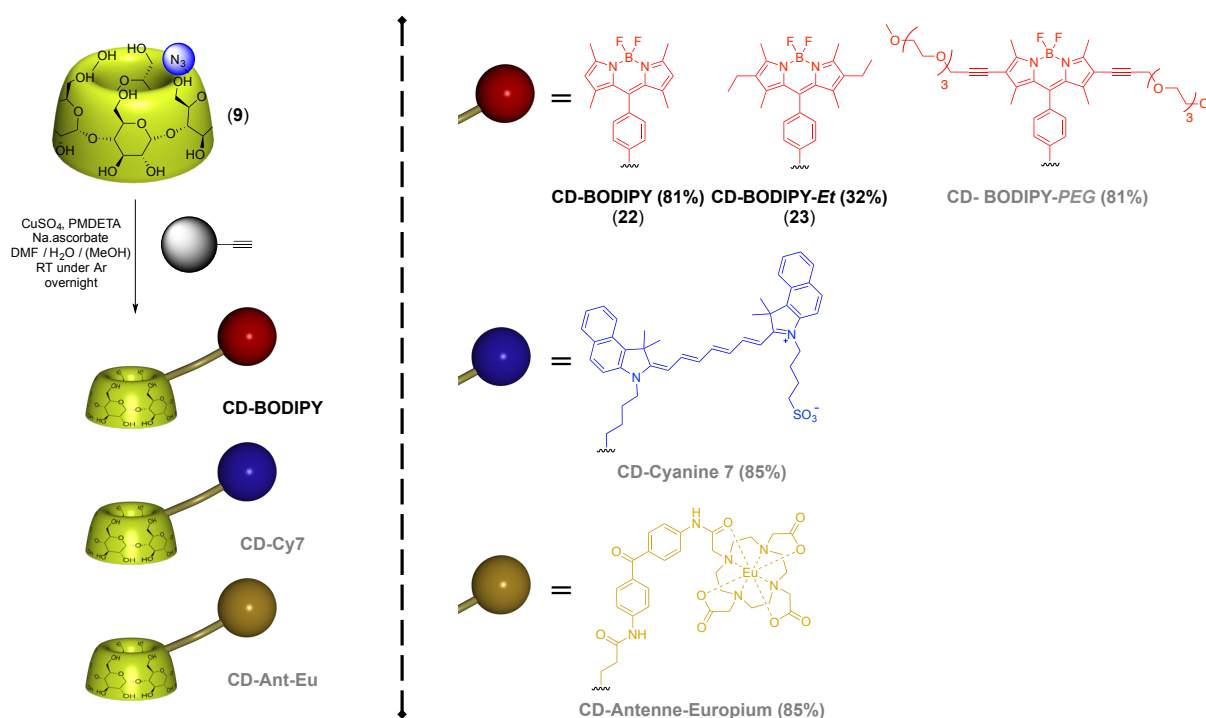


Figure 1.13 : Bibliothèque de CDs mono-fonctionnalisées par CuAAC

La réaction de cycloaddition a permis de synthétiser cinq CDs fluorescentes présentant des propriétés optiques complémentaires (Figure 1.13) avec une émission autour de 500 nm, 800 nm, et de 550 à 720 nm respectivement pour les **CD-BODIPYs**, **CD-Cy7** et **CD-Ant-Eu**. Si de son côté l'hydrosolubilité de l'agent de contraste semble élevée, le développement de plusieurs sondes fluorescentes a été nécessaire pour parvenir à une CD fluorescente hydrosoluble utilisable *in vivo*. Importante d'une part pour la biocompatibilité, l'hydrosolubilité est aussi nécessaire pour un bon enfilage de cette dernière sur un axe. En effet, une mauvaise solubilité dans l'eau peut provoquer la formation d'agrégats mais aussi l'auto-inclusion de la sonde fluorescente au sein de la cavité de la CD, induisant une compétition entre l'auto-inclusion et la formation du rotaxane.<sup>[102]</sup> C'est la raison pour laquelle différentes **CD-BODIPYs** ont été testées. La **CD-BODIPY (22)** est relativement

soluble dans l'eau mais est assez peu stable en solution à cause de ses positions  $\beta$  pyrroliques non protégées. Ainsi, pour accroître la stabilité, la **CD-BODIPY-Et (23)** a été synthétisée. Elle est plus stable, mais bien moins soluble dans l'eau. Son faible rendement de CuAAC s'explique aussi par une solubilité réduite du fluorophore dans le mélange de solvant eau/DMF/MeOH. La synthèse de la **CD-BODIPY-PEG** devait permettre l'obtention d'un fluorophore bien plus hydrosoluble. Néanmoins, cette CD précipite spontanément dans l'eau et laisse supposer la formation de complexes d'inclusion entre les PEG et la cavité de la CD. Comme on l'a vu dans le chapitre d'introduction, deux unités éthylène glycol suffisent d'après les études d'Harada pour leur inclusion. Dans un premier temps, c'est la **CD-BODIPY (22)**, la plus hydrosoluble, qui a été utilisée pour les études d'architectures supramoléculaires.

En marge de la synthèse des **CD-BODIPYs**, une CD luminescente à base d'Europium a été explorée (**CD-Ant-Eu**). Elle est intéressante car stable et émettrice entre 550 et 720 nm. Ces longueurs d'onde d'émission permettent de réaliser des études *in vivo* car elles tendent vers le proche infrarouge. Le travail dans le proche infrarouge permet de restreindre l'absorption des tissus biologiques (constitués d'eau et d'hémoglobine). Ainsi, il est possible de réaliser des expériences d'imagerie de fluorescence *in vivo* en s'affranchissant du travail de biopsie et du sacrifice du système étudié. Néanmoins, le complexe d'Europium nécessite une antenne ou photosensibilisateur (ici la benzophénone) pour son excitation. En effet, celle-ci passe par une transition f-f interdite dont les coefficients d'absorption molaires sont très faibles. L'antenne initialement choisit ayant des longueurs d'onde d'absorption entre 200 et 400 nm, son utilisation pour des applications *in vivo* est compromise.

Le groupe a aussi démarré un travail de synthèse de **CD-Cy7**. La **Cyanine 7** est elle aussi utilisable pour l'imagerie *in vivo* (excitation et émission autour de 800 nm). Si la synthèse de la **CD-Cy7** a pu être réalisée durant le post-doctorat d'Aurélié Guénet, elle ne possède pas les propriétés d'hydrosolubilité et de stabilité requises pour son utilisation. Il est donc envisagé de travailler sur la synthèse de **Cyanines 5** hydrosolubles plus stables, émettant à des longueurs d'onde un peu plus faibles (650-700 nm) mais toujours dans la fenêtre de transparence.

Pour l'ensemble de ces fluorophores, il a été remarqué que le couplage à la CD ne modifie pas les propriétés d'absorption et d'émission de la sonde, les quelques nanomètres de différences étant plutôt attribués à des effets solvatochromes.

### 3. Étude cinétique d'enfilage sur un monomère modèle dicationique

Afin d'étudier l'affinité des différentes cyclodextrines fonctionnalisées pour le polyammonium perméthylé, nous nous sommes intéressés à leur enfilage sur un monomère modèle, le diammonium dodécane perméthylé (**24**) (Figure 1.14).

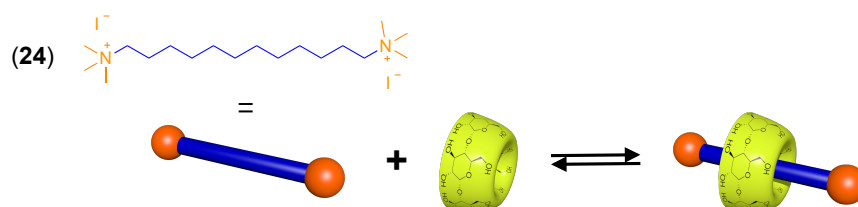


Figure 1.14 : Formation du *pseudo*-[2]rotaxane

Les ammoniums perméthylés jouent ici le rôle de *pseudo*-bouchons, ils permettent l'enfilage de la CD mais le ralentissent. Ainsi, l'échange entre la forme dissociée et associée devient lent à l'échelle de la RMN. Ceci a pour effet de permettre l'observation simultanée des espèces libres et du complexe d'inclusion. On peut alors suivre, en fonction du temps, l'enfilage progressif de la CD sur l'axe jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique. Des travaux antérieurs ont permis de montrer qu'une seule cyclodextrine pouvait s'inclure sur cet axe.<sup>[103]</sup> L'étude consiste alors à introduire en proportions stœchiométriques l'axe et la CD à étudier dans l'eau deutérée et à suivre par RMN <sup>1</sup>H l'enfilage au cours du temps. Sur le monomère modèle, il n'est pas nécessaire de chauffer pour enfiler la CD, ces études peuvent alors être réalisées à température ambiante sur la période nécessaire pour que l'équilibre soit atteint. Pour pouvoir comparer les constantes d'association et profils cinétiques d'enfilage, la concentration a été fixée (c = 2,8 mM).

Sur la Figure 1.15, l'enfilage de la CDLa (**18**) est représenté à titre d'exemple. Quatre pics caractéristiques sont indiqués : le proton du triazole (bleu), les protons anomériques (violet), les méthyles des *pseudo*-bouchons (orange), et les méthylènes en alpha du groupement ammoniums (vert). Lorsque la cyclodextrine s'enfile sur l'axe, le signal correspondant au proton du triazole de la forme libre diminue en faveur de celui de la forme enfilée. On peut suivre au cours du temps la disparition de l'un et l'apparition de l'autre car l'échange entre ces deux formes est lent. Le même comportement est visible sur le signal des protons anomériques. Pour les signaux de l'axe, il faut prendre en considération un paramètre supplémentaire. Lorsque la CD s'enfile sur l'axe, les deux côtés de l'axe ne possèdent plus le même environnement chimique (l'un voit la couronne primaire tandis que l'autre voit la

couronne secondaire). Ainsi, on observe un dédoublement des méthyles (orange) et méthylènes des bouts de chaîne (vert). Il y a donc trois signaux : 1 pour l'axe libre, et 2 pour l'axe enfilé dissymétrisé. En particulier ici, le pic de l'axe libre à 3,12 ppm est superposé avec l'un des pics de la forme enfilée.

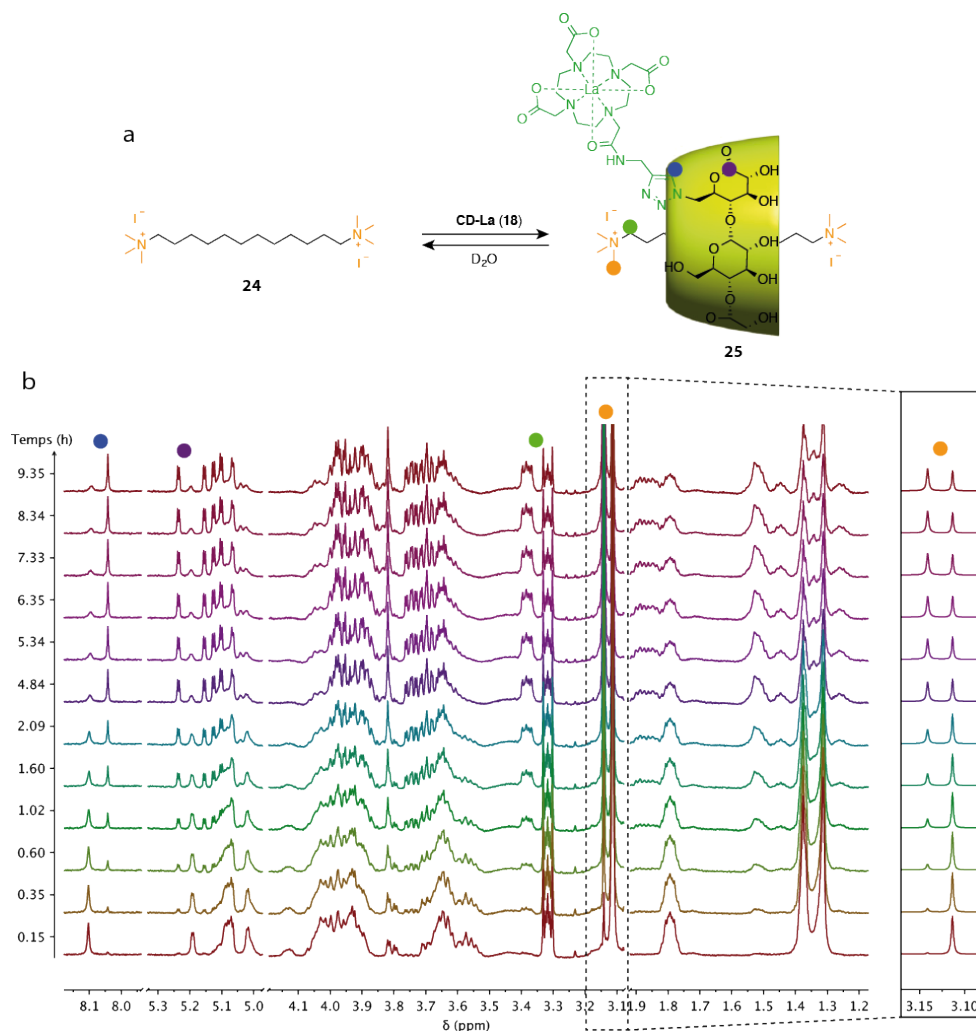


Figure 1.15 : a) Enfilage de la **CDLa** sur l'axe modèle ; b) Suivi RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) de l'enfilage de **CDLa** sur l'axe modèle (mélange 1:1 ;  $c = 2,8$  mM).

Une fois l'équilibre atteint, on peut tracer le pourcentage d'enfilage de la CD étudiée en fonction du temps, modéliser son allure avec une fonction mono-exponentielle ( $y = A(1 - e^{-kt})$ ) afin de visualiser le plateau à l'équilibre et déterminer le temps de demi enfilage ( $t_{1/2}$ ) (Figure 1.16) et déterminer la constante de formation ( $K_f$ ) du complexe d'inclusion (CI, **25**) (Équation 1.9), (Tableau 1.1).

$$K_f = \frac{X}{C_0(1 - X)^2} \quad \text{Équation 1.9}$$

$X$  : taux d'inclusion

$C_0$  : concentration initiale en hôte et invité ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

$K_f$  : constante de formation

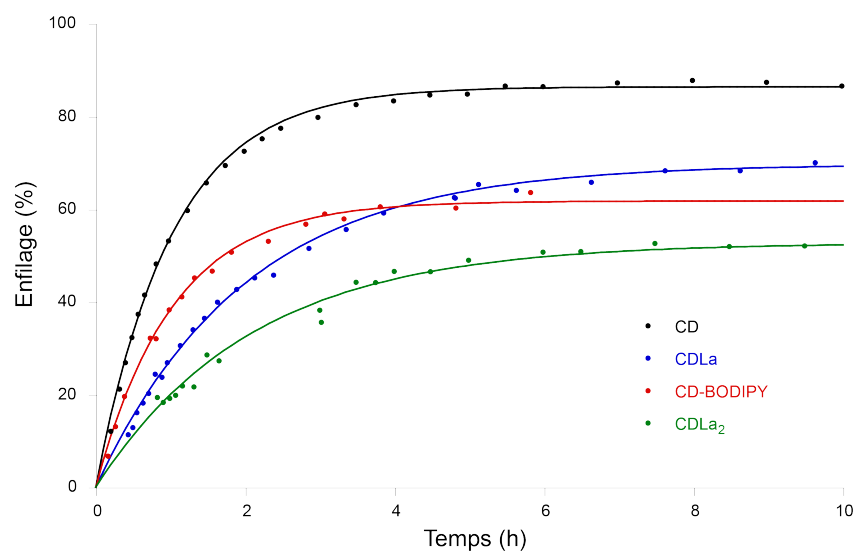


Figure 1.16 : Suivis cinétiques d'enfilage de l' $\alpha$ CD, CDLa, CDLa<sub>2</sub> et CD-BODIPY sur le monomère modèle en mélange 1:1 dans D<sub>2</sub>O ( $c = 2,8 \text{ mM}$  ; 300 K).

Tableau 1.1 : Pourcentage de complexe d'inclusion à l'équilibre, constante d'équilibre et temps de demi enfilage du complexe d'inclusion pour différentes CDs en mélange 1:1 avec le monomère modèle (**24**) à 2,8 mM et 300 K.

CD	$X$ (%)	Log $K_f$	$t_{1/2}$ (min)
$\alpha$ CD ( <b>1</b> )	88	4,3	43
CDLa ( <b>18</b> )	71	3,5	84
CDLa <sub>2</sub> ( <b>20</b> )	53	2,9	85
CD-BODIPY ( <b>22</b> )	64	3,2	48

Ces études permettent de déterminer l'aptitude des CDs fonctionnalisées à s'auto-assembler avec le monomère pour former le *pseudo*-[2]rotaxane. Comme on peut le constater, CDLa<sub>2</sub> possède une constante d'association inférieure à CDLa qui est probablement due à l'encombrement du col primaire de la CD (même tendance de  $\alpha$ CD à CDLa). De plus, la CD-BODIPY est assez bien soluble dans l'eau et s'enfile à hauteur de 64%. Néanmoins, les propriétés optiques de cette dernière n'étant pas suffisantes pour l'imagerie *in vivo*, la

synthèse de nouveaux fluorophores hydrosolubles pour la microscopie de fluorescence dans le proche infrarouge a été réalisée ainsi que la caractérisation de leurs propriétés optiques et d'enfilage.

### III. Étude de nouveaux fluorophores hydrosolubles

#### 1. Préparation de cyanines 5 hydrosolubles

##### a. Stratégie de synthèse

De façon générale, les cyanines sont synthétisées en deux étapes. Prenons l'exemple de la synthèse d'une cyanine 5 dissymétrique à base d'indole (Figure 1.17). La première étape consiste en la préparation de l'hémicyanine par la réaction de l'indolium avec la chaîne polyméthine. Cette chaîne est souvent commerciale et peut être fonctionnalisée. Pour la synthèse de cyanine 7, elle est souvent stabilisée par un cycle intermédiaire. La deuxième étape consiste à faire réagir l'hémicyanine avec un deuxième indolium pour obtenir la cyanine. Ces deux étapes sont combinées pour la synthèse de cyanine symétrique mais doivent être successives pour une cyanine dissymétrique. Le cas échéant, l'hémicyanine peut aussi être isolée avant de l'engager dans la deuxième étape.

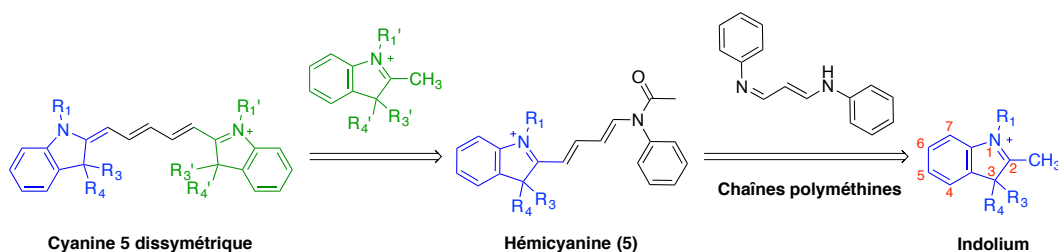


Figure 1.17 : Rétro-synthèse d'une cyanine 5 dissymétrique à base d'indole

Les groupements indoliums (pyrroliums, benzindoliums, etc) sont principalement fonctionnalisables en position 1 par *N*-alkylation. Cette position doit forcément être substituée pour permettre la formation de la cyanine (Annexe 1). Le méthyle en position 2 contribue pour l'apport d'un carbone supplémentaire à la chaîne polyméthine. La position 3 doit impérativement être substituée pour permettre la formation du système conjugué entre les deux azotes et éviter toutes cyclisations parasites. Souvent substituées par des méthyles, elles peuvent aussi permettre l'introduction de fonctions supplémentaires.<sup>[104]</sup> Enfin, les autres positions peuvent servir à l'introduction de groupements solubilisants (-NO<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, ...). Si la synthèse de cyanine symétrique semble aisée,<sup>[105]</sup> la dissymétrisation est plus

complexe et donne dans la plupart des cas des rendements plus faibles, en particulier pour la synthèse de cyanines hydrosolubles.<sup>[104a]</sup>

Pour parvenir à une sonde fluorescente dans le proche infrarouge, hydrosoluble, et suffisamment stable, nous avons choisi d'explorer la synthèse de Cy5 dissymétrique possédant un alcyne vrai pour pouvoir réaliser sa cycloaddition sur la CD (Figure 1.18). La dissymétrie de la molécule est nécessaire pour ne pas introduire deux fonctions alcynes qui pourraient entraîner la formation de dimères de CDs. Pour améliorer l'hydrosolubilité, nous envisageons l'utilisation de groupements sulfonates très largement utilisés dans la littérature. La synthèse d'une cyanine 5 nous permet de réinvestir les briques azotées développées par Aurélie Guénet durant son post-doctorat sur la synthèse de la cyanine 7.

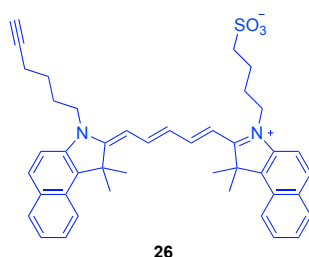
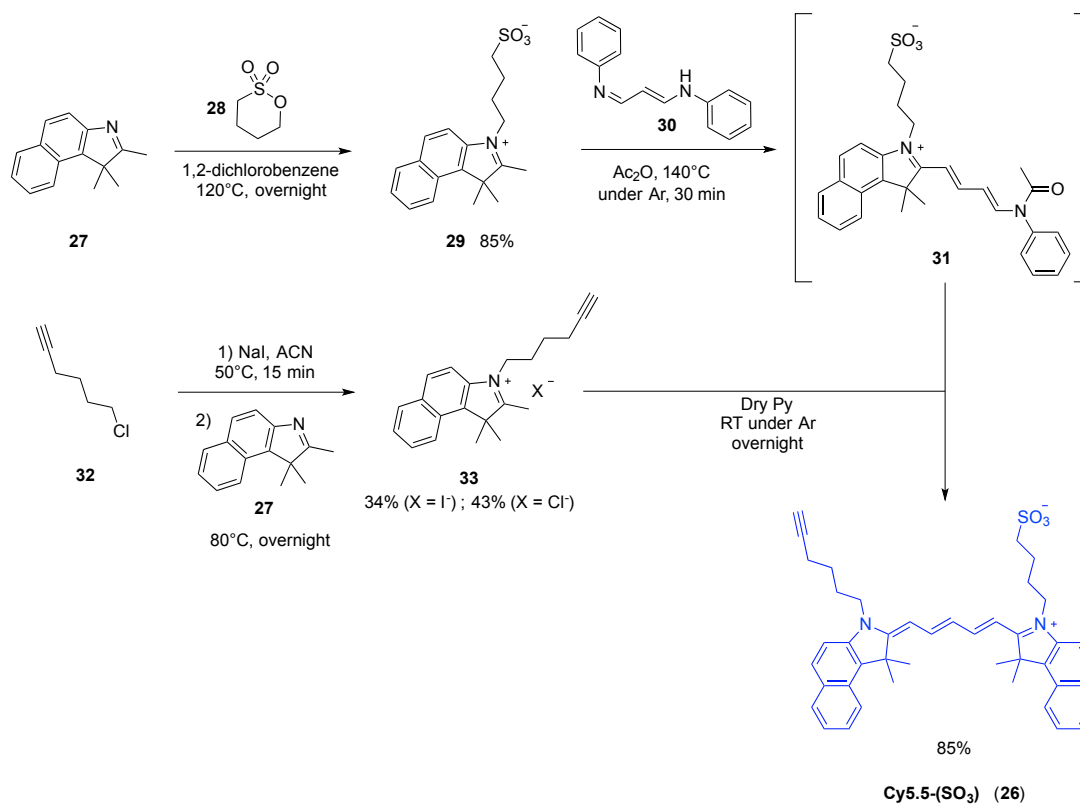


Figure 1.18 : **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)** - Molécule cible pour l'obtention d'un fluorophore utilisable *in vivo*

### b. Synthèse de **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)**

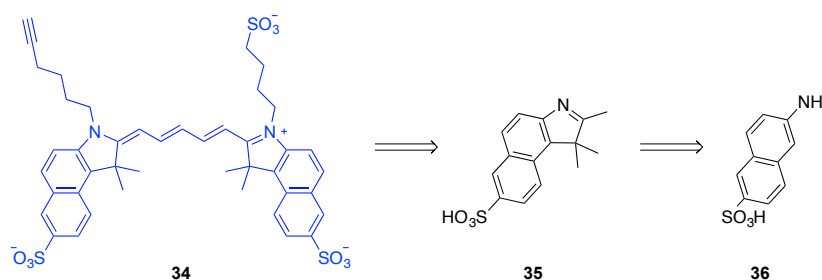
La synthèse de **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)** (**26**) (Figure 1.19) débute par l'alkylation du 1,1,2-triméthyl[1]benz[e]indole commercial (**27**) par l'iodohexyne généré *in situ* par réaction de substitution nucléophile entre le chlorohexyne (**32**) et l'iodure de sodium dans l'acétonitrile à reflux pour donner le benzindolium **33**.<sup>[106]</sup> D'autre part, la *N*-alkylation du benzindole (**27**) par ouverture de cycle de la 1,4-butanesultone (**28**) dans le 1,2-dichlorobenzène à 120°C permet d'obtenir le benzindolium sulfonate **29**.<sup>[104a]</sup> La synthèse de la cyanine **26** se fait ensuite en deux étapes *in situ* en faisant d'abord réagir le benzindolium-butanesulfonate (**29**) avec le 3-anilino-acroléine anil (**30**) pour former l'hémicyanine **31**, puis l'ajout du benzindolium-hexyne (**33**) permet de former la cyanine **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)**. Le rendement de ces deux étapes 'one-pot' conduisant à la cyanine dissymétrique est très correct (85%). La cyanine **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)** a pu aisément être synthétisée à l'échelle de la centaine de milligrammes. Néanmoins, cette cyanine n'étant pas assez hydrosoluble, l'incorporation de groupements sulfonates supplémentaires a été réalisée.



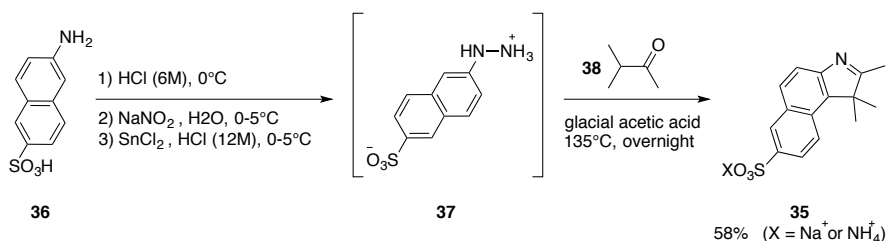

 Figure 1.19 : Voie de synthèse de la Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)

### c. Synthèse d'une Cy5.5 hydrosoluble

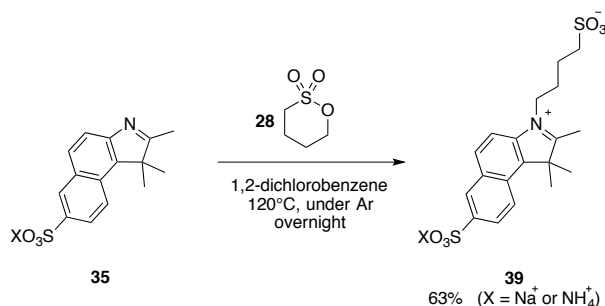
Afin d'accroître la solubilité dans l'eau de la cyanine 5.5, nous avons entrepris l'introduction de groupements sulfonate sur la partie benzindole pour l'obtention d'une cyanine 5.5 hydrosoluble (**34**) (Figure 1.20).


 Figure 1.20 : Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> cible et ses précurseurs commerciaux

Le benzindole-SO<sub>3</sub>H (**35**) étant relativement cher, nous avons réalisé sa synthèse à partir de l'acide 6-amino-1-naphtalènesulfonique commercial (**36**) (Figure 1.21).


 Figure 1.21 : Synthèse du benzindole sulfonate (**35**)

Cette synthèse se fait en deux étapes suivant la synthèse des indoles de Fischer.<sup>[104,107]</sup> Elle consiste en la formation d'une hydrazine (**37**), suivie d'une cyclisation pour obtenir le benzindole **35**. En condition acide, le nitrite de sodium forme de l'acide nitreux ( $\text{HNO}_2$ ) qui peut réagir avec le précurseur dérivé du naphthalène (**36**) pour former un intermédiaire diazonium. Celui-ci est réduit par le chlorure d'étain pour donner l'hydrazine **37**. Celle-ci est isolée par recristallisation dans l'eau distillée et engagée sans plus de purification dans la réaction de cyclisation de Fischer avec la 3-méthylbutanone (**38**) dans l'acide acétique. Après purification par colonne de chromatographie sur silice, le benzindole- $\text{SO}_3$  (**35**) est obtenu avec un rendement global de 58%.


 Figure 1.22 : Synthèse du benzindolium- $\text{SO}_3$ -butanesulfonate (**39**)

Cette brique doit maintenant être fonctionnalisée par la 1,4-butanesultone (**28**) et un alcyne comme précédemment. Si l'ouverture de la 1,4-butanesultone se fait convenablement et mène au benzindolium- $\text{SO}_3$ -butanesulfonate (**39**) avec un rendement convenable de 63% (Figure 1.22), l'insertion de l'alcyne s'est révélée plus difficile (Figure 1.23 ; Tableau 1.2).

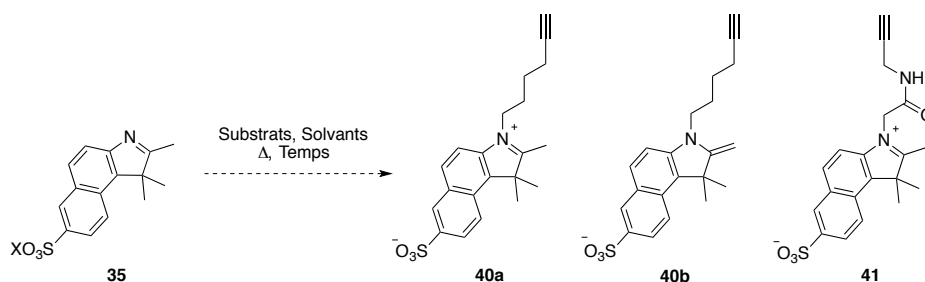
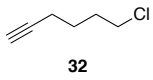
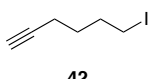
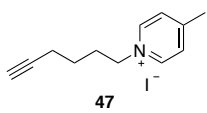
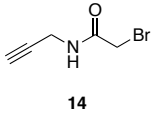

 Figure 1.23 : Synthèse des benzindoliums- $(\text{SO}_3)$ -alcyne

Tableau 1.2 : Conditions réactionnelles pour la *N*-alkylation du benzindole-SO<sub>3</sub>. \*moins de 10% de produit par rapport au réactif. Réactions sur 20 à 100 mg de réactif (à concentration fixe)

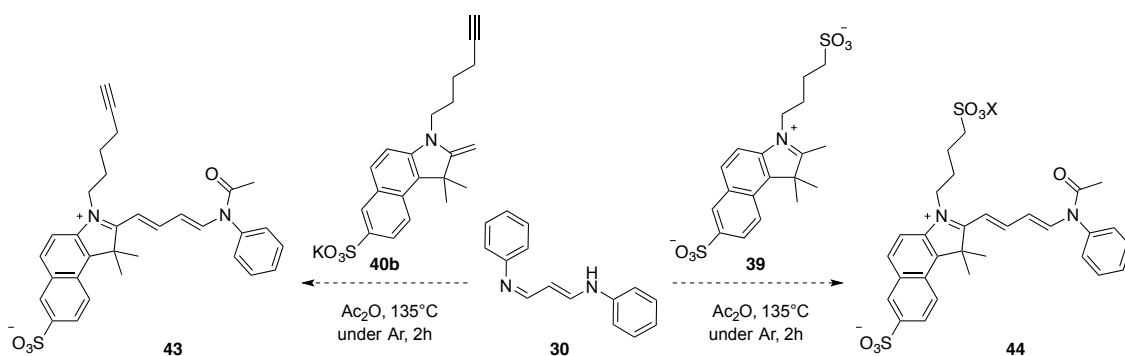
Substrats	Solvants	Co-réactifs	Δ	Temps	Observations
 32	Acétonitrile	NaI	Thermique (85°C)	12h	/
		NaI, TBABr			
 42	MeOH/1,2-dichlorobenzène	/	Microondes (140°C, 1h) (120°C, 2h)		Traces du produit <b>40a*</b> + dégradation
	1,2-dichlorobenzène		Microondes (120°C)	2h	Traces du produit <b>40a*</b>
	Sulfolane		Thermique (120°C)	12h	
	DMF		Thermique (70°C)	4h	
	DMSO				Réactif dégradé
	MeOH	4-Picoline	Thermique (85°C)	2h30	Réactif +  47
	MeOH/1,2-dichlorobenzène	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Thermiques (85°C)	2h	Traces du produit <b>40b*</b>
			Microondes (120°C)	10 min + 1h30	Produit <b>40b</b> (42% de rendement RMN)
			Microondes (120°C, 2h) (130°C, 2h) (140°C, 2h)		Produit <b>40b</b> (74% rendement RMN)
	 14	MeOH/1,2-dichlorobenzène	/	Thermique (120°C)	24h
MeOH		Thermique (90°C)		72h	
1,2-dichlorobenzène		Microondes (100°C)		1h	
		Thermique (150°C)		48h	
MeOH		Microondes (150°C)		1h	
		Thermique (65°C)		24h	
MeOH/1,2-dichlorobenzène		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Thermique (120°C)	24h	Traces du produit <b>41*</b>

Trois substrats dérivés d'alcyne ont été testés pour réaliser la *N*-alkylation du benzindole-SO<sub>3</sub> (**35**) (le chlorohexyne (**32**), l'iodohexyne (**42**), et le 2-bromo-*N*-(prop-2-ynyl)acétamide (**14**)) et mener aux produits **40** et **41**. Souvent décrites dans le 1,2-dichlorobenzène ou le sulfolane, deux solvants dont la température d'ébullition est élevée,

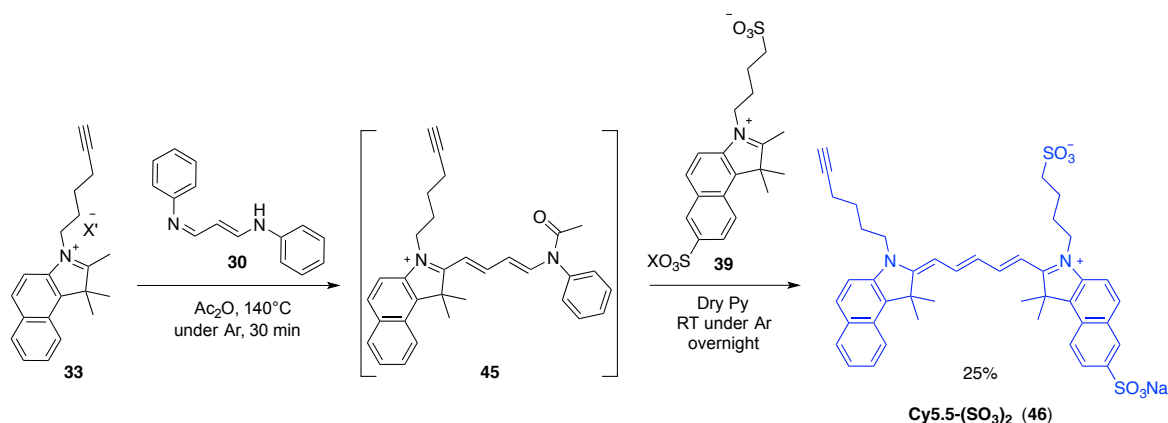
cette réaction est réalisée par voie thermique ou assistée par microondes à des températures supérieures à 100°C. Néanmoins, la solubilité du benzindole-(SO<sub>3</sub>) (**35**) étant faible dans ces solvants, du méthanol ou du DMSO ont aussi été testés pour améliorer la réactivité du réactif. Le benzindole-SO<sub>3</sub> est très soluble dans le méthanol mais, utilisé seul, ce solvant ne permet pas le chauffage à température élevée, de plus il peut conduire à la *N*-alkylation par un groupement méthoxy.

Les premières expériences ont été réalisées en l'absence de base. Le chlorohexyne (**32**) a d'abord été utilisé dans les mêmes conditions réactionnelles que la *N*-alkylation du benzindole commercial (**27**). Dans ces conditions, on ne détecte ni la dégradation du réactif ni la formation de produit. L'ajout de bromure de tétrabutylammonium pour modifier le contre-ion du réactif et augmenter sa solubilité n'a pas amélioré la réactivité. La synthèse du précurseur iodohexyne (**42**) a alors été réalisée et différentes conditions réactionnelles ont été testées. En l'absence de base, différents solvants ont été utilisés (DMSO, DMF, sulfolane, dichlorobenzène). Le DMSO est un bon solvant pour les deux réactifs mais ces conditions réactionnelles mènent à la dégradation du benzindole-SO<sub>3</sub> (**35**). Dans le sulfolane ou le dichlorobenzène, seules des traces du produit sous la forme imine (**40a**) ont pu être détectées. Le chauffage répété par assistance microonde n'a pas conduit à l'amélioration de l'avancement mais à la dégradation progressive du réactif. Constatant la faible solubilité et réactivité du réactif, nous avons fait l'hypothèse que l'imine pouvait être protonée et donc être sous forme iminium. En présence de carbonate de potassium comme base, l'avancement de la réaction a été amélioré, principalement par chauffage assisté par microondes dans un mélange MeOH/1,2-dichlorobenzène (1:9). Dans ces conditions, la conversion déterminée par RMN <sup>1</sup>H sur le brut réactionnel est de 74%. Le produit identifié se trouve majoritairement sous la forme énamine (**40b**) d'après la caractérisation RMN après purification par colonne chromatographique sur silice. Les halogénohexynes étant relativement volatiles, nous avons effectué différents tests sur le 2-bromo-*N*-(prop-2-ynyl)acétamide (**14**) par voie thermique avec ou sans base. Seules des traces de produit **41** ont été détectées.

La synthèse de Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (**34**) à partir des benzindoliums **39** et **40b** a été entreprise en faisant réagir l'un ou l'autre des benzindoliums sur l'anilino acroléine anil (**30**) (Figure 1.24). Après la première étape permettant la formation de l'hémicyanine, la RMN <sup>1</sup>H et la spectrométrie de masse n'ont permis que la détection des réactifs de départ.


 Figure 1.24 : Tentatives de synthèse d'une hémicyanine- $(\text{SO}_3)_2$ 

Nous nous sommes alors intéressés à la synthèse d'une cyanine dissymétrique « hybride », **Cy5.5- $(\text{SO}_3)_2$**  (**46**) (Figure 1.25). Sa synthèse a été possible par l'utilisation du benzindolium-hexyne (**33**) pour former l'hémicyanine (**45**) avec la chaîne polyméthine (**30**), puis par ajout de **39** pour obtenir, avec un rendement de seulement 25%, la cyanine **Cy5.5- $(\text{SO}_3)_2$**  (**46**). Si la solubilité de cette cyanine est plus élevée que celle de **Cy5.5- $(\text{SO}_3)$**  (**26**) du fait de l'ajout d'un groupement sulfonate supplémentaire, nous avons entrepris la synthèse d'une cyanine 5 à base d'indole. La réduction du système conjugué devrait permettre de diminuer les effets d'agrégation et donc accroître l'hydrosolubilité.


 Figure 1.25 : Synthèse de **Cy5.5- $(\text{SO}_3)_2$** 

#### d. Synthèse de **Cy5- $(\text{SO}_3)_3$**

L'utilisation d'un noyau indole à la place des benzindoles a pour effet de réduire le système conjugué de la cyanine et donc de diminuer les longueurs d'onde d'absorption et d'émission de 30 à 40 nm. Les longueurs d'onde caractéristiques des cyanines 5 à base d'indole sont de 650 nm pour l'absorption et de 670 nm pour l'émission, elles sont donc encore utilisables dans la fenêtre de transparence des tissus biologiques définie plus haut.

Pour la synthèse des indoliums fonctionnalisés, nous sommes partis de l'hydrazine commerciale (**48**). Dans les mêmes conditions que précédemment, la cyclisation de l'indole est réalisée et est suivie d'une précipitation du produit par l'ajout d'hydroxyde de potassium dans un mélange de méthanol et d'isopropanol (1:1) (Figure 1.26). Cette étape permet de contrôler le contre-ion ( $K^+$ ) du produit et d'obtenir une bonne solubilité du produit dans l'acétonitrile pour l'étape de *N*-alkylation.

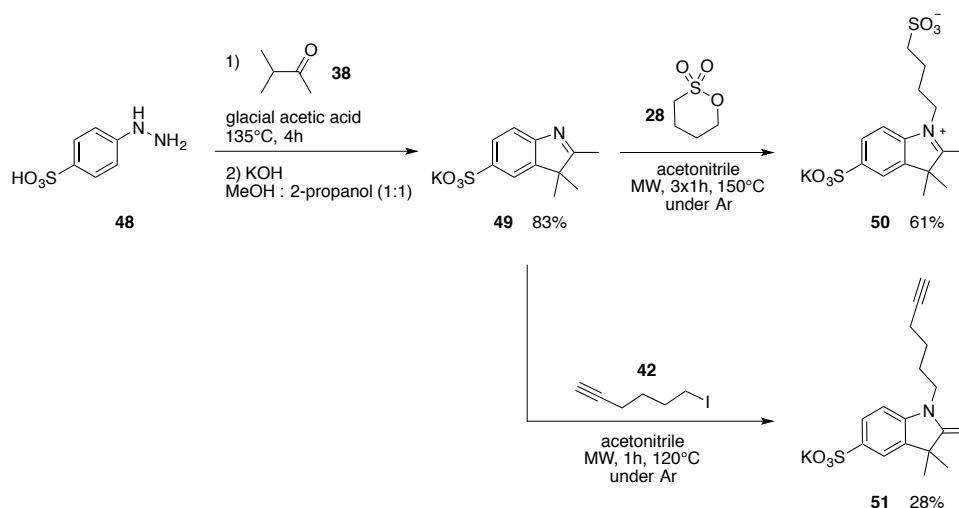


Figure 1.26 : Synthèse des indoliums fonctionnalisés

Les indoles fonctionnalisés **50** et **51** ont ensuite été obtenus par *N*-alkylation assistée par microondes en présence de 1,4-butanedisulfone (**28**) ou d'iodohexyne (**42**). Dans le premier cas, le rendement est correct (61%) et le produit **50** est isolé après une colonne chromatographique sur silice sous sa forme imine. Le produit **51** est lui obtenu sous sa forme énamine avec un rendement plus faible de 28% mais sa synthèse n'a pour autant pas fait l'objet d'une optimisation réactionnelle.

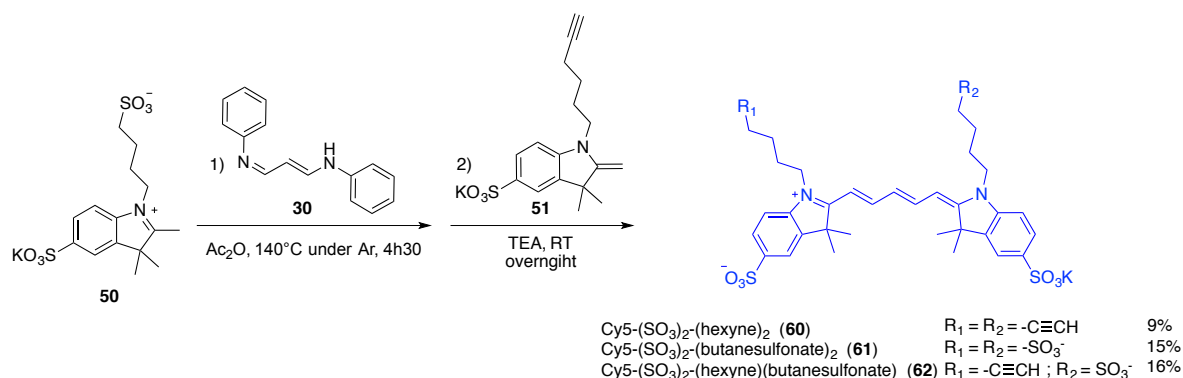


Figure 1.27 : Synthèse des Cy5 à base d'indole

La synthèse de la cyanine 5 dissymétrique à base d'indole (**62**) a pu être effectuée. Lors des premières tentatives, l'indole alcyne (**51**) a été introduite pour réagir avec la chaîne

polyméthine (**30**). Avant même l'ajout de la seconde brique, le mélange réactionnel étant d'une couleur bleue intense, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée et a permis d'observer la formation de la cyanine 5 symétrique **60**. Le second indole **50** a tout de même été introduite dans les conditions décrites plus haut (Figure 1.27) mais, après purification, seule la **Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.(hexyne)<sub>2</sub> (60)** a été obtenue avec un rendement de 37%.

Les conditions réactionnelles ont été inversées pour faire réagir l'indole **50** en premier (Figure 1.27). Ces conditions ont mené à l'obtention de trois cyanines 5 qui ont pu être séparées par une colonne de chromatographique sur silice. Deux cyanines symétriques (**60** et **61**), et la cyanine dissymétrique souhaitée (**62**) ont été isolées avec des rendements de 9, 15 et 16% respectivement. Des tests préliminaires ont permis de mettre en évidence une hydrosolubilité élevée de ces trois cyanines.

Les trois cyanines dissymétriques obtenues, **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) (26)**, **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (46)** et **Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (62)**, ont été couplées à la CD mono-azoture (**9**) et leurs propriétés optiques, avant et après couplage, ont été caractérisées.

## 2. Synthèse des CD-Cyanine 5

La fonctionnalisation de **CD(N<sub>3</sub>) (9)** par les différentes cyanines dissymétriques a été réalisée par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre (Figure 1.28a). Les conditions réactionnelles restent inchangées : CuSO<sub>4</sub>, PMDETA, ascorbate de sodium. Les deux CD-Cy5.5 (**63** et **64**) sont obtenues dans un mélange DMF/H<sub>2</sub>O (1:1), tandis que la Cy5 (**62**), suffisamment soluble dans l'eau, ne nécessite pas l'ajout de DMF pour sa 'click'. La CuAAC a permis l'obtention de ces trois nouvelles CDs fonctionnalisées avec des rendements de 60 à 92%. **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) (63)** ne semble pas plus soluble dans l'eau que la cyanine de départ, sur la Figure 1.28b, on peut observer que toute la CD-Cy **63** n'est pas solubilisée, de plus on observe la formation d'une émulsion certainement due au caractère amphiphile du composé. **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (64)** montre une amélioration en terme de solubilité, aucun précipité n'est observé et l'émulsion est atténuée. La cyclodextrine cyanine à base d'indole **65** ne présente aucune émulsion et semble la plus hydrosoluble (Figure 1.28b). On peut aussi visuellement noter la diminution de la longueur d'onde d'absorption de cette dernière par rapport aux CD-Cy5.5 (**63** et **64**) par sa coloration bleu marine contre cyan pour les CD-Cy5.5. La présence de trois groupements sulfonates et le remplacement des benzindoles par des indoles permet donc d'obtenir une CD-Cyanine hydrosoluble (**65**). Leur caractérisation totale a été réalisée par RMN dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> et HRMS.

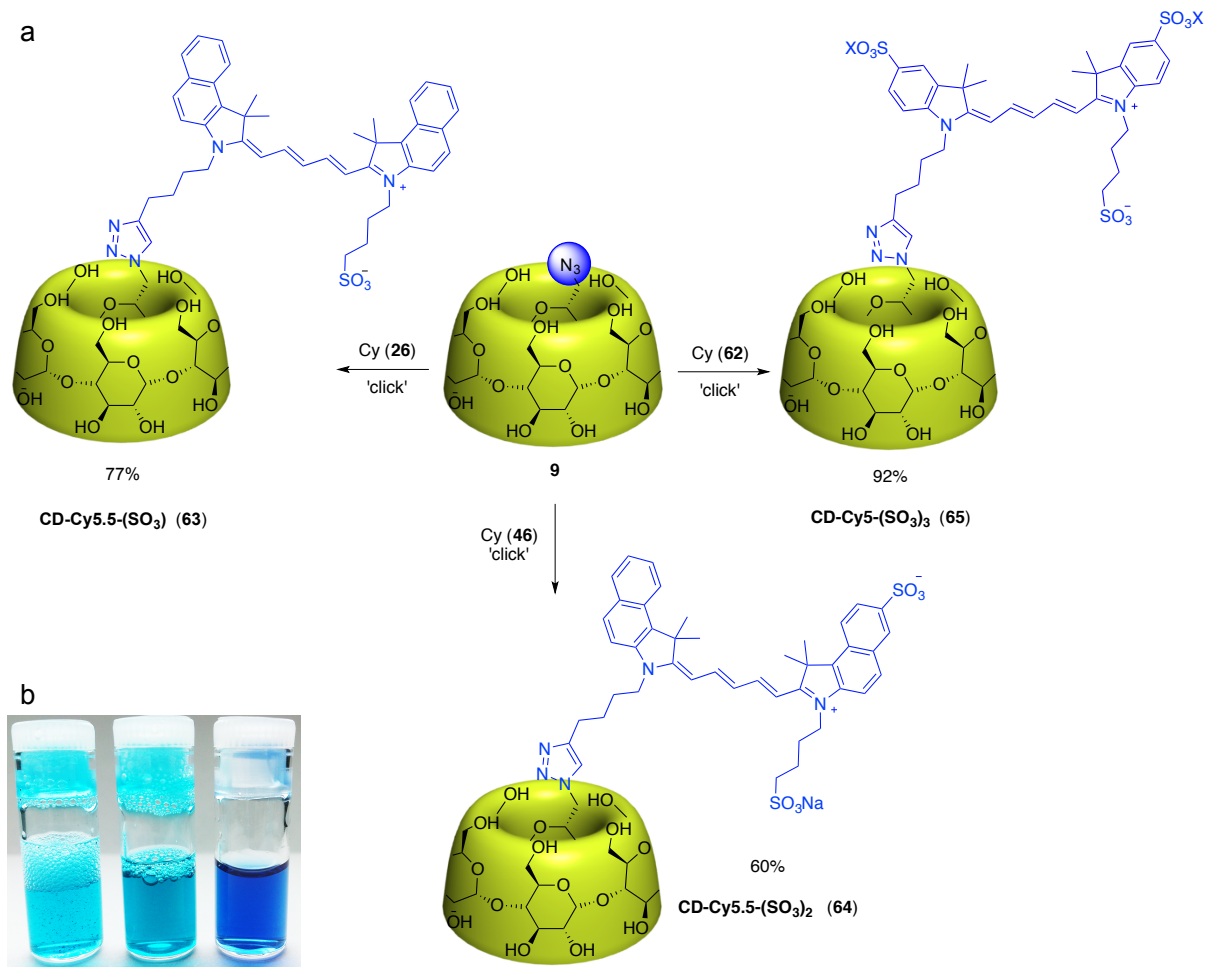


Figure 1.28 : a) Synthèse des CD-Cyanines 5 par CuAAC dans un mélange H<sub>2</sub>O/DMF (1:1) pour les cyanines **26** et **46** et dans l'eau pure pour **62** ; b) Photos de solutions de CD-cyanines **63** ; **64** et **65** (de gauche à droite) à 0,6 mM dans l'eau.

### 3. Étude des propriétés optiques des cyanines et CD-Cy

Les propriétés optiques des trois cyanines et CD-Cy obtenues au cours de ce travail ont été caractérisées (Figure 1.29 ; Tableau 1.3). Les composés **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) (26)** et **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) (63)** n'étant pas suffisamment solubles dans l'eau, la caractérisation de leur absorption et émission a été effectuée dans un mélange d'eau et d'acétonitrile (8:2). Les cyanines **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (46)** et **Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (62)** sont elles suffisamment solubles dans l'eau, de même que les CD-Cyanines associées (**64** et **65**).



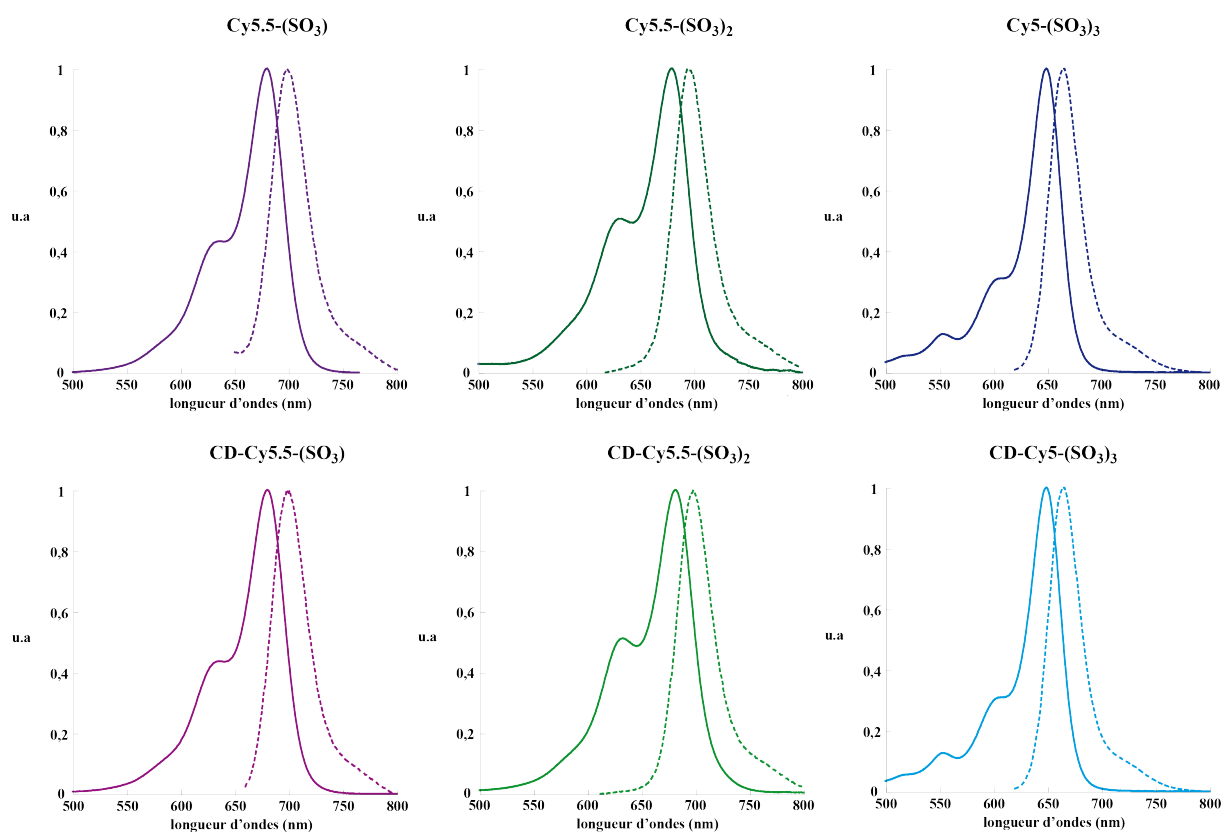


Figure 1.29 : Spectres d'absorption et d'émission des Cyanines et CD-cyanines associées à 20°C. Les mesures de **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)** (26) et **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)** (63) sont réalisées dans un mélange H<sub>2</sub>O:ACN (8:2) ( $\lambda_{\text{ex}} = 650$  nm), les quatre autres sont réalisées dans l'eau avec des longueurs d'onde d'excitation de 675 nm (**Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 670 nm (**CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**) et 620 nm (**Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** et **CD-Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**).

Tableau 1.3 : Propriétés optiques des Cyanines et CD-cyanines associées. \*Mesures effectuées dans un mélange H<sub>2</sub>O:ACN (8:2).

Fluorophore	$\lambda_{\text{max absorption}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max émission}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
<b>Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)*</b>	680	698	18
<b>CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)*</b>	680	698	18
<b>Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	680	694	14
<b>CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	681	698	17
<b>Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	648	664	16
<b>CD-Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	649	664	15

Comme on peut le constater, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission ne sont pas affectées par le couplage du fluorophore à la cyclodextrine. Pourtant, on a remarqué que les propriétés optiques des cyanines étaient sensibles aux changements solvants (voir partie expérimentale, composé **26**), on peut donc penser qu'aucun phénomène d'auto-inclusion de la cyanine dans la cavité de la CD ne se produit. Les propriétés optiques mesurées sont en accord avec la littérature à savoir, pour la Cy5, des longueurs d'onde caractéristiques entre 650 et 670 nm et pour la Cy5.5, entre 680 et 700 nm. Les épaulements hypsochromes visibles sur les spectres d'absorption et leur intensité sont caractéristiques des cyanines et liés aux sous-bandes vibroniques.<sup>[108]</sup>

L'obtention de la **CD-Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>** (**65**), la plus soluble des trois, est très prometteuse pour des applications *in vivo* et son hydrosolubilité élevée devrait permettre un bon enfilage sur l'axe modèle.

#### 4. Étude d'enfilage des cyclodextrines cyanines

Les études d'enfilage des trois cyclodextrines-cyanines ont pu être réalisées (Figure 1.30). L'axe modèle, le 1,12-diammonium dodécane perméthylé (**24**), est utilisé dans un mélange 1:1 avec la CD fonctionnalisée à 2,8 mM à température ambiante. La première CD testée, **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)** (**63**), n'a montré aucun signe d'enfilage que ce soit dans l'eau pure ou après l'ajout de 20% d'acétonitrile deutéré. L'enfilage de **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** (**64**) a été effectué dans l'eau seule et est caractérisé par un  $t_{1/2}$  de 2,9 h et un taux d'enfilage de 29% à l'équilibre ( $\log K_f = 2,3$ ). En comparaison des 64% d'enfilage de **CD-BODIPY** (**22**) et du  $t_{1/2}$  de 48 min (Tableau 1.1), ce résultat est peu satisfaisant. La troisième CD, **CD-Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>** (**65**), permet la formation du complexe d'inclusion à hauteur de 70% ( $\log K_f = 3,4$ ) avec un enfilage sur l'axe très rapide ( $t_{1/2} = 26$  min).

On constate sur cet exemple que l'hydrosolubilité (déterminée de façon très qualitative ici) influence particulièrement la formation du complexe d'inclusion avec le monomère modèle (**24**). L'obtention tardive de **CD-Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>** (**65**) n'a pas permis son utilisation sur des structures polyrotaxanes, néanmoins, ce fluorophore semble particulièrement intéressant pour les futures études *in vivo*.

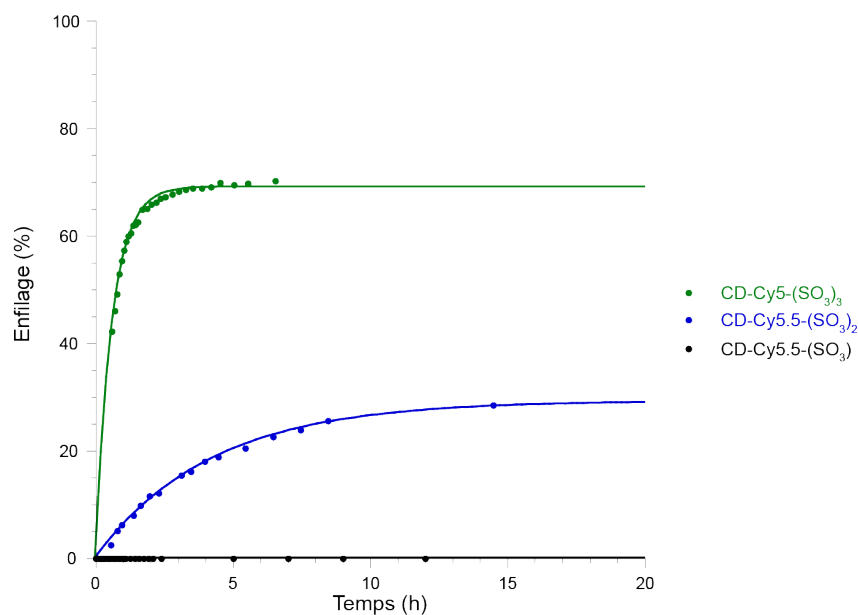


Figure 1.30 : Suivis cinétiques d'enfilage des **CD-Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**, **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** et **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)**

## V. Conclusion

La méthode de synthèse des cyclodextrines mono- et bis-azoture a été présentée et permet la génération aisée d'une bibliothèque de cyclodextrines fonctionnalisées pour l'imagerie médicale par microscopie de fluorescence ou imagerie par résonance magnétique. Les propriétés optiques des fluorophores utilisés ont été optimisées pour leur utilisation *in vivo*. Les études d'enfilage ont permis de valider la faisabilité de synthétiser des architectures supramoléculaires de type polyrotaxane pour l'imagerie multimodale avec ces CD. En particulier, l'amélioration de l'hydrosolubilité des cyclodextrines fonctionnalisées par des cyanines a mis en avant le composé **CD-Cy5-(SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>** pour son utilisation dans la synthèse de *PPRs* bimodaux pour des tests *in vivo*. Nous aborderons dans le chapitre suivant l'utilisation de ces CD fonctionnalisées pour l'obtention de rotaxanes et *pseudopolyrotaxanes*.

---

**CHAPITRE 2 :**  
**ROTAXANES ET *PSEUDOPOLYROTAXANES* DE**  
**CYCLODEXTRINES POUR L'IMAGERIE MEDICALE**

---



Ce chapitre se décompose en deux parties, la première concerne la synthèse d'architectures [3]rotaxanes fonctionnalisés pour l'IRM et la seconde traite de l'extension des ces rotaxanes à l'échelle polymérique pour l'obtention de *pseudopolyrotaxanes* multimodaux.

## I. [3]Rotaxanes fonctionnalisés pour l'IRM

Le développement d'agents de contraste par la synthèse de nouveaux ligands, assemblages et nanostructures, permet d'améliorer l'efficacité de l'agent paramagnétique et donc le contraste. Le but de son optimisation est d'obtenir un meilleur contraste pour une plus faible quantité de composé injectée. Le cas particulier du DOTA-Gd, agent de contraste commercial le plus utilisé au niveau clinique, est qu'il n'est pas toléré par les patients ayant des insuffisances rénales. Ainsi, son couplage à des macromolécules peut permettre : i) d'accroître ses propriétés d'AC ; ii) de diminuer la dose à injecter ; iii) de permettre une filtration par le foie et non par les reins. Dans cette optique, la synthèse de [3]rotaxanes modèles pour l'IRM a été développée (Figure 2.1).

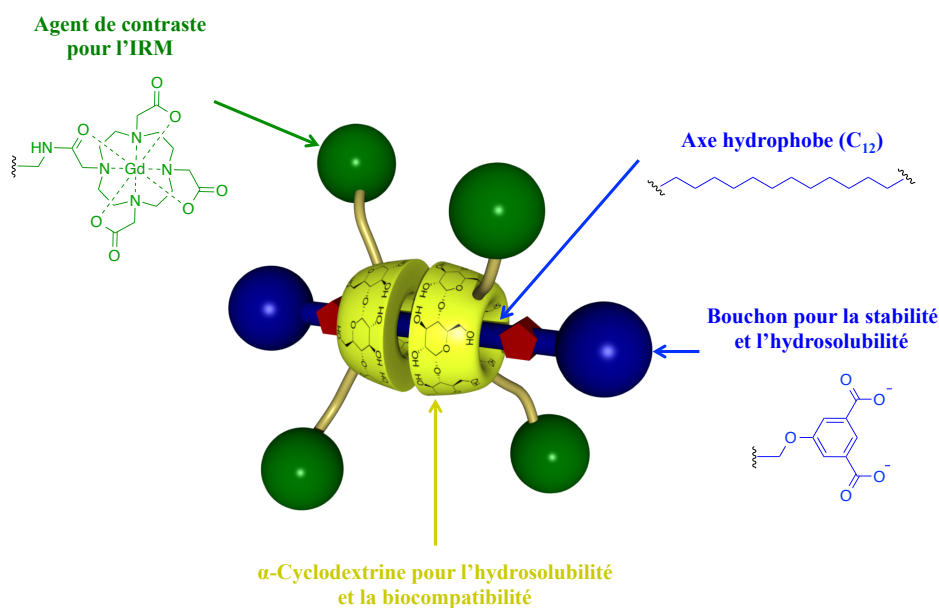


Figure 2.1 : [3]Rotaxane de CDs fonctionnalisées (architecture de la molécule cible pour l'IRM)

Afin d'enfiler les  $\alpha$ -CDs **CDGd (19)** et **CDGd<sub>2</sub> (21)**, nous avons utilisé un axe linéaire pour la synthèse des rotaxanes. Au vu des cinétiques d'enfilage effectuées sur le monomère modèle, le 1,12-diammonium dodécane perméthylé (**24**), il semblait intéressant d'utiliser un axe alcane possédant une douzaine de carbones pour permettre l'enfilage d'au moins une CD avec une constante d'association assez élevée. Pour obtenir un rotaxane stable, nous avons décidé de réaliser leur synthèse par enfilage suivi du bouchonnage.

Depuis 2012, le groupe japonais de Toshikazu Takata a publié la synthèse de [2]-, [3]- et [4]rotaxane d' $\alpha$ -CD.<sup>[109]</sup> Ils sont obtenus par enfilage des CDs natives ou perméthylées sur des axes alcanes bis-amine de 10 à 24 carbones permettant la formation des *pseudo*-rotaxanes suivi, *in situ*, de l'ajout de bouchons de type phényl isocyanate permettant le bouchonnage de l'axe et l'obtention des rotaxanes. D'après la publication de 2014,<sup>[109b]</sup> l'utilisation du 1,12-diaminedodécane semble la plus propice pour la synthèse de [3]rotaxane de CDs natives.

## 1. Synthèse de [3]rotaxanes

### a. [3]Rotaxane modèle

Les premiers tests de synthèse de rotaxanes, réalisés au cours de la thèse de Jean Wilfried Fredy, ont permis de mettre en évidence la possibilité de synthétiser des [3]rotaxanes de CDs natives par l'utilisation d'un axe diazoture dodécane (**66**) pouvant réagir par CuAAC avec un bouchon possédant une fonction alcyne vrai (**67**) (Figure 2.2). L'utilisation de la CuAAC pour l'étape de bouchonnage est inspirée des travaux des groupes de James Fraser Stoddart<sup>[110]</sup> et Sébastien Fort.<sup>[111]</sup> L'axe est mélangé avec deux équivalents de CDs natives (**1**) dans l'eau permettant la formation du complexe d'inclusion par effet hydrophobe, celui-ci se traduit par l'augmentation de la turbidité de la solution. Après quelques minutes, une solution aqueuse contenant le bouchon (2 équivalents), du carbonate de potassium pour solubiliser le bouchon, et les réactifs de CuAAC (Cu(II), PMDETA, ascorbate de sodium) est introduite. La synthèse de rotaxanes courts permet l'introduction de bouchons pouvant jouer un rôle non négligeable sur la solubilité finale du composé. En effet, ce bouchon, suffisamment volumineux pour inhiber le désenfilage des CDs,<sup>[110]</sup> est soluble dans l'eau à pH 10. Après réaction de celui-ci avec les fonctions azoture du *pseudo*-[3]rotaxane de CDs, de l'acide chlorhydrique est introduit pour protoner les acides carboxyliques des bouchons et permettre d'isoler le **[3]Rot-CD (68)** par précipitation et filtration avec un rendement maximal de 30%. Celui-ci est dissout dans le DMSO- $d_6$  pour sa caractérisation par RMN  $^1\text{H}$ , DOSY et TROESY. Le spectre RMN DOSY  $^1\text{H}$  présenté dans la Figure 2.3, permet de montrer que les pics caractéristiques des CDs, de l'axe et des bouchons diffusent tous à la même vitesse (coefficient de diffusion ( $D$ ) de  $1,02 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Le DMSO étant un solvant qui favorise la dissociation des complexes d'inclusion de CD, l'observation d'un même coefficient de diffusion indique que les différents composants appartiennent à la même espèce et qu'un rotaxane a bien été obtenu. De plus, l'intégration du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé

isolé permet de vérifier la présence de deux CD enfilées sur l'axe validant la stœchiométrie des conditions réactionnelles.

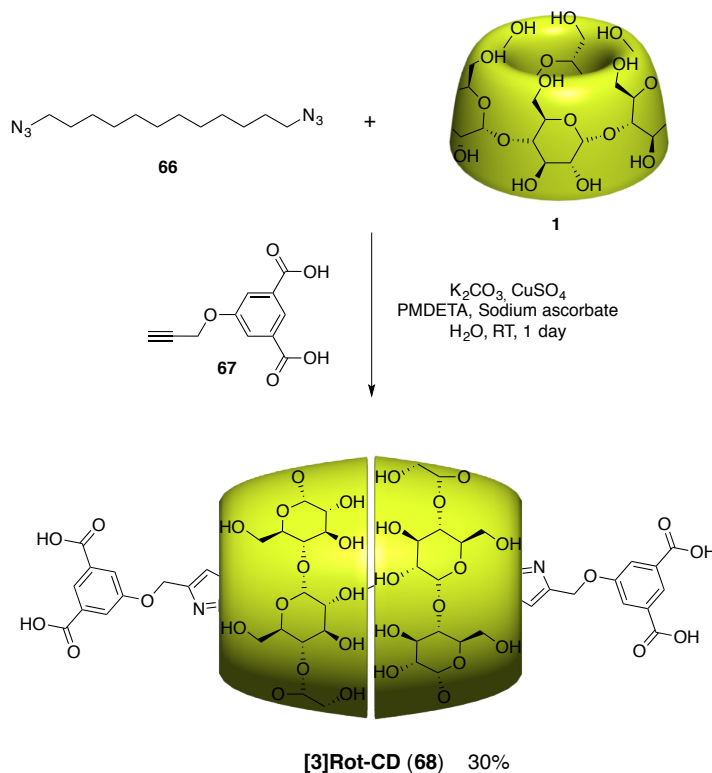


Figure 2.2 : Synthèse du [3]Rot-CD (68)

Afin de déterminer l'arrangement des CD sur l'axe, nous avons réalisé une expérience RMN 2D TROESY (Figure 2.4). Elle permet de mettre en évidence des corrélations entre les protons H<sub>t</sub>, H<sub>o</sub>, et H<sub>s</sub> de l'axe avec le proton H<sup>5</sup> du col primaire de la CD traduisant une proximité spatiale. Elle nous permet de conclure que chaque CD a son col primaire dirigé vers le bouchon. Cette orientation est appuyée par la corrélation entre H<sub>c-f</sub> et H<sup>3</sup> et l'absence de corrélation entre H<sub>b</sub> et H<sup>3</sup>. Cette orientation des cols secondaires face à face est en accord avec les travaux qu'Akira Harada a décrit dans les années 90.<sup>[16a]</sup>

Enfin, le composé **68** a été caractérisé par spectrométrie de masse (ionisation par électronébuliseur - (ESI)) (Annexe 2). Cette caractérisation nous permet de mettre en évidence que la méthode de purification par précipitation, même répétée, ne permet pas de s'affranchir totalement de la présence de CD libres. De plus, deux pics caractéristiques du [2]rotaxane sont visibles ( $z = 1$ ,  $m/z = 1663,59$ ;  $z = 2$ ,  $m/z = 831,29$ ). Néanmoins ni la présence de [2]rotaxane ni celle de cyclodextrine libre n'a été détectée lors des études RMN ce qui est déjà révélateur d'une pureté élevée.



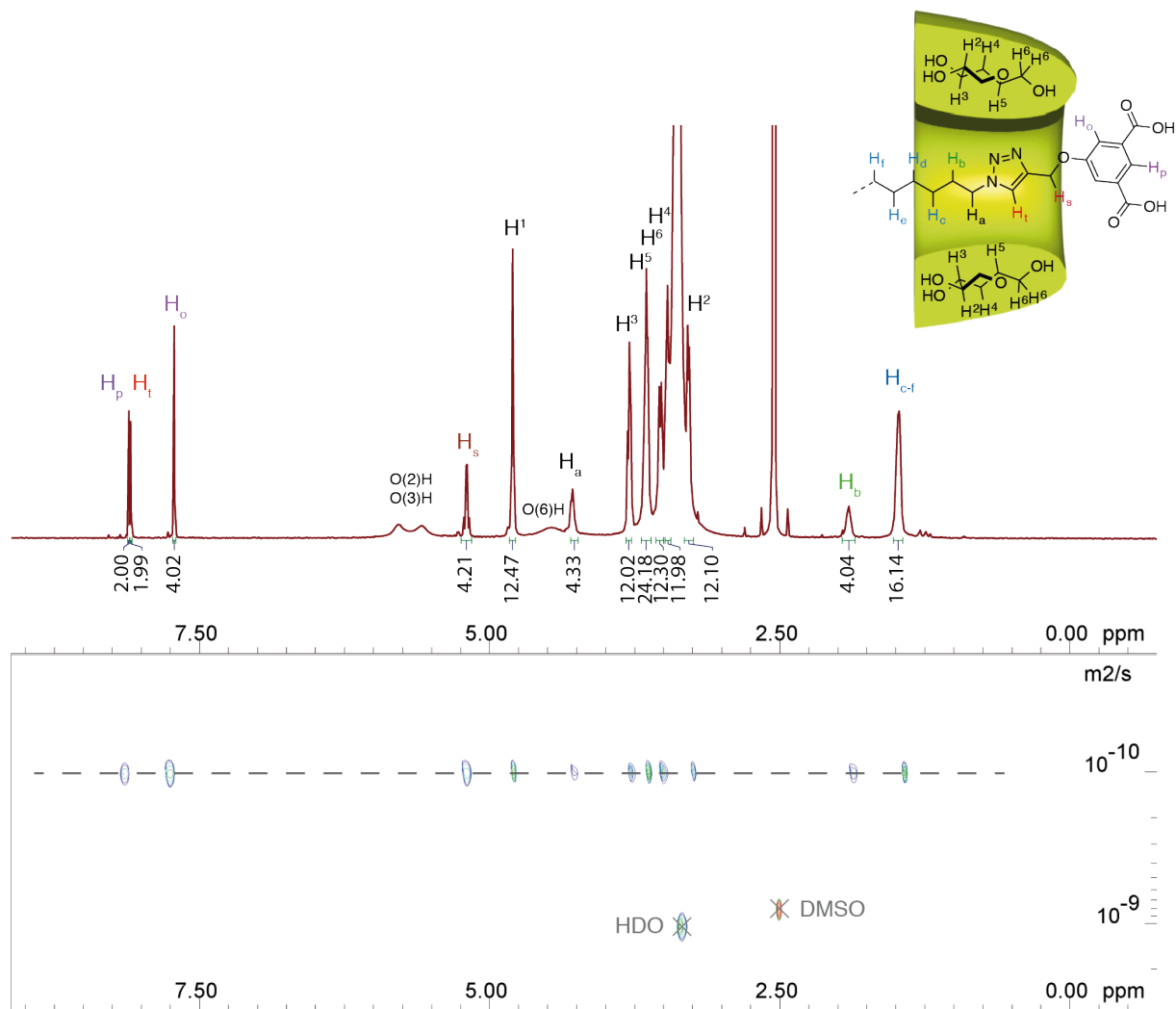


Figure 2.3 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et DOSY (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 K) de **[3]Rot-CD (68)**

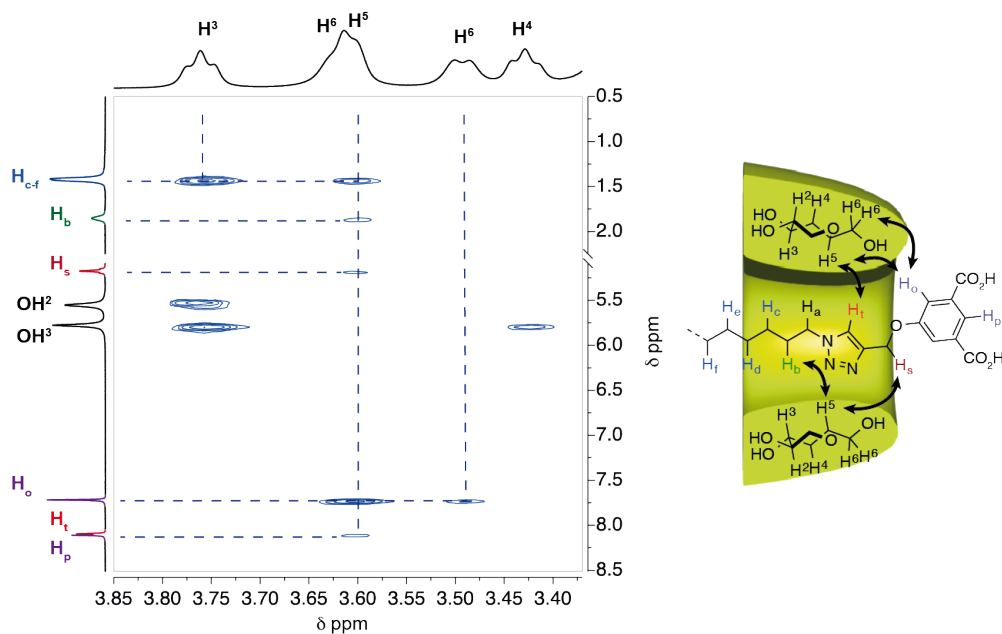


Figure 2.4 : Spectre TROESY (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **[3]Rot-CD (68)**

**b. [3]Rotaxanes fonctionnalisés**

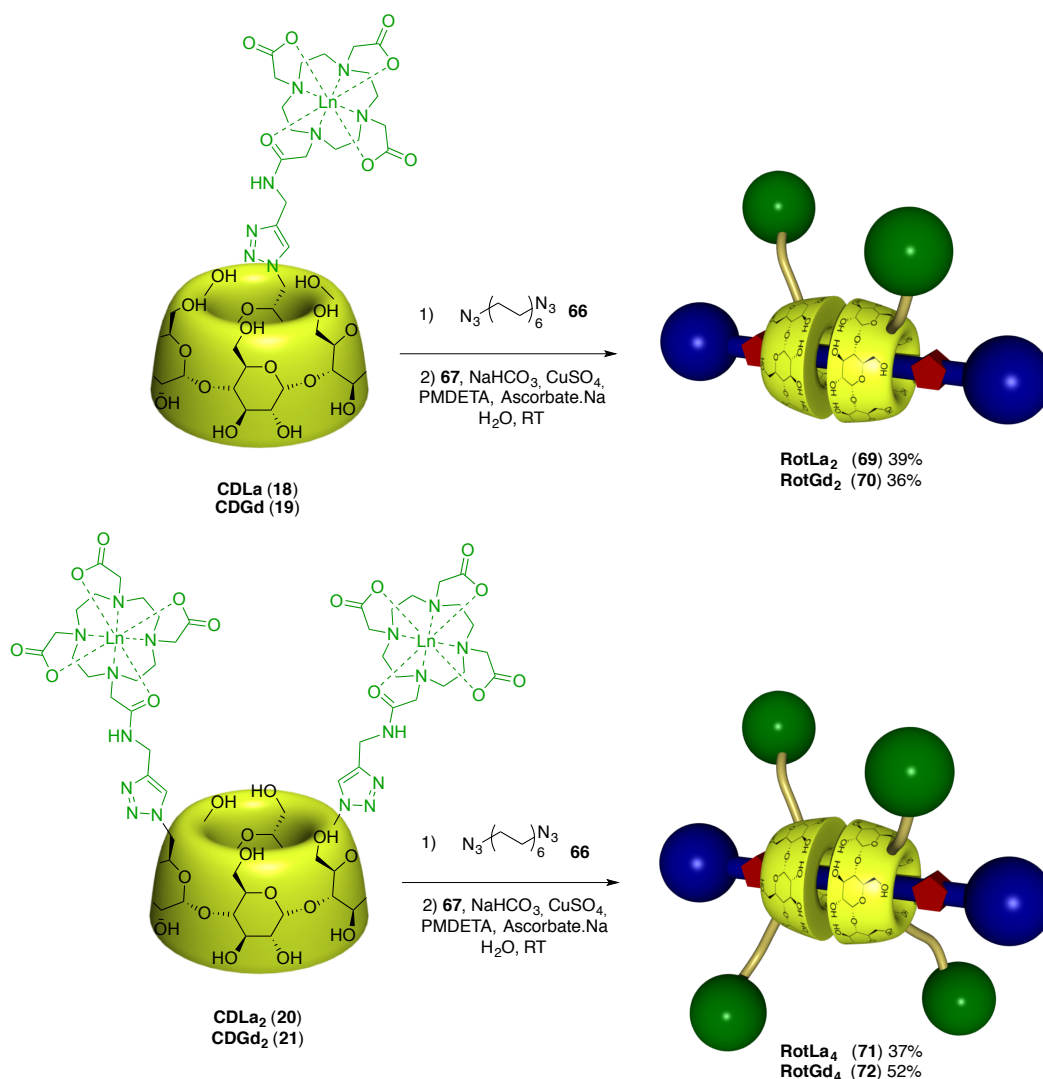


Figure 2.5 : Synthèse des [3]rotaxanes de cyclodextrines mono- et bi-fonctionnalisées

La synthèse des rotaxanes fonctionnalisés a été réalisée en utilisant les mêmes conditions réactionnelles avec **CDLn** (18 et 19) ou **CDLn<sub>2</sub>** (20 et 21). À la différence des rotaxanes de CDs natives, leurs purifications ne peuvent se faire par précipitation en condition acide. En effet, la protonation des acides carboxyliques du ligand MA-DO3A risque d'entraîner le relargage du lanthanide. La méthode de purification initialement envisagée passait par la concentration du mélange réactionnel suivie de l'ajout de méthanol. La solution, alors trouble, était filtrée sur membrane et l'opération de précipitation était répétée jusqu'à 5 fois. Néanmoins, celle-ci conduisait à un produit partiellement purifié avec des rendements inférieurs à 10%. Afin d'optimiser la purification de ces composés, une colonne d'exclusion stérique Sephadex G25 dans l'eau a été utilisée. Couplée à l'analyse de chacune des fractions par spectrométrie de masse, elle a permis de purifier les rotaxanes fonctionnalisés de

l'excédent de CDs libres en solution. Les rotaxanes **RotLn** (**69** et **70**) et **RotLn<sub>2</sub>** (**71** et **72**) ont ainsi été obtenus, purs, avec des rendements de 36 à 52% (Figure 2.5).

### c. Caractérisation des rotaxanes par RMN

Comme pour le [3]rotaxane de CD native (**68**), la caractérisation des rotaxanes fonctionnalisés a été réalisée par une combinaison de techniques RMN sur les analogues Lanthane. Ces rotaxanes étant solubles dans l'eau à pH neutre grâce à la présence des groupements carboxylate, les études RMN ont été menées dans D<sub>2</sub>O. Les analyses RMN DOSY <sup>1</sup>H (Figure 2.6 ; Annexe 3) permettent ainsi de confirmer que les différentes unités (CDs fonctionnalisées, axe et bouchons) sont bien imbriquées entre elles avec un même coefficient de diffusion pour les différents composants. La détermination des coefficients de diffusion de **RotLa<sub>2</sub>** (**69**) et **RotLa<sub>4</sub>** (**71**) donne des valeurs de 2,20 et 1,92 x10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup> respectivement.

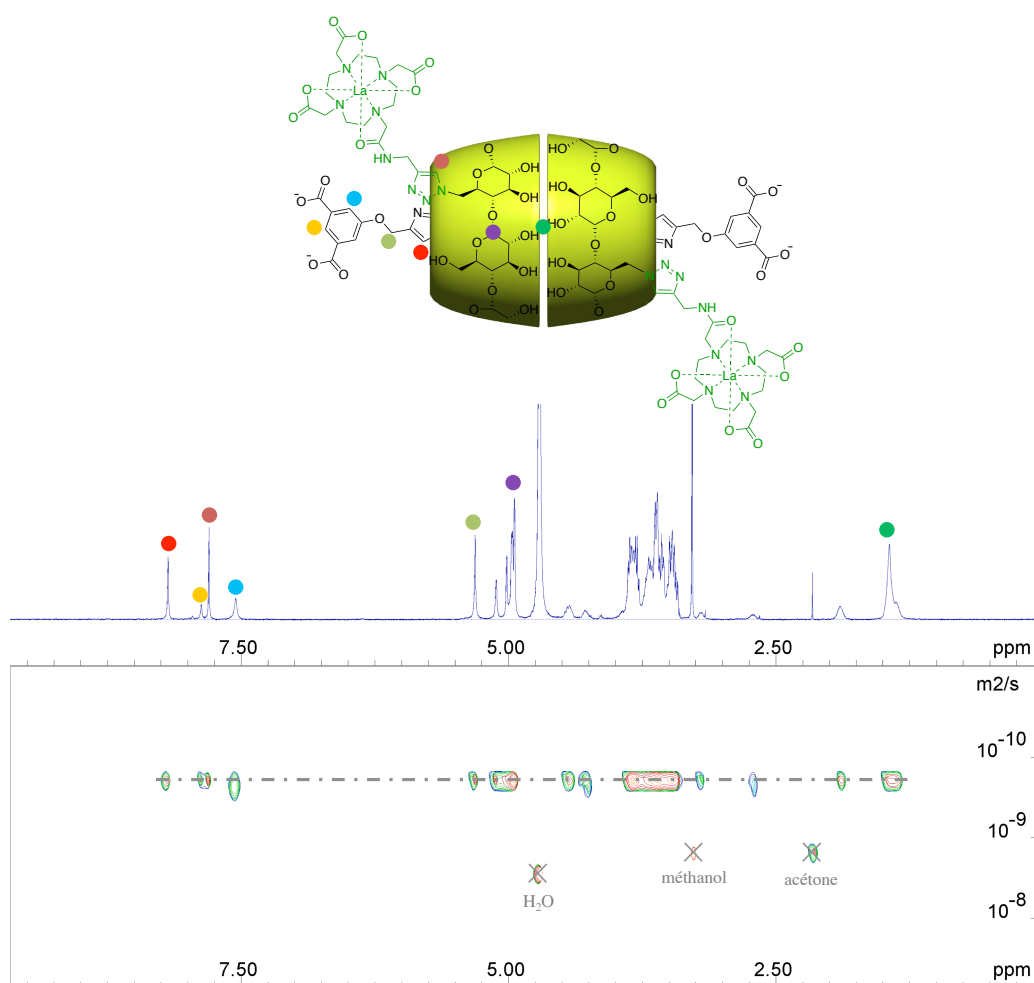


Figure 2.6 : Spectre DOSY (600 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K) de **RotLa<sub>2</sub>** (**69**)

L'orientation des  $\alpha$ -CDs de **[3]Rot-CD (68)** étant compatible avec la présence de groupements fonctionnels sur la couronne primaire, on peut imaginer que les CDs **CDLa (18)** et **CDLa<sub>2</sub> (71)** s'arrangeront de même. La caractérisation de **RotLa<sub>2</sub>** et **RotLa<sub>4</sub>** par RMN 2D TROESY, a permis de valider cette hypothèse avec la présence d'une corrélation entre le proton du triazole H<sub>t</sub> et H<sup>5</sup> (Figure 2.7 ; Annexe 4).

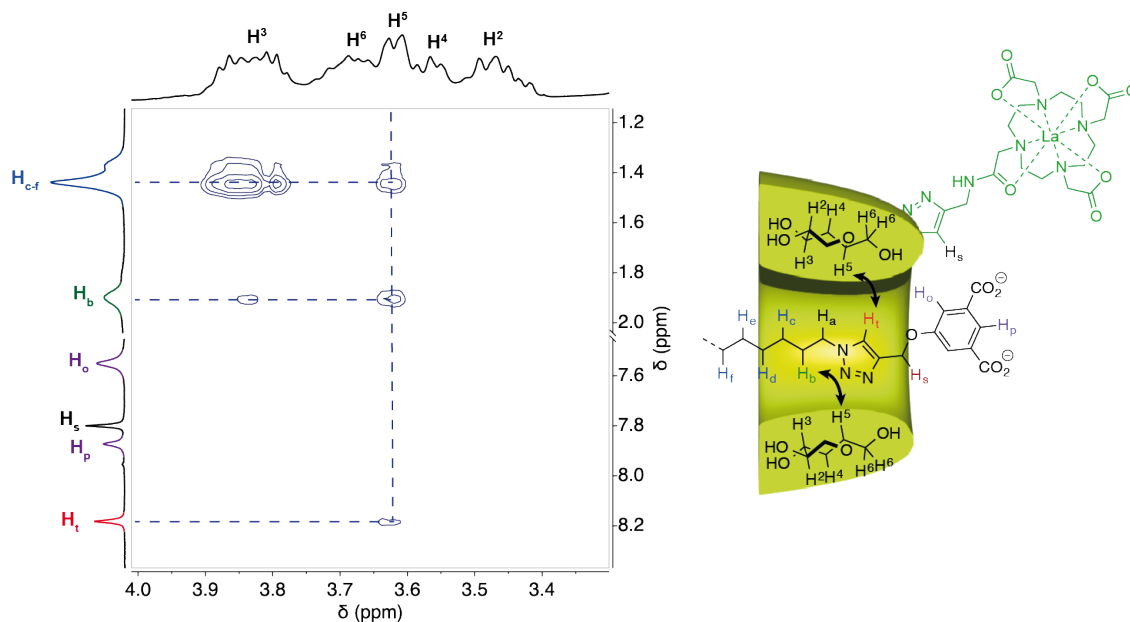


Figure 2.7 : Spectre TROESY (600 MHz, D<sub>2</sub>O) de **RotLa<sub>2</sub> (69)**

#### d. Caractérisation des rotaxanes par spectrométrie de masse

Les études RMN des composés **RotLa<sub>2</sub>** et **RotLa<sub>4</sub>** ont permis de valider le maintien de l'arrangement tête à tête des CDs fonctionnalisées sur le rotaxane et nous permettent de juger d'une certaine pureté. Si on peut admettre que pour les analogues au gadolinium, l'orientation est similaire, il faut s'assurer de leur pureté pour une future utilisation comme agent de contraste. Ainsi, leurs caractérisations par spectrométrie de masse ont été réalisées. L'analyse du brut réactionnel de **RotGd<sub>2</sub>** (Figure 2.8) après une nuit permet d'observer les pics caractéristiques des [3]rotaxanes mais aussi, moins intenses, ceux des [2]rotaxanes et **CDGd** libres. Après deux passages sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique, les pics caractéristiques de la CD libre et du [2]rotaxane observés sont nettement atténués indiquant l'efficacité de cette méthode de purification. De même, le spectre de masse après purification de **RotGd<sub>4</sub>** présenté sur la Figure 2.9 montre l'absence de **CDGd<sub>2</sub>** libre ou de [2]rotaxane. On peut observer sur les spectres de masse enregistrés en mode négatif la présence des états de charge 2-, 3- et 4- à 1938,57 ; 1292,05 et 968,80 m/z du [3]rotaxanes de **CDGd** et 3- (1706,14

m/z), 4- (1279,36 m/z) et 5- (1023,09 m/z) du [3]rotaxanes de **CDGd<sub>2</sub>**, chacun présentant une distribution de contre-ions sodium dont les attributions sont détaillées sur les Figure 2.8 et Figure 2.9.

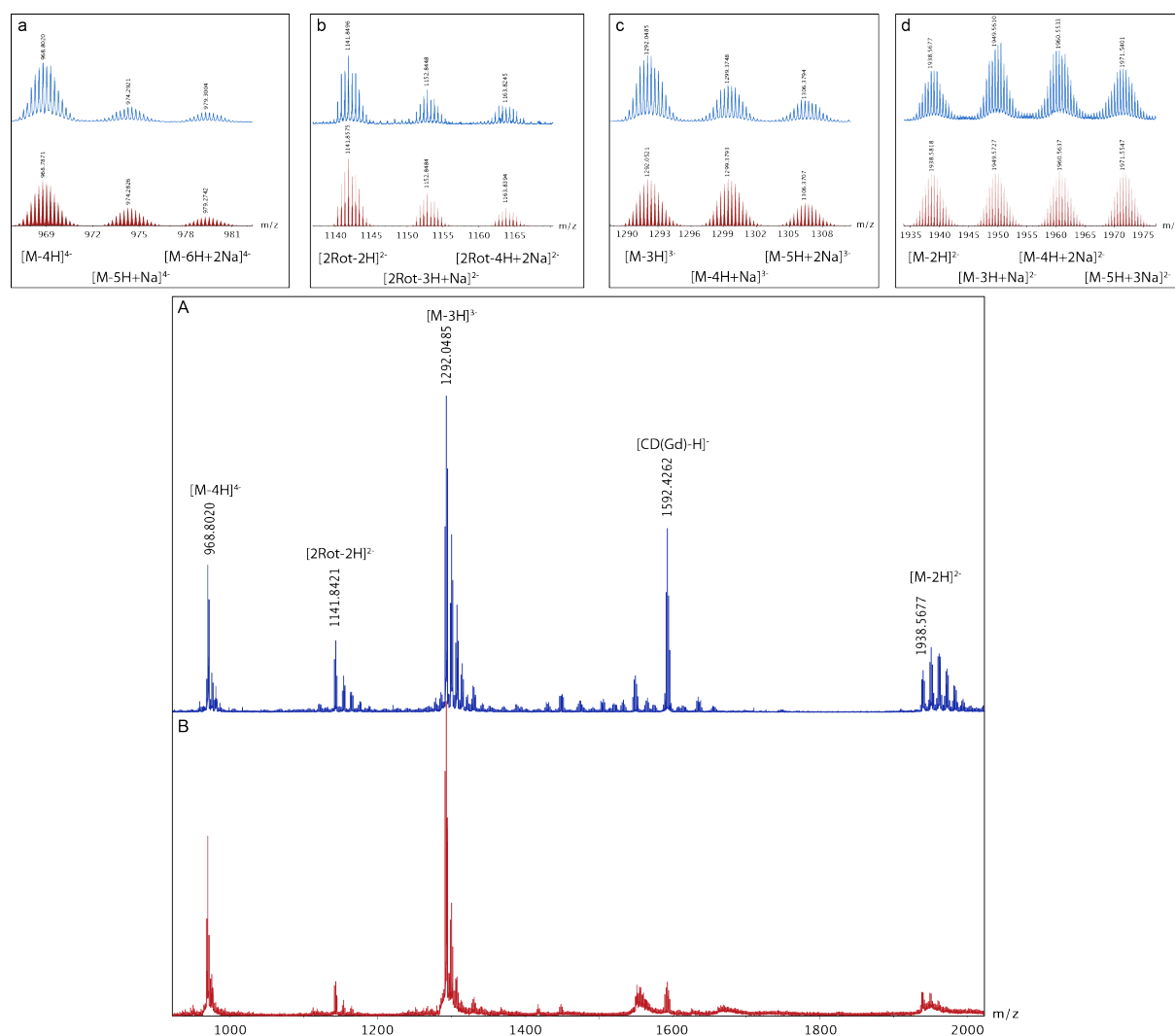


Figure 2.8 : Spectres de masse haute résolution (ESI, Négatif) de **RotGd<sub>2</sub>** (70) avant purification par chromatographie d'exclusion stérique (A) et après (B). Spectres d'attribution des pics caractéristiques de **RotGd<sub>2</sub>** (z = 4 (a) ; 3 (c) ; 2 (d) et [2]Rot-CDGd (z = 2 ; (b) présents dans le brut réactionnel. M = C<sub>144</sub>H<sub>214</sub>Gd<sub>2</sub>N<sub>22</sub>O<sub>82</sub> ; acides carboxyliques des bouchons protonés, molécule d'eau sur le Gd non comptabilisée. Spectre observé en bleu, calculé en rouge.

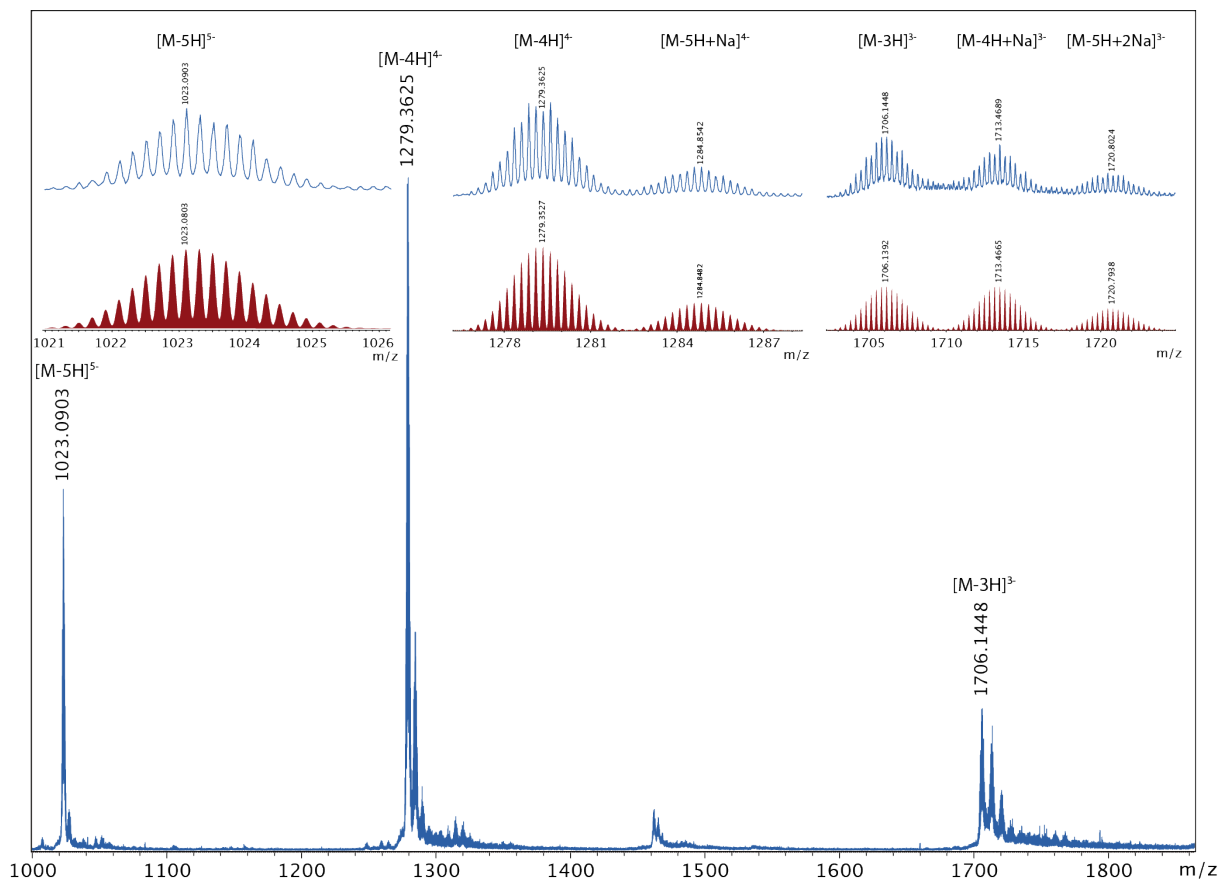


Figure 2.9 : Spectre de masse haute résolution (ESI, Négatif) de **RotGd<sub>4</sub> (72)** après purification par chromatographie d'exclusion stérique.  $M = C_{182}H_{268}Gd_4N_{38}O_{94}$  ; acides carboxyliques des bouchons protonés, molécule d'eau sur le Gd non comptabilisée. Spectre observé en bleu, calculé en rouge.

## 2. Études des propriétés d'imagerie des agents de contraste

### a. Étude *in vitro*

Les rotaxanes fonctionnalisés par des complexes de gadolinium (**70** et **72**) ont ensuite pu être caractérisés par relaxométrie en collaboration avec la Dr. Célia Bonnet et la Dr. Eva Toth au Centre Biophysique Moléculaire d'Orléans. Les profils NMRD présentés sur la Figure 2.10 mettent en avant des relaxivités à 37°C augmentées d'un facteur 1,8 lorsque les CDs sont sur la structure [3]rotaxane par rapport aux mêmes CDs libres (1,5 à 25°C ; Tableau 2.1). Cette observation est en accord avec une augmentation du temps de corrélation rotationnelle due à l'augmentation de la taille de l'agent de contraste par la formation de la structure supramoléculaire. De plus, on constate un rehaussement particulier autour de 60 MHz comme présenté dans le chapitre 1 dans le cas d'agents de contraste greffés à des macromolécules. Cela signifie que la structure [3]rotaxane permet de réduire les degrés de

liberté de l'agent de contraste et sa vitesse de rotation. Cet effet est d'autant plus marqué pour **RotGd<sub>4</sub>** (72) (Tableau 2.1 ; 37°C) avec le gain d'un facteur 5 sur la relaxivité longitudinale par rapport au DOTA-Gd libre grâce à sa fixation sur la structure [3]rotaxane. Le temps de corrélation rotationnelle étant proportionnel au volume hydrodynamique, en approximant les rotaxanes à des sphères, on peut utiliser le coefficient de diffusion pour connaître le rapport entre les temps de corrélation rotationnelle des deux rotaxanes (Équation 2.1). Si on prend comme valeurs de coefficient de diffusion celles des rotaxanes de lanthane, on obtient  $\tau_R(\mathbf{RotGd}_4) \approx 1,5 \times \tau_R(\mathbf{RotGd}_2)$  à 25°C.

$$\tau_R \propto \frac{1}{D^3} \quad \text{Équation 2.1}$$

Il est intéressant de comparer les profils NMRD à différentes températures pour juger des contributions influençant le plus la relaxivité (Figure 2.11 ; Tableau 2.1).

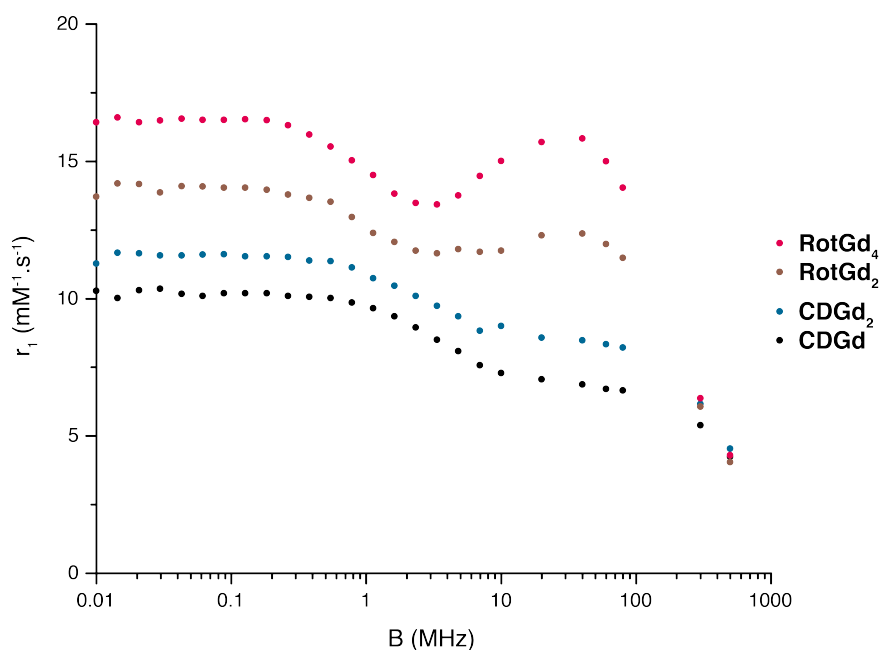
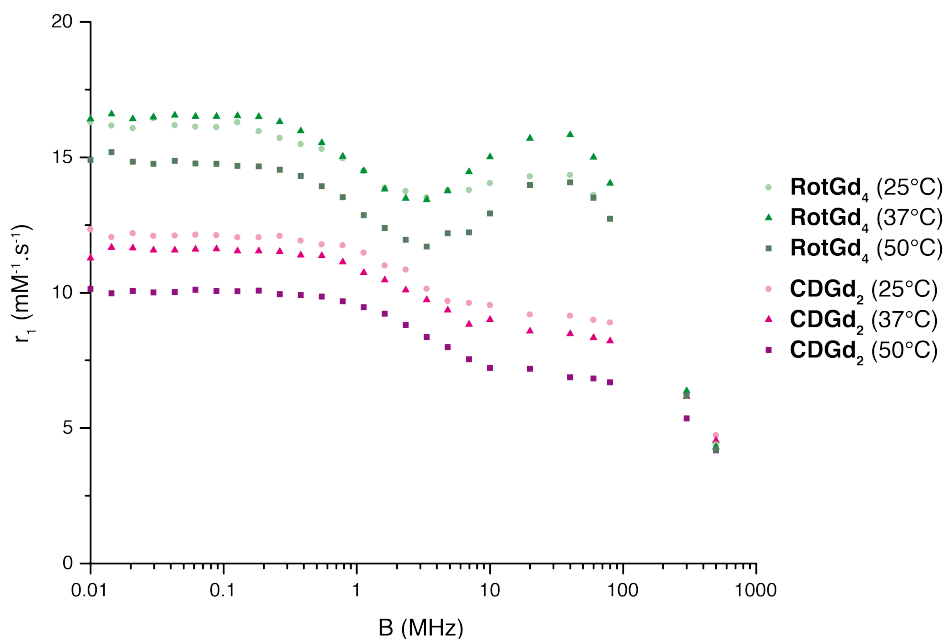


Figure 2.10 : Profils NMRD des **RotLn<sub>x</sub>** (70 et 72) comparés aux CDs fonctionnalisés (19 et 21) mesurés à 37°C.

Tableau 2.1 : Relaxivité longitudinale ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) à 60 MHz mesurée à 25, 37 et 50°C

	DOTA-Gd	CDGd	CDGd <sub>2</sub>	RotGd <sub>2</sub>	RotGd <sub>4</sub>
$r_1$ à 25°C	4,2	7,6	9,0	11,5	13,6
$r_1$ à 37°C	3,0	6,7	8,3	12,0	15,0
$r_1$ à 50°C			6,8		13,5

Figure 2.11 : Profils NMRD de **CDGd<sub>2</sub>** (**21**) et **RotGd<sub>4</sub>** (**72**) à 25, 37 et 50°C

Sur la Figure 2.11 et le Tableau 2.1, on peut remarquer que lorsqu'on augmente la température de 25°C à 50°C, la relaxivité de **CDGd<sub>2</sub>** ne fait que diminuer dans la gamme de fréquence de 10 à 100 MHz. Ce n'est pas le cas pour le composé **RotGd<sub>4</sub>** qui voit sa relaxivité augmenter à 37°C, puis diminuer lorsque la température s'élève à 50°C. Ces deux comportements permettent de conclure que dans le cas de la **CDGd<sub>2</sub>**, l'augmentation de la température contribue principalement à augmenter la vitesse de rotation de l'agent de contraste, ce qui a pour effet de diminuer la relaxivité longitudinale. Dans le cas de **RotGd<sub>4</sub>**, la mesure à 37°C confirme qu'une légère augmentation de température favorise plus l'augmentation de la vitesse d'échange des molécules d'eau coordonnées au gadolinium que l'augmentation de la vitesse de rotation de l'AC. Néanmoins, à plus haute température (50°C), l'effet bénéfique de la vitesse d'échange est contré par la diminution du temps de corrélation rotationnelle. Les propriétés relaxométriques de ces composés sont très intéressantes pour l'étude *in vivo* car elles sont optimales à la température corporelle.

### b. Étude en imagerie *in vivo*

Les études *in vivo* effectuées sur les rotaxanes ont été réalisées en collaboration avec la Dr. Bich-Thuy Doan et le Dr. Grégory Ramniceanu, spécialisés dans l'imagerie du petit animal, sur la plateforme d'imagerie *in vivo* IRM à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris.



### i. Évaluation de la cytotoxicité

Avant toute étude *in vivo* utilisant des agents d'imagerie, il est nécessaire de réaliser des études de biocompatibilité et non toxicité *in vitro*. La toxicité des rotaxanes nouvellement obtenus a été évaluée, au niveau cellulaire dans un premier temps, sur une lignée de cellules hépatiques (BWGT3) (Figure 2.12). La détermination de l'IC<sub>50</sub> de **RotGd<sub>2</sub>** révèle une toxicité relativement faible, de 0,48 mM. Le test de viabilité cellulaire avec **RotGd<sub>4</sub>** a été effectué jusqu'à une concentration en rotaxane de 5 mM, la concentration haute maximale prévue *in vivo*, sans que les 50% de viabilité soient atteints (b). Il ne permet donc pas de déterminer la valeur de l'IC<sub>50</sub> mais indique seulement une valeur supérieure à 5mM. Le composé **RotGd<sub>4</sub>** semble donc moins cytotoxique que son équivalent mono-fonctionnalisé (sur cette lign e cellulaire). Ce résultat permet de révéler une cytotoxicité relativement faible et permet de passer à l'étape suivante de biodistribution *in vivo*.

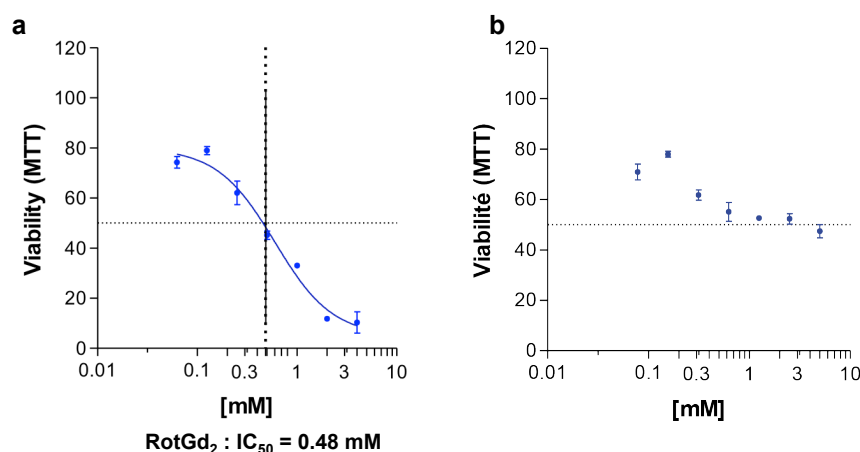


Figure 2.12 : Viabilité cellulaire (BWGT3) en fonction de la concentration en **RotGd<sub>2</sub>** (a) et **RotGd<sub>4</sub>** (b). Détermination possible de l'IC<sub>50</sub> de **RotGd<sub>2</sub>** (0,48 mM).

### ii. Biodistribution par imagerie chez la souris

Le rôle d'un agent d'imagerie est de pouvoir effectuer ou améliorer le diagnostic de pathologies *in vivo*. Le cahier des charges d'un tel agent efficace repose sur sa biocompatibilité, sa sensibilité et sa capacité à être distribué dans l'organisme vivant entier afin d'atteindre la lésion cible à diagnostiquer. L'étude *in vivo* par imagerie de chacun des rotaxanes permet d'étudier sa biodistribution dans les différents organes du corps et de vérifier sa non toxicité apparente finale. Le temps de vie du composé dans le sang ainsi que son accumulation ou sa filtration par différents organes et son élimination sont des caractéristiques à prendre en compte en fonction de la pathologie à diagnostiquer.

Les études de biodistribution se réalisent sur souris saines avant de passer aux souris pathologiques. Sur la plateforme d'imagerie IRM Paris Descartes/ENSCP, un protocole de biodistribution dynamique a été utilisé : l'injection des composés est réalisée à une concentration de 10 mM en gadolinium (100  $\mu$ L dans du liquide physiologique, pH physiologique vérifié) par voie intraveineuse après la pose d'un cathéter dans la queue de la souris anesthésiée. Six souris par agents de contraste ont été utilisées pour moyenniser les résultats (protocole éthique Paris Descartes, Saisine CEEA34.JS.142.1). Les acquisitions IRM sont réalisées sur un spectromètre micro IRM 7 T (Bruker, 300 MHz) et permettent l'observation de coupes d'imagerie de souris localisées sur les reins, la rate ou le foie (Figure 2.13). Les relaxivités longitudinales de **RotGd<sub>2</sub>** et **RotGd<sub>4</sub>** à 300 MHz (7 T) et 37 °C sont respectivement de 6.1 et 6.4 mM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>.

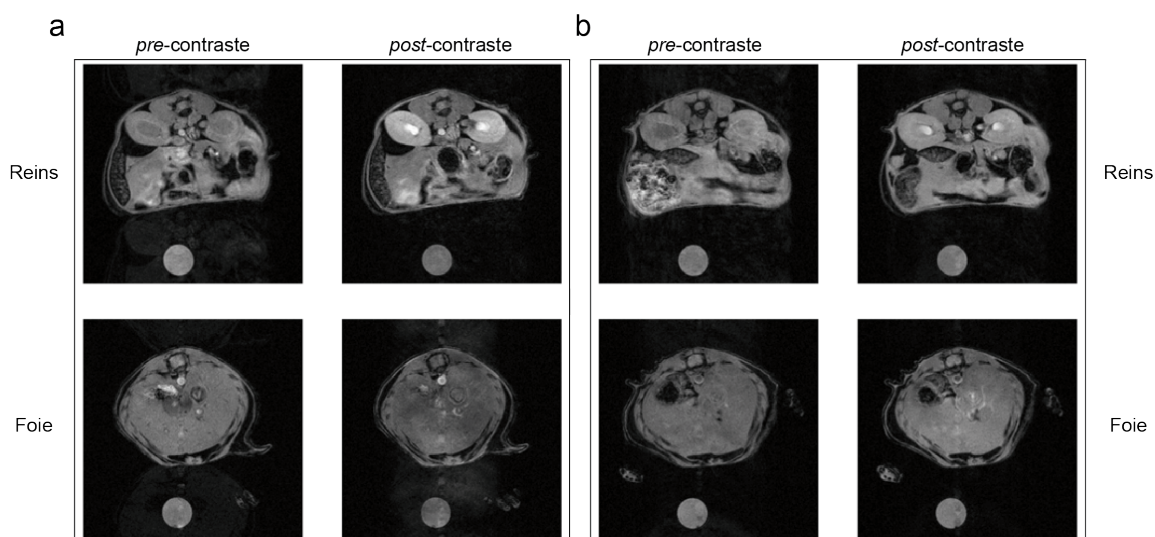


Figure 2.13 : IRM *in vivo* de souris avant et 40 minutes après injection de **RotGd<sub>2</sub>** (a) et **RotGd<sub>4</sub>** 10 mM en Gd (b).

Sur les clichés IRM des reins *pre* et *post*-contraste (40 minutes après l'injection) de la Figure 2.13, on peut, visuellement, observer la présence d'agent de contraste dans les reins 40 minutes après injection, et plus particulièrement, dans la partie interne du rein (la médullaire) avec une augmentation de contraste plus marquée dans le cas de **RotGd<sub>2</sub>**. Cependant, on n'observe pas de rehaussement dans la rate, ni dans le muscle. Sur les clichés de la section permettant de visualiser le foie, on n'observe pas de rehaussement de contraste particulier. Ainsi, on peut en conclure que le composé ne semble pas s'accumuler dans le foie. Afin d'analyser plus en détails, le temps de vie du composé dans le sang et ses voies d'excrétion, nous avons réalisé un suivi de la présence d'agent de contraste dans le foie et les reins au cours du temps après injection en mesurant sur les images le rehaussement du signal IRM.

Ces suivis permettent de tracer les cinétiques de rehaussement du signal IRM (Équation 2.2 ; Figure 2.14) :

$$\text{Rehaussement (\%)} = \left( \frac{I_1(t)}{I_1(t_0)} - 1 \right) \times 100 \quad \text{Équation 2.2}$$

$I_1(t)$  : intensité IRM au temps  $t$

$I_1(t_0)$  : intensité IRM juste avant l'injection de l'AC

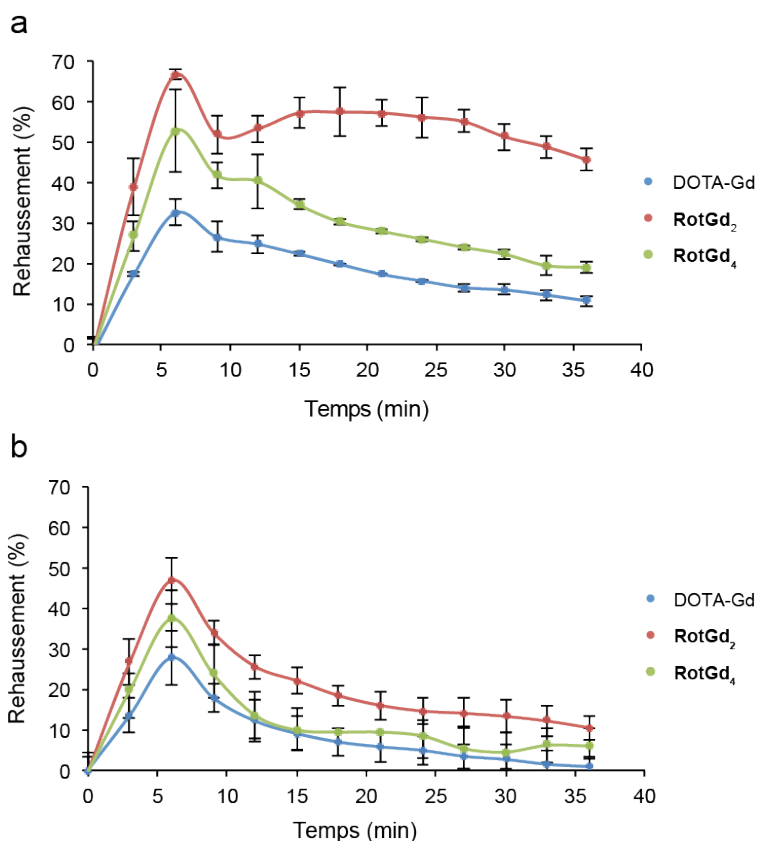


Figure 2.14 : Cinétiques de rehaussement du signal IRM dans les reins (a) et dans le foie (b) après injection de l'agent de contraste (DOTA-Gd, **70** ou **72**).

On peut remarquer sur la Figure 2.14 qu'il suffit de 6 minutes pour que l'agent de contraste produise son plus fort rehaussement de signal dans les reins et le foie. Dans le foie, les rotaxanes se comportent de façon similaire au DOTA-Gd et le rehaussement de signal indique qu'ils y sont respectivement moins accumulés que dans les reins. Ils en sont de plus rapidement excrétés. 40 minutes après l'injection, le niveau de rehaussement de DOTA-Gd et **RotGd<sub>4</sub>** est revenu à leur valeur pre-contraste, tandis que 10% de rehaussement persiste pour **RotGd<sub>2</sub>**. On estime la concentration résiduelle en **RotGd<sub>4</sub>** et **RotGd<sub>2</sub>** dans le foie 40 minutes après l'injection à 0,02 et 0,03 mM respectivement (Annexe 5). Dans les reins, le comportement de **RotGd<sub>4</sub>** n'est pas si différent du DOTA-Gd si ce n'est qu'il présente un

meilleur rehaussement. **RotGd<sub>2</sub>** quant à lui permet un rehaussement à 6 minutes deux fois plus important que l'agent commercial (DOTA-Gd). Son comportement après 6 minutes diffère particulièrement par rapport à **RotGd<sub>4</sub>** et DOTA-Gd. En effet, 21 minutes après l'injection, le rehaussement du signal IRM dans les reins est de 57% avec **RotGd<sub>2</sub>**, 28% avec **RotGd<sub>4</sub>**, et 17% avec le DOTA-Gd. L'excrétion de **RotGd<sub>2</sub>** par le rein est beaucoup plus lente que celle du foie. Après 40 minutes, le rehaussement dans le rein est toujours de 46% pour **RotGd<sub>2</sub>**, tandis qu'il est redescendu à 19 et 11% pour **RotGd<sub>4</sub>** et DOTA-Gd respectivement.

Les structures [3]rotaxanes ont permis d'obtenir des relaxivités plus élevées des agents de contraste de part leur effet sur le temps de corrélation rotationnelle. De façon intéressante, les meilleures valeurs de relaxivité ont été obtenues à 37°C et attribuées à une augmentation de la vitesse d'échange des molécules d'eau coordonnées au Gd. Ces structures, si elles ont des propriétés de relaxométrie similaires à celles des macromolécules par l'augmentation du temps de corrélation rotationnelle de l'agent de contraste, ne sont pas excrétées de la même manière. De façon générale, les agents de contraste sont éliminés, soit par le foie (clairance hépatique), soit par les reins (clairance rénale) selon leur taille. Le foie permettra la dégradation du composé de taille supérieure à 6 nm environ dans la bile d'une part, et les reins, après filtration des composés de taille inférieure à environ 6 nm, relargueront dans la vessie le produit pour qu'il soit évacué dans les urines.<sup>[112]</sup> Les [3]rotaxanes (3 nm de diamètre maximum) sont donc majoritairement excrétés par les reins mais leur filtration y est lente. Cela conduit à un effet d'accumulation et à un relargage relativement lent, surtout dans le cas de **RotGd<sub>2</sub>**. S'il peut être intéressant de soulager le travail des reins pour les patients atteints de fibrose rénale et donc de s'orienter vers une clairance hépatique, le temps de demi vie élevé de **RotGd<sub>2</sub>** dans le plasma et les reins peut aussi être utile pour la détection d'insuffisance rénale. En effet, la détection d'un rein déficient peut se faire par IRM en comparant les vitesses de filtration et de relargage d'un AC. Si l'AC est trop vite excrété, comme c'est le cas du DOTA-Gd, le constat d'une anomalie est plus difficile que si l'observation d'un signal IRM est possible sur une longue période.

### 3. Conclusion

La synthèse de quatre rotaxanes de cyclodextrines fonctionnalisées par des complexes de lanthanides a pu être réalisée. Leurs préparations se faisant par auto-assemblage et réaction

de CuAAC *in situ*, la structure rotaxane est obtenue en une seule étape avec des rendements s'élevant entre 36 et 52% pour la combinaison des 5 composants. Les propriétés relaxométriques amplifiées grâce à l'architecture supramoléculaire et les résultats positifs de l'étude par imagerie IRM *in vivo* apportent la preuve que notre approche simple et modulaire pour la synthèse de rotaxanes pour l'imagerie médicale est prometteuse. La bibliothèque de CDs fonctionnalisées permettant la combinaison de sondes fluorescentes et d'agents de contraste, nous nous sommes tournés vers la synthèse de PPR de CDs pour l'imagerie bimodale.

## II. *Pseudopolyrotaxanes* fonctionnalisés pour l'imagerie multimodale

Les études d'enfilage des CDs fonctionnalisées réalisées sur le monomère modèle (**24**) ont permis de mettre en évidence des constantes d'association de  $10^3$  à  $10^4$ . Celles-ci sont encourageantes pour l'enfilage des CDs sur le polymère, de type polyammonium perméthylé, choisi comme colonne vertébrale pour la synthèse des PPRs. Les premiers tests *in vivo* des PPRs étant antérieurs à l'obtention des CD-cyanines, la **CD-BODIPY (22)** a été utilisée comme fluorophore pour la synthèse des agents bimodaux. Intéressons-nous tout d'abord à la synthèse du polymère.

### 1. Synthèse des PPRs de CDs fonctionnalisées

#### a. Synthèse de l'axe polymérique

La synthèse de ce polymère a été adaptée d'une publication de Gerhard Wenz.<sup>[113]</sup> Elle commence par la réduction des amides du Nylon 11 commercial (**73**) par action du borane diméthyle sulfure. Les amines sont ensuite méthylées par l'iodométhane en excès. Un traitement par une solution d'acide chlorhydrique ou par colonne échangeuse d'ions permet de remplacer les contre-ions iodure en chlorure, permettant une meilleure solubilité du polymère **75** en solution aqueuse (Figure 2.15).

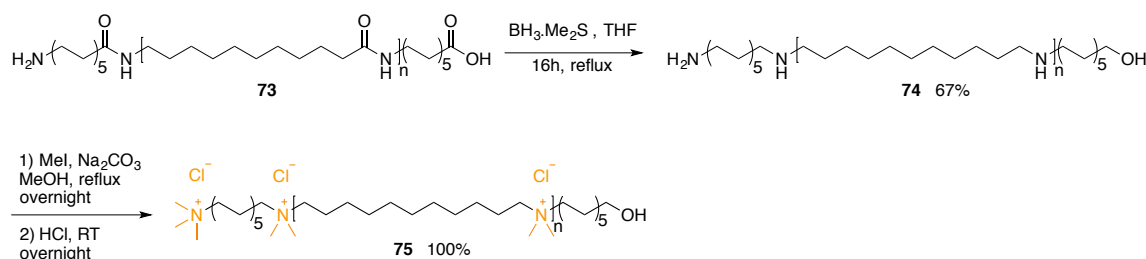


Figure 2.15 : Synthèse du polyammonium perméthylé (**75**)

### b. Synthèse des *pseudopolyrotaxanes*

Les travaux antérieurs de Gerhard Wenz<sup>[17b]</sup> ainsi que la thèse de Jean Wilfried Frey décrivent le comportement du polymère en solution aqueuse en présence d' $\alpha$ -CDs. Si à température ambiante l'enfilage de la cyclodextrine est très lent, le chauffage de la solution entre 50 et 80°C permet la formation du *PPR*. Ainsi, après 20 jours à 60°C, le polymère (en présence d'un équivalent de CD par motif monomérique) est recouvert à 50%. Ce recouvrement est déterminé par RMN  $^1\text{H}$  par l'intégration des protons anomériques des CDs enfilées. Le *PPR* peut être purifié par dialyse ou par ultrafiltration sur membrane pour retirer l'excédent de CDs libres. Le protocole de synthèse et de purification des *PPRs* a été mis en place et a permis l'enfilage des CDs fonctionnalisées pour l'obtention d'une famille de *PPRs* mono- ou bi-modaux (Figure 2.16 ; Tableau 2.2).

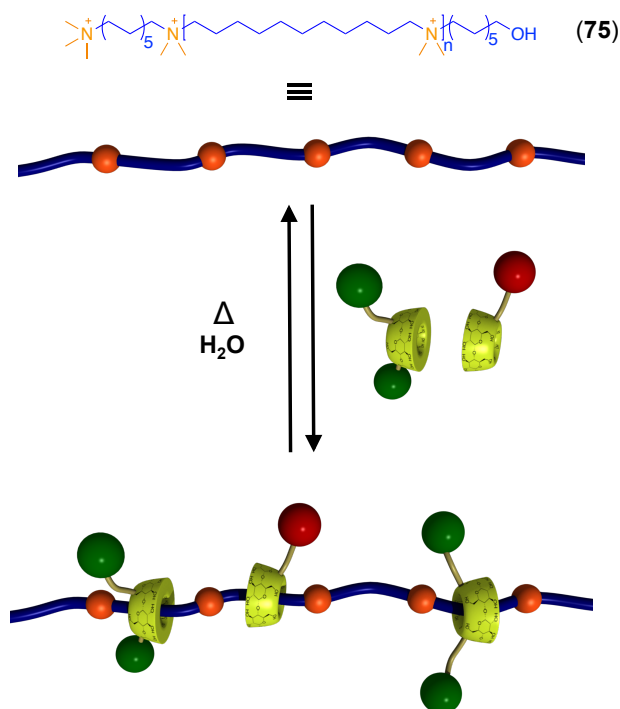


Figure 2.16 : Voie de synthèse des *PPRs* par auto-assemblage

Toutes les synthèses ont été réalisées en mélange stœchiométrique entre les CDs et les motifs monomériques, néanmoins, les conditions réactionnelles (température et temps de réaction) ont été optimisées en fonction des *PPRs*. Le *PPR-CD* (76) a été obtenu par chauffage pendant 20 jours à 60°C, ou à 80°C pendant 3 jours et demi pour donner le même taux d'enfilage de 50%. Un chauffage à 80°C sur une durée supérieure à 5 jours conduit à des rendements d'enfilage de 76%. L'enfilage des CDs mono- et bis-azoture à 80°C, pendant 13

et 14 jours respectivement, s'est révélé lui aussi très efficace avec un recouvrement d'environ 74%. L'affinité de la CD fonctionnalisée par une ou deux fonctions azotures pour l'axe polymérique ne semble donc pas diminuer. Ces *PPRs* sont intéressants par leurs fonctions azoture encore réactives qui pourront être utilisées pour des tests de *post*-fonctionnalisation par CuAAC. Les CD fonctionnalisés pour l'imagerie ont d'abord été enfilés seuls pour vérifier leur affinité pour l'axe polymérique. Des pourcentages de recouvrement du polymère de 20 à 25% ont pu être obtenus. Pour la synthèse des *PPRs* bimodaux, la CD(Ln)<sub>x</sub> a toujours été enfilée en première pendant quelques jours à 80°C avant de diminuer la température à 60°C pour l'enfilage de **CD-BODIPY** (moins stable). La préparation de *PPR9* et *PPR9'* s'est faite respectivement par l'introduction de **CD-BODIPY** et **CDLa** en proportions stœchiométriques ou en mélange 1:4. Ces deux CD ayant des constantes d'association proches (sur le monomère modèle), l'ajustement des proportions de CD initialement introduites permet le contrôle de la composition finale. Les taux d'enfilage de *PPR6*, *PPR7* et *PPR10* sont déduits par analogie aux équivalents Lanthane synthétisés dans les mêmes conditions. Celui de *PPR11* est déterminé par un dosage de la quantité de Gd par ICP (*Inductively Coupled Plasma*) et son rendement massique. Nous sommes donc parvenu à synthétiser quatre *PPRs* avec des agents de contraste IRM, dont deux sont bimodaux et peuvent être utilisés en microscopie de fluorescence.

Tableau 2.2 : Composition des *PPRs* en pourcentage de recouvrement en CD. Les *PPRs* grisés ont été synthétisés par Jean Wilfried Fredey.

	$\alpha$ -CD	CD(N <sub>3</sub> )	CD(N <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CD-BODIPY	CDLa	CDLa <sub>2</sub>	CDGd	CDGd <sub>2</sub>
<i>PPR-CD</i> (76)	50 / 76	-	-	-	-	-	-	-
<i>PPR1</i>	-	74	-	-	-	-	-	-
<i>PPR2</i>	-	-	73	-	-	-	-	-
<i>PPR3</i>	-	-	-	25	-	-	-	-
<i>PPR4</i>	-	-	-	-	25	-	-	-
<i>PPR5</i>	-	-	-	-	-	20	-	-
<i>PPR6</i>	-	-	-	-	-	-	25	-
<i>PPR7</i>	-	-	-	-	-	-	-	20
<i>PPR8</i>	-	44	-	-	16	-	-	-
<i>PPR9</i>	-	-	-	12	13	-	-	-
<i>PPR9'</i>	-	-	-	4	21	-	-	-
<i>PPR10</i>	-	-	-	4	-	-	21	-
<i>PPR11</i>	-	-	-	6,5	-	-	-	5,5

### c. Caractérisation des *PPRs*

La caractérisation des *PPRs* est réalisée par RMN 1D et 2D. La RMN  $^1\text{H}$  nous permet de juger de la pureté des *PPRs* et des taux de recouvrement et la TROESY permet de prouver que les CD sont bien enfilées sur l'axe et non encapsulées dans le polymère sous forme de pelote. Ainsi, la formation du *PPR* se traduit par la proximité spatiale entre des protons de la CD pointant vers l'intérieur de la cavité ( $\text{H}^3$  et  $\text{H}^5$ ) et les méthylènes des motifs monomériques (Figure 2.17).

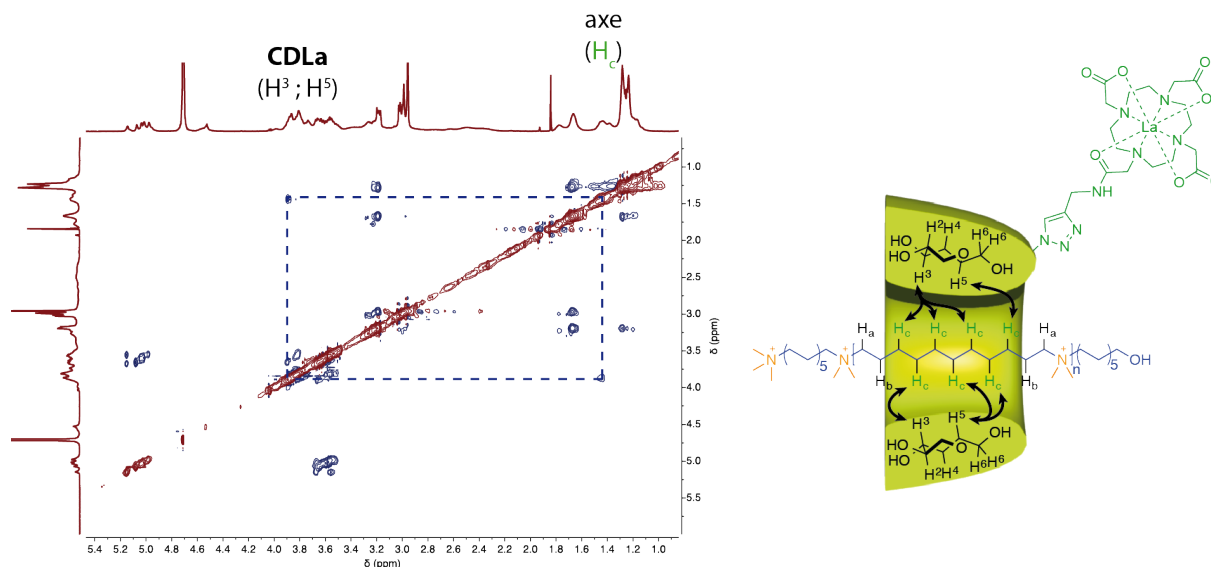


Figure 2.17 : Spectre TROESY (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) du *PPR* de **CDLa** (*PPR4*) après purification par ultrafiltration

## 2. Étude *in vitro* et *in vivo* des *pseudopolyrotaxanes*

### a. Étude *in vitro* des propriétés optiques

Parmi les *PPRs* synthétisés, nous sommes particulièrement intéressés par les **PPR10** (**CDGd** {21%} / **CD-BODIPY** {4%}) et **PPR11** (**CDGd**<sub>2</sub> {5,5%} / **CD-BODIPY** {6,5%}) qui sont bimodaux. Leur caractérisation a commencé par la vérification du maintien de leurs propriétés optiques dans un mélange hydro alcoolique (Figure 2.18).



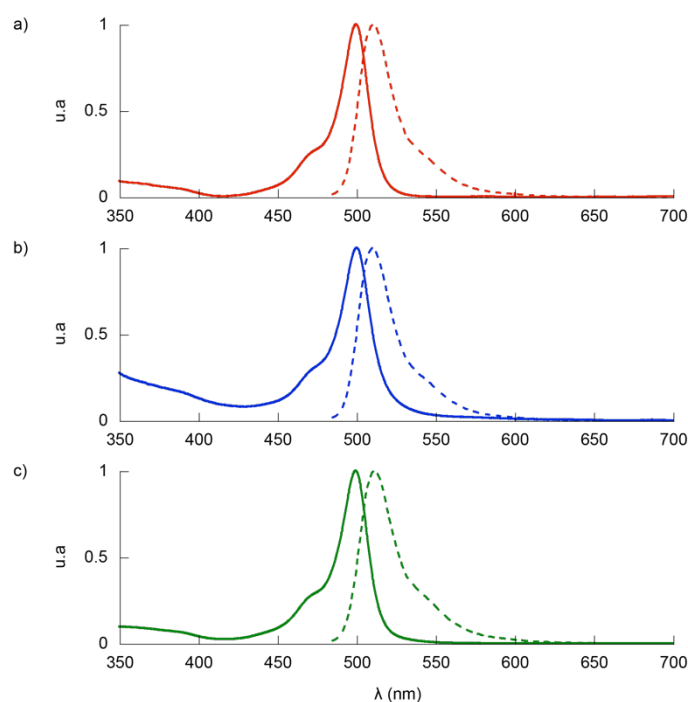


Figure 2.18 : Spectres normalisés d'absorption (trait plein) et d'émission (pointillé) de **PPR11** (a); **PPR10** (b); **CD-BODIPY (22)** (c) dans un mélange H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1) à 20°C ( $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ )

Ces mesures permettent de conclure que, d'une part la sonde fluorescente reste active, d'autre part, ses longueurs d'ondes d'absorption et d'émission ne sont pas modifiées par son enfilage sur l'axe polymérique.

### b. Mesures de relaxivité *in vitro* des PPRs

Les profils NMRD des **PPRs** paramagnétiques ont été enregistrés (Figure 2.19). Ils permettent de mettre en évidence que tous les **PPRs** sont à des niveaux de relaxivité longitudinale quasiment deux fois supérieurs aux **CDGd** et **CDGd<sub>2</sub>** sur l'ensemble de la gamme de fréquences balayées. La comparaison avec les [3]rotaxanes met en avant l'apport de l'architecture supramoléculaire basée sur un polymère qui reste cependant limitée à la vue de la différence de taille entre **PPR** et rotaxane. Cette restriction est due à la flexibilité intrinsèque du polymère qui est peu modifiée par l'enfilage des **CDs** et limite l'augmentation espérée du  $\tau_R$ . Comme pour les rotaxanes et contrairement aux **CDGd** et **CDGd<sub>2</sub>**, les **PPRs** présentent un rehaussement de relaxivité entre 5 et 80 MHz. Dans cette gamme de fréquences, la contribution du temps de corrélation du procédé de relaxation est dominé par le temps de corrélation rotationnelle (Équation 1.6). Ce rehaussement est caractéristique des agents de contraste couplés à des macromolécules,<sup>[86]</sup> et est en accord avec les travaux de Thompson.<sup>[75]</sup>

Dans notre cas, c'est la structure polyrotaxane qui permet l'augmentation du temps de corrélation rotationnelle. Le profil NMRD de **PPR11** n'est pas aussi élevé qu'espéré, néanmoins, il peut s'expliquer par le plus faible taux de recouvrement du polymère (12%) qui doit avoir un effet sur la rigidité du système.

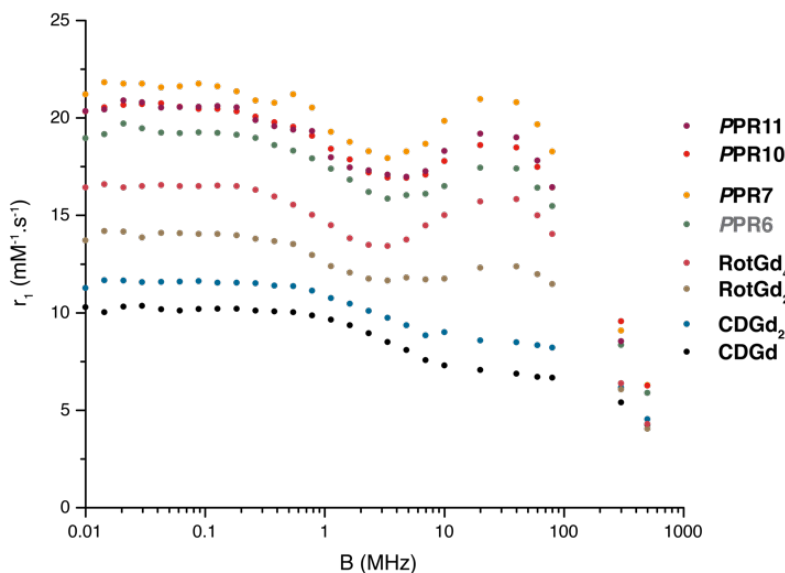


Figure 2.19 : Profils NMRD des CDs fonctionnalisées, [3]rotaxanes et PPRs mono- ou bimodaux à 37°C.

Les mesures de relaxivité ont été réalisées à deux températures (25 et 37°C) (

Tableau 2.3). On sait qu'une augmentation de température peut avoir pour effet : i) d'augmenter la vitesse de rotation de l'AC et donc de diminuer le temps de corrélation rotationnelle ; ii) d'augmenter la vitesse d'échange des molécules d'eau avec le Gd(III). On peut remarquer que dans notre cas, la seconde contribution semble être supérieure à la première car on observe une augmentation de la valeur de la relaxivité en augmentant la température de 25 à 37°C pour tous les PPRs, tandis qu'une diminution est observée pour le DOTA-Gd et les CDs fonctionnalisées. Le PPR **PPR7** est comparé à son analogue [3]rotaxane et à **CDGd<sub>2</sub>** sur trois températures de mesures (Figure 2.20 ; Tableau 2.4). Ce dernier présente la même tendance que le rotaxane à savoir des profils NMRD les plus rehaussés à 25 et 37°C et des valeurs de relaxivité entre 5 et 80 MHz optimales à 37°C.

Si la structure rotaxane est stable à ces trois températures d'étude, la mesure de la relaxivité de **PPR7**, de retour à 25°C après son chauffage à 50°C, a permis de valider la stabilité de la structure polyrotaxane par un retour exact aux valeurs initiales de relaxivité.

Tableau 2.3 : Relaxivité ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) des différents composés paramagnétiques à 25 et 37°C à 20 et 60 MHz

	25°C		37°C	
	$r_1$ at 20 MHz	$r_1$ at 60 MHz	$r_1$ at 20 MHz	$r_1$ at 60 MHz
DOTA-Gd	4,7	4,2	3,8	3,0
<b>CDGd</b>	7,9	7,6	7,1	6,7
<b>CDGd<sub>2</sub></b>	9,2	9,0	8,6	8,3
<b>RotGd<sub>2</sub></b>	11,9	11,5	12,3	12,0
<b>RotGd<sub>4</sub></b>	14,3	13,6	15,7	15,0
<b>PPR6</b>	16,4	15,4	17,4	16,4
<b>PPR7</b>	19,3	18,1	20,9	19,7
<b>PPR10</b>	17,8	16,8	18,6	17,5
<b>PPR11</b>	17,7	16,5	19,2	17,8

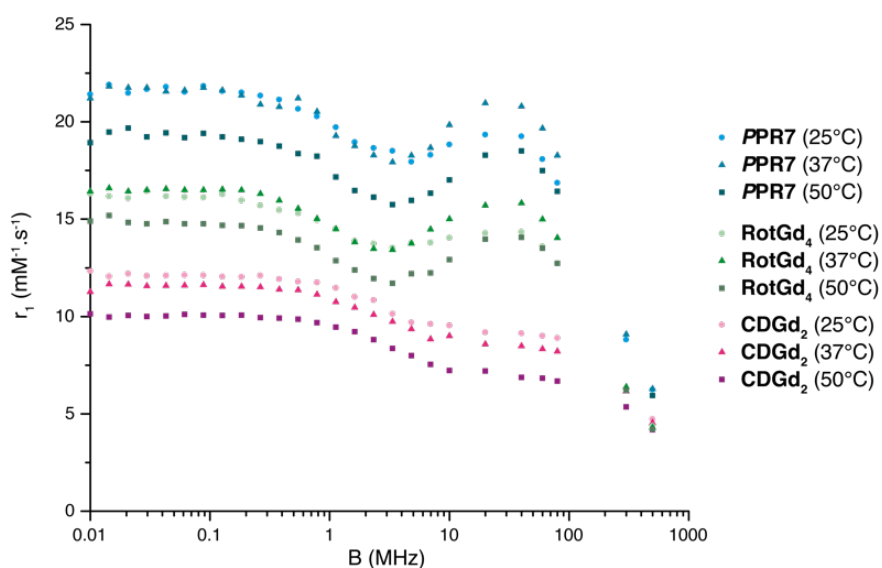

 Figure 2.20 : Profils NMRD de **CDGd<sub>2</sub>**, **RotGd<sub>4</sub>** et **PPR7** mesurés à 25, 37 et 50°C

 Tableau 2.4 : Relaxivité longitudinale ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de **CDGd<sub>2</sub>**, **RotGd<sub>4</sub>** et **PPR7** à 60 MHz pour trois températures d'études (25, 37, 50°C)

	$r_1$ à 25°C	$r_1$ à 37°C	$r_1$ à 50°C
<b>CDGd<sub>2</sub></b>	9,0	8,3	6,8
<b>RotGd<sub>4</sub></b>	13,6	15,0	13,5
<b>PPR7</b>	18,1	19,7	17,5

### c. Étude *in vivo* des *pseudopolyrotaxanes*

Les caractérisations *in vitro* ont permis de prouver la stabilité des CDs fonctionnalisés sur le polymère en condition physiologiques. Après purification par ultrafiltration, le *PPR* est bien fluorescent, et joue bien le rôle d'agent de contraste T<sub>1</sub> pour l'IRM. De plus, son comportement assimilable à celui d'une macromolécule est en accord avec la structure supramoléculaire obtenue. Des tests *in vivo* ont alors pu être envisagés.

Le **PPR10** est le premier *pseudopolyrotaxane* bimodal synthétisé. Il est obtenu dans les mêmes conditions que **PPR9'**. Ce dernier semble plus intéressant qu'un analogue au gadolinium de **PPR9** de part la proportion plus élevée en CDLn. Les tests *in vivo* sur la souris ont donc été réalisés avec **PPR10** (Figure 2.21).

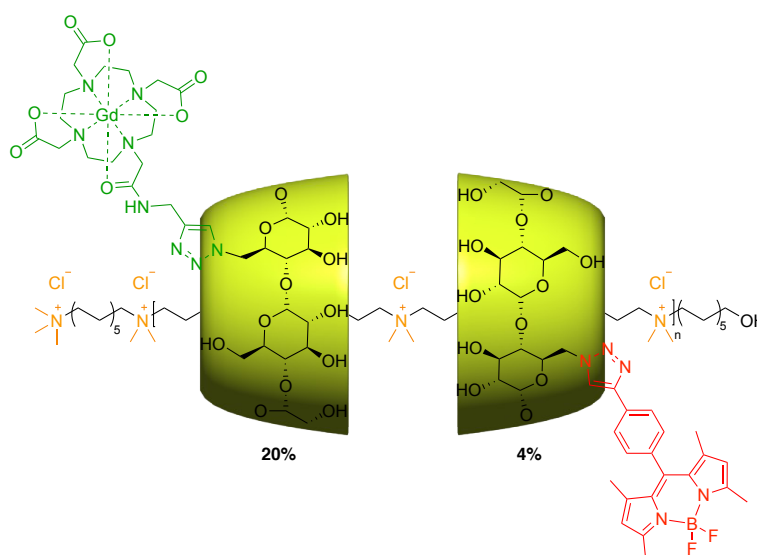


Figure 2.21 : **PPR10**, *pseudopolyrotaxane* bimodal pour les tests *in vivo* d'imagerie médicale

#### i. Études préliminaires

On a pu vérifier *in vitro*, avec le spectromètre de micro IRM 7T (300 MHz) qui sera utilisé pour l'IRM sur la souris, que le contraste pouvait être corrélé à la concentration en *PPR* (Figure 2.22). De plus, le rapport de la relaxivité transversale sur la relaxivité longitudinale (à 298K et 7T) est inférieur à 10 (Équation 2.3) ce qui nous permet de conclure que **PPR10** se comporte bien comme un agent de contraste de type T<sub>1</sub>.

$$\frac{r_2}{r_1} = \frac{7,2}{4,5} = 1,6 < 10 \quad \text{Équation 2.3}$$

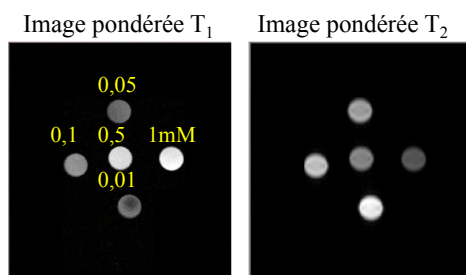


Figure 2.22 : Image IRM pondérée en  $T_1$  ou  $T_2$  des échantillons de **PPR10** à différentes concentrations (0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1,0 mM en Gd(III)) à 7 T (300 MHz)

Afin d'anticiper la biodistribution du composé, une mesure de diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été effectuée sur le *PPR* en solution dans un tampon phosphate salin. Il permet de caractériser un volume hydrodynamique d'environ 220 nm. Cette taille élevée permet de s'attendre à une accumulation du produit dans la rate, les poumons, ou le foie, et il est trop volumineux pour être excrété par les reins.<sup>[112]</sup> Cet élément est intéressant car, si les CDs se désenfilent du polymère, elles pourront être filtrées par les reins. Ainsi, le non rehaussement de contraste dans les reins apparaît comme un contrôle de la stabilité de notre architecture.

Enfin, la cytotoxicité de **PPR10** au niveau cellulaire a été évaluée par des tests MTT sur des macrocytes (globules rouges) et hépatocytes (cellules du foie). Ils ont relevé une cytotoxicité élevée du *PPR* avec un  $IC_{50}$  de 3  $\mu$ M (contre plus de 0,48 mM pour les [3]rotaxanes). Les cyclodextrines et sondes utilisées ayant déjà fait l'objet d'étude *in vivo*, il semblerait que la toxicité provienne du polycation ou de ses contre-ions chlorure.

## ii. Tests par imagerie *in vivo*

Le produit **PPR10** a été injecté dans une souris (150  $\mu$ L ; 10 mM en Gd). L'imagerie par résonance magnétique révèle, 5 minutes après l'injection, une augmentation de contraste de 30% dans la tranche ciblant le foie (Figure 2.23). Néanmoins, aucune cinétique de biodistribution n'a pu être effectuée car l'animal s'est retrouvé en détresse respiratoire et est mort une dizaine de minutes après l'injection.

L'injection a été reconduite sur une autre souris avec une concentration moitié moins élevée (5 mM en Gd) mais a aussi conduit à la mort de l'animal. L'injection à 1 mM en Gadolinium a permis de garder la souris en vie mais les clichés IRM ne se sont pas révélés suffisamment contrastés pour être analysés.

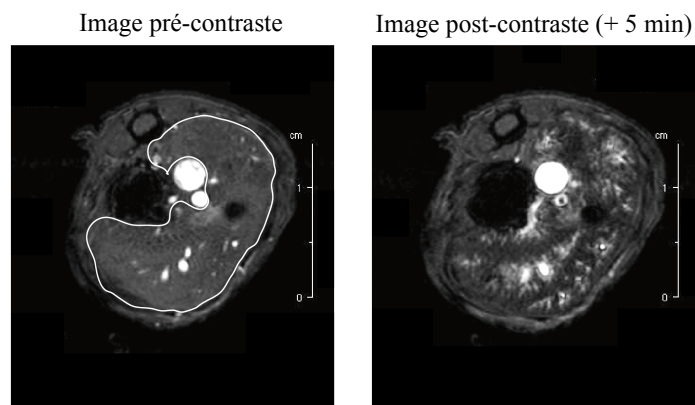


Figure 2.23 : Images IRM avant injection et 5 minutes après injection de **PPR10**. Tranche permettant l'observation du foie.

Le prélèvement du foie, des reins, de la rate et des poumons a été réalisé sur la souris ayant reçu l'injection à 10 mM en Gd. La microscopie de fluorescence sur ces organes permet de conclure que seuls les poumons et le foie ont capté le *PPR* (Figure 2.24). L'absence de signal de fluorescence dans les reins confirme la non dissociation des CD.

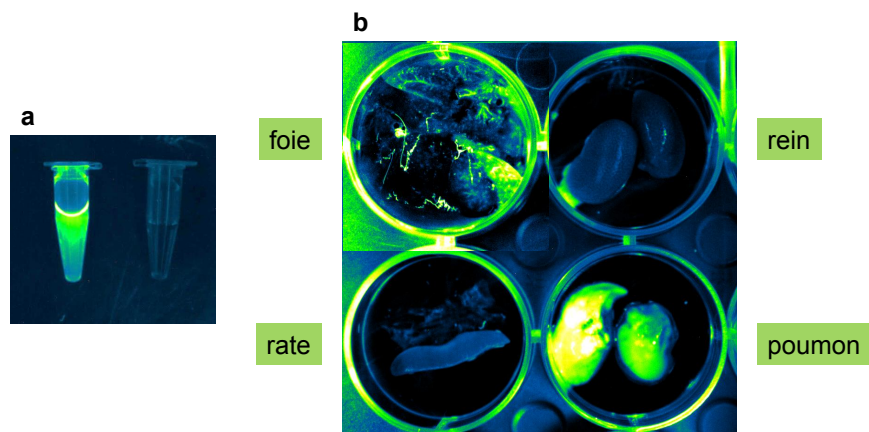


Figure 2.24 : Imagerie de fluorescence ( $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ ) : a) de tubes contenant une solution de **PPR10** à 10 mM en Gd dans du sérum physiologique (à gauche) ; une solution de sérum physiologique (à droite) ; b) des organes de la souris morte après injection de **PPR10** à 10 mM en Gd. Plateforme d'imagerie optique Paris Descartes/ENSCP, caméra Apogée

L'accumulation importante de **PPR10** dans les poumons pourrait avoir causé une embolie pulmonaire, c'est-à-dire, une obstruction des voies d'irrigation sanguines des poumons par la formation d'agrégats. Afin d'évaluer cette hypothèse, des mesures de DLS ont été réalisées sur **PPR10** en solution dans un tampon phosphate salin permettant d'imiter les conditions *in vivo*. En présence d'albumine (HSA, protéine la plus abondante dans le plasma sanguin) on peut noter une augmentation significative de la taille des particules en solution, passant de 220 nm à 880 nm (soit un facteur 4), qui semble confirmer la formation

d'agrégats impliquant le *PPR* lors de l'injection *in vivo* (Tableau 2.5). Les équipes de Boothman et Gao ont décrit en 2005 l'agrégation d'HSA en surface de nanoparticules chargées positivement.<sup>[114]</sup> Il semble donc envisageable que le *PPR*, et plus particulièrement, l'ensemble des ammoniums accessibles du polymère puissent interagir de façon électrostatique avec la HSA chargée négativement en surface dans les conditions physiologiques.

Tableau 2.5 : Mesures de DLS. PBS : *Phosphate Buffered Saline* (solution de NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ; HSA : *Human Serum Albumin*.

Milieu	Taille (nm)
PBS + HSA (0,5%)	100
<b>PPR10</b> + PBS	220
<b>PPR10</b> + PBS + HSA (0,5%)	<b>880</b>

### 3. Conclusion

L'approche modulaire utilisée a permis de générer plusieurs *PPRs*, mono- ou bimodaux pour les imageries IRM et optique, dont la caractérisation a mis en évidence le maintien de leurs propriétés optiques ainsi qu'une amélioration de l'efficacité des agents de contraste IRM. Si les résultats *in vivo* ne sont pas concluants au vu de la mort rapide des souris, l'imagerie de fluorescence des organes prélevés et les mesures de DLS permettent de faire des hypothèses quant à la cause de la toxicité élevée du composé. Ces conclusions ont permis d'orienter la suite du projet vers différentes voies de synthèses pour l'amélioration de la biocompatibilité des *PPRs* polycationiques. Le camouflage de la structure supramoléculaire par un polymère biocompatible, hydrosoluble et approuvé pour des applications biomédicales a été envisagé, de même que de nouveaux axes et synthèses de *PPRs* ont été développés pour compléter l'étude *in vivo* de ces structures.

Les résultats présentés dans ce chapitre apportent une preuve de concept de la faisabilité de notre approche supramoléculaire pour la conception d'agents multimodaux par enfilage de CDs fonctionnalisées avec des résultats très encourageant sur les architectures [3]rotaxanes. Les résultats de relaxométrie révèlent ainsi une cohérence des profils NMRD en fonction des architectures rotaxane ou *pseudopolyrotaxane*. Néanmoins l'extension à des architectures *PPRs* à base de polyammonium a mis en évidence une incompatibilité biologique importante probablement due au caractère polycationique du système qui a tendance à s'agréger avec les protéines du plasma. Le chapitre suivant rapporte le développement d'axes polyanioniques pour la synthèse de *pseudopolyrotaxanes*.

---

**CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE**  
***PSEUDOPOLYROTAXANES POLYANIONIQUES***

---





Nous avons pu voir dans l'introduction que la majorité des axes polymériques développés pour la synthèse de polyrotaxanes de CDs sont polycationiques ou neutres. En parcourant la littérature nous avons trouvé quelques exemples de *pseudopolyrotaxanes* de CDs polyanioniques basés sur un axe poly(acide méthacrylique)<sup>[115]</sup> ou poly(éthylène phosphate).<sup>[116]</sup> En Avril 2014, l'équipe de N. Yui met en évidence dans son étude sur le poly(éthylène phosphate) (PHP) la possibilité de former des complexes d'inclusion entre le PHP et l' $\alpha$ -CD, et plus faiblement avec la  $\gamma$ -CD (Figure 3.1). En effet, on peut observer une augmentation de la turbidité des solutions de PHP en présence d' $\alpha$ -CD et de  $\gamma$ -CD (b) se traduisant par une diminution de la transmittance à 500 nm (c) qui révèle la formation d'un précipité. Ce précipité a été caractérisé par RMN et diffraction des rayons X comme étant le *PPR* de CDs. L'unité éthylène séparant les phosphates est courte et implique que les cyclodextrines enfilées les recouvrent aussi. Yui *et al.* ont caractérisé l'enfilage de 0,93 CD par motif monomérique. Des modifications de pH ont été réalisées pour étudier son influence sur la formation du complexe d'inclusion mais aucun changement significatif n'a été observé.

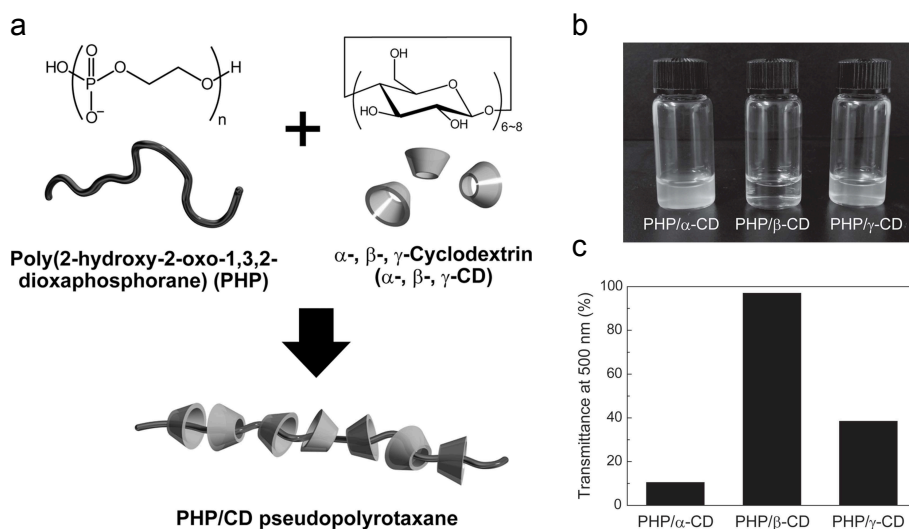


Figure 3.1 : a) Voie de synthèse de *pseudopolyrotaxane* de CDs ; b) PHP en solution aqueuse avec chaque cyclodextrine (pH 3) ; c) Transmittance à 500 nm des solutions de PHP/CD (pH 3).<sup>[116]</sup>

Cette publication a été le point de départ du développement de nouveaux axes pour la synthèse de *PPR* d' $\alpha$ -CD au sein du groupe. L'objectif étant de remplacer le polyammonium utilisé initialement par un poly(alkylène phosphate) permettant l'enfilage des CDs fonctionnalisées et qui posséderait une toxicité réduite *in vivo* (Figure 3.2). Nous voulions de

plus augmenter la longueur de la chaîne carbonée séparant les phosphates pour favoriser la formation du complexe hôte/invité par effet hydrophobe.

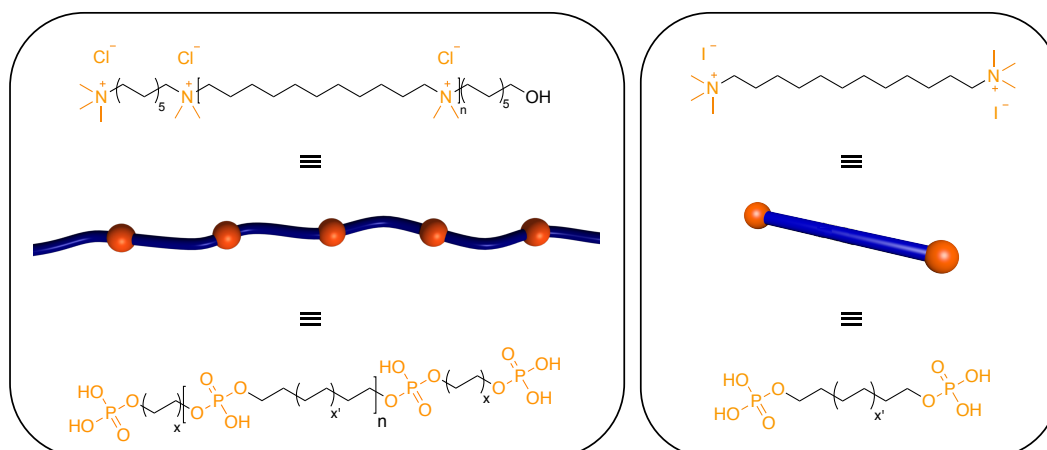


Figure 3.2 : Nouveaux axes polyanioniques envisagés et analogie avec les axes cationiques précédemment utilisés pour la synthèse de *PPR-CDs*

Le développement de nouveaux axes pour la formation de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines passe par la synthèse d'un nouvel axe modèle pour les études d'enfilage et la caractérisation de l'auto-assemblage. Les monomères diphosphates n'ayant jamais été utilisés pour la synthèse de rotaxanes de cyclodextrine, nous avons choisi d'en faire l'étude détaillée en faisant varier la longueur de la chaîne alcane et l'état de protonation des phosphates.

## I. Synthèse et étude d'axes modèles diphosphates

### 1. Synthèse des axes modèles phosphatés

La synthèse des monomères modèles diphosphatés a été aisément réalisée à partir des alcanes diols commerciaux (hexane-, octane-, décane-, dodécane-, hexadécane-1,2-diol) (Figure 3.3) par ajout de trichlorure de phosphore dans le toluène sec à 100°C, suivi de l'hydrolyse des dichlorophosphates de part et d'autre de l'axe dans l'eau distillée à reflux.<sup>[117]</sup> La caractérisation par RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  permet de vérifier la présence des phosphates ( $\delta \approx 0,7$  ppm) et l'absence d'acide phosphorique ( $\delta \approx 0$  ppm) dans le produit final qui pourrait se former par hydrolyse du  $\text{POCl}_3$  restant.

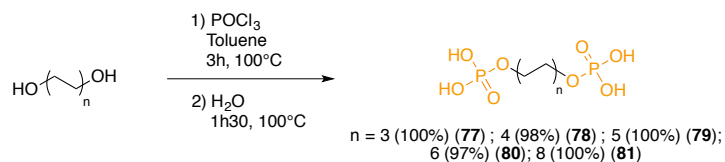


Figure 3.3 : Voie de synthèse des alcanes diphosphates

Les hexane- (77), octane- (78), décane- (79) et dodécane-diphosphates (80) sont solubles dans l'eau à pH 1, tandis que l'axe C<sub>16</sub> (81) ne l'est qu'à pH ≥ 6. En effet, en fonction des conditions de pH, les phosphates sont protonés, mono-déprotonés ou totalement déprotonés, cet état de protonation influence peu l'hydrosolubilité pour les axes C<sub>6</sub> (77), C<sub>8</sub> (78), C<sub>10</sub> (80) et C<sub>12</sub> (81) mais on s'attend à ce qu'il influence l'enfilage des cyclodextrines. Par des dosages acido-basiques nous avons pu montrer que les deux phosphates sont indépendants quelque soit la longueur du monomère et possèdent bien les mêmes valeurs de pK<sub>a1</sub> et pK<sub>a2</sub>. Leur détermination (excepté pour l'axe C<sub>16</sub>) donne des valeurs comprises entre 1,1 et 2,3 pour la première acidité et 7,1 à 7,3 pour la seconde (Tableau 3.1).

 Tableau 3.1 : Valeurs de pK<sub>a1</sub> et pK<sub>a2</sub> des alcanes diphosphates à 6, 8, 10 et 12 carbones.

\*Faible solubilité à pH acide pour le monomère 80.

	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>
pK <sub>a1</sub>	1,7	1,1	1,6	2,3*
pK <sub>a2</sub>	7,1	7,1	7,1	7,3

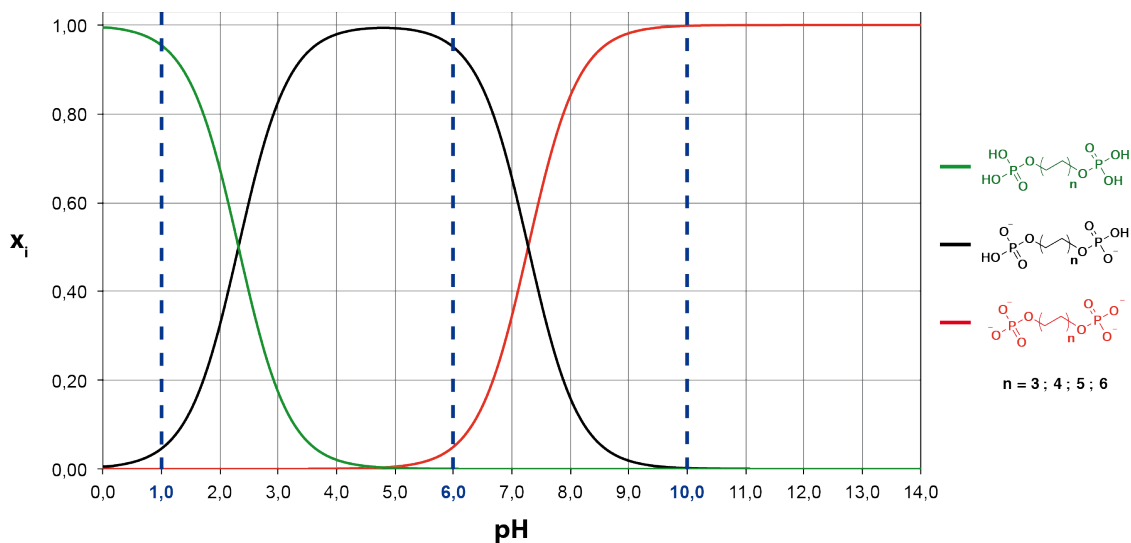


Figure 3.4 : Diagramme de prédominance des états de protonation des monomères modèles en fonction du pH ( $x_i$  : fraction molaire de  $i$ ) tracé avec les pK<sub>a1</sub> et pK<sub>a2</sub> moyens de C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub> (1,7 et 7,1 respectivement) pour une concentration de 2,8 mM.

L'interaction des axes C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub> avec la CD a été étudiée à trois valeurs de pH (1 ; 6 ; 10) nous permettant l'étude de l'interaction des différents états de protonation des monomères avec la CD (Figure 3.4). Le diagramme de spéciation nous permet de considérer que le monomère se trouve à plus de 90% sous la forme qui nous intéresse (AH<sub>4</sub>, AH<sub>2</sub><sup>2-</sup>, A<sup>4-</sup> respectivement) pour son étude. L'axe C<sub>16</sub> n'étant pas soluble à pH 1, il a fait l'objet d'une étude particulière.

### 2. Étude de la formation des complexes d'inclusion en conditions acides

À pH 1 comme à pH 6, les phosphates des monomères se comportent comme des *pseudo*-bouchons car ils permettent l'observation simultanée des espèces libres et enfilées par RMN, on est donc en présence d'un régime d'échange lent par rapport au temps caractéristique d'acquisition RMN. Néanmoins, et à la différence du monomère modèle 1,12-diammonium dodécane (**24**), on observe que l'équilibre thermodynamique est très rapidement atteint. En effet, les études préliminaires réalisées en condition acides ont mis en évidence un enfilage considéré comme « instantané » : le temps de la préparation d'un mélange d'axe et de CD est suffisant pour que l'équilibre soit atteint, ainsi, le spectre RMN obtenu une minute après cette préparation est identique à celui du même échantillon 1h, 2h, 1 jour après. Afin de déterminer les différentes espèces en solution en fonction des équivalents entre hôte et invité et d'obtenir des constantes de formation des rotaxanes, nous avons réalisé des dosages par la méthode des ajouts dosés. En partant d'une solution de monomère modèle à 2,8 mM dans l'eau deutérée conditionnée au pH d'étude par du carbonate de potassium à température ambiante, l' $\alpha$ -CD est ajoutée sous forme solide (pour ne pas diluer la solution) par portion d'environ 0,15 équivalents et le mélange est caractérisé par RMN <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}. Nous allons présenter dans la suite deux exemples représentatifs des dosages.

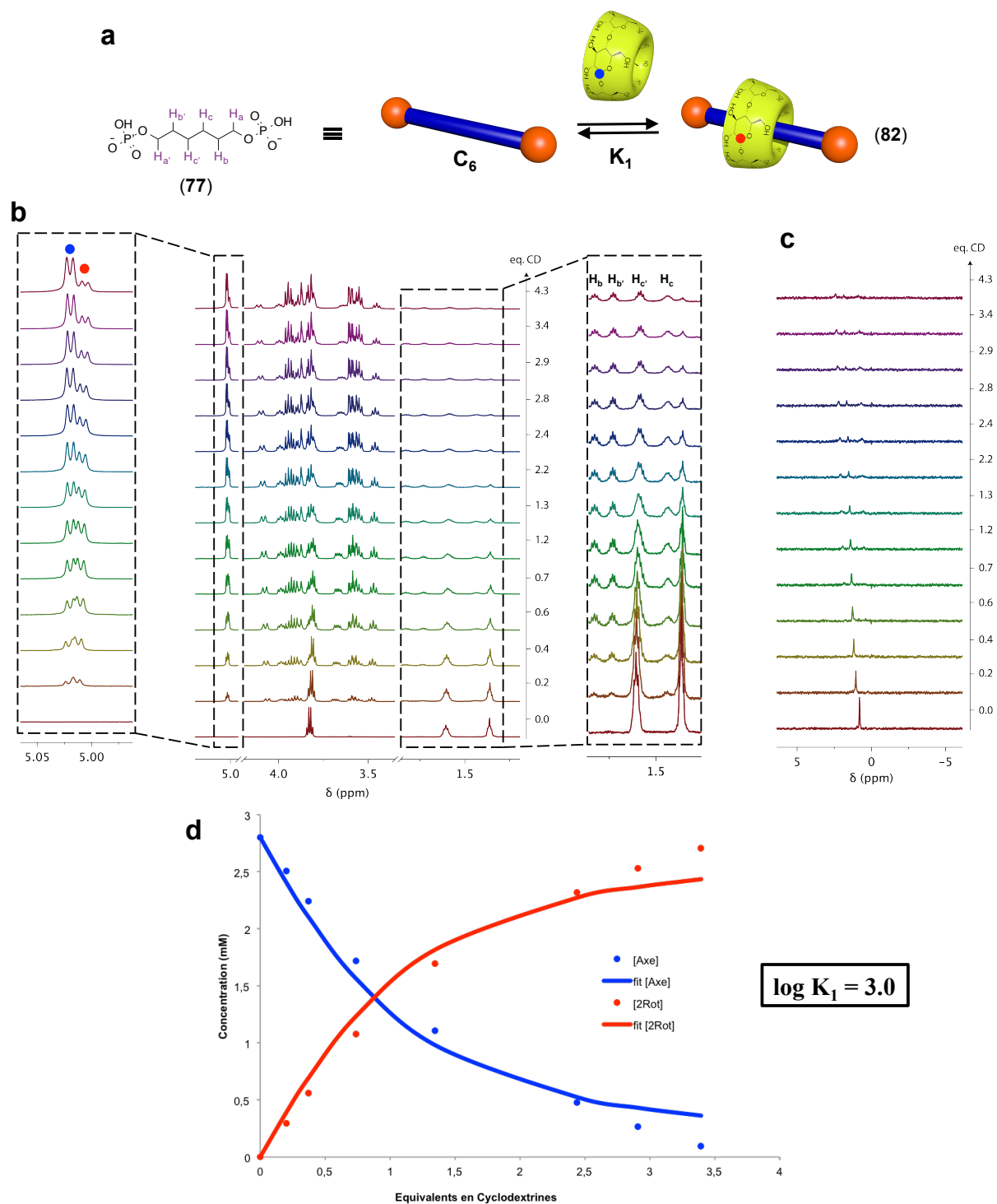
a. Ajout dosé de CD sur l'axe C<sub>6</sub> à pH 6


Figure 3.5 : a) Équilibre de la formation du complexe d'inclusion entre l'axe modèle C<sub>6</sub> (77) et la CD native ; b) Superposition des spectres RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K) en fonction des équivalents en CD ; c) Superposition des spectres RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (600 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K) ; d) Concentrations en axe libre (77) et en *pseudo*-[2]rotaxane (82) en fonction des équivalents en CD.

L'hexane-diphosphate (**77**) est l'axe modèle le plus court ( $\approx 11,4$  Å), il possède 4 atomes de moins entre les phosphores que l'axe modèle diammonium dodécane entre les azotes. L'ajout dosé de CD réalisé sur l'axe C<sub>6</sub> confirme une longueur suffisante pour qu'il soit enfilé dans la cavité de l' $\alpha$ -CD (Figure 3.5). En effet, deux observations peuvent être faites sur la Figure 3.5b, tout d'abord on constate la dissymétrisation de l'axe au fur et à mesure des ajouts de CDs dans la zone 1,30 - 1,85 ppm correspondant aux pics caractéristiques des protons H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>c</sub> et H<sub>c'</sub> intégrant chacun pour 2 protons. De plus, le zoom sur les pics des protons anomériques révèle deux doublets correspondant à deux formes de la cyclodextrine, l'une libre (bleu) et l'autre enfilée (rouge). On remarque que le suivi par RMN du phosphore est peu concluant, on observe la diminution du singulet de départ et l'apparition de deux singulets mais l'atténuation générale du signal rend l'intégration impossible, l'intensité des signaux semble donc affectée par les ajouts de CDs successifs. Ce comportement est observé pour l'ensemble des études réalisées à pH 6. On suppose que dans ces conditions, les phosphates mono-déprotonés échangent leurs protons avec l'eau et interagissent probablement avec les CDs, ce qui entraîne l'élargissement et l'atténuation des signaux.

L'intégration des pics caractéristiques de la forme enfilée et libre permet de tracer l'évolution en concentration des différentes espèces en solution en fonction des équivalents de CD ajoutés (Figure 3.5d), les données ont ensuite été modélisées pour un équilibre 1 : 1 à l'aide des outils développés par le Pr. Pall Thordarson<sup>[118]</sup> nous permettant d'associer à ce complexe d'inclusion (*pseudo*-[2]rotaxane) une constante de formation de 10<sup>3</sup>.

### **b. Ajout dosé de CD sur l'axe C<sub>8</sub> à pH 1**

L'étude d'enfilage des CDs sur l'axe C<sub>8</sub> à pH 1 est suivie par RMN <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} et est présentée sur la Figure 3.6. La superposition des spectres <sup>1</sup>H met en avant trois doublets caractéristiques des protons anomériques, impliquant que la CD se trouve sous trois formes différentes. Si on observait plutôt un effet de dissymétrisation des protons de l'axe dans le cas de l'axe C<sub>6</sub>, on remarque ici que l'ajout de la CD provoque l'atténuation des deux pics à 1,40 (8H) et 1,68 ppm (4H) caractéristiques du milieu de l'axe en faveur de l'apparition de trois autres pics à 1,52 (4H), 1,58 (4H) et 2,01 ppm (4H). Cette équivalence 2 à 2 des méthylènes de part et d'autre de l'axe est corroborée par la superposition des spectres <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (c) où l'on observe la disparition du singulet caractéristique de l'axe libre symétrique (en bleu) en faveur de la légère apparition de deux singulets correspondant au *pseudo*-[2]rotaxane (**83**)

intermédiaire (en rouge) suivie de celle d'un singulet caractéristique d'un *pseudo*-[3]rotaxane (**84**) symétrique (en vert). La formation du *pseudo*-[3]rotaxane a été confirmée par des études RMN et DRX qui seront détaillées par la suite.

Le tracé des concentrations des différentes espèces en solution en fonction des équivalents de CDs ajoutés a été possible par l'intégration de pics caractéristiques sur les spectres  $^1\text{H}$  mais aussi  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ . La Figure 3.7 correspond aux graphiques obtenus après modélisation des données, on constate que les deux tracés sont similaires et que les constantes de formation du *pseudo*-[2]rotaxane **83** ( $K_1 = 10^{3.1}$  ( $^1\text{H}$ ) ;  $10^{3.0}$  ( $^{31}\text{P}$ )) et *pseudo*-[3]rotaxane **84** ( $K_2 = 10^{3.4}$  ( $^1\text{H}$ ) ;  $10^{3.5}$  ( $^{31}\text{P}$ )) obtenus par la modélisation sont cohérentes. Alors que seule la formation du *pseudo*-[2]rotaxane (**82**) a été observée avec l'axe  $\text{C}_6$ , l'ajout de deux carbones supplémentaires permet l'enfilage d'une deuxième cyclodextrine et la formation du *pseudo*-[3]rotaxane (**84**) avec une constante de formation supérieure à celle du *pseudo*-[2]rotaxane (**83**). Dans ces conditions (pH 1,  $25^\circ\text{C}$ ,  $[\text{axe}] = 2,8 \text{ mM}$ ), l'ajout de 3,5 équivalents de CD par rapport à l'axe suffit pour que l'intégralité de l'axe soit sous la forme [3]rotaxane (**84**).

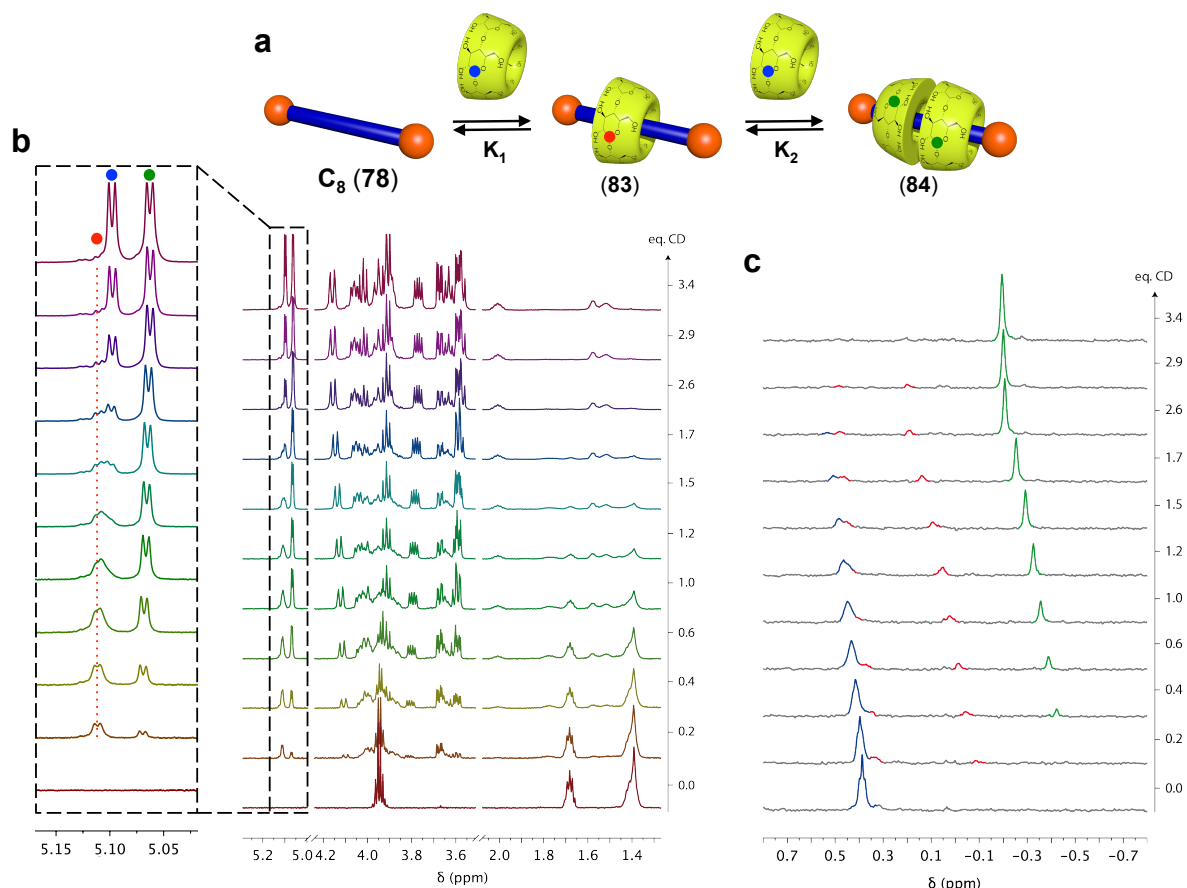


Figure 3.6 : a) Équilibre de la formation des complexes d'inclusion entre l'axe modèle  $\text{C}_8$  (**78**) ( $c = 2,8 \text{ mM}$ ) et les CDs natives à pH 1; Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (b) et RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (c) en fonction des équivalents en CD (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K). Les espèces libres en bleu, le *pseudo*-[2]rotaxane (**83**) en rouge, le *pseudo*-[3]rotaxane (**84**) en vert.



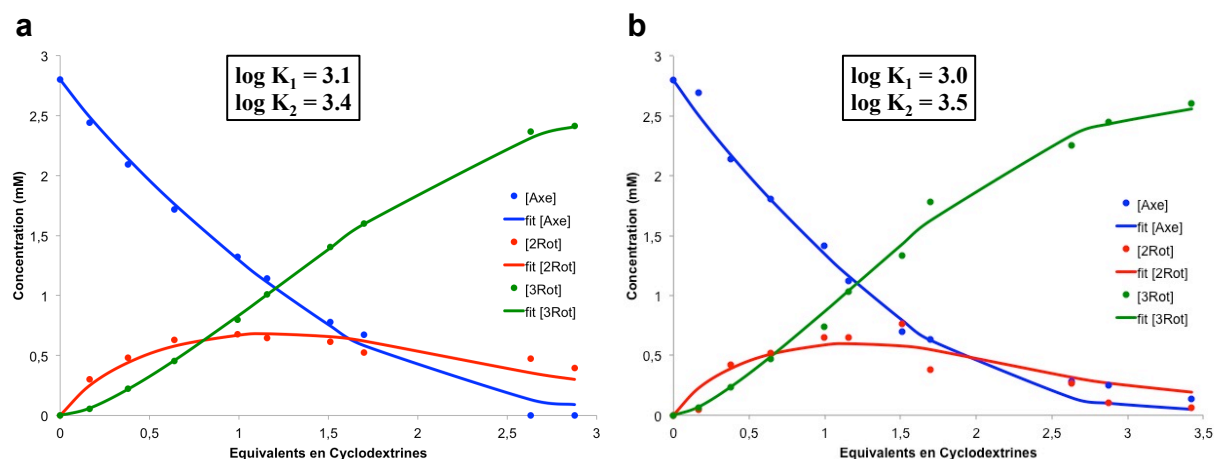


Figure 3.7 : Évolution des concentrations en axe libre  $\text{C}_8$  (**78**), [2]Rotaxane (**83**) et [3]Rotaxane (**84**) déterminées à partir des spectres  $^1\text{H}$  (a) et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (b) en fonction des équivalents en CD et leurs modélisations.

### c. Étude générale des alcanes diphosphates à pH 1 et 6

L'étude des ajouts dosés à pH 1 et 6 a été réalisée sur l'ensemble des monomères et les concentrations des différentes espèces en solution en fonction des équivalents en cyclodextrine native sont présentées sur la Figure 3.8. Les constantes de formation des différents complexes d'inclusion ont été déterminées par la modélisation des données et sont compilées dans le Tableau 3.2. On peut remarquer que pour les axes  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_8$  et  $\text{C}_{10}$  les constantes de formation obtenues à pH 1 par la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  sont du même ordre de grandeur. Si on s'intéresse de plus près à la comparaison des graphiques des axes  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{10}$  et  $\text{C}_{12}$  à pH 6 (Figure 3.8), on constate que le *pseudo*-[2]rotaxane est très faiblement formé avec l'octane-diphosphate tandis que l'utilisation de l'axe  $\text{C}_{10}$  conduit à sa formation quasi quantitative à 2,5 équivalents en CD. La formation de *pseudo*-[3]rotaxane passant par la consommation de *pseudo*-[2]rotaxane, ce comportement traduit soit une stabilisation accrue du [3]rotaxane avec l'axe  $\text{C}_8$ , soit sa déstabilisation avec l'axe  $\text{C}_{10}$ . L'axe  $\text{C}_{12}$  a lui un comportement intermédiaire avec, à 2 équivalents en CD, une concentration voisine des deux rotaxanes. Enfin, l'augmentation du pH de 1 à 6 semble être favorable à la formation des rotaxanes avec une augmentation des constantes de formation.

Tableau 3.2 : Compilation des constantes de formation des *pseudo*-[2]rotaxanes ( $C_6$  (**82**) ;  $C_8$  (**83**) ;  $C_{10}$  (**85**) ;  $C_{12}$  (**87**)) et *pseudo*-[3]rotaxanes ( $C_8$  (**84**) ;  $C_{10}$  (**86**) ;  $C_{12}$  (**88**)) de CDs à pH 1 et 6 ( $c = 2,8$  mM,  $D_2O$ ,  $25^\circ C$ ) déterminées par RMN  $^1H$  et  $^{31}P\{^1H\}$ . \* Modélisation réalisée sur l'intégration de deux signaux superposés.

log $K_1$ ; log $K_2$		$C_6$	$C_8$	$C_{10}$	$C_{12}$
pH 1	$^{31}P\{^1H\}$	2.3	3.0 ; 3.5	3.5 ; 2.9	4.4* ; 4.5*
	$^1H$	2.6	3.1 ; 3.4	3.8 ; 2.8	3.7 ; 3.6
pH 6	$^1H$	3.0	3.8 ; 4.8	3.9 ; 1.7	3.9 ; 2.9

L'accès aux constantes de formation des deux rotaxanes permet de calculer l'effet coopératif entre les deux espèces (Tableau 3.2).<sup>[118]</sup> Si le paramètre de coopérativité ( $\alpha$ ) est supérieur à 1, cela signifie que la formation du [2]rotaxane favorise celle du [3]rotaxane (coopérativité positive), dans le cas contraire on parle de coopérativité négative et l'ajout de la seconde CD est moins favorable que l'enfilage de la première. On peut alors conclure que la formation du [3]rotaxane est fortement stabilisée avec l'axe  $C_8$  ( $\alpha = 45$ ), très déstabilisée avec l'axe  $C_{10}$  ( $\alpha = 0,03$ ) et déstabilisée pour l'axe  $C_{12}$  avec une coopérativité de 0,41.

Tableau 3.3 : Calcul de l'effet coopératif entre le [2] et [3]rotaxane à pH 1 et 6 :  $\alpha = 4 * K_2 / K_1$ <sup>[118]</sup> ;  $\alpha > 1$  coopérativité positive ;  $\alpha < 1$  coopérativité négative. \* Modélisation réalisée sur l'intégration de deux signaux superposés.

Coopérativité ( $\alpha$ )	$C_8$		$C_{10}$	$C_{12}$	
pH 1	14 ( $^{31}P\{^1H\}$ )	9.7 ( $^1H$ )	0.90	2.1* ( $^{31}P\{^1H\}$ )	2.8 ( $^1H$ )
pH 6	45		0.030	0.41	

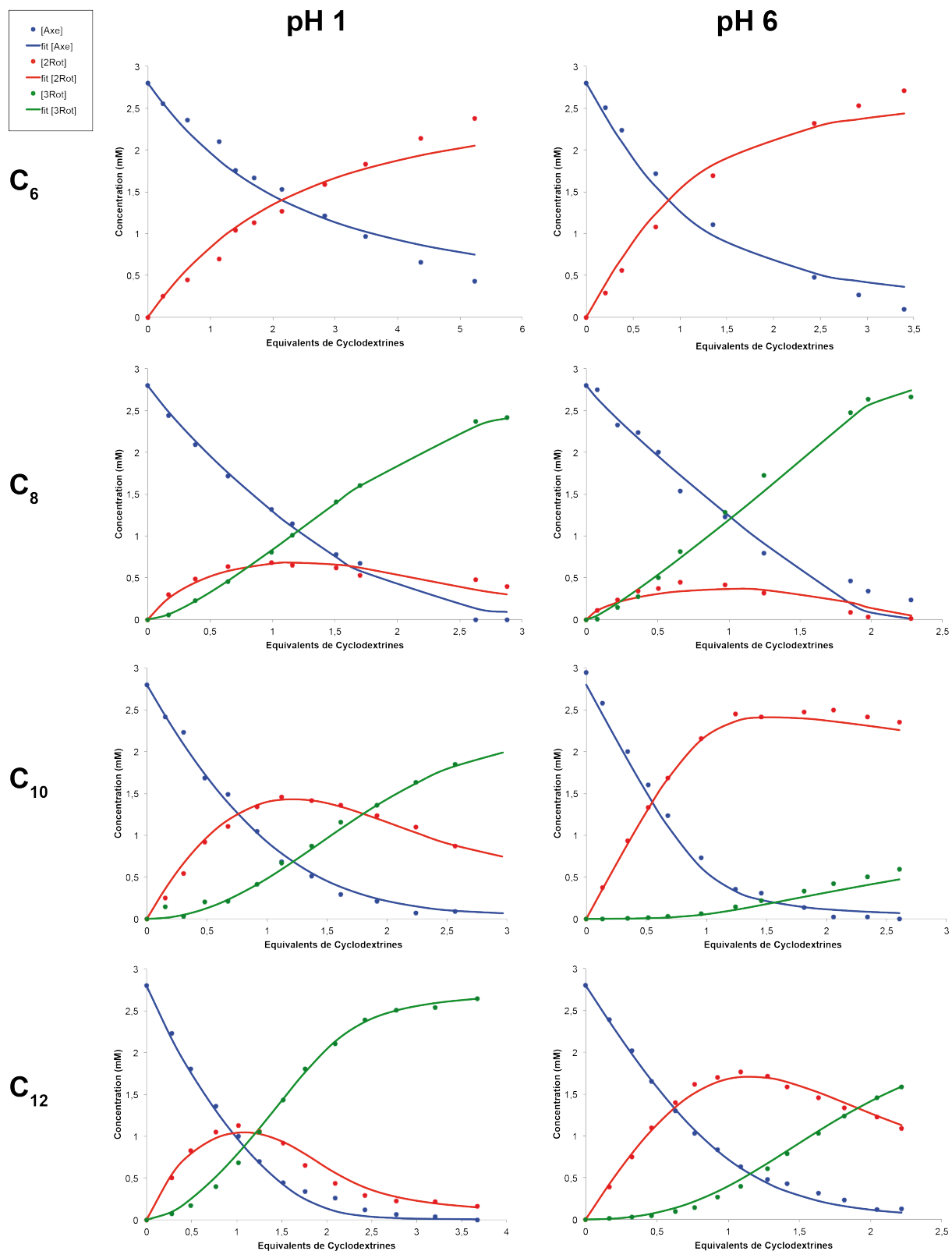


Figure 3.8 : Compilation des graphiques représentant la concentration des espèces en solution en fonction des équivalents en CD ajoutés à une solution de monomère ( $C_6$  ;  $C_8$  ;  $C_{10}$  ;  $C_{12}$ ) à 2,8 mM dans  $D_2O$  à pH 1 ou 6 à 25°C.

### 3. Étude cinétique d'enfilage de CD sur les axes modèles à pH 10

Les études préliminaires d'enfilage de CD native sur les monomères modèles à pH 10 ont montré que les phosphates déprotonés ralentissaient l'enfilage de cette dernière de façon similaire aux ammoniums perméthylés de l'axe modèle **24**. Les études à pH 1 et 6 ayant permis de mettre en évidence la formation de [2]rotaxane avec l'axe C<sub>6</sub> et celle de [3]rotaxane avec les axes C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>, nous avons choisi d'étudier l'affinité de la CD pour ces trois axes par suivi cinétique d'enfilage de la même manière qu'avec **24** (chapitre 1.II.3) en respectant la stœchiométrie entre CDs et axes modèles. L'enfilage d'un seul équivalent de CD sera réalisé sur l'axe C<sub>6</sub> tandis que deux équivalents seront ajoutés aux solutions des axes plus longs.

#### a. Étude d'enfilage de CD sur l'axe C<sub>6</sub> à pH 10

L'étude de l'enfilage de la cyclodextrine native sur l'hexane-diphosphate a été réalisée à température ambiante en mélange 1 : 1 entre l'axe et la CD à une concentration de travail de 2,8 mM dans l'eau deutérée. Le monomère est d'abord solubilisé dans D<sub>2</sub>O puis conditionné à pH 10 par ajout de carbonate de potassium, la CD est ensuite ajoutée et l'évolution de l'échantillon est suivie par RMN <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (Figure 3.9). Comme on l'avait noté pendant l'ajout dosé de la CD sur l'axe C<sub>6</sub> à pH 6, on observe deux doublets caractéristiques des protons anomériques sur la superposition des spectres <sup>1</sup>H (b), avec le pic le plus déblindé (bleu) qui s'atténue progressivement en faveur du second moins déblindé (rouge) qui s'intensifie. De plus, le suivi par RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} vient confirmer la formation du *pseudo*-[2]rotaxane avec la disparition progressive du pic caractéristique des phosphores de l'axe libre qui sont équivalents (singulet bleu) et l'apparition de deux singulets à 3,51 et 3,59 ppm caractéristiques de la formation du *pseudo*-[2]rotaxane (**82**) impliquant la dissymétrisation de l'axe enfilé. L'intégration sur les spectres en <sup>1</sup>H ou <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} permet la détermination d'une constante de formation de 10<sup>3</sup>. Pour cet axe court, seules quelques heures sont nécessaires pour atteindre l'équilibre thermodynamique dans ces conditions.

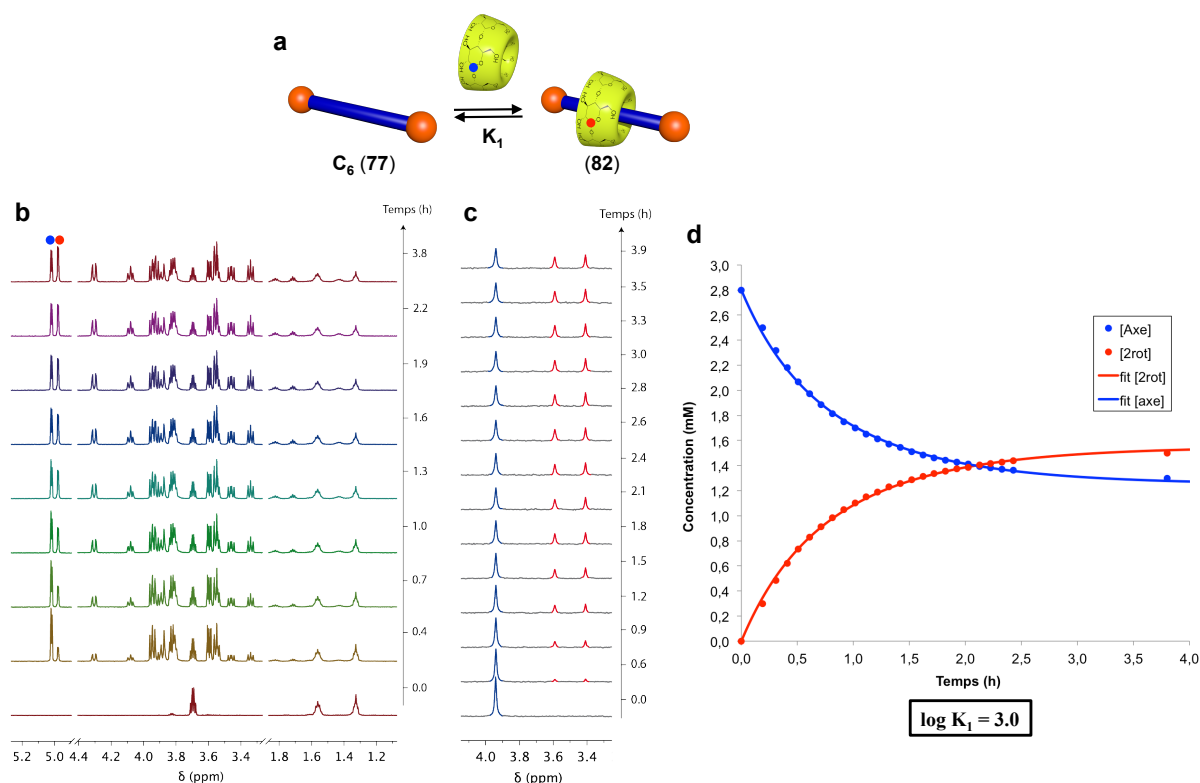


Figure 3.9 : a) Équilibre de formation du *pseudo*-[2]rotaxane de CD avec l'axe  $C_6$  (82) à pH 10 et à température ambiante (25°C) ; Suivi cinétique d'enfilage de la CD native sur l'axe  $C_6$  (77) par RMN  $^1H$  (b) et  $^{31}P\{^1H\}$  (c) ( $D_2O$ , pH 10, 25°C,  $c = 2,8$  mM, mélange 1:1) ; d) Concentrations de l'axe libre et du rotaxane en fonction du temps.

### b. Étude d'enfilage de CD sur l'axe $C_{10}$ à pH 10

Les enfilages des CDs à pH 10 sur les axes à plus de 6 carbones ont été réalisés avec deux équivalents de CDs car nous avons remarqué à pH acide la formation de *pseudo*-[3]rotaxanes. Les suivis par RMN  $^1H$  et  $^{31}P\{^1H\}$  sur l'axe  $C_{10}$  sont présentés sur la Figure 3.10. Comme l'étude à pH 1 et 6, trois doublets sont observés dans la zone des protons anomériques et la RMN du phosphore permet de valider la consommation de l'axe libre 79 (bleu) en faveur du *pseudo*-[2]rotaxane (85) (deux singulet en rouge) puis l'apparition progressive du singulet correspondant à l'axe du *pseudo*-[3]rotaxane (86) (vert). On peut observer qu'après seulement un jour, la quasi totalité de l'axe se trouve sous la forme [2]rotaxane et que l'équilibre thermodynamique n'est atteint qu'après 15-20 jours (d). La vitesse d'enfilage de la première cyclodextrine semble donc déjà diminuée par l'augmentation de la longueur de l'axe par rapport à  $C_6$ . La détermination des constantes de formation du [2]rotaxane et [3]rotaxane est réalisée à partir de l'Équation 3.1 et l'Équation 3.2 et sont de  $10^{3,8}$  et  $10^{2,4}$  respectivement.

$$K_1 = \frac{[2rot]_{eq}}{[Axe]_{eq}[CD]_{eq}} \quad \text{Équation 3.1} \quad K_2 = \frac{[3rot]_{eq}}{[2rot]_{eq}[CD]_{eq}} \quad \text{Équation 3.2}$$

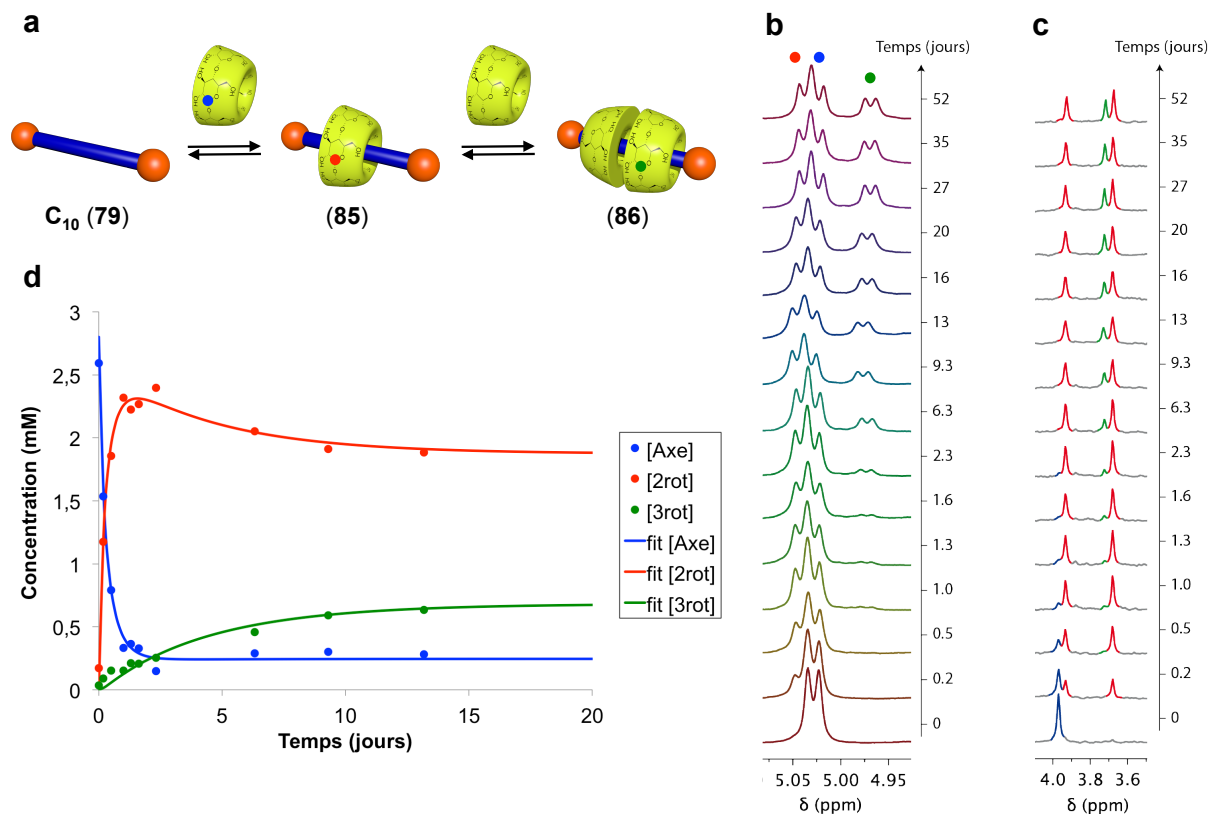


Figure 3.10 : a) Équilibre de formation des rotaxanes de CD avec l'axe  $C_{10}$  à pH 10 et à température ambiante ( $25^\circ C$ ) ; Suivi cinétique d'enfilage de la CD native sur l'axe  $C_{10}$  par RMN  $^1H$  (b) et  $^{31}P\{^1H\}$  (c) ( $D_2O$ , pH 10,  $25^\circ C$ ,  $c = 2,8$  mM, mélange axe/CD 1:2) ; d) Concentrations des différentes espèces en solution en fonction du temps.

L'enfilage des deux équivalents de CD sur l'axe  $C_{10}$  a été répété à  $50^\circ C$ , cette élévation de température permet d'atteindre l'équilibre thermodynamique en seulement quelques heures. La caractérisation des espèces par RMN  $^{31}P\{^1H\}$  est similaire à celle de l'enfilage réalisé à  $25^\circ C$ , mais moins évidente en RMN  $^1H$  du fait de la superposition des protons anomériques des différentes espèces.

### c. Étude générale des axes modèles à pH 10

Les axes  $C_8$  (78) et  $C_{12}$  (80) ont été étudiés dans les mêmes conditions d'enfilage et les graphiques représentant la concentration en chacune des espèces en fonction du temps sont présentés sur la Figure 3.11. On peut observer qu'à pH 10, le *pseudo*-[2]rotaxane est chaque fois « rapidement » formé (quelques jours) et que sa consommation en faveur de la formation du *pseudo*-[3]rotaxane est lente et s'étale sur plusieurs semaines. Comme pour les études à pH

acide, l'axe C<sub>8</sub> semble encore une fois le plus propice à la formation du [3]rotaxane et la détermination des constantes de formation permet de révéler une coopérativité positive dans le cas de cet axe ( $\alpha = 3,2$ ) (Tableau 3.4).

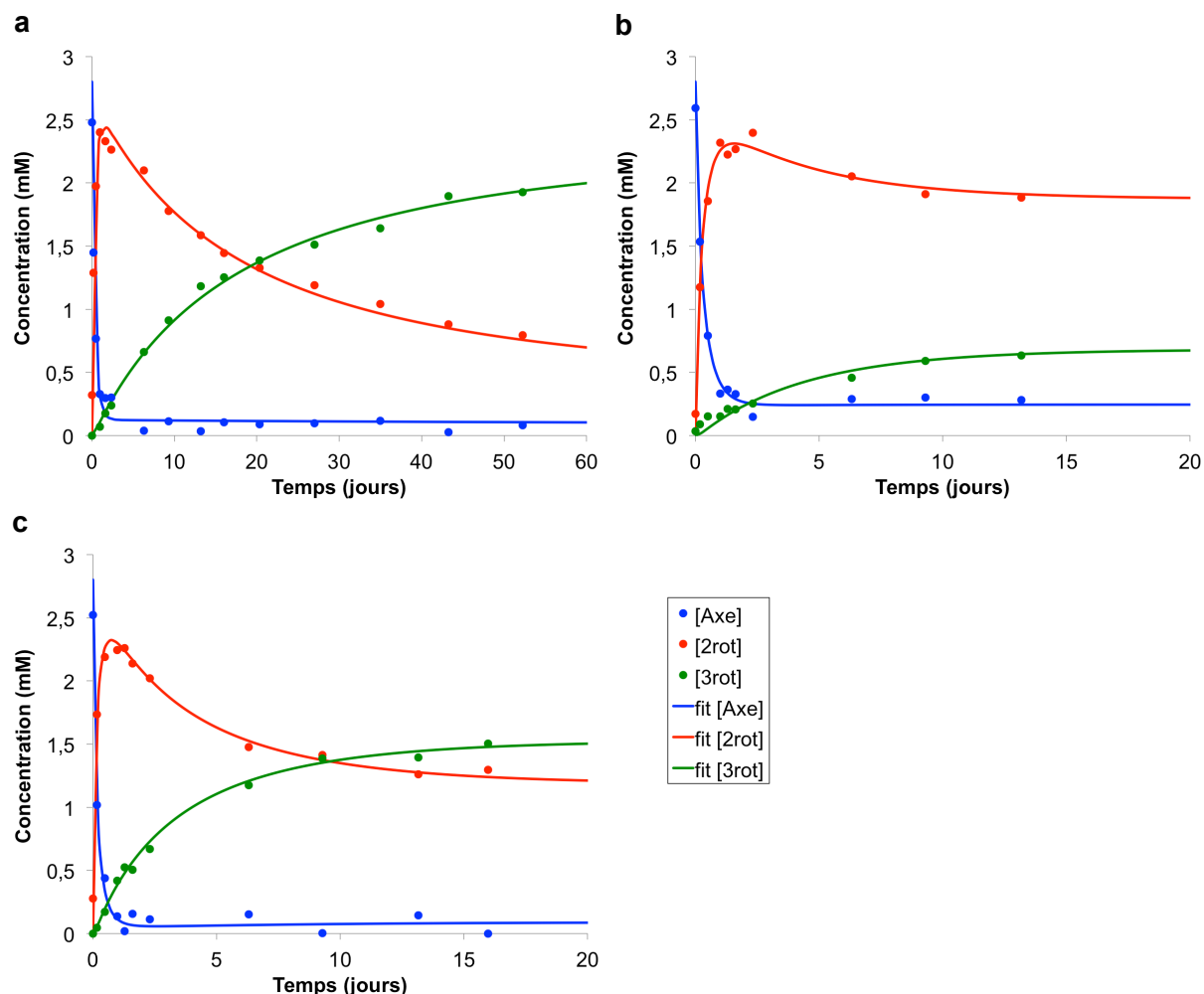


Figure 3.11 : Suivis cinétiques d'enfilage à 25°C de la CD sur les axes C<sub>8</sub> (a), C<sub>10</sub> (b) et C<sub>12</sub> (c)

Tableau 3.4 : Constantes de formation des [2]- et [3]rotaxanes à pH 10 (25°C, c = 2,8 mM) déterminées à partir des équations Équation 3.1 et Équation 3.2 sur les acquisitions <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} et calcul de la coopérativité pour les axes C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>.

	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>
<b>log K<sub>1</sub> ; log K<sub>2</sub></b>	3.0	4.4 ; 4.3	3.8 ; 2.4	6.6 ; 3.6
<b>Coopérativité (<math>\alpha</math>)</b>	-	3.2	0.15	0.0040

La modélisation des suivis cinétiques d'enfilage réalisés à pH 10 sur les axes C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub> nous donne accès aux constantes cinétiques des équilibres de formation des complexes d'inclusion (Figure 3.12) avec  $k_1$  et  $k_2$  ( $k_{-1}$  et  $k_{-2}$ ) les constantes de vitesse de formation (de

dissociation) des [2] et [3]rotaxanes respectivement et  $K_1$  et  $K_2$  les constantes d'équilibre associées.

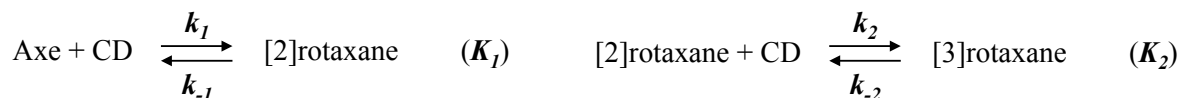


Figure 3.12 : Équilibres de formation du [2] et [3]rotaxanes

Les constantes d'équilibre thermodynamiques sont liées aux constantes cinétiques par l'Équation 3.3.

$$K_i = \frac{k_i}{k_{-i}} \quad \text{Équation 3.3}$$

Tableau 3.5 : Constantes cinétiques et d'équilibre associées à la formation des *pseudo*-[2] et [3]rotaxanes ( $k_i$  en  $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $k_{-i}$  en  $\text{s}^{-1}$ )

	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>
$10^4 k_1$	$761,2 \pm 5,5$	$78,1 \pm 3,9$	$88,2 \pm 4,4$	$185 \pm 12$
$10^7 k_{-1}$	$767 \pm 16$	$10,6 \pm 2,2$	$18,7 \pm 2,8$	$6,4 \pm 2,9$
$10^4 k_2$	-	$2,07 \pm 0,094$	$3,17 \pm 0,47$	$10,71 \pm 0,8$
$10^7 k_{-2}$	-	$0,25 \pm 0,12$	$14 \pm 3,2$	$3,84 \pm 0,86$
$\log(K_1)$ ; $\log(K_2)$	3,0	3,9 ; 3,9	3,7 ; 2,4	4,5 ; 3,4
Coopérativité ( $\alpha$ )	-	4,5	0,19	0,39

L'ensemble des valeurs déterminées par la modélisation des données des suivis cinétiques d'enfilage (Figure 3.9d ; Figure 3.11) sont regroupées dans le Tableau 3.5. Tout d'abord, on peut constater qu'il y a un facteur 10 entre la constante de vitesse de formation du [2]rotaxane **82** (C<sub>6</sub>) et celles des [2]rotaxanes obtenus avec les axes C<sub>8</sub> (**83**), C<sub>10</sub> (**85**) et C<sub>12</sub> (**87**), qui sont elles très proches. Néanmoins la constante de vitesse de dissociation du [2]rotaxane (C<sub>6</sub>) est aussi 40 à 120 fois plus élevée que celles des autres [2]rotaxanes ce qui explique sa constante de formation de  $10^{3,0}$ . On remarque, principalement pour les axes à 8, 10 et 12 carbones, que les constantes cinétiques  $k_1$  et  $k_2$  augmentent avec la longueur de l'axe. Cette tendance s'explique par l'augmentation de l'hydrophobicité de l'axe avec sa longueur qui diminue la barrière d'activation de l'enfilage des cyclodextrines.<sup>[119]</sup> Néanmoins, pour chacun de ces axes, la constante cinétique d'enfilage de la première cyclodextrine ( $k_1$ ) est



toujours plus élevée que celle de la seconde cyclodextrine ( $k_2$ ) du fait de la stabilisation du *pseudo*-[2]rotaxane par rapport à l'axe libre qui augmente la barrière d'activation de l'enfilage de la 2<sup>ème</sup> cyclodextrine. De plus, si lors de la formation du *pseudo*-[2]rotaxane le sens d'enfilage de la CD importe peu, l'enfilage de la deuxième cyclodextrine entraîne la formation du *pseudo*-[3]rotaxane avec les cols primaires ou secondaires face à face. Un sens privilégié d'enfilage de la seconde cyclodextrine pourrait donc avoir pour effet de diminuer la constante cinétique de formation du [3]rotaxane. Si les constantes de vitesse de formation des [3]rotaxanes avec l'axe C<sub>8</sub> (**84**) et C<sub>10</sub> (**86**) sont proches ( $2,07$  et  $3,17 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), la constante de vitesse de dissociation associée au [3]rotaxane C<sub>10</sub> est 60 fois plus élevée que celle du [3]rotaxane (C<sub>8</sub>). Le calcul des constantes thermodynamiques associées aux deux équilibres et de la coopérativité a été réalisé (Tableau 3.5), nous pouvons les comparer aux valeurs obtenues par les équations (Équation 3.1 ; Équation 3.2) et regroupées dans le Tableau 3.4. L'ensemble des constantes semble cohérent et va dans le sens des observations de stabilisation et déstabilisation discutées plus haut. La constante de formation du *pseudo*-[2]rotaxane avec l'axe C<sub>12</sub> déterminée à partir des concentrations des espèces à l'équilibre ( $10^{6,6}$ ) (Équation 3.1) semble assez élevée comparée à l'ensemble des autres constantes déterminées. La modélisation des concentrations des différentes espèces en solution en fonction du temps réalisée sur l'enfilage de CDs sur l'axe C<sub>12</sub> (**80**) étant proches des valeurs expérimentales, on retiendra la valeur de constante de formation  $K_f$  obtenue par cette seconde méthode ( $10^{4,5}$ ) plutôt que celle obtenue sur une seule mesure ( $10^{6,6}$ ).

L'étude cinétique d'enfilage des CDs sur ces axes diphosphatés peut être comparée à celle réalisée par l'équipe de Donal H. Macartney sur l'axe modèle diammonium (**24**).<sup>[103]</sup> La constante de vitesse de formation du *pseudo*-[2]rotaxane de CD avec le 1,12-diammonium dodécane *per*-méthylé **24** est de  $120 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  contre 8 à  $76 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour les axes diphosphatés et la constante de vitesse de dissociation du [2]rotaxane de  $13 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  contre 0,6 à  $76 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Les constantes cinétiques obtenues avec les alcanes diphosphates sont donc proches de celles obtenues avec l'axe **24**, en particulier pour la formation du [2]rotaxane avec l'axe C<sub>6</sub>, et la dissociation des [2]rotaxanes avec les axes C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>. Il semble donc que la barrière d'activation de l'enfilage de la CD sur l'axe C<sub>6</sub> soit proche de celle liée au passage du *pseudo*-bouchon ammonium *per*-méthylé et que la barrière d'activation du désenfilage avec le monomère **24** soit plutôt similaire à celle des axes C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>.

#### 4. Caractérisation des *pseudo*-[2] / [3]rotaxanes diphosphatés

Une caractérisation détaillée des rotaxanes formés a été entreprise afin d'essayer de comprendre l'origine de la stabilisation particulière du [3]rotaxane de  $C_8$ . La RMN a très largement été utilisée pour mettre en évidence l'inclusion des axes dans la cavité des cyclodextrines et la position des groupements phosphate. A pH 10, les pics caractéristiques des différentes espèces en solution sont plus éclatés qu'à pH acides (Figure 3.13) ce qui facilite leur attribution, néanmoins il semble difficile d'isoler les *pseudo*-[3]rotaxanes seuls à pH 10 au vu des suivis cinétiques d'enfilage. *A contrario*, en condition acide il est possible de réaliser la formation quasi quantitative d'une seule espèce. Ainsi, il semble possible de former quantitativement le *pseudo*-[3]rotaxane à pH acide, de le vérifier par RMN  $^1H$  et  $^{31}P\{^1H\}$ , puis de basculer à pH 10 par ajout de carbonate de potassium pour obtenir un spectre plus facilement interprétable. Cette expérience nous permet aussi de vérifier la stabilité du [3]rotaxane lors du changement de pH. La déprotonation des *pseudo*-bouchons permet donc le piégeage cinétique du *pseudo*-[3]rotaxane. Cette méthode de synthèse des [3]rotaxanes a été utilisée pour les axes  $C_8$ ,  $C_{10}$  et  $C_{12}$  et a permis leur caractérisation complète par RMN.

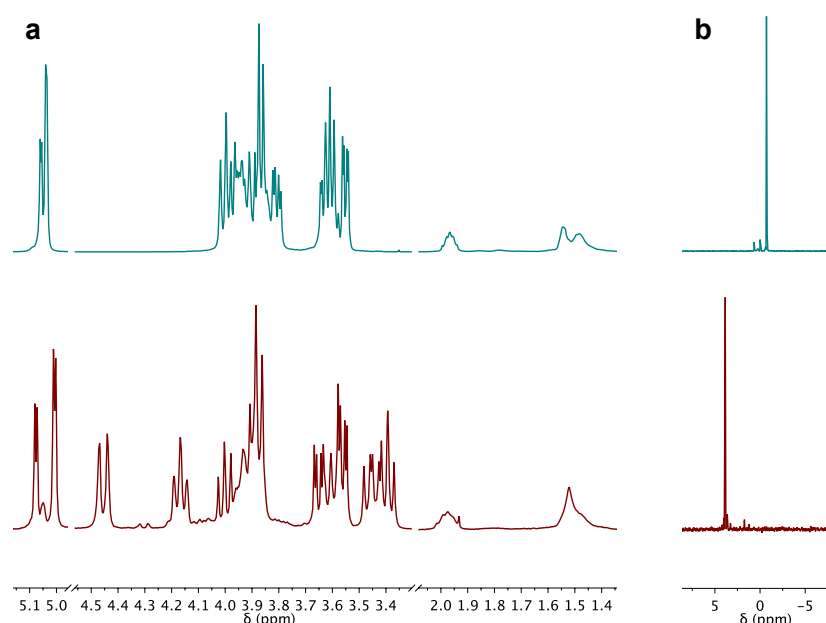


Figure 3.13 : Superposition de spectres RMN  $^1H$  (a) et  $^{31}P\{^1H\}$  (b) d'une solution d'axe  $C_8$  (**78**) ( $c = 2,8$  mM) et de cyclodextrine en mélange 1:3 dans  $D_2O$  à pH 1 (en haut), puis après ajout de  $K_2CO_3$  jusqu'à pH 10 (en bas).

**a. Caractérisation du *pseudo*-[2]rotaxane (C<sub>6</sub>)**

L'échantillon de *pseudo*-[2]rotaxane de l'axe C<sub>6</sub> (**82**) caractérisé en RMN a été obtenu en mélangeant 2 équivalents de cyclodextrine avec un équivalent d'axe conditionné à pH 10 (c = 15 mM) et en attendant que la solution soit à l'équilibre à température ambiante. La CD en excès permet de s'affranchir de la présence d'axe libre à l'équilibre. Le spectre <sup>1</sup>H de l'échantillon ainsi que son attribution sont présentés en Figure 3.14. On peut remarquer que les deux protons H<sup>6</sup> ne sont pas équivalents (pics à 3,52 et 4,37 ppm) et que les signaux des H<sup>3</sup> et H<sup>5</sup> sont bien séparés ; ce sont eux qui vont nous permettre de discuter de l'inclusion de l'axe dans la cavité. De plus, on observe bien les quatre multiplets caractéristiques des quatre méthylènes du milieu de chaîne, leur intégration pour 2 protons chacun validant l'absence d'axe libre résiduel. Les expériences RMN 2D TROESY (<sup>1</sup>H) et HOESY (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}/<sup>1</sup>H) ont été réalisées (Figure 3.15), l'HOESY étant l'équivalent hétéro-nucléaire de l'expérience NOESY, elle permet ici de mettre en évidence la proximité spatiale entre phosphores et protons. Les corrélations NOE des protons H<sup>3</sup> et H<sup>5</sup> avec les méthylènes H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>c</sub> et H<sub>c'</sub> confirment que l'interaction de l'axe avec la CD se fait bien par l'inclusion de celui-ci dans la cavité hydrophobe de la CD. De plus la corrélation entre H<sup>5</sup> et H<sub>a</sub> et l'absence de corrélation entre H<sup>5</sup> et H<sub>c'</sub> indiquent que la cyclodextrine n'est pas centrée sur l'axe mais plutôt décalée avec le col primaire vers un bout de chaîne. L'expérience HOESY est venue confirmer cette position en révélant les corrélations d'un des phosphores avec les protons H<sup>5</sup> et les protons H<sup>6a</sup> (H<sup>6a</sup> et H<sup>6b</sup> étant diastéréotopiques). Ces deux caractérisations ont permis de prouver l'inclusion de l'axe C<sub>6</sub> dans la cavité de l' $\alpha$ -CD et la position privilégiée du col primaire de la CD à proximité d'un *pseudo*-bouchon phosphate. Cette position peut être rationalisée en considérant la formation de liaisons hydrogène entre le phosphate et les hydroxyles primaires de la CD spatialement proches.

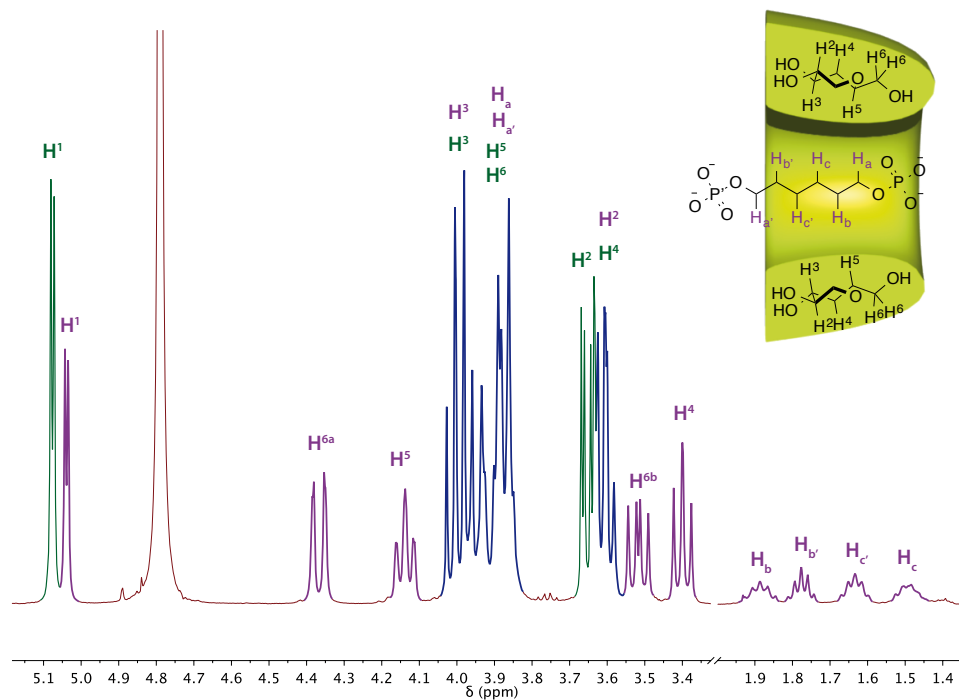


Figure 3.14 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) du *pseudo*-[2]rotaxane **82** ( $\text{C}_6$ ) ; CD enfilée en violet, CD libre en vert, et les superpositions en bleu.

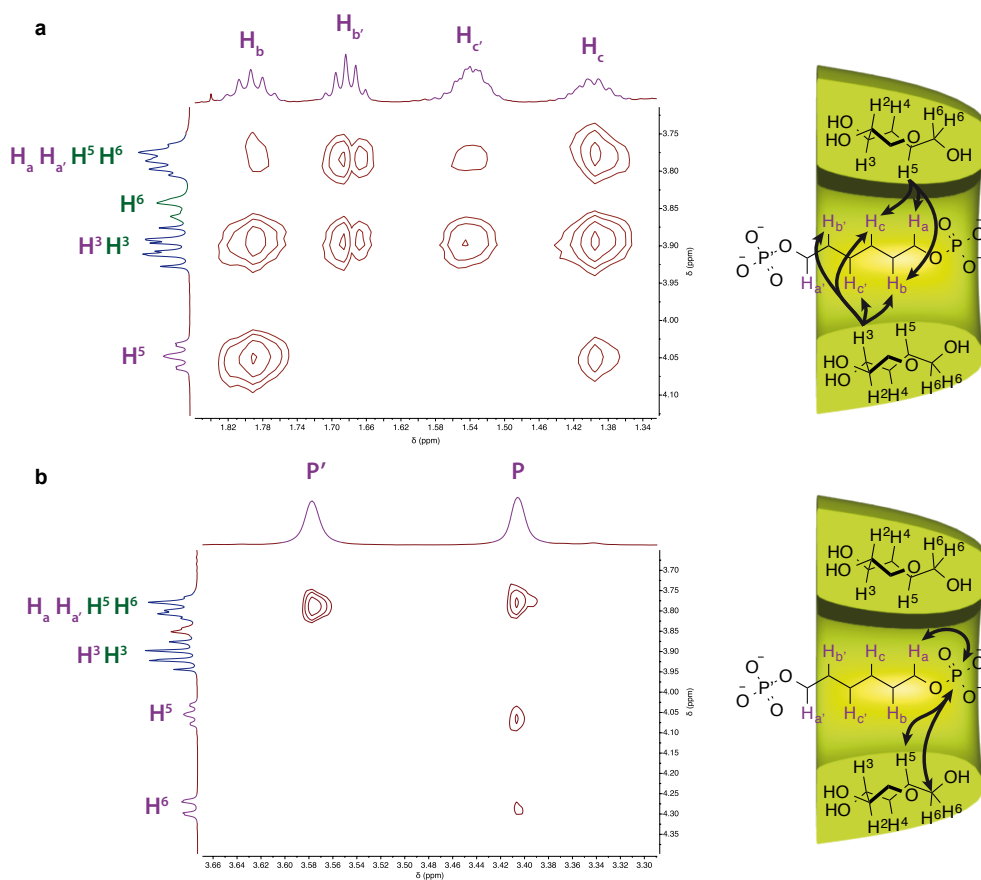


Figure 3.15 : RMN TROESY  $^1\text{H}$  (a) et HOESY ( $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}/^1\text{H}$ ) (b) (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300K) du *pseudo*-[2]rotaxane **82** ( $\text{C}_6$ ) ; CD enfilée en violet, CD libre en vert, et les superpositions en bleu.

**b. Caractérisation du *pseudo*-[3]rotaxane (C<sub>8</sub>)**

La caractérisation des *pseudo*-[3]rotaxanes par les mêmes expériences RMN développées sur le *pseudo*-[2]rotaxane de l'axe C<sub>6</sub> devrait nous permettre de juger d'une part de l'arrangement des deux cyclodextrines sur le monomère, mais aussi de postuler des hypothèses quant aux variations de stabilité des rotaxanes en fonction de la longueur de l'axe. Ainsi, nous avons réalisé la préparation quantitative du *pseudo*-[3]rotaxane **84** avec l'axe C<sub>8</sub> en mélangeant à pH 1, un équivalent d'axe C<sub>8</sub> (c = 15 mM) avec 2,6 équivalents de CD native dans l'eau deutérée puis en ajoutant du carbonate de potassium pour rehausser le pH à 10. Le spectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} ne présente qu'un seul singulet caractéristique du [3]rotaxane et valide l'absence d'axe libre et de *pseudo*-[2]rotaxane dans l'échantillon.

Les expériences de RMN 2D ont été réalisées (Figure 3.16) et, comme précédemment, l'inclusion de l'axe à l'intérieur des CDs est validée par la RMN 2D TROESY et les corrélations entre le proton H<sup>5</sup> pointant à l'intérieur de la cavité et les protons de la chaîne carbonée (H<sub>b</sub>, H<sub>c/d</sub>). L'expérience TROESY ne permet cependant pas de conclure sur l'orientation des CDs car le proton H<sup>3</sup> est superposé aux protons H<sub>a</sub>. Néanmoins, l'expérience hétéro-nucléaire apporte la preuve que les CDs sont orientées avec leur col secondaire face à face grâce aux corrélations entre les phosphores de l'axe et les protons H<sup>5</sup> et H<sup>6</sup>. Ainsi, l'arrangement des CDs natives sur l'axe C<sub>8</sub> est similaire à celui observé sur les [3]rotaxanes présentés dans le chapitre 2. La position de la CD sur le *pseudo*-[2]rotaxane de l'axe C<sub>6</sub> est elle aussi cohérente. La cyclodextrine semble donc bien stabilisée par le phosphate déprotoné, et la longueur de l'axe C<sub>8</sub> semble permettre la stabilisation simultanée des deux phosphates et peut expliquer que la formation du *pseudo*-[3]rotaxane soit si favorisée par rapport aux axes C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>. En effet, la distance entre les deux phosphores de l'axe C<sub>8</sub> est d'environ 14 Å quand les α-CDs ont une hauteur de 7,8 Å (Tableau 1) et sont dans la plupart des structures cristallographiques arrangées avec les cols secondaires face à face à une distance d'environ 2,8 Å.<sup>[109c]</sup> Ces dimensions sont donc cohérentes avec la position du phosphate dans la structure [3]rotaxane déterminée par RMN.

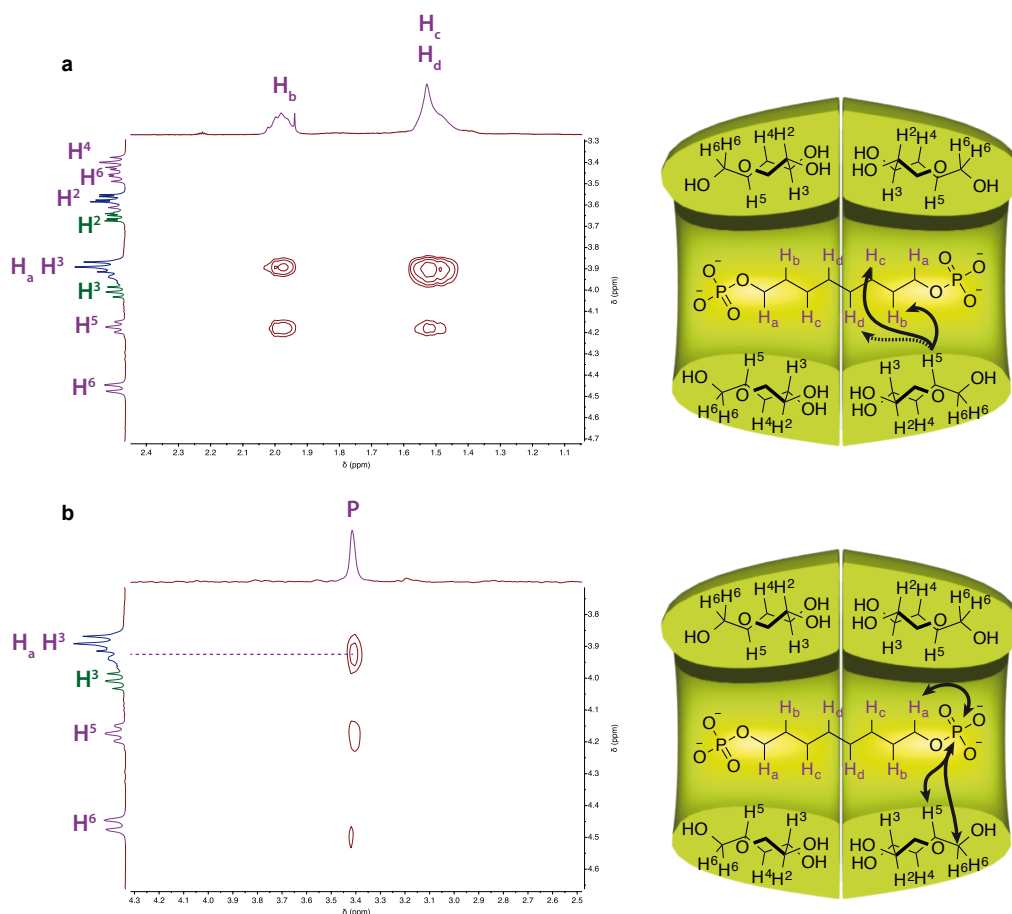


Figure 3.16 : RMN TROESY  $^1\text{H}$  (a) et HOESY ( $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}/^1\text{H}$ ) (b) (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) du *pseudo*-[3]rotaxane **84** ( $\text{C}_8$ ) ; CD enfilée formant le [3]rotaxane en violet, CD libre en vert, et les superpositions en bleu.

### c. Caractérisation des *pseudo*-[3]rotaxanes ( $\text{C}_{10}$ et $\text{C}_{12}$ )

Les synthèses des *pseudo*-[3]rotaxanes avec l'axe  $\text{C}_{10}$  (**86**) et  $\text{C}_{12}$  (**88**) ont été réalisées suivant la même méthode (ajout de 2,2 équivalents de CDs à pH 1 avant de basculer à pH 10). Les mêmes conclusions ressortent de l'analyse des RMN 2D avec l'axe  $\text{C}_{10}$ , orientation des cols primaires vers les *pseudo*-bouchons et corrélations spatiales des phosphores avec les  $\text{H}^5$  et  $\text{H}^6$  des CDs (Annexes 6-8). Toutefois, si la caractérisation du rotaxane avec l'axe  $\text{C}_{12}$  permet de confirmer par RMN TROESY l'inclusion de l'axe dans les cavités des CDs et l'orientation des cols secondaires vers le centre de la chaîne carbonée (Annexe 9-10), l'expérience HOESY ne permet plus de montrer la proximité spatiale entre les phosphores et le col primaire (Annexe 11). Cette absence de corrélation permet de faire l'hypothèse que le réseau de liaisons hydrogène entre les deux cols secondaires est plus stabilisant que l'interaction entre les phosphates et les cols primaires. L'hypothèse d'un rotaxane figé en

solution avec les deux CDs qui resteraient du même côté de l'axe semble aussi peu probable (la symétrie du spectre  $^1\text{H}$  allant aussi dans ce sens).

#### **d. Étude des *pseudo*-[3]rotaxanes par diffraction des rayons X**

Pour apporter des preuves structurales supplémentaires à notre étude des rotaxanes issus d'axes diphosphatés, nous avons tenté différentes voies de cristallisation en jouant sur la charge des *pseudo*-bouchons. En effet, nous avons constaté que les *pseudo*-[3]rotaxanes se dissociaient instantanément dans le DMF à pH acide, mais lorsque le pH est réhaussé à 10, ces rotaxanes précipitent dans le DMF tandis que la CD libre reste soluble. La cristallisation des [3]rotaxanes a alors été réalisée en faisant diffuser du DMF dans une solution de *pseudo*-[3]rotaxane à pH 10. Trois structures cristallines de [3]rotaxanes ont été obtenues avec les monomères  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{10}$  et  $\text{C}_{12}$ .

#### **i. Structure cristallographique du *pseudo*-[3]rotaxane ( $\text{C}_8$ )**

Le *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe octane-diphosphate (**84**) cristallise dans un groupe d'espace tétragonal  $P4_22_12$  avec une maille élémentaire caractérisée par un volume de  $13,3 \times 10^3 \text{ \AA}^3$  ( $a = b = 23,43 \text{ \AA}$  ;  $c = 24,28 \text{ \AA}$  ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ). L'unité asymétrique est constituée d'un demi rotaxane. La distance moyenne des oxygènes face à face ( $\text{O}_2\text{-O}_2$  ou  $\text{O}_3\text{-O}_3$ ) entre les deux cols secondaires est de  $2,82 \text{ \AA}$  et est cohérente avec d'autres structures cristallographiques de [3]rotaxanes de cyclodextrine,<sup>[109c]</sup> elle est suffisamment courte pour permettre la formation de liaisons hydrogène entre les deux cols. La distance entre les deux phosphores est de  $14,07 \text{ \AA}$ , les angles entre les méthylènes de la chaîne carbonée réguliers à  $121,09^\circ$  avec des angles dièdres à  $179,01^\circ$  en moyenne. Ces mesures permettent de juger de la conformation *trans* de l'axe au sein de la structure rotaxane et comme on peut le voir sur la Figure 3.17, l'axe est bien centré au centre des cavités. Les distances entre les oxygènes du *pseudo*-bouchon et les oxygènes du col primaire les plus proches sont comprises entre  $2,59$  et  $2,70 \text{ \AA}$  ce qui permet là aussi d'envisager la formation de liaisons hydrogène courtes et stabilisantes.

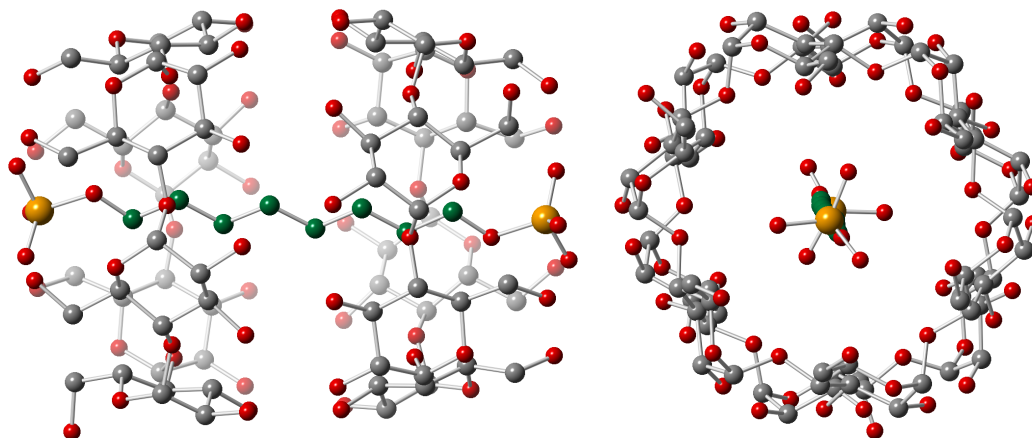


Figure 3.17 : Vues orthogonales de la structure cristallographique du *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe  $C_8$  (**84**). Les atomes de carbones de l'axe ont été colorés en vert et les atomes d'hydrogènes masqués par souci de clarté.

## ii. Structure cristallographique du *pseudo*-[3]rotaxane ( $C_{10}$ )

La structure cristallographique du *pseudo*-[3]rotaxane obtenue avec l'axe  $C_{10}$  (**86**) est présentée en Figure 3.18. Cristallisant dans un groupe d'espace tétragonal  $P4_32_12$ , la maille est caractérisée par un volume de  $26,5 \times 10^3 \text{ \AA}^3$  ( $a = b = 23,32 \text{ \AA}$  ;  $c = 48,78 \text{ \AA}$  ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ) et une unité asymétrique constituée d'un rotaxane. La particularité de cette structure cristallographique est la contraction du monomère  $C_{10}$  sous forme hélicoïdale au sein des deux cavités des CD. En effet, on peut remarquer que la distance entre les oxygènes des cols secondaires est de  $2,82 \text{ \AA}$  en moyenne (distance O-O face à face), que les oxygènes des *pseudo*-bouchons sont à une distance moyenne de  $2,65 \text{ \AA}$  des oxygènes du col primaire (de  $2,55$  à  $2,73 \text{ \AA}$ ) et que la distance entre les deux phosphores est de  $14,20 \text{ \AA}$ , soit des distances similaires à celle de l'axe  $C_8$  au sein de la structure [3]rotaxane **84**. Ces paramètres sont obtenus grâce à la torsion de la chaîne carbonée du monomère  $C_{10}$  centrée dans les cavités des cyclodextrines caractérisée par des angles dièdres de  $175.64$ ,  $65.13$ ,  $52.15$ ,  $51.58$ ,  $50.89$ ,  $64.37$  et  $171.27^\circ$ . Ainsi, la stabilisation de la structure par la reconnaissance des cols secondaires et la formation de liaisons hydrogène entre les *pseudo*-bouchons et les cols primaires semble supérieure à la déstabilisation due à la torsion et contraction du monomère.



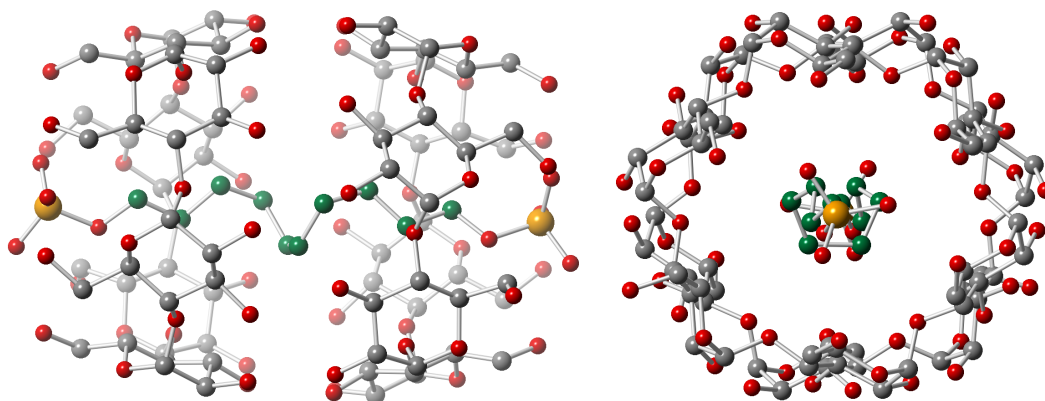


Figure 3.18 : Vues orthogonales de la structure cristallographique du *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe  $C_{10}$  (86). Les atomes de carbones de l'axe ont été colorés en vert et les atomes d'hydrogènes masqués par souci de clarté.

### iii. Structure cristallographique du *pseudo*-[3]rotaxane ( $C_{12}$ )

Le *pseudo*-[3]rotaxane résultant de l'enfilage de deux cyclodextrines natives sur le dodécane-diphosphate (88) cristallise dans un groupe d'espace monoclinique  $P2_1$  avec une unité asymétrique composée d'un rotaxane et demi et une maille d'un volume total de  $14,4 \times 10^3 \text{ \AA}^3$  ( $a = 22,94 \text{ \AA}$  ;  $b = 13,97 \text{ \AA}$  ;  $c = 44,77 \text{ \AA}$  ;  $\alpha = \gamma = 90,0^\circ$  ;  $\beta = 92,7^\circ$ ). Comme on peut le constater sur la Figure 3.19, le rotaxane est similaire à celui obtenu avec l'axe  $C_8$  en deux points. Les cols secondaires des CD sont proches l'un de l'autre avec une distance moyenne entre les oxygènes face à face de  $2,85 \text{ \AA}$ . Et l'un des *pseudo*-bouchons est aligné avec le col primaire de la cyclodextrine avec des distances entre les oxygènes du phosphate et ceux des hydroxyles primaires comprises entre  $2,51$  et  $2,86 \text{ \AA}$  permettant donc la formation de liaisons hydrogène. Pour autant la structure cristalline montre bien que la longueur de l'axe est trop grande avec un *pseudo*-bouchon et quatre carbones vicinaux dépassant du col primaire de la seconde cyclodextrine. Si l'axe  $C_{12}$  est tout aussi linéaire et centré au sein des cavités des CD que l'est l'axe  $C_8$ , il se distingue par ce bout de chaîne possédant un angle de torsion de  $77,79^\circ$  entre ces quatre carbones extérieurs et des angles entre méthylènes de  $115,03^\circ$  en moyenne. La courbure de cette extrémité permet de rapprocher le phosphate pointant vers l'extérieur de la cavité vers un oxygène d'un hydroxyle primaire à une distance de  $2,70 \text{ \AA}$  et au niveau intermoléculaire à des distances de  $2,58$  et  $2,66 \text{ \AA}$  des hydroxyles secondaires  $O(2)H$  d'une CD d'un autre rotaxane. Ainsi il semble que la cristallisation de ce rotaxane passe par la stabilisation d'un *pseudo*-bouchon au sein du col primaire d'une CD et du second via des liaisons H intra- et intermoléculaires. On sait qu'en solution cette

stabilisation du phosphate au niveau du col primaire ( $H^5$ ,  $H^6$ ) n'intervient pas ou peu d'après les études RMN et en particulier l'expérience HOESY.

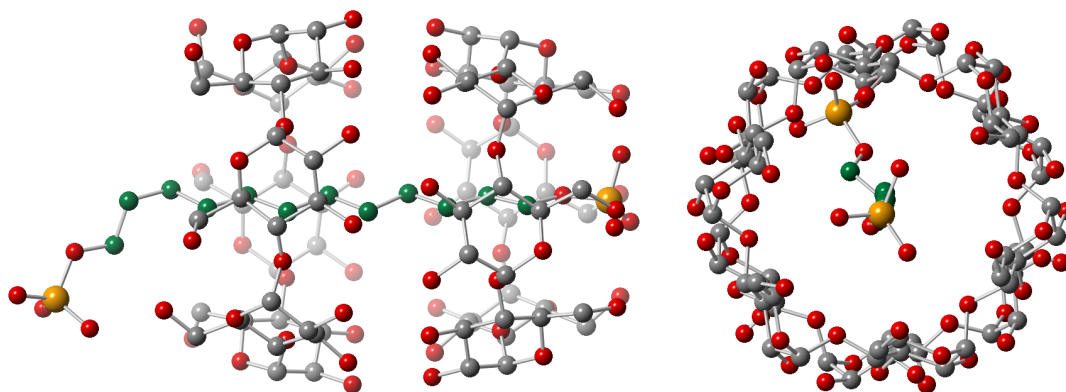


Figure 3.19 : Vues orthogonales de la structure cristallographique du *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe  $C_{12}$  (**88**). Les atomes de carbones de l'axe ont été colorés en vert et les atomes d'hydrogènes masqués par souci de clarté.

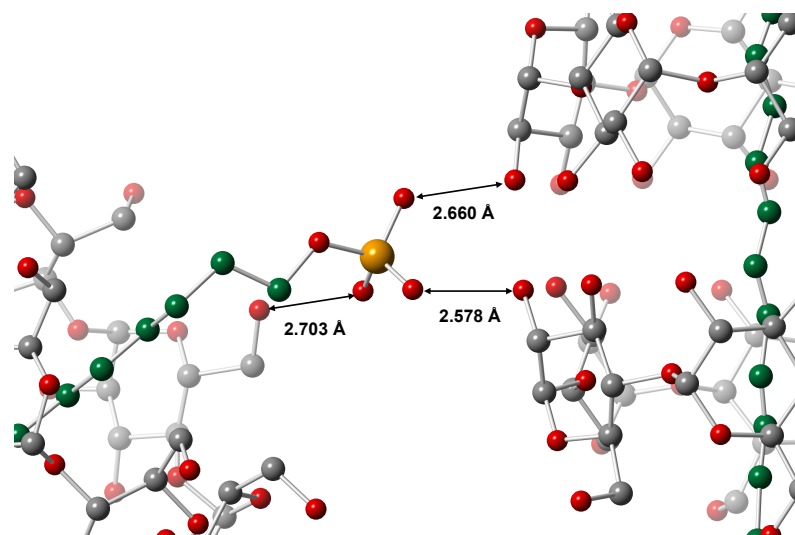


Figure 3.20 : Distances entre les oxygènes du phosphate extérieur du *pseudo*-[3]rotaxane **88** ( $C_{12}$ ) et un oxygène du col primaire (intramoléculaire) et deux oxygènes des cols secondaires (intermoléculaire) des cyclodextrines. Les atomes de carbones de l'axe ont été colorés en vert et les atomes d'hydrogènes masqués par souci de clarté.

L'analyse des structures cristallographiques va dans le sens des résultats obtenus en solution avec un axe à huit carbones présentant une longueur adéquate pour la stabilisation des cols secondaires entre eux et celle des phosphates au niveau des cols primaires le tout par liaisons hydrogènes. L'étude du [3]rotaxane **88** à l'état solide est intéressante car elle met en évidence la possible stabilisation intermoléculaire du *pseudo*-bouchon extérieur à l'état solide. On peut imaginer qu'en solution les deux CDs restent « jointes » et basculent d'un phosphate

à l'autre avec l'agitation thermique rendant chaque fois le second *pseudo*-bouchon solvatable par les contre-ions ou par liaisons H avec le solvant. Le décane-diphosphate montre lui une torsion inattendue de la chaîne carbonée au sein des cavités révélatrice de la stabilisation qu'apporte la position des phosphates centrés à hauteur du col primaire des CDs. Si cette structure peut être obtenue par cristallisation, on a vu que la formation du *pseudo*-[3]rotaxane n'était pas du tout favorisée avec cet axe C<sub>10</sub>. On peut faire l'hypothèse qu'en solution cette stabilisation des deux phosphates à la fois peut se produire mais est associée à une contraction de la chaîne de l'axe qui déstabilise le complexe. L'expérience HOESY du *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe C<sub>10</sub> permet de valider une proximité spatiale entre les phosphores et les H<sup>5</sup> et H<sup>6</sup>.

### 5. Mise à profit des *pseudo*-bouchons sensibles au pH pour la synthèse de rotaxanes

#### a. Purification des *pseudo*-[3]rotaxanes

Si la présence d'un léger excès de CDs (> 2 eq) à pH acide permet de consommer totalement l'axe libre pour former le [3]rotaxane à des concentrations de 3 à 15 mM, la présence de CDs libres peut difficilement être évitée. La faible solubilité des rotaxanes déprotonés dans le DMF permet néanmoins d'en réaliser la purification par précipitation (ou cristallisation). Ainsi, le passage en condition basique permet d'élever la barrière énergétique du passage de la cyclodextrine au dessus du *pseudo*-bouchon. Sur la Figure 3.21, le spectre <sup>1</sup>H d'un échantillon de [3]rotaxane obtenu avec l'axe C<sub>8</sub> présentant de la CD libre (a) est superposé à l'échantillon obtenu après précipitation dans le DMF froid, filtration et rinçage par du DMF puis de l'éther diéthylique (b), son spectre <sup>1</sup>H, toujours à pH 10, permet d'observer l'atténuation des pics caractéristiques de la CD libre. Cette étape de purification a été réalisée à trois reprises mais des traces de CDs libres persistent et on ne parvient pas à la pureté obtenue par cristallisation (c).

Cette méthode de purification par précipitation et lavage au DMF permet de mettre en évidence la stabilité du [3]rotaxane qui, lorsqu'il est totalement déprotoné, ne se trouve plus en équilibre avec sa forme dissociée à température ambiante. Néanmoins elle ne permet que la séparation du rotaxane et de la CD libre car l'axe libre et le *pseudo*-[2]rotaxane ne sont pas non plus solubles dans le DMF. C'est la conversion totale de l'axe libre sous la forme [3]rotaxane à pH acide qui permet de s'affranchir de la séparation des [2] et [3]rotaxanes, voire de l'axe libre une fois à pH 10, lorsque le rotaxane est piégé cinétiquement.

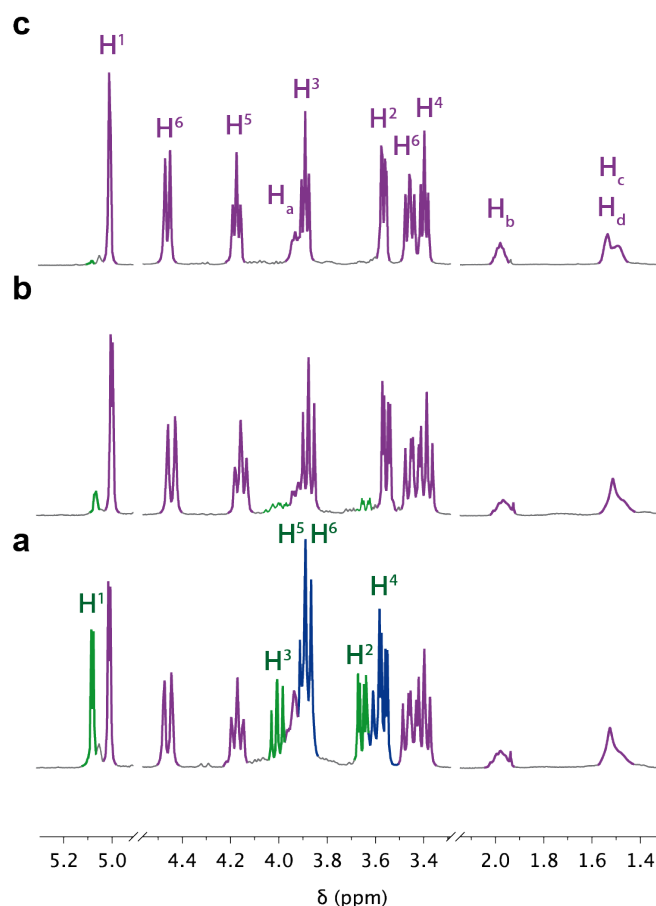


Figure 3.21 : Superposition de spectres RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) d'un échantillon de *pseudo*-[3]rotaxane d'axe  $\text{C}_8$  (**84**) à pH 10 préparé avec un excès de CD avant purification par précipitation dans le DMF (a) et après (b) ; Comparaison avec les cristaux du [3]rotaxane **84** ( $\text{C}_8$ ) dissout dans une solution de  $\text{D}_2\text{O}$  à pH 10 (c)

### b. Synthèse contrôlée de *pseudo*-[2]rotaxanes

Parvenant à synthétiser les *pseudo*-[3]rotaxanes purs, nous nous sommes intéressés à la synthèse sélective des *pseudo*-[2]rotaxanes (**83**, **85** et **87**). Afin d'obtenir quantitativement les [2]rotaxanes, nous avons utilisé l'enfilage lent de la cyclodextrine à température ambiante lorsque l'axe est déprotoné. Le suivi cinétique d'enfilage d'un mélange 1 pour 1 en axe et CD a été réalisé et permet d'obtenir après 9 jours le [2]rotaxane avec seulement des traces d'axe libre ou de [3]rotaxane avec les axes  $\text{C}_{10}$  (Figure 3.22b) et  $\text{C}_{12}$  (c). La formation favorisée du *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe  $\text{C}_8$  n'a pas permis d'isoler le complexe d'inclusion 1 pour 1 (a).

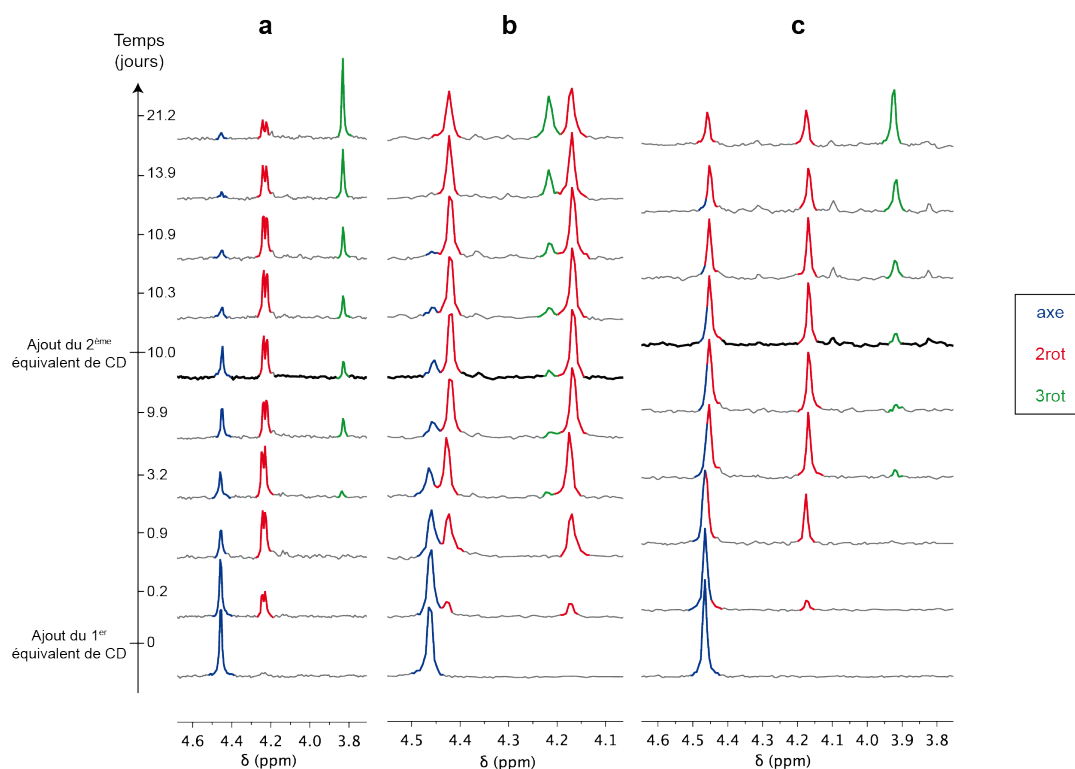


Figure 3.22 : Suivis cinétiques d'enfilage d' $\alpha$ -CD sur les axes C<sub>8</sub> (a), C<sub>10</sub> (b) et C<sub>12</sub> (c) à pH 10 par RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O). La CD est ajoutée un équivalent après l'autre. Axe libre en bleu, *pseudo*-[2]rotaxane en rouge, *pseudo*-[3]rotaxane en vert.

La caractérisation des *pseudo*-[2]rotaxanes de C<sub>10</sub> (**85**) et C<sub>12</sub> (**87**) a été réalisée par RMN et est détaillée dans les Annexes 12-15. Les spectres  $^1\text{H}$  démontrent l'obtention des [2]rotaxanes avec seulement des traces des autres composés. Les expériences HOESY ( $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}/^1\text{H}$ ) ont été effectuées, et si elles ne permettent pas directement d'attribuer une position privilégiée de la CD sur l'axe car seules les corrélations spatiales entre les méthylènes en  $\alpha$  des phosphates et le phosphore sont visibles, on peut supposer par analogie avec le *pseudo*-[2]rotaxane de C<sub>6</sub> que le phosphore le plus blindé correspond au *pseudo*-bouchon qui se trouve face au col primaire. La corrélation observée en HOESY entre un phosphate de l'axe C<sub>6</sub> et le col primaire de la CD sera donc due à la longueur réduite de l'axe induisant, quelque soit la position de la CD, une proximité spatiale entre le phosphore et les protons H<sup>5</sup> et H<sup>6</sup>.

Ce procédé de synthèse sélective du [2]rotaxane est extrêmement intéressante car il signifie que nous pouvons réaliser l'enfilage d'une première cyclodextrine (CD<sub>1</sub>) à pH 10 jusqu'à l'obtention quantitative du *pseudo*-[2]rotaxane et ajouter une seconde cyclodextrine (CD<sub>2</sub>) pour compléter l'enfilage et parvenir à la synthèse quantitative d'un *pseudo*-[3]rotaxane recouvert par deux cyclodextrines différentes. Dans ce cas, il faut s'assurer que

l'enfilage de la deuxième CD ne provoque pas le désenfilage de la première et c'est ce sur quoi nous travaillons en ce moment.

### c. Caractérisation par RMN DOSY $^1\text{H}$

Nous sommes donc parvenus à isoler trois *pseudo*-[2]rotaxanes (avec les axes  $\text{C}_6$  (**82**),  $\text{C}_{10}$  (**85**) et  $\text{C}_{12}$  (**87**)) et trois *pseudo*-[3]rotaxanes (avec les axes  $\text{C}_8$  (**84**),  $\text{C}_{10}$  (**86**) et  $\text{C}_{12}$  (**88**)), leur caractérisation a été complétée par spectrométrie de masse (voir partie expérimentale) et par RMN DOSY  $^1\text{H}$  dont un exemple est présenté en Annexe 16. Les coefficients de diffusion ( $D$ ) obtenus pour les différents rotaxanes sont récapitulés dans le Tableau 3.6. Ils viennent confirmer que la vitesse de diffusion des [3]rotaxanes est plus faible que celle des [2]rotaxanes, elle-même plus faible que celle de la CD libre. La même tendance est observable lorsque la longueur de l'axe augmente pour les [2]rotaxanes.

Tableau 3.6 : Coefficients de diffusion ( $D$ ) des différents rotaxanes ( $c = 15 \text{ mM}$  ;  $\text{D}_2\text{O}$  ;  $\text{pH } 10$  ;  $25^\circ\text{C}$ ). \*Déterminé sur les traces de CD libre ou [3]rotaxanes présents dans les échantillons. \*\*erreur  $< 0.033 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

$D^{**}$ ( $\times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\text{C}_6$	$\text{C}_8$	$\text{C}_{10}$	$\text{C}_{12}$
$\alpha\text{-CD}$	2.69*	2.60*	-	-
[2]RotCD	2.55	-	2.41	2.34
[3]RotCD	-	2.09	1.94 (2.15*)	1.95 (2.10*)

### 6. Mise en perspective de l'étude des monomères diphosphates

L'étude réalisée sur les axes  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{10}$  et  $\text{C}_{12}$  à différents pH a permis de mettre en évidence, par de multiples techniques d'analyses, la formation de complexes d'inclusion avec une ou deux cyclodextrines. Si seul le *pseudo*-[2]rotaxane est obtenu avec l'hexane-diphosphate, l'élongation de la chaîne dès 8 carbones permet la formation des *pseudo*-[2] et [3]rotaxanes. En particulier, les ajouts dosés réalisés à pH 6 sur les axes  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{10}$  et  $\text{C}_{12}$  révèlent soit une stabilisation du [3]rotaxane avec l'octane-diphosphate, soit une déstabilisation de cette structure avec le décane-diphosphate. Des éléments de réponse nous sont apportés par les études RMN et les structures cristallines. En effet, l'expérience HOESY ( $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}/^1\text{H}$ ) met en avant la proximité spatiale entre les protons  $\text{H}^5$  et  $\text{H}^6$  du col primaire des cyclodextrines et les phosphores des axes  $\text{C}_8$  et  $\text{C}_{10}$  mais pas avec l'axe  $\text{C}_{12}$ . Ainsi, si on envisage la stabilisation des phosphates avec les cols primaires des cyclodextrines par liaisons

hydrogène, le dodécane-diphosphate semble trop long pour qu'elle se réalise. Pourtant, la formation du *pseudo*-[3]rotaxane est plus favorisée avec l'axe C<sub>12</sub> qu'avec l'axe C<sub>10</sub> à pH acide. La diffraction des rayons X sur ces structures permet d'émettre d'autres hypothèses. Tout d'abord, l'axe C<sub>8</sub> semble avoir la taille adéquate pour permettre une complémentarité entre les cols secondaires des cyclodextrines par liaisons hydrogène et la stabilisation des deux phosphates par les cols primaires ce qui est en accord avec une constante de formation du [3]rotaxane élevée et une coopérativité positive. La structure obtenue avec l'axe C<sub>10</sub> possède des dimensions similaires permettant l'ensemble de ses stabilisations mais au détriment de la linéarité de la chaîne carbonée qui subit une torsion hélicoïdale impliquant une déstabilisation de la structure. Si cette contraction de la chaîne alkyle se produit à l'état solide lors de la cristallisation, nous n'avons pour le moment aucune preuve que la contraction se produit en solution : l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H ne permet pas d'accéder aux constantes de couplage entre les méthylènes qui pourraient nous indiquer des changements d'angles dièdres, néanmoins on peut noter que l'intensité de la corrélation HOESY entre le phosphore et les protons H<sup>5</sup> et H<sup>6</sup> est plus faible sur la structure *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe C<sub>10</sub> qu'avec l'axe C<sub>8</sub>. Les cristaux obtenus avec l'axe C<sub>12</sub> montrent quant à eux que l'axe est trop long pour adopter l'un ou l'autre des comportements, ainsi il possède un phosphate au niveau du col primaire de la première cyclodextrine et son autre extrémité de chaîne à l'extérieur de la cavité. L'absence de corrélation H<sup>5</sup>/<sup>31</sup>P en HOESY indique qu'en solution les phosphates ne restent pas au niveau de l'un des cols primaires. L'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée entraîne donc progressivement la perte du signal de corrélation.

En poursuivant ce raisonnement sur les *pseudo*-[2]rotaxanes, on peut conclure que la présence de la corrélation H<sup>5</sup>/<sup>31</sup>P en HOESY est visible avec l'hexane-diphosphate grâce au maintien de la CD sur l'axe et une proximité constante entre le col primaire et le *pseudo*-bouchon mais n'implique pas nécessairement le maintien de la position de la cyclodextrine au dessus du phosphore. Ce serait d'ailleurs la raison de l'absence de corrélation pour les deux autres *pseudo*-[2]rotaxanes (C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>) pour lesquels la cyclodextrine navigue sur la chaîne alkyle et se trouve donc en moyenne de plus en plus loin du *pseudo*-bouchon.

Afin de quantifier l'énergie de stabilisation des phosphates par la cyclodextrine, nous envisageons de calculer l'énergie potentielle associée à la torsion de la chaîne alkyle de l'axe C<sub>10</sub>. Cette stabilisation des groupements phosphates étant basée sur des liaisons hydrogènes, elle dépend naturellement de leur état de protonation. On observe d'ailleurs que les constantes de formation des [2] et [3]rotaxanes sont globalement plus élevées à pH 6 qu'à pH 1, ceci a pour effet d'accentuer la coopérativité du système avec une coopérativité positive plus élevée

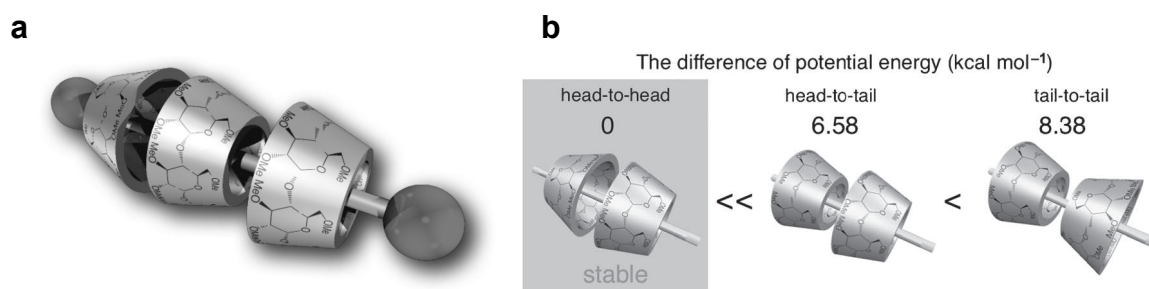
pour l'axe C<sub>8</sub> (gain énergétique lié à la formation de l'ensemble des liaisons H) et négatives pour les axes C<sub>10</sub> (du fait de la conformation défavorable de l'axe) et C<sub>12</sub>.

La dépendance des *pseudo*-bouchons aux conditions de pH nous permet de contrôler le niveau de la barrière d'activation pour l'enfilage ou le désenfilage des CDs sur les différents axes. Cela nous permet d'une part la purification des architectures [3]rotaxanes à pH 10 et à température ambiante par piégeage cinétique ( $k_{-2}$  faible), mais aussi la formation sélective de *pseudo*-[2]rotaxanes avec les axes C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub> en tirant profit de la coopérativité négative associée à l'enfilage de la seconde cyclodextrine. L'obtention de cristaux de [3]rotaxanes dépourvus de CD libre nous permet d'envisager des études de désenfilage (par élévation de température ou ajout de solvant compétiteur) qui nous permettraient d'étudier si le désenfilage des deux cyclodextrines est simultané ou successif.

Pour aller plus loin dans notre étude des *pseudo*-[n]rotaxanes, nous avons allongé la longueur de la chaîne carbonée séparant les deux phosphates à 16 carbones (le précurseur pour l'axe C<sub>14</sub> (tétradécane-diphosphate) étant beaucoup plus onéreux) afin d'étudier l'enfilage d'une troisième cyclodextrine.

### 7. Étude préliminaire de *pseudo*-[n]rotaxane avec l'hexadécane-diphosphate

En Février 2016, le groupe japonais de Toshikazu Takata a publié ses travaux sur la synthèse de [n]rotaxanes de CDs natives et *per*-méthylées (PMeCDs).<sup>[109c]</sup> Il démontre entre autres la synthèse, avec un rendement de seulement 2%, d'un [4]rotaxane de PMeCDs dont il caractérise la structure par RMN NOESY comme représentée sur la Figure 3.23a.



L'axe utilisé pour la synthèse de ce rotaxane comporte 24 carbones, néanmoins, on sait que la méthylation des hydroxyles de la CD rompt le réseau de liaisons H entre les différents cols des cyclodextrines, il caractérise d'ailleurs par une structure cristallographique



une distance de 4,3 Å entre les deux cols secondaires d'un [3]rotaxane de PMeCDs (contre 2,83 Å en moyenne sur nos structures de CDs natives). Pour justifier l'orientation de la troisième cyclodextrine dont le col primaire est aussi orienté vers l'extrémité de la chaîne, il effectue des simulations de dynamique moléculaire leur donnant accès à l'augmentation de l'énergie potentielle entre un arrangement cols secondaires face à face, tête-bêche et cols primaires face à face. Il postule une stabilisation du col primaire au niveau des amines terminales favorisant cet arrangement.

Dans notre cas et en utilisant une longueur d'axe adéquate, on espère non pas profiter de cet arrangement des PMeCD mais plutôt de la stabilisation privilégiée du *pseudo*-bouchon phosphate au niveau du col primaire de la CD native. On s'attend donc à obtenir une orientation similaire de la troisième cyclodextrine. La synthèse de l'axe C<sub>16</sub> a été présentée plus tôt et son étude préliminaire a été réalisée par spectrométrie de masse, ajout dosé à pH 6, suivi cinétique d'enfilage à pH 10, et RMN DOSY <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}.

### a. Caractérisation par spectrométrie de masse

La formation de *pseudo*-[4]rotaxane n'ayant encore jamais été observée avec les différents monomères étudiés plus haut, la première expérience réalisée avec l'hexadécane-diphosphate (**81**) fut d'étudier par spectrométrie de masse un mélange d'axe et de cyclodextrines. L'axe a été solubilisé à pH 6 et 6 équivalents de cyclodextrines natives ont été ajoutés. Comme c'était le cas avec tous les autres rotaxanes, l'ionisation en spectrométrie de masse ne semble pas efficace à pH 6, cependant l'ajout de carbonate de potassium jusqu'à pH 10 a permis d'enregistrer un spectre de masse révélant la présence de plusieurs rotaxanes avec des massifs *m/z* caractéristiques des *pseudo*-[2], [3], [4] et [5]rotaxanes (Figure 3.24).

Si l'observation de ces espèces par spectrométrie de masse est possible, il est difficile de quantifier la proportion de chacune d'entre elles ne connaissant pas leur facilité d'ionisation. Afin d'évaluer la formation privilégiée de l'un des rotaxanes, nous avons réalisé un ajout dosé de CDs dans une solution de monomère à pH 6.

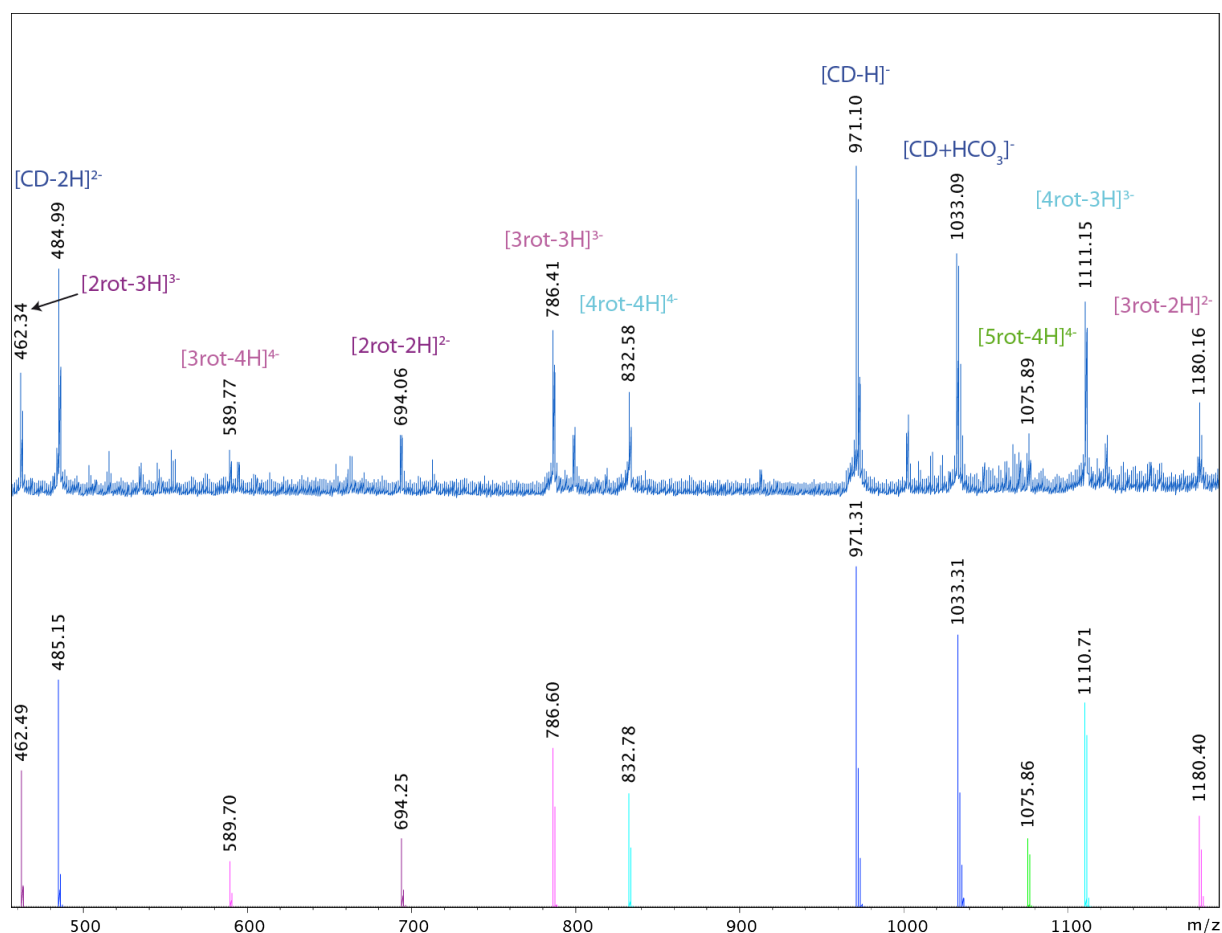


Figure 3.24 : En haut, spectre de masse d'une solution aqueuse d'axe  $C_{16}$  et de cyclodextrine (en mélange 1:6) préparée à pH 6 puis conditionnée à pH 10 (ESI, mode négatif). En bas, pics  $m/z$  calculés pour le *pseudo*-[5]rotaxane en vert ( $z = 4$  (1075.86)), le [4]rotaxane en cyan ( $z = 3$  (1110.71) ; 4 (832.78)), le [3]rotaxane en magenta ( $z = 2$  (1180.40) ; 3 (786.60) ; 4 (589.70)), le [2]rotaxane en violet ( $z = 2$  (694.25) ; 3 (462.49)) et de CD libre en bleu ( $z = 1$  (971.31) ; 1033.31 [ $M+HCO_3^-$ ]) ; 2 (485.15)).

### b. Ajout dosé de CD sur l'axe $C_{16}$ à pH 6

L'axe  $C_{16}$  (**81**) n'étant pas/peu soluble dans l'eau deutérée à pH acide, son étude d'enfilage a été réalisée à pH 6. Comme nous l'avons remarqué avec les monomères plus courts, le suivi par RMN  $^{31}P\{^1H\}$  à pH 6 est compromis du fait de l'élargissement des signaux, sa caractérisation par RMN  $^1H$  est présentée sur la Figure 3.25a. On peut observer jusqu'à 8 doublets différents pour les protons anomériques de la cyclodextrine dont celui caractéristique de la CD libre introduit en large excès coloré en bleu marine. La complexité du spectre  $^1H$  à la fin de l'ajout dosé laisse supposer une grande diversité des rotaxanes et arrangements multiples des différentes cyclodextrines. On peut entre autres observer que le doublet majoritaire en début d'ajout à 5.03 ppm (cyan) s'accroît jusqu'à 1 équivalent en CD

puis disparaît totalement pendant l'ajout des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> équivalents. Cette observation est aussi valable pour le doublet coloré en marron mais son intensité maximale semble centrée sur deux équivalents de CD et est simultanée à une certaine symétrisation de la chaîne carbonée qui peut être associée à la formation du *pseudo*-[3]rotaxane et qui induirait l'attribution du premier doublet au *pseudo*-[2]rotaxane. Enfin, l'apparition des doublets à 4.95 ppm (bleu ciel et violet) à partir de l'ajout du 2<sup>ème</sup> équivalent semble concomitante (confirmé par leur intégration) et pourrait donc être attribuée à un rotaxane composé de plus de deux CDs. L'ajout de carbonate de potassium jusqu'à pH 10 a été effectué sur l'échantillon après l'ajout de 13 équivalents de cyclodextrines, si aucun changement significatif n'est observé en RMN <sup>1</sup>H, la superposition des spectres <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} à pH 6 et 10 permet de révéler 6 singulets confirmant la présence de plusieurs espèces en solution.

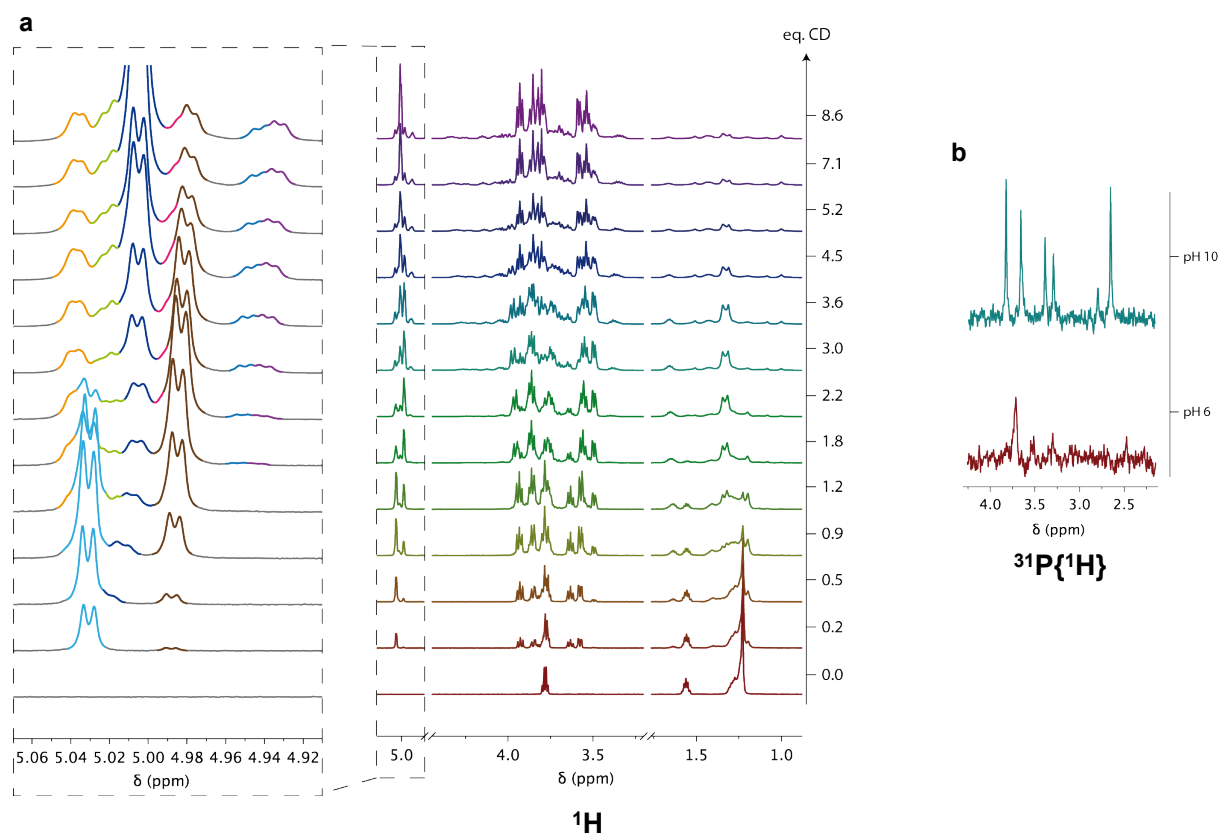


Figure 3.25 : a) Superposition des spectres RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O) de l'ajout dosé de CD sur l'axe C<sub>16</sub> conditionné à pH 6 par du carbonate de potassium ; b) Spectres RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} de l'échantillon après l'ajout dosé (13 équivalents de CD) à pH 6 et pH 10.

### c. Suivi cinétique d'enfilage de CD sur l'axe C<sub>16</sub> à pH 10

L'étude de l'interaction de l'hexadécane-diphosphate avec la cyclodextrine native a aussi été réalisée à pH 10, lorsque l'enfilage de la CD est lent et qu'il peut être suivi par RMN sur plusieurs jours. Ayant détecté des pics moléculaires des *pseudo*-[4] et [5]rotaxanes par spectrométrie de masse, l'enfilage a été réalisé en présence de 4 équivalents de CD et suivi par RMN du proton et du phosphore (Figure 3.26).

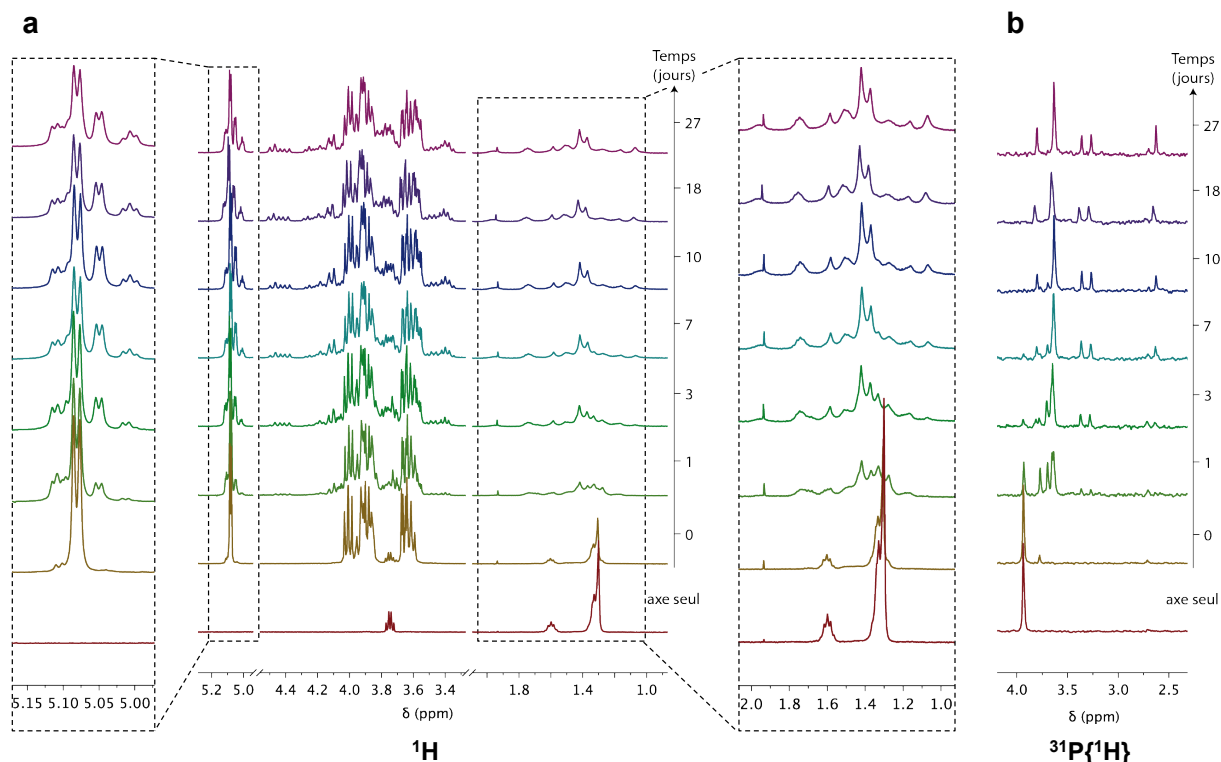


Figure 3.26 : Suivi cinétique d'enfilage d' $\alpha$ -CD sur l'axe C<sub>16</sub> à pH 10 ( $c = 2,8$  mM ; 4 eq. CD) par RMN <sup>1</sup>H (a) et <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} (b) (400 MHz, D<sub>2</sub>O).

De façon assez similaire à l'ajout dosé réalisé à pH 6, l'enfilage de la CD à pH 10 semble conduire à la formation du *pseudo*-[3]rotaxane. En effet on observe le doublet des protons anomériques à 5.05 ppm croître simultanément au multiplet à 1.73 ppm et au massif centré à 1.40 ppm caractéristiques de la chaîne carbonée avec une concordance des intégration pour 12, 4 et 24 protons respectivement. En comparant au suivi par RMN du phosphore, on s'aperçoit qu'après trois jours, la totalité de l'axe libre a été consommé (singulet à 3.94 ppm) et que le singulet à 3.63 ppm est majoritaire et semble correspondre aux *pseudo*-bouchons du [3]rotaxane. Comme à pH 6, cinq singulets distincts sont observables après 27 jours de suivi, et on peut constater que les singulets à 2.63 et 3.80 ppm de même qu'à 3.27 et 3.38 ppm

apparaissent en même temps. Des expériences de DOSY  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  ont été effectuées pour parvenir à associer les signaux aux différences structures supramoléculaires.

#### d. Caractérisation par RMN DOSY $^1\text{H}$

Un échantillon de rotaxane d'hexadécane-diphosphate a été préparé à pH 6 en présence d'un large excès de cyclodextrines natives (20 équivalents) puis ajusté à pH 10 par ajout de carbonate de potassium. Le mélange réactionnel a ensuite été précipité dans le DMF, rincé au DMF afin d'éliminer une partie de la CD native en excès puis à l'éther diéthylique avant d'être solubilisé dans une solution d'eau deutérée conditionnée à pH 10. A l'issue des lavages, on peut caractériser la présence de 3 équivalents de CDs pour un équivalent d'axe  $\text{C}_{16}$ .

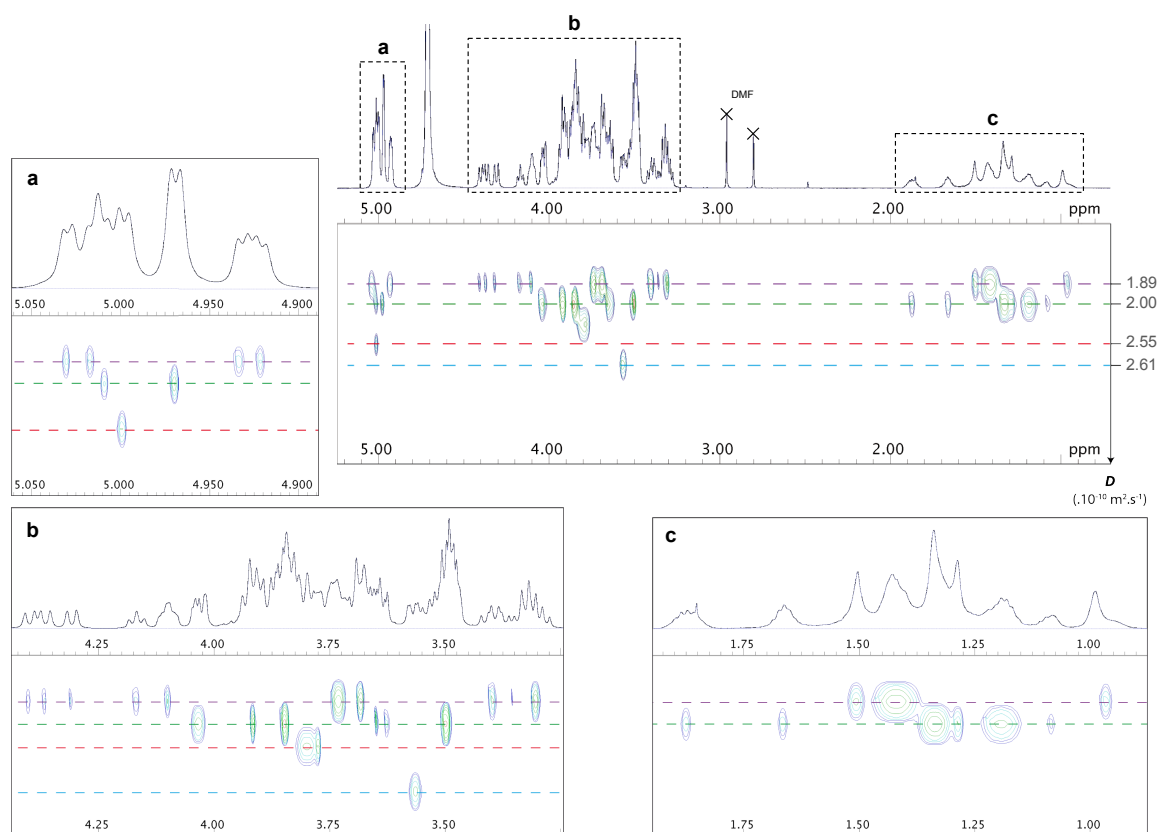


Figure 3.27 : Spectre RMN DOSY  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) d'un mélange de *pseudo*-[n]rotaxane ( $\text{C}_{16}$ )

Le spectre RMN DOSY  $^1\text{H}$  est présenté sur la Figure 3.27 et permet de mettre en avant quatre coefficients de diffusion entre  $1.89$  et  $2.61 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Les massifs à  $3.57$  et  $5.00$  ppm semblent appartenir à l'axe et à la CD respectivement mais sont totalement isolés des autres pics caractéristiques de leurs espèces. On observe ensuite deux distributions de protons anomériques diffusant à  $1.89$  et  $2.00 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  composées de 4 et 2 signaux chacune. Dans le premier cas, les 4 doublets intègrent tous pour 6 protons, tandis que dans le second, le pic à

5.01 ppm intègre pour 6H quand celui à 4.97 ppm intègre pour 12 protons. Ainsi, nous sommes tentés de revoir notre attribution faite à l'issue de l'ajout dosé et d'associer les assemblages diffusant à 1.89 et  $2.00 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  aux *pseudo*-[5]rotaxane et *pseudo*-[4]rotaxane respectivement. Si l'intégration des signaux caractéristiques des 28 protons centraux de la chaîne carbonée (de 0.90 à 1.93 ppm) diffusant à  $1.89 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  est cohérente pour le [5]rotaxane (trois massifs intégrant pour 8, 16 et 4 protons respectivement), elle semble aberrante pour les pics caractéristiques de l'espèce [4]rotaxane (diffusant à  $2.00 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), de plus l'absence complète de [3]rotaxane reste étonnante. La caractérisation de ce mélange de rotaxanes doit être poursuivie afin d'apporter un faisceau de preuves convergentes permettant d'affirmer l'obtention de rotaxanes à 3 et 4 cyclodextrines. Des expériences RMN DOSY  $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ , TROESY  $^1\text{H}$  et HOESY ( $^3\text{P}\{^1\text{H}\}/^1\text{H}$ ) ont déjà été réalisées mais n'apportent pas encore les informations suffisantes.

## 8. Conclusion

La synthèse de nouveaux monomères modèles diphosphatés a permis d'étudier leurs affinités pour la cavité de l' $\alpha$ -cyclodextrine native. En fonction de la longueur de la chaîne carbonée séparant les *pseudo*-bouchons et de leur état de protonation nous avons mis en avant la possibilité d'enfiler rapidement ou lentement une à deux cyclodextrines sur les axes C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>. Les constantes d'association de  $10^{3,6}$  en moyenne et la coopérativité des systèmes à deux CDs ont été déterminées et complétées par des études par spectroscopie RMN et diffraction des rayons X pour conclure sur la stabilisation par liaisons hydrogènes des *pseudo*-bouchons au sein du col primaire. L'étude d'un axe à 16 carbones a alors démarré pour tenter de synthétiser un *pseudo*-[4]rotaxane avec de bons rendements. La maîtrise de la synthèse sélective et quantitative des *pseudo*-[2] et [3]rotaxanes avec ces différents axes ainsi que leur purification en font des précurseurs intéressants pour la synthèse de nouveaux édifices supramoléculaires. Enfin, l'étude de ces monomères modèles nous a encouragé à effectuer la synthèse d'un poly(alkylène phosphate) pour réaliser l'enfilage de CDs et développer un nouvel axe pour la synthèse de *pseudopolyrotaxane* de CDs fonctionnalisées.

## II. Synthèse de *PPRs* polyanioniques

### 1. Synthèse du poly(alkylène phosphate)

Pour réaliser l'enfilage des cyclodextrines sur le polymère poly(alkylène phosphate), nous avons décidé d'introduire des chaînes carbonées à six carbones seulement entre chaque phosphate afin de limiter l'enfilage à une seule cyclodextrine par motif monomérique et de faciliter la caractérisation de l'architecture finale. Celui-ci sera obtenu par conversion d'un poly(alkylène phosphite) en poly(alkylène phosphate) par oxydation ou chloration du phosphite suivi de son hydrolyse.

#### a. Stratégie de synthèse

La synthèse de poly(alkylène phosphite) a été très largement décrite depuis 1988 par les chimistes polonais Julia Pretula et Stanislaw Penczek.<sup>[120]</sup> Réalisée par copolymérisation entre un dialkylphosphite et un diol, elle permet de suivre la croissance des macromolécules et donc de contrôler la taille du polymère final (Figure 3.28). Elle repose sur la polycondensation des dialkylphosphites avec les diols effectuée à environ 130°C et menant à des oligomères de courtes tailles qui sont ensuite couplés entre eux par transestérification à plus haute température (170°C). Si le développement du diphénylphosphite en remplacement du diméthylphosphite (DMP) leur a permis d'accroître leur degré de polymérisation, nous nous sommes focalisés sur la copolymérisation du diméthylphosphite (**89**) pour réduire l'encombrement stérique des bouts de chaînes afin de permettre l'enfilage des CDs.

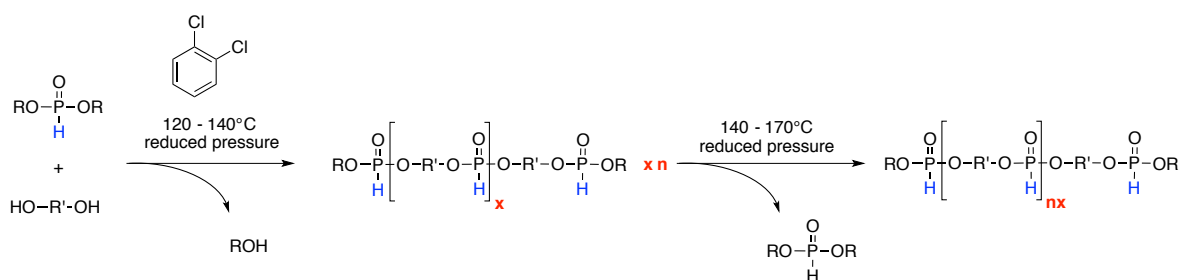


Figure 3.28 : Voie de synthèse d'un poly(alkylène phosphite) à la manière de J. Pretula *et al.*<sup>[120]</sup>

#### b. Synthèse d'un poly(hexylène phosphite)

L'utilisation de diols variés a été décrite par ce groupe de recherche (PEG-1000 / tétraéthylène glycol / éthylène glycol / 1,6-hexanediol / 1,10-décane diol / ...), pour notre synthèse, l'utilisation de l'hexanediol (**90**) est privilégiée pour obtenir un polymère

relativement soluble dans l'eau sous sa forme définitive de poly(hexylène phosphate) et restreindre le recouvrement des motifs à un maximum d'une seule cyclodextrine. La synthèse du polymère est présentée sur la Figure 3.29 avec son suivi réactionnel réalisé par RMN du phosphore. L'intégration des singulets caractéristiques des phosphates en bouts de chaîne (en orange) et des phosphates en milieu de chaîne (en bleu) permet de suivre le degré de polymérisation au cours du temps. Ainsi, nous avons pu effectuer des prélèvements du mélange réactionnel pour sélectionner trois longueurs de chaînes à 15 (**91**), 26 (**92**) et 78 (**93**) motifs. Ces longueurs moyennes ont été confirmées par l'analyse du spectre  $^1\text{H}$  dont l'attribution est présentée sur la Figure 3.30 sur le poly(hexylène phosphite) à 15 motifs répétitifs (**91**). On y remarque en particulier les constantes de couplage  $^1J_{\text{P-H}}$  élevées (696 Hz) pour le proton des phosphites de milieu et bout de chaîne.

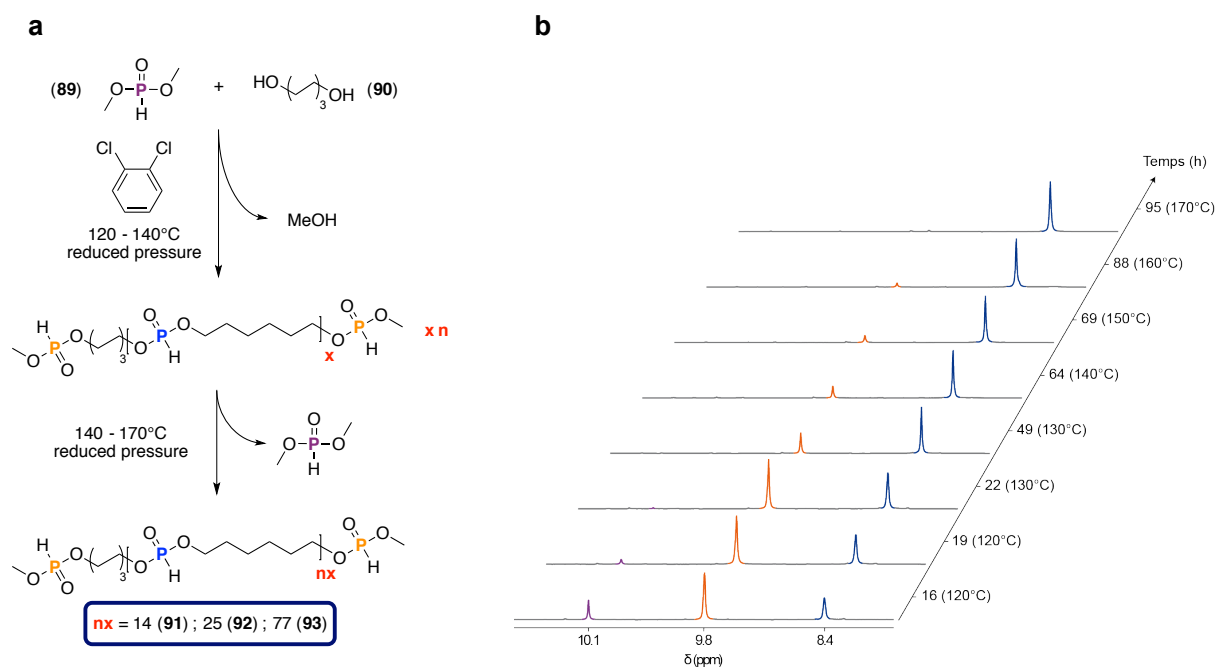


Figure 3.29 : a) Synthèse du poly(hexylène phosphite) par copolymérisation de l'hexanediol (**90**) et du diméthylphosphite (**89**) ; b) Suivi par RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la formation du poly(hexylène phosphite).

A l'issue de la polymérisation, le poly(hexylène phosphite) est obtenu avec des phosphites terminaux méthylés (en orange sur la Figure 3.30). Nous avons cherché à déméthyliser ces positions pour deux raisons. Dans un premier temps, à l'issue de la conversion du poly(hexylène phosphite) en poly(hexylène phosphate), le phosphate terminal obtenu pourra être utilisé pour contrôler l'enfilage lent ou rapide des CDs sur le polymère en fonction des conditions de pH. De plus, nous aurons le choix de boucher ou non le



*pseudopolyrotaxane* par une réaction de couplage de phosphate pour obtenir un véritable polyrotaxane.

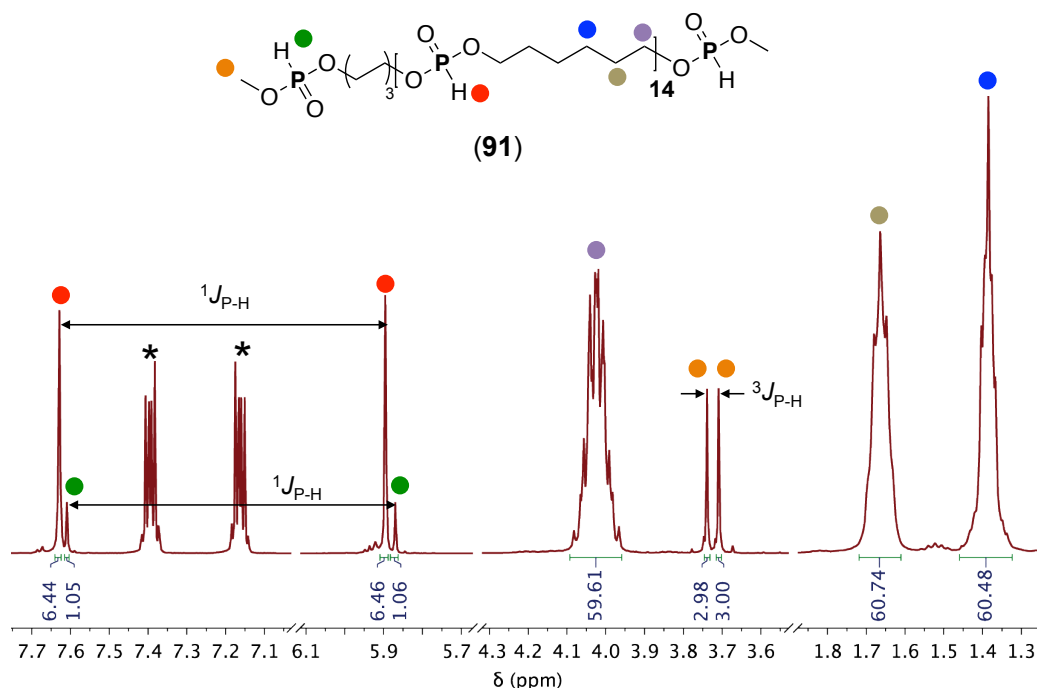


Figure 3.30 : Attribution du spectre <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du poly(hexylène phosphite) à 15 motifs (91). \*Dichlorobenzène résiduel.

Pour réaliser la déméthylation des phosphites terminaux du polymère, nous avons utilisé une méthode principalement décrite pour la formation de liquide ionique entre un méthylphosphite déprotoné et un dialkylimidazolium.<sup>[121]</sup> La réaction se fait dans l'acétonitrile sec à 80°C en présence d'un large excès de 1-méthylimidazole (94) (Figure 3.31).

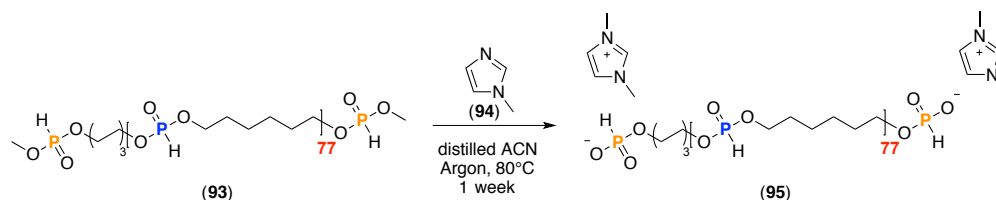


Figure 3.31 : Déméthylation des phosphites terminaux du poly(hexylène phosphite)

Le suivi de la réaction a été réalisé par RMN <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}, on observe en particulier la disparition du doublet caractéristique des méthyles des phosphites terminaux à 3.72 ppm après une semaine à 80°C.

### c. Synthèse du poly(hexylène phosphate)

Il existe différentes voies de synthèse permettant la conversion d'un phosphite en phosphate. La chloration (par  $\text{CCl}_4$  ou  $\text{Cl}_2$ ) suivie de l'hydrolyse des chlorophosphates ou l'oxydation (par  $\text{NO}_2$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en sont deux particulièrement utilisées par le groupe de Penczek.<sup>[120a,120c-e,h]</sup> Nous avons choisi de passer par la chloration des phosphites suivie de leur hydrolyse en utilisant les conditions réactionnelles développées depuis 2012 par l'équipe japonaise de K. Makino.<sup>[122]</sup> La chloration se fait par ajout d'acide trichloroisocyanurique (**96**) dans une solution de poly(hexylène phosphite) (**95**) dissout dans l'acétonitrile sec. Une mole de ce composé est nécessaire pour chlorer trois positions du polymère et son efficacité est directement visible par la précipitation de l'acide isocyanurique (**97**) formé. La purification du poly(hexylène chlorophosphate) (**98**) peut alors se faire par filtration suivie de l'ajout d'eau distillée dans le filtrat pour conduire à l'hydrolyse des chlorophosphates en phosphates (Figure 3.32) avec un rendement quantitatif sur deux étapes.

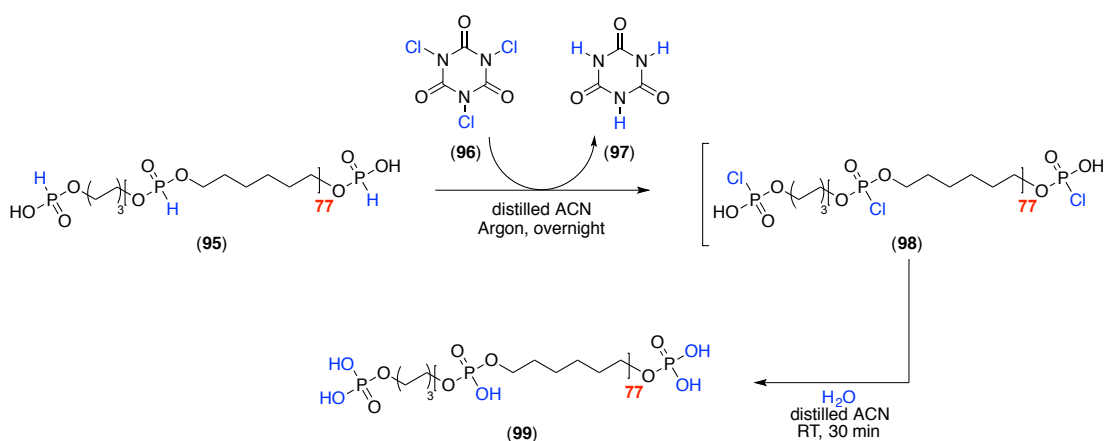


Figure 3.32 : Synthèse du poly(hexylène phosphate) (**99**) par chloration puis hydrolyse

Le suivi de la réaction se fait par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  avec la disparition des pics caractéristiques des phosphites à 3.71 ; 3.74 ; 5.87 ; 5.90 ; 7.61 et 7.63 ppm (Figure 3.30) lors de la première étape de chloration, puis par la modification des constantes de couplage  $^3J_{\text{P-H}}$  de 8.5 Hz à 6.5 Hz lors de l'hydrolyse. La caractérisation du polymère a été complétée par spectrométrie de masse MALDI en effectuant des dépôts sur une co-matrice de trihydroxyacétophénone (THAP) et de citrate d'ammonium permettant l'observation des pics caractéristiques de l'espèce  $[\text{H}(\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{O}(\text{CH}_2)_6)_x\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2+\text{H}]^+$  avec un degré de polymérisation maximum (x) observé de 10 (le degré de polymérisation déterminé par RMN étant de 78). D'autres matrices doivent être utilisées pour favoriser une meilleure ionisation du polymère et espérer observer des degrés de polymérisation en accord avec ceux déterminés

par RMN. La caractérisation du polymère doit encore être complétée par la détermination de sa polydispersité.

L'obtention du poly(hexylène phosphate) nous a permis de réaliser les premières études d'auto-assemblage avec la cyclodextrine native.

## 2. Enfilage de CDs sur le polyphosphate

La présence des phosphates terminaux sur le poly(hexylène phosphate) (**99**) permet de modifier la barrière énergétique de l'enfilage par contrôle du pH. Les études d'enfilage ont été réalisées sur le polymère **99** et sur deux autres poly(hexylène phosphate) de degrés de polymérisation égaux à 15 et 26 mais dont les extrémités de chaînes n'avaient pas été déméthylées. Analysés par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , TROESY  $^1\text{H}$  et DOSY  $^1\text{H}$ , les complexes d'inclusion formés ont montré de grandes similitudes et aucune influence de la longueur caractéristique des macromolécules n'a été observée. Les études préliminaires ont permis de mettre en évidence que l'enfilage des CDs était aussi rapide que sur les monomères modèles à température ambiante et que le chauffage n'améliorait en rien le pourcentage d'enfilage. Ainsi, nous avons effectué l'étude du polymère par ajout dosé de CD à pH 1.

### a. Ajout dosé de CD sur le polyanion

A pH 1, l'ajout dosé peut être caractérisé à la fois par RMN du proton et du phosphore et est présenté sur la Figure 3.33. La superposition des spectres  $^1\text{H}$  met en avant deux doublets caractéristiques des protons anomériques de la CD autour de 5.0 ppm dès les premiers ajouts de CDs ainsi qu'un dédoublement important des signaux caractéristiques des 8 protons centraux du motif carboné. Sur le suivi par RMN du phosphore, on constate d'abord que dans l'eau deutérée à pH 1, on ne parvient pas à observer le phosphore des phosphates terminaux. L'ajout de CDs se traduit par l'apparition progressive d'un singulet à -0.63 ppm dont la proportion est tracée en fonction des équivalents en CDs par rapport au motif monomérique sur la Figure 3.33c. Il semble que deux équivalents de CDs par motif suffisent à atteindre l'équilibre entre la forme libre et le complexe d'inclusion. D'après les études réalisées sur le monomère hexane-diphosphate, on s'attend à ce que deux singulets caractéristiques des phosphates dissymétrisés par l'enfilage de la CD apparaissent, on suppose que le singulet complémentaire est superposé au massif à 0,66 ppm et est observable à la fin de l'ajout dosé à 0,35 ppm. Il convient donc de caractériser un recouvrement à hauteur de 44% du polymère soit deux fois la valeur du plateau atteint sur la Figure 3.33c. Ce taux d'enfilage est cohérent

avec le rapport d'intégration de l'épaule du signal à 5.01 ppm ( $2.5 H_{\text{anomérique}}$ ) et le milieu de la chaîne carbonée (8 H, méthylènes en position  $\beta$  et  $\gamma$  des phosphates) entre 1.2 et 1.9 ppm qui donne un taux d'enfilage de 42%.

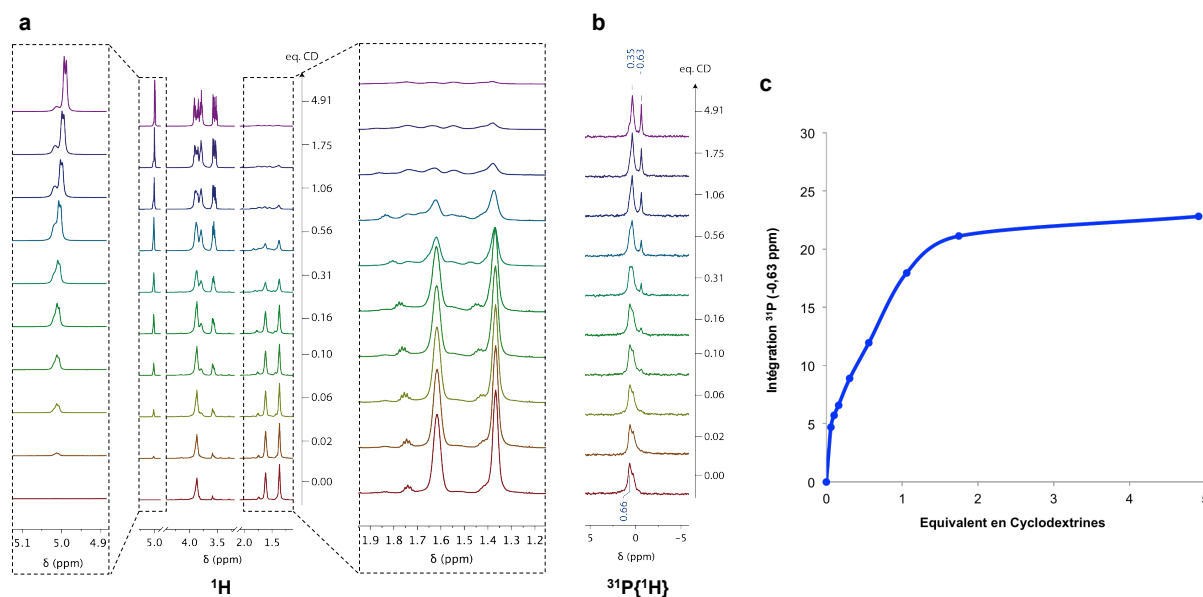


Figure 3.33 : Ajout dosé de cyclodextrine sur le poly(hexylène phosphate) (**99**) à pH 1 suivi par RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) (a) et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (b). Les équivalents sont donnés par rapport à un motif monomérique ; c) Pourcentage d'intégration du singulet à -0.63 ppm sur l'ensemble des signaux phosphores en fonction des équivalents en CDs.

Comme pour l'étude des monomères, le passage à pH 10 par ajout de carbonate de potassium permet d'améliorer l'éclatement des signaux entre les formes libres et enfilées. Nous avons alors poursuivi la caractérisation de cette architecture par RMN TROESY  $^1\text{H}$  et DOSY  $^1\text{H}$ .

### b. Caractérisation RMN du PPR de CD

La caractérisation de l'échantillon de *pseudopolyrotaxane* obtenu par enfilage de CDs sur le poly(hexylène phosphate) à 78 motifs (**99**) est présentée ci-dessous (Figure 3.34 ; Figure 3.35). L'expérience de TROESY  $^1\text{H}$  nous indique de nombreuses corrélations spatiales entre la chaîne carbonée des motifs monomériques et les protons de la cyclodextrine. En particulier, sur le zoom (à droite), on constate la proximité des protons caractérisés par des déplacements chimiques de 1.81 et 4.08 ppm similaire à celle observée avec les monomères modèles entre les protons  $\text{H}^5$  pointant à l'intérieur de la cavité et les méthylènes de l'axe.

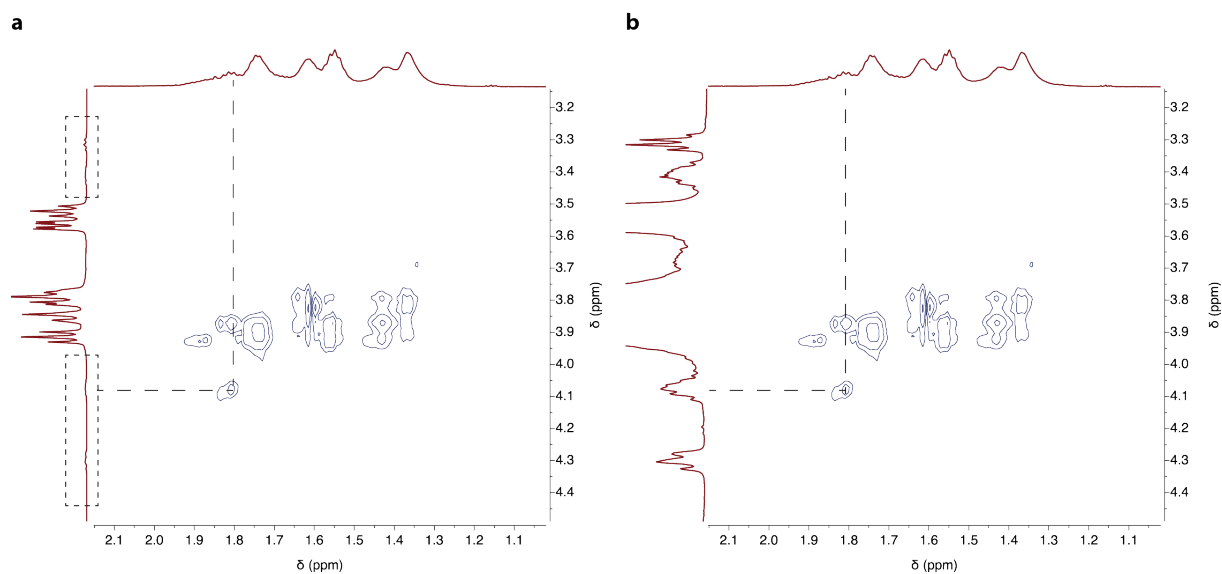


Figure 3.34 : a) Spectre RMN TROESY  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 10) du *pseudopolyrotaxane* de CDs avec l'axe **99** avec un zoom de la trace verticale (b)

La caractérisation a été complétée par une expérience de DOSY sur le proton (Figure 3.35). La diffusion lente des macromolécules de polymères rend difficile l'optimisation de l'atténuation des signaux et donc la détermination d'un coefficient de diffusion avec une bonne précision, néanmoins, le spectre DOSY présenté montre bien que la CD se trouve sous différentes formes et en particulier que l'épaule au niveau des protons anomériques semble caractériser les CDs enfilées sur le polymère avec un coefficient de diffusion voisin à celui du polymère.

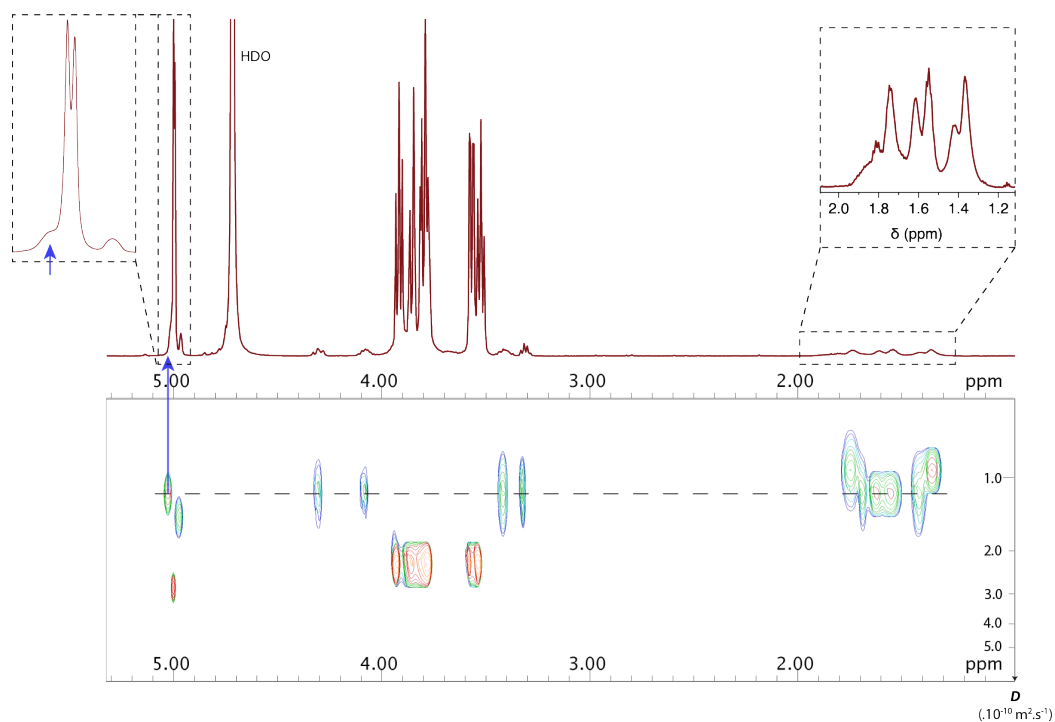


Figure 3.35 : RMN DOSY  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) du *pseudopolyrotaxane* de CDs avec l'axe **99**

La purification du *PPR* obtenu doit être réalisée par ultrafiltration sur une membrane de 3 kDa dans l'eau tamponnée à pH 10 et devrait permettre de retirer l'excès de CDs libres.

L'obtention récente de ces nouveaux *pseudopolyrotaxanes* polyanioniques ne nous a pas permis d'aller au bout de leur étude. Des caractérisations de volume hydrodynamique en fonction des longueurs de chaînes et de cytotoxicité des *PPRs* de CDs natives sont envisagées. La présence des phosphates terminaux devrait permettre des réactions de bouchonnage pour l'obtention de polyrotaxanes stables. Une fois l'étude terminée avec les CDs natives, l'enfilage de CDs fonctionnalisées par des sondes fluorescentes et agents de contraste pour l'IRM sera réalisé.

### III. Conclusion

La nécessité de trouver des alternatives à l'axe polyammonium initialement utilisé ainsi que la faible représentation des polyanions pour la synthèse de polyrotaxanes nous ont orienté vers la synthèse de poly(alkylène phosphate). La synthèse de quatre monomères modèles de 6 à 12 carbones a permis de caractériser leur affinité pour la CD conduisant à la formation de *pseudo*-[2] et [3]rotaxanes. Les structures cristallographiques ont permis de confirmer la stabilisation des phosphates au centre des cols primaires des CDs et d'appuyer les conclusions obtenues par la détermination des constantes d'association et de l'effet coopératif. L'extension de l'étude avec l'axe C<sub>16</sub> a mis en évidence la formation de rotaxanes possédant 2 à 4 CDs. Nous cherchons à améliorer la sélectivité de la synthèse pour réduire le nombre d'espèces présentes lors de la caractérisation et faciliter l'attribution de l'ensemble des signaux RMN aux composés. L'expertise acquise sur la synthèse, la purification et la caractérisation des [2] et [3]rotaxanes nous ont encouragés dans l'extension de la structure par l'utilisation d'un poly(hexylène phosphate)

La synthèse de ce polymère de trois longueurs différentes a été réalisée et son étude d'enfilage avec l' $\alpha$ -CD a permis la caractérisation d'un enfilage à hauteur de 44% à pH acide. La purification des *pseudopolyrotaxanes* devrait permettre d'étudier leur stabilité, leur propriété d'agrégation en solution, et leur toxicité pour envisager l'utilisation de leurs analogues fonctionnalisés dans le domaine biomédical.



---

**CHAPITRE 4 :**  
**VERS L'AMELIORATION DES SYSTEMES**  
**POLYROTAXANES**

---





La synthèse de polyrotaxanes de CDs intéresse la communauté scientifique depuis plus de 25 ans. Si de nombreux axes et méthodes de fonctionnalisation ont été développés, l'amélioration de la biocompatibilité, de la dynamique des systèmes ainsi que le développement de nouvelles approches synthétiques restent encore des défis. Ce chapitre relate le travail réalisé pour améliorer la biocompatibilité des PPRs polycationiques d'une part et développer des nouvelles voies de bouchonnage ou de synthèse de PRs d'autre part.

### **I. Post-fonctionnalisation des PPRs de CDs pour l'imagerie médicale**

#### **1. PEGylation de pseudopolyrotaxanes de cyclodextrines**

Le développement de l'axe polyammonium permettant l'enfilage des différentes CDs fonctionnalisées avec des constantes d'association proches est une réelle avancée pour le projet. La synthèse, la purification et la caractérisation des PPRs bimodaux ont été réalisées et leurs propriétés, aussi bien optiques que relaxométriques, se sont révélées très intéressantes pour leur utilisation en imagerie médicale. La toxicité élevée des composés rendant impossible leurs études *in vivo*, des stratégies permettant d'améliorer leur biocompatibilité ont été investiguées. On qualifie de biocompatible, un composé ou matériau qui n'est pas toxique pour l'organisme et dont l'injection n'entraîne pas de réponse immunitaire. La PEGylation, c'est-à-dire le couplage covalent ou non de chaînes polyéthylène glycol, est une méthode couramment utilisée pour augmenter la biocompatibilité des composés à visée biomédicale.<sup>[123]</sup>

##### **a. Concept de PEGylation**

Le concept de PEGylation a été introduit à la fin des années 1970 par Abuchowski *et al.* qui démontrèrent dans deux publications<sup>[124]</sup> que le couplage de PEG (de 2 à 5 kD) sur l'albumine ne provoque aucune réponse immunitaire et augmente le temps de circulation de la protéine dans le sang. Dans les années 1990, différents groupes de recherche rapportent l'utilisation de cette fonctionnalisation pour améliorer la biodistribution de liposomes pour des applications biomédicales.<sup>[125]</sup> Depuis maintenant 25 ans il existe des produits cliniques fonctionnalisés par du PEG.<sup>[126]</sup>

## CHAPITRE 4 : Vers l'Amélioration des Systèmes Polyrotaxanes

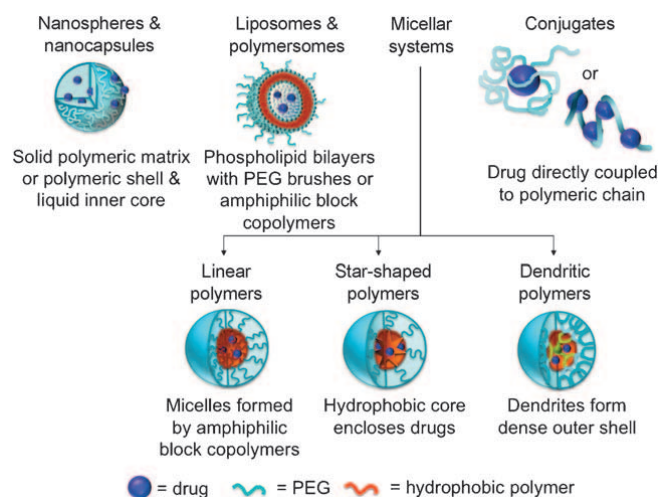


Figure 4.1 : Exemples de transporteurs PEGylés pour le relargage de principe actif<sup>[123]</sup>

La Figure 4.1 présente différents transporteurs utilisés dans le domaine biomédical rendus biocompatibles par couplage avec du PEG.<sup>[123]</sup> Les avantages de ce polymère sont principalement : son faible coût, son hydrosolubilité, et la furtivité et circulation prolongée dans le sang qu'il confère aux différentes structures. Ces qualités en ont fait un polymère de choix pour des applications biomédicales, il est d'ailleurs approuvé par la FDA et l'*European Medicines Agency*. Une revue publiée par l'équipe d'Ulrich Schubert apporte néanmoins la lumière sur certains aspects négatifs de ce polymère.<sup>[123]</sup> En effet, en fonction de sa taille, ce polymère est tantôt non-biodégradable et s'accumule donc dans l'organisme (> 20 kDa), tantôt dégradé par des déhydrogénases générant des sous-produits toxiques (< 400 Da). Des alternatives au PEG comme le poly(acrylamide), le poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide), le poly(vinylpyrrolidone), le poly(2-oxazoline) ou le poly(glycérol) (Figure 4.2), conférant, eux aussi, une augmentation du temps de circulation dans le sang sont proposées.

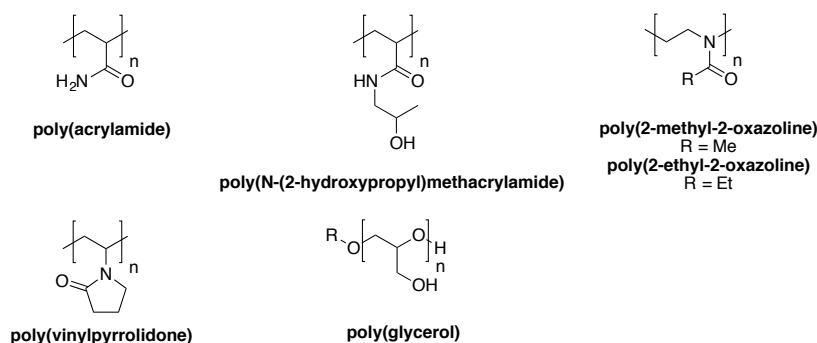


Figure 4.2 : Structures des polymères prometteurs pour le camouflage de transporteurs de principes actifs *in vivo*<sup>[123]</sup>

### b. Étude préliminaire sur les PPRs

Les voies de PEGylation varient en fonction du système utilisé. Si les surfaces de nanoparticules (d'or ou polymériques) peuvent être efficacement fonctionnalisées par adsorption basée sur des interactions électrostatiques, ou liaisons hydrogène,<sup>[127]</sup> on suppose que la linéarité du PPR est augmentée par la présence des CDs<sup>[128]</sup> et les répulsions entre ammoniums réduisant alors son agrégation en pelote et donc la densité de charge. C'est pourquoi une approche covalente est privilégiée pour parvenir à un PPR camouflé (Figure 4.3).

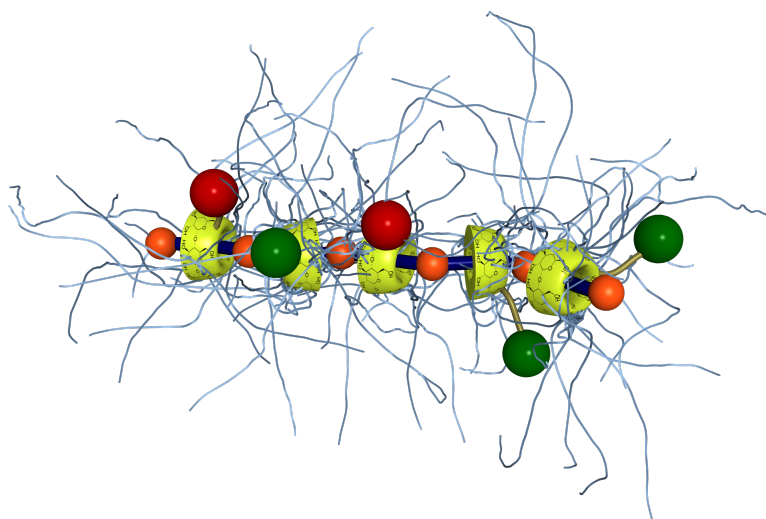


Figure 4.3 : Représentation d'un PPR bimodal camouflé par PEGylation covalente

Nous cherchons donc à fonctionnaliser statistiquement les cyclodextrines enfilées sur le polymère par un PEG de 2 kDa. Cette taille est supérieure à celle des oligomères décrits comme subissant l'oxydation des déshydrogénases, et nettement inférieure à celle des polymères s'accumulant dans certains organes du corps (> 20 kDa).

La première voie de PEGylation envisagée consiste à fonctionnaliser directement les CDs enfilées sur le PPR pour permettre le couplage avec le PEG. Nous nous sommes initialement orientés sur un couplage peptidique et ceci pour deux raisons : i) la réaction est réalisable dans l'eau et est donc compatible avec la solubilité du PPR ; ii) l'introduction statistique d'acide carboxylique sur un polyrotaxane d' $\alpha$ -CDs natives enfilées sur un poly(éthylène)glycol a déjà été décrite par Yui *et al.* en 2002.<sup>[129]</sup> L'ouverture de cycle de l'anhydride succinique par l'attaque nucléophile des hydroxyles primaires des CDs permet leur fonctionnalisation dans la pyridine anhydre et donc l'insertion des fonctions acides carboxyliques.

### i. Synthèse des CDs modèles

Afin de vérifier la faisabilité de la fonctionnalisation des CDs natives mais aussi fonctionnalisées, des réactions préliminaires ont été réalisées avant enfilage (Figure 4.4). Dans les conditions expérimentales décrites précédemment (anhydride succinique (100), pyridine anhydre, température ambiante, 1 jour),<sup>[129]</sup> nous sommes parvenus à fonctionnaliser par six fonctions acides succiniques en moyenne le col primaire de la CD native (1), et partiellement celui des CDs fonctionnalisés (CDLa (18) et CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) (63)).

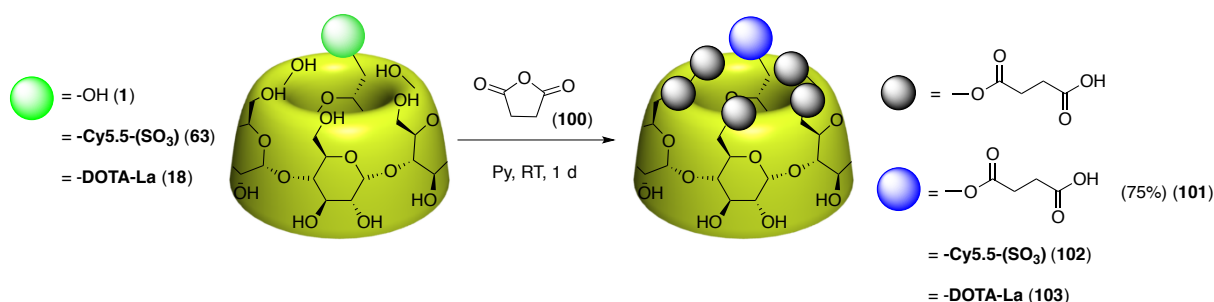


Figure 4.4 : Synthèse des CDs pré-fonctionnalisées pour le couplage de PEG<sub>2000</sub>

La caractérisation par spectrométrie de masse permet de mettre en évidence la présence d'une distribution de composés pour la fonctionnalisation des CDs CDLa et CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) (exemple de CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)-(CO<sub>2</sub>H)<sub>x</sub> (102) ; Figure 4.5), celle-ci étant centrée sur le produit tri-fonctionnalisé. La caractérisation par RMN <sup>1</sup>H confirme que le col primaire est peu substitué et permet d'observer la présence de CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) non fonctionnalisée. Cette faible réactivité est probablement due à l'encombrement du col primaire.

Cette étape supplémentaire de fonctionnalisation de la CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) aurait pu avoir un effet bénéfique sur son hydrosolubilité, néanmoins la RMN <sup>1</sup>H réalisée dans l'eau deutérée n'a pas validé cette attente. La fonctionnalisation statistique des cols primaires des CDs fonctionnalisés est assez faible (environ 3 acides) mais se révèle totale sur la CD native. On s'attend à ce que cette efficacité soit réduite sur les cyclodextrine fonctionnalisées enfilées sur le polymère. Nous avons toutefois poursuivi les tests sur un PPR de CDs natives.

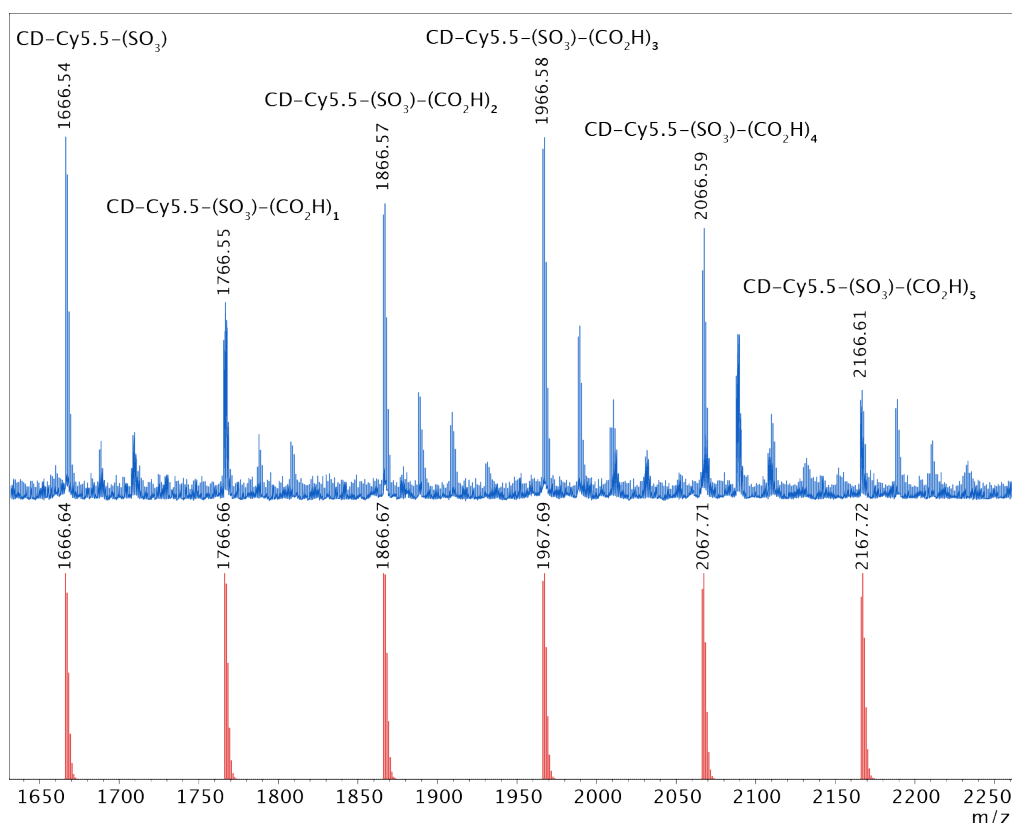
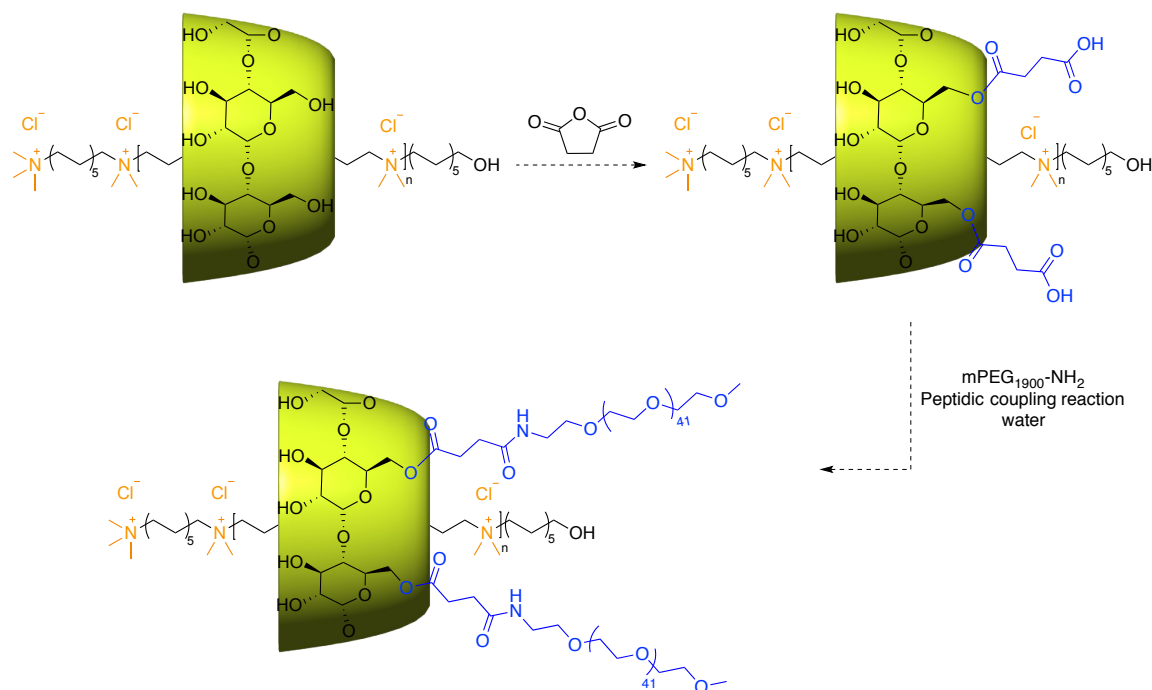


Figure 4.5 : Spectre de masse (ESI, Mode Négatif) de **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)-(CO<sub>2</sub>H)<sub>x</sub> (102)**, espèces mono-chargées

## ii. PEGylation du *PPR in situ*

Pour tester la réactivité des CDs enfilées sur un axe polymérique, nous utilisons un *PPR* de CDs natives recouvert à 71% (Figure 4.6). La très faible solubilité du *PPR* dans la pyridine n'ayant pas permis la fonctionnalisation statistique des CDs, différents solvants ont été testés (DMF, THF, toluène, acétonitrile, DMSO). Parmi eux, seul le DMSO permet de dissoudre le *PPR*. Néanmoins, celui-ci a aussi pour effet d'entrer en compétition avec le polymère pour interagir avec la cavité de la CD. Un suivi de la stabilité du *PPR*-CD à température ambiante dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> a été réalisé par RMN <sup>1</sup>H. L'acquisition du premier spectre <sup>1</sup>H, quelques minutes après dissolution du *PPR* révèle une perte de 26% de CDs enfilées. Le taux de recouvrement chute et se stabilise à 15% au bout de 8 jours. L'utilisation de DMSO pour cette réaction a donc été écartée. Aucun solvant compatible à la fois avec la réaction, la solubilité, et la stabilité du *PPR* n'ayant été trouvé, la *post*-fonctionnalisation directe du composé auto-assemblé n'a pu être réalisée.


 Figure 4.6 : Voie de PEGylation *in situ* du PPR de CDs native

Nous avons alors imaginé deux approches alternatives possibles. La première consiste à utiliser les CDs **CDLa-(CO<sub>2</sub>H)<sub>x</sub> (103)** et **CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)-(CO<sub>2</sub>H)<sub>x</sub> (102)** précédemment synthétisées et à réaliser leur enfilage sur le polymère pour réaliser le couplage avec le PEG-NH<sub>2</sub>. Cette approche présente deux inconvénients : elle nécessite une étape de synthèse supplémentaire sur les CDs déjà fonctionnalisées ainsi que la ré-évaluation des constantes d'association des cyclodextrines sur l'axe (modèle ou polymérique). L'autre approche consiste à ajouter une cyclodextrine fonctionnalisée à notre bibliothèque pour servir de support à la PEGylation, elle devra donc pouvoir réagir avec plusieurs unités PEG et posséder une constante d'association élevée pour obtenir un taux de recouvrement important afin que la *post*-fonctionnalisation puisse être efficace. Nous nous sommes orientés vers cette seconde approche pour réduire la toxicité des PPRs polycationiques.

## 2. Ajout d'une cyclodextrine spécifique pour la PEGylation

Pour optimiser le nombre de fonctions réactives tout en maintenant une bonne affinité des CDs pour l'axe, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation du col primaire de l' $\alpha$ -CD par des fonctions peu volumineuses afin de limiter l'encombrement de la cavité. Trois fonctions ont été envisagées : azotures pour une réaction de CuAAC et acide carboxylique ou amine primaire pour une PEGylation par réaction de couplage peptidique (Figure 4.7).

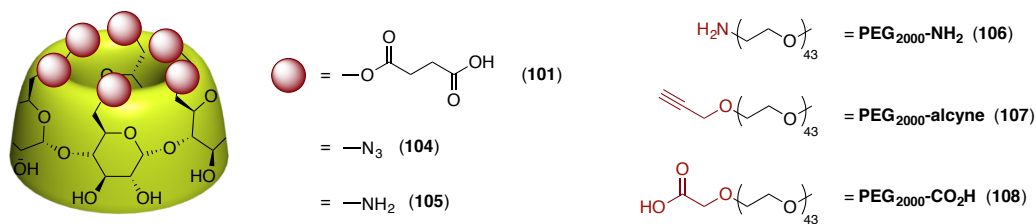


Figure 4.7 : CDs hexa-fonctionnalisées et différents fragments PEG fonctionnalisés pour l'étape de PEGylation

Ces cyclodextrines seront synthétisées et leur enfilage sur l'axe modèle analysé. Pour s'assurer de la faisabilité du couplage *post*-enfilage entre les cyclodextrines et le PEG, des tests préliminaires ont pu être réalisés sur différents PPRs synthétisés plus tôt.

### a. *Post*-fonctionnalisation par CuAAC

#### i. Étude préliminaire avec la CD mono-azoture

La *post*-fonctionnalisation de PR de CDs enfilées sur du PEG par CuAAC a été décrite par H. Hyun et N. Yui en 2011.<sup>[130]</sup> Différents tests ont déjà été réalisés au laboratoire et ont démontré qu'elle donnait accès à : i) des PPRs de **CDLa** recouvert à 55% (soit 23% de plus que par enfilage direct de **CDLa**) par couplage du complexe de lanthane sur le PPR-CD(N<sub>3</sub>) recouvert à 55% ; ii) des PPRs fonctionnalisés par des sondes dont les CDs ne présentent pas une bonne affinité pour l'axe (exemple : **BODIPY-Et**, **Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)**). La caractérisation par RMN <sup>1</sup>H et spectroscopie infrarouge (IR ; atténuation de la bande caractéristique de la fonction azoture à 2120 cm<sup>-1</sup>) permet de conclure sur une fonctionnalisation efficace à 60-80%. Ces résultats sont donc encourageants pour la réaction de PEGylation.

La PEGylation d'un PPR de **CD(N<sub>3</sub>)** enfilé à 70% a été réalisée en présence de 1,5 équivalents (par rapport aux fonctions azoture) de PEG<sub>2000</sub>-alkyne (**107**). La superposition des spectres RMN <sup>1</sup>H avant et après la réaction de PEGylation est présentée sur la Figure 4.8. L'intégration des protons anomériques et des méthyles des ammoniums donne accès à un enfilage global de 60%. Celles du proton du triazole et des protons anomériques permettent de conclure à un rendement de PEGylation de 42% et on observe l'atténuation de la bande caractéristique des azotures en IR. Enfin, on peut vérifier le rapport de 3 entre l'intégration du triazole et celle du groupe méthoxy du PEG qui confirme l'efficacité de la purification par ultrafiltration pour retirer l'excès de PEG libre.

Cette expérience confirme la possibilité d'utiliser la CuAAC pour l'étape de PEGylation, néanmoins, elle met aussi en évidence un désenfilage de 10% au cours de la réaction ou de sa purification. Son optimisation pourra être réalisée pour augmenter le



pourcentage de fonctions azoture PEGylées dans le cas de l'utilisation de la cyclodextrine hexa-substituée  $CD(N_3)_6$ .

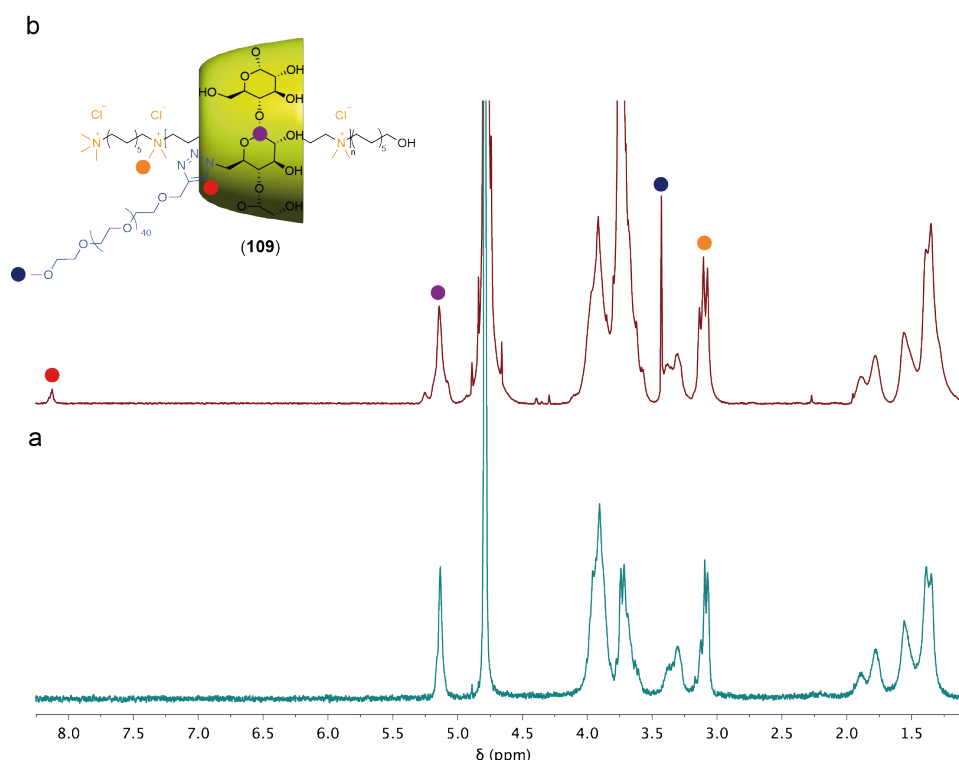
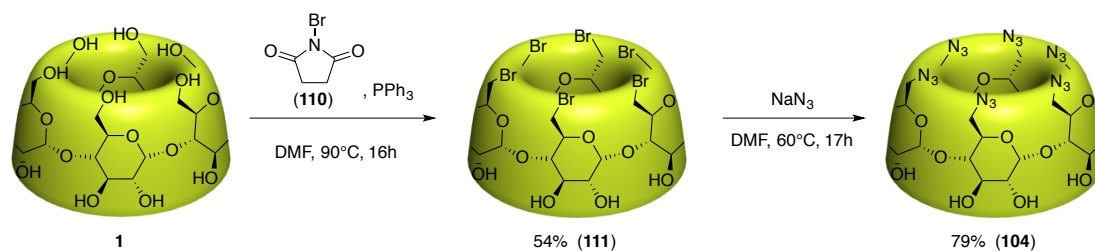


Figure 4.8 : Spectre RMN  $^1H$  (400 MHz,  $D_2O$ ) du PPR de  $CD(N_3)_6$  enfilé à 60% avant PEGylation (a) et après (b). Le produit (109) est purifié par ultrafiltration sur membrane 10 kDa.

## ii. Extension à la CD hexa-azoture

La cyclodextrine hexa-azoture (104) est obtenue en deux étapes de synthèse avec un rendement de 43% (Figure 4.9). La première étape consiste en la *per*-halogénéation du col primaire de la cyclodextrine par action du *N*-bromosuccinimide (110) et de la triphénylphosphine à 90°C. Cette réaction a été décrite par l'équipe de J. Defaye en 2000 avec le *N*-chlorosuccinimide.<sup>[131]</sup> La spectrométrie de masse a permis de valider que la totalité du col primaire était bromée. La réaction de substitution nucléophile par l'azoture de sodium dans le DMF par voie thermique (60°C) permet d'obtenir la cyclodextrine  $CD(N_3)_6$  (104) avec un rendement de 79%.<sup>[132]</sup> Cette cyclodextrine est néanmoins très peu soluble dans l'eau et les tentatives d'enfilage sur l'axe modèle sont restées vaines. Nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation de cyclodextrines hexa-acide ou hexa-amine pour réaliser la réaction de PEGylation par couplage peptidique.


 Figure 4.9 : Voie de synthèse de  $CD(N_3)_6$  (**104**)

## b. CDs hexa-fonctionnalisées pour la PEGylation par couplage peptidique

### i. CD hexa-acide

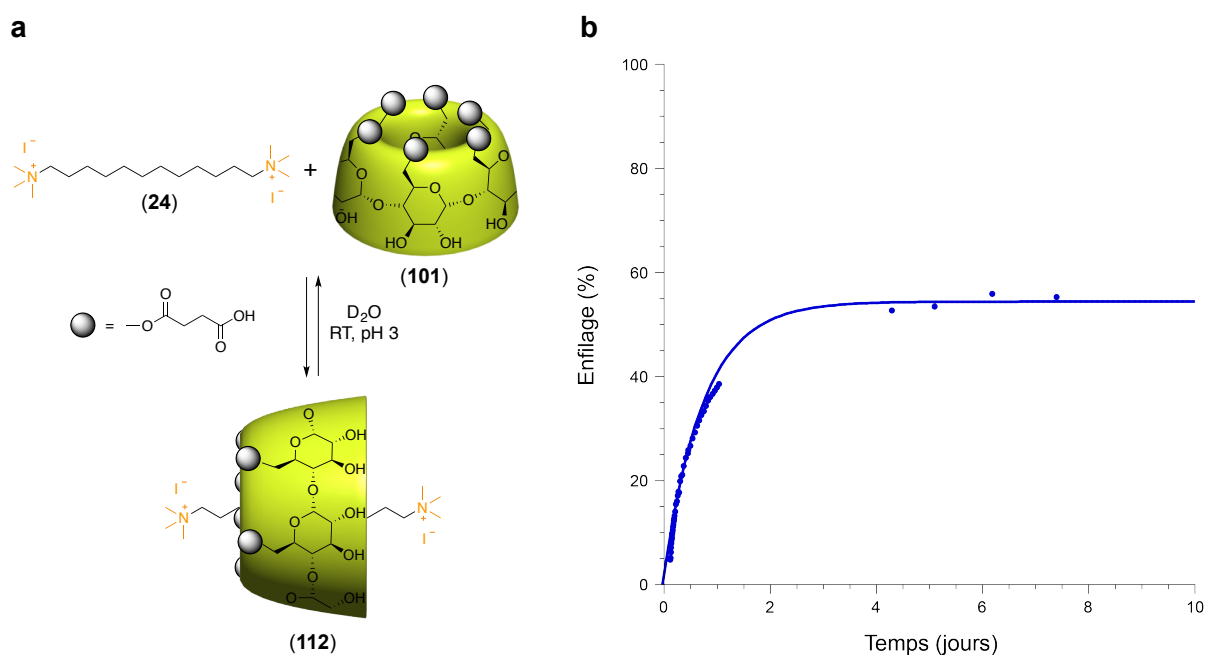


Figure 4.10 : a) Voie de synthèse de complexe d'inclusion entre la CD-hexa-acide (**101**) et le monomère **24** ; b) Suivi cinétique d'enfilage de  $CD(CO_2H)_6$  (**101**) sur le monomère modèle (**24**) en mélange 1:1 dans  $D_2O$  à 2,8 mM, 300 K, pH 3.

Dans un premier temps, l'enfilage de la CD hexa-acide (**101**) dont la synthèse a déjà été présentée sur la Figure 4.4, a été étudié avec l'axe modèle **24**. L'auto-assemblage a été réalisé à pH 3 (Figure 4.10) car cette CD est peu soluble à pH inférieur à cause de la protonation de toutes les fonctions acides carboxyliques et pour éviter les interactions électrostatiques des carboxylates avec les groupements ammonium à pH plus élevé. Si la constante d'association est relativement bonne avec 54% de complexe d'inclusion formé à l'équilibre, l'enfilage est aussi très lent, deux jours sont nécessaires pour atteindre le plateau quand en moyenne 4h suffisent à la CD native (**1**), **CDLa** (**18**), **CDLa<sub>2</sub>** (**20**) ou **CD-BODIPY** (**22**).

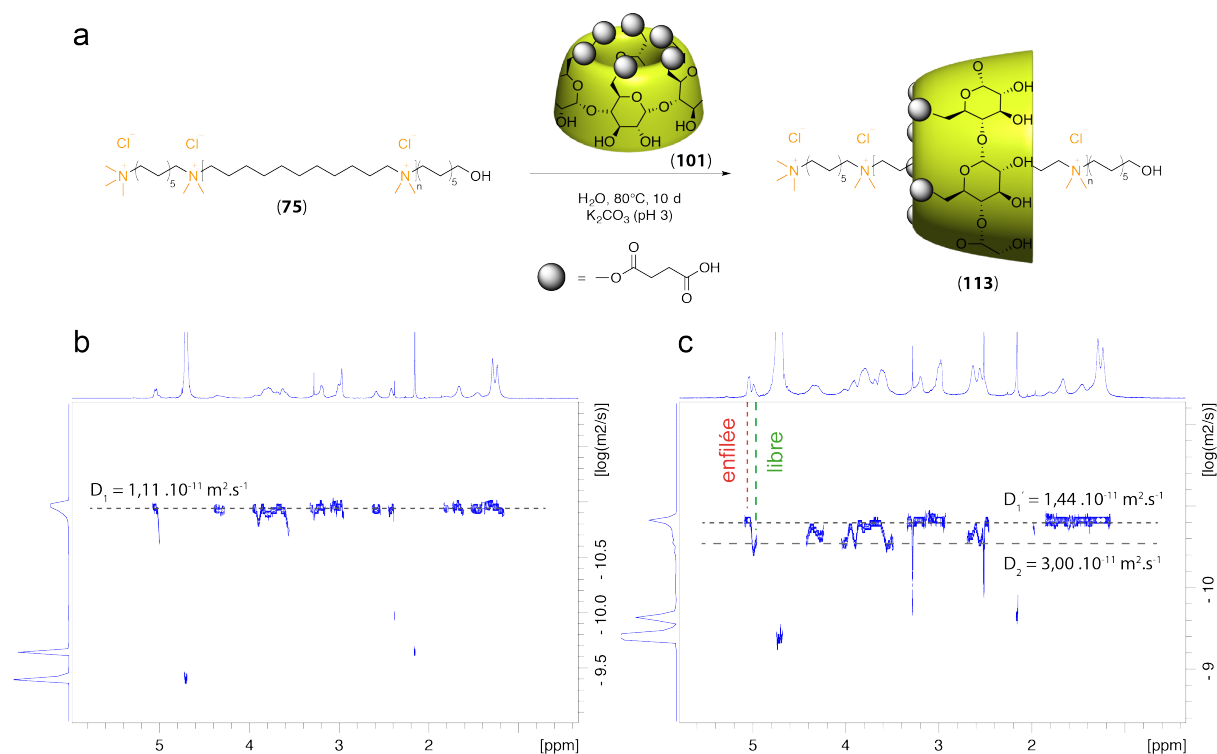


Figure 4.11 : a) Enfilage de  $\text{CD}(\text{CO}_2\text{H})_6$  (101) sur le polyammonium perméthylé (75) ; a) RMN DOSY  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) du PPR de  $\text{CD}(\text{CO}_2\text{H})_6$  (113) après ultrafiltration ; b) Echantillon (a) auquel a été ajoutée de la  $\text{CD}(\text{CO}_2\text{H})_6$  libre.

Cet enfilage lent sur le monomère modèle risque d'être limitant pour l'utilisation de  $\text{CD}(\text{CO}_2\text{H})_6$  pour la *post*-fonctionnalisation du PPR. Toutefois, son enfilage sur le polymère a été réalisé à 80°C pendant 10 jours dans une solution aqueuse à pH 3 (Figure 4.11a). Le mélange réactionnel est alors purifié par ultrafiltration sur membrane (10 kDa). L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  permet d'avancer un enfilage d'environ 30% en cyclodextrines et la RMN DOSY  $^1\text{H}$  (Figure 4.11b) semble valider que l'ensemble des protons du composé diffusent à la même vitesse. Cette expérience permet de conclure que les cyclodextrines toujours présentes après purification sont enfilées sur le polymère. Néanmoins, la caractérisation par RMN 2D TROESY n'a pas permis de mettre en évidence de corrélation entre les protons de la cavité et la chaîne carbonée du polymère ne nous permettant pas de valider la formation du *pseudopolyrotaxane*. On peut alors se poser la question des interactions électrostatiques entre les ammoniums et les acides carboxyliques des CDs. Une seconde expérience RMN DOSY  $^1\text{H}$  a été réalisée en ajoutant de la  $\text{CD}(\text{CO}_2\text{H})_6$  libre à température ambiante. Comme on peut le voir sur la Figure 4.11c, l'ajout de CD libre conduit à l'obtention d'un second coefficient de diffusion, légèrement plus élevé et à l'observation de deux pics caractéristiques des protons anomériques. Ce coefficient de diffusion de  $3,0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  est très faible pour une CD aussi peu fonctionnalisée et libre (autour de  $10^{-10}$ - $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  habituellement), on peut

donc penser que la cyclodextrine est sous la forme enfilée initialement et que la CD ajoutée interagissait de façon électrostatique avec le polymère. En admettant que l'on forme bien le PPR de  $\text{CD}(\text{CO}_2\text{H})_6$ , son taux de recouvrement de seulement 30% est assez faible pour que la PEGylation soit efficace. Ainsi le manque de caractérisation prouvant l'inclusion de l'axe dans la cyclodextrine et l'enfilage insuffisant nous ont amené à écarter cette cyclodextrine et à réaliser la synthèse de la cyclodextrine hexa-amine.

## ii. CD hexa-amine

La cyclodextrine hexa-amine (**105**) a été obtenue par réaction de Staudinger sur la cyclodextrine hexa-azoture (**104**) (Figure 4.12).<sup>[132]</sup> Un rendement global de 60% a été obtenu en reproduisant les trois étapes de synthèse sans purification intermédiaire. L'hydrosolubilité de la cyclodextrine hexa-amine étant plus élevée à pH acide grâce à la protonation des amines du col primaire, elle est aisément purifiée de l'ensemble des sous-produits des étapes précédentes (principalement de l'oxyde de triphénylphosphine) par précipitation dans l'éthanol puis filtrée de ces impuretés dans l'eau à pH 3 avant d'être lyophilisée.

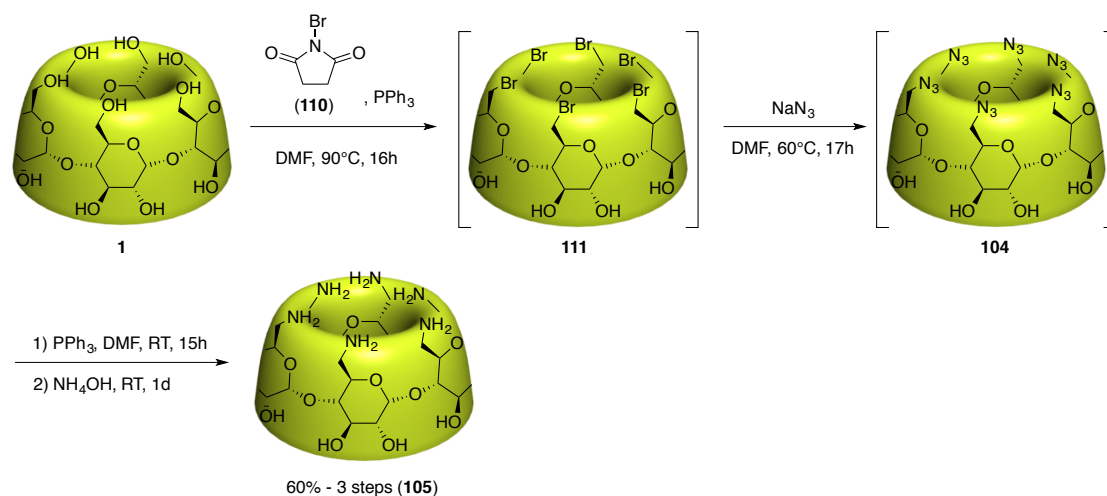


Figure 4.12 : Voie de synthèse de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  (**105**)

La cyclodextrine hexa-amine (**105**) seule dans l'eau est soluble jusqu'à pH 7-8, à des valeurs de pH plus élevées, elle précipite spontanément. Les premiers essais d'enfilage de cette CD sur le monomère modèle ont été réalisés à pH 3-4. Dans ces conditions acides, la formation du complexe d'inclusion n'a pas été observée et la répulsion entre le col primaire de la cyclodextrine et les ammoniums de l'axe modèle, tous deux chargés positivement, ont été mis en cause. Le chauffage de l'échantillon jusqu'à 50°C n'améliorant pas l'enfilage, du carbonate de potassium a été introduit pour ajuster le pH à 10 et a conduit à l'observation d'une légère augmentation de la turbidité de l'eau, mais surtout à l'enfilage de la CD sur l'axe

à hauteur de 75% en une quarantaine de minutes seulement (Figure 4.13 ;  $t_{1/2} = 11$  min ;  $\log(K_f) = 3,6$ ). Il semblerait donc que la présence de l'axe **24**, non enfilé au moment de l'ajout du carbonate de potassium, permette d'augmenter l'hydrosolubilité de **CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>** (**105**) car, d'après la RMN <sup>1</sup>H à pH 10, le mélange reste proche d'une stœchiométrie 1:1 malgré la turbidité de la solution (on note néanmoins un élargissement de l'ensemble des pics caractéristiques de la CD qui peut être dû à la formation d'agrégats). En comparaison à **CD(CO<sub>2</sub>H)<sub>6</sub>** (**101**), l'enfilage de la cyclodextrine hexa-amine est nettement plus rapide et donne un taux d'enfilage supérieur de 21% à celui de **CD(CO<sub>2</sub>H)<sub>6</sub>**. De plus, elle possède le meilleur enfilage de toutes les cyclodextrines fonctionnalisées obtenues, à peine plus faible que la CD native (91%) et un temps d'enfilage très faible. Le complexe d'inclusion a été caractérisé par RMN TROESY (Figure 4.14), montrant les corrélations spatiales attendues entre les H<sup>3</sup> et H<sup>5</sup> pointant vers l'intérieur de la cavité et les protons de la chaîne carbonée.

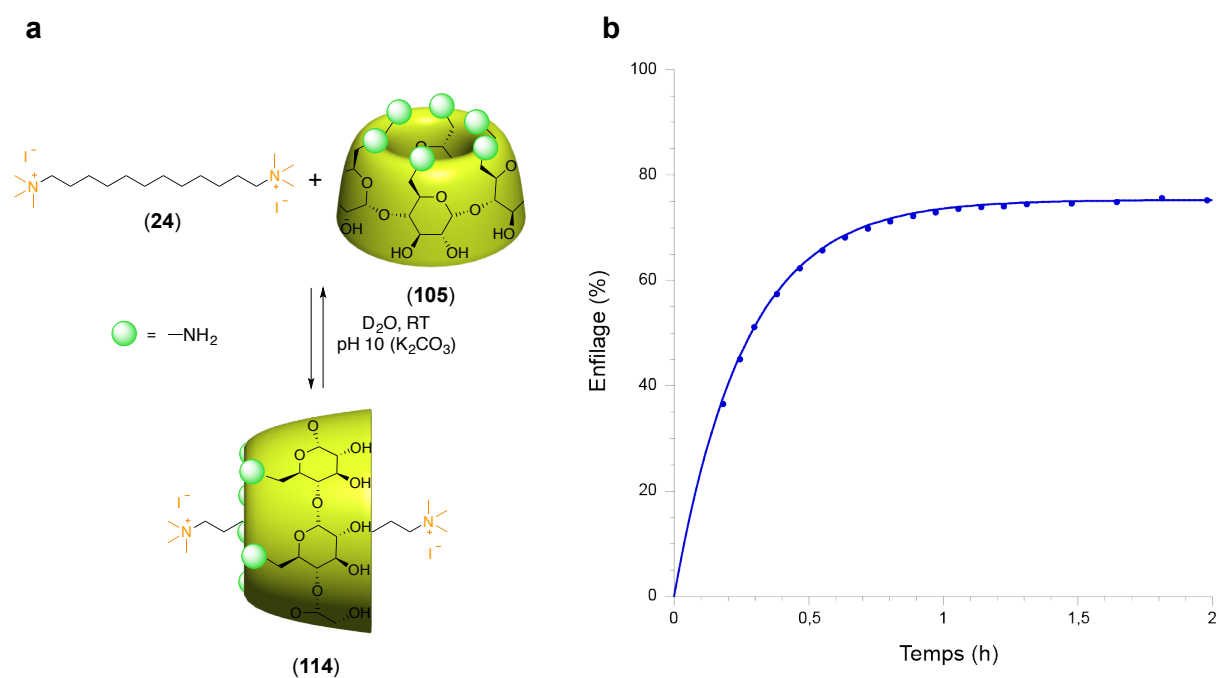


Figure 4.13 : a) Voie de synthèse de complexe d'inclusion **(114)** entre la CD-hexaamine **(105)** et le monomère **24** ; b) Suivi cinétique d'enfilage de **CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>** sur le monomère modèle en mélange 1:1 à 2,8 mM dans D<sub>2</sub>O à pH 10 (300 K)

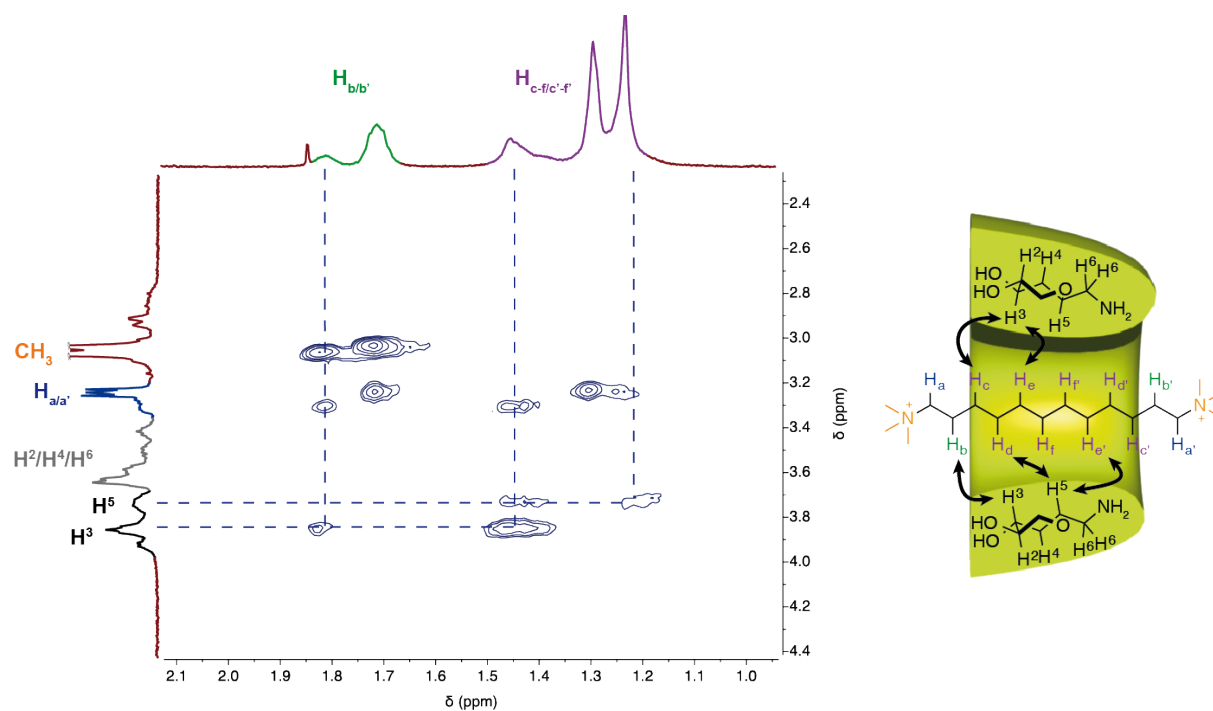


Figure 4.14 : Spectre RMN TROESY (600 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[2]rotaxane de CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**114**) à pH 10 (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

Cette cyclodextrine hexa-fonctionnalisée apparaît donc comme très prometteuse pour son utilisation sur le polyammonium. Les essais d'enfilage de la CD hexa-amine sur le polyammonium (**75**) ont été réalisés à différentes températures (de 25 à 80°C), et en modifiant les conditions de pH du mélange réactionnel de 3 à 10 par pallier d'une unité. Malheureusement, aucun enfilage n'a été détecté jusqu'à pH 8 et l'ajout de carbonate de potassium supplémentaire a conduit à la précipitation de la cyclodextrine. Le mélange réactionnel a été chauffé à 80°C pendant une dizaine de jours mais aucune modification n'a été observée. Cette expérience a été répétée en introduisant dans un premier temps de la CD native pouvant s'enfiler sur le polymère et accroître son hydrosolubilité, mais les conclusions restent inchangées : aucun enfilage de CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> et formation d'un précipité à pH supérieur à 8. Comme on a déjà pu le remarquer avec le monomère modèle, le passage à pH 10 provoque l'augmentation légère de la turbidité de la solution. Cette turbidité pourrait être caractéristique de la formation instantanée d'un complexe d'inclusion, néanmoins le suivi par RMN <sup>1</sup>H indique que sa formation se fait progressivement sur une quarantaine de minutes. Ce précipité en suspension est donc plus vraisemblablement associé à la CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> peu soluble dans ces conditions de pH (élargissement de ses pics caractéristiques en RMN <sup>1</sup>H). L'absence d'enfilage de la cyclodextrine hexa-amine (**105**) sur l'axe polymérique (**75**) pourrait donc être due à la différence d'hydrosolubilité entre le monomère modèle (**24**) et le polyammonium

(75). Cette cyclodextrine, très intéressante au demeurant, n'a donc pas pu être mise à profit pour les réactions de *post*-fonctionnalisation des PPRs.

### 3. Conclusion

Si la PEGylation des *pseudopolyrotaxanes* polycationiques semble intéressante pour la réduction de leur toxicité, aucune voie de *post*-fonctionnalisées envisagée n'a aboutie pour permettre d'en évaluer l'efficacité. Souhaitant minimiser le nombre d'étape de synthèse *post*-enfilage des cyclodextrines fonctionnalisées pour l'IRM et la microscopie de fluorescence, nous avons synthétisé des cyclodextrines hexa-fonctionnalisées et réalisé leur enfilage pour en faire le support de la PEGylation. Les résultats d'enfilage de la CD hexa-acide n'étant pas concluant, nous avons poursuivi avec la CD hexa-amine dont le comportement d'enfilage sur le monomère modèle dépend du pH. La combinaison des faibles hydrosolubilités du polyammonium et de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  à pH 10 rend la formation du *pseudopolyrotaxane* impossible. Néanmoins, l'étude de son enfilage en fonction des conditions de pH a été développé sur le monomère modèle.

En perspectives de ce travail de réduction de la toxicité, beaucoup de questions se posent. Nous sommes parvenus à synthétiser de nombreux PPRs fonctionnalisés avec cet axe dont les propriétés, en particulier en relaxométrie, se sont révélées intéressantes. La valorisation de ces structures supramoléculaires est donc pertinente pour des applications biomédicales. Néanmoins, au vu du nombre considérable de PRs de CDs utilisés *in vivo*, d'autres axes, moins toxiques, permettent de parvenir à de telles structures et ne nécessitent aucune *post*-fonctionnalisation. C'est l'une des raisons pour laquelle nous avons investigué l'utilisation des axes poly(alkylène phosphate) d'une part (Chapitre 3), mais aussi d'autres voies de synthèses de PR par polymérisation de *pseudo*-rotaxanes qui seront présentées dans la dernière partie du chapitre.

## II. Enfilage pH-contrôlé de CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>

### 1. Étude préliminaire

L'observation du non enfilage à pH < 10 de la CD hexa-amine (**105**) nous a incité à expérimenter le comportement du complexe d'inclusion de retour dans des conditions acides. L'ajout d'acide trifluoroacétique (TFA) jusqu'à pH 1 dans une solution de complexe d'inclusion **114** a permis de mettre en évidence le désenfilage, lui aussi très rapide ( $t_{1/2} = 15$  min), de CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (Figure 4.15c).

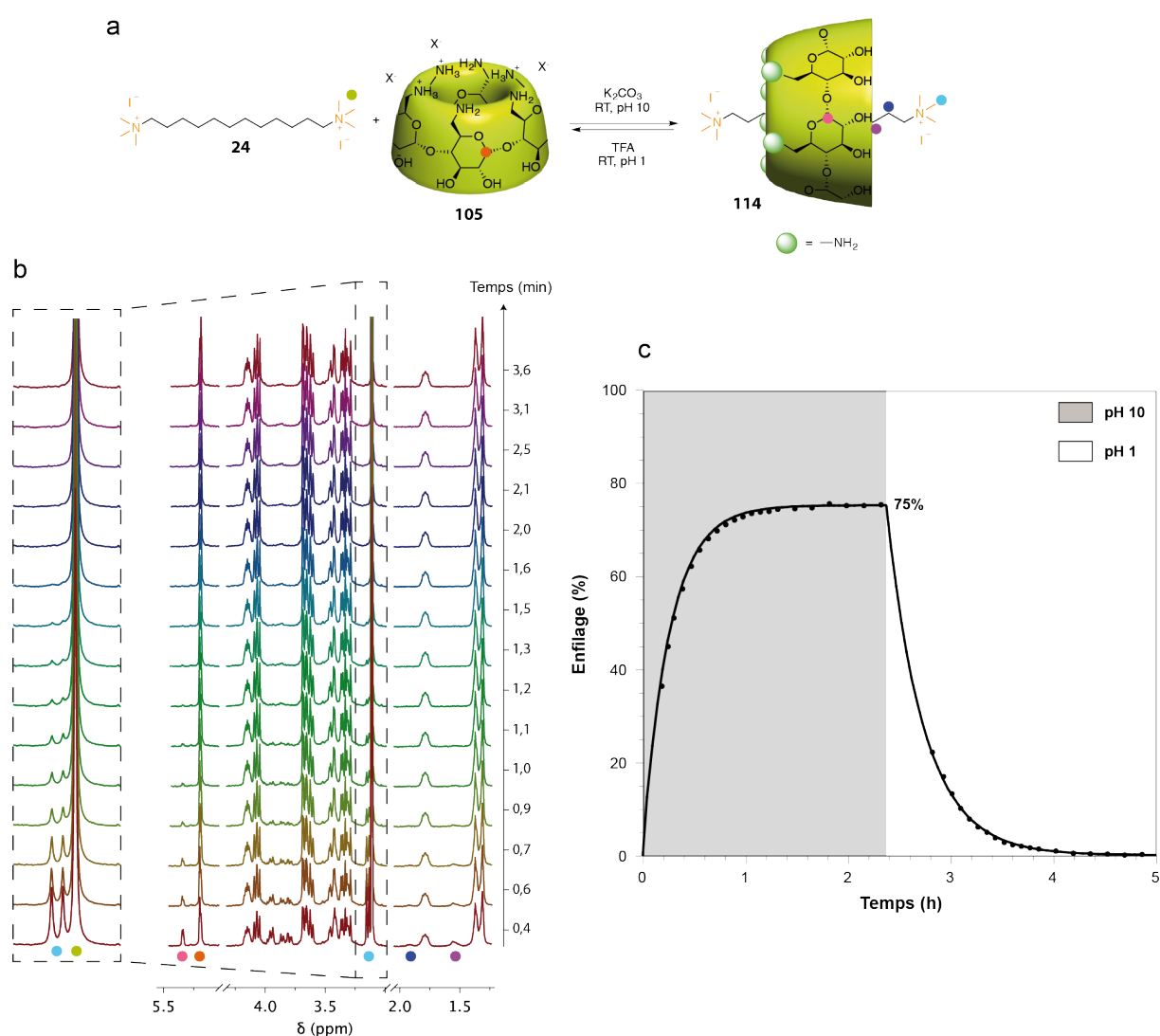


Figure 4.15 : a) Enfilage pH-contrôlé de CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (**105**) sur le monomère modèle **24** ; b) Suivi RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K) du désenfilage de CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> de l'axe modèle (mélange 1:1 ; c = 2,8 mM) ; c) Suivis cinétiques d'enfilage à pH 10 et de désenfilage à pH 1 de CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> sur le monomère modèle (c = 2,8 mM ; D<sub>2</sub>O ; 300 K).



Le suivi RMN  $^1\text{H}$  après l'ajout de TFA permet d'observer la cinétique de dissociation de complexe d'inclusion. De façon similaire à l'étude de l'enfilage, les *pseudo*-bouchons du monomère modèle permettent l'observation simultanée de la forme enfilée (*pseudo*-[2]rotaxane (**114**)) et de l'axe libre (**24**). En condition acide (pH 1), les méthyles des *pseudo*-bouchons (pastille cyan sur la Figure 4.15) de l'axe enfilé ne se trouvent plus superposés à ceux de la forme libre et on peut suivre l'atténuation concomitante des deux singulets (Figure 4.15b). L'expérience d'enfilage/désenfilage a pu être étudiée par RMN DOSY  $^1\text{H}$ . On constate bien la présence de deux coefficients de diffusion à pH 1 correspondant à la CD hexaamine libre ( $2,68 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) et à l'axe libre ( $4,28 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), et un unique coefficient de diffusion à pH 10 lorsque le *pseudorotaxane* (**114**) est formé ( $2,46 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Annexe 17).

Le développement d'un système pH-contrôlé à base de cyclodextrine, intéressant au premier abord pour son caractère innovant, pourrait être utilisé pour obtenir un moyen de relargage de cyclodextrine sous stimulus. Wenz a décrit en 2009 un polyrotaxane de  $\beta$ -cyclodextrines *pseudo*-bouchonné par des  $\alpha$ -cyclodextrines enfilées aux extrémités des chaînes du polymammmonium et dont la position est stable à température ambiante.<sup>[133]</sup> L'utilisation de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  permet d'envisager un bouchonnage similaire mais apportant l'avantage d'être contrôlé par un stimulus chimique.

## 2. Exemples d'enfilage/désenfilage de cyclodextrines contrôlés

Tout un domaine de la chimie supramoléculaire consiste en l'étude de machines moléculaires dans lesquelles un stimulus externe induit un mouvement mécanique moléculaire.<sup>[134]</sup> Lorsque ce mouvement est réversible, le système est dit « commutable », et en fonction du stimulus on peut choisir d'induire ou non ce mouvement, de bouger d'une position et d'y revenir, d'assembler ou de désassembler une architecture. Il existe dans la littérature quelques exemples de *pseudopolyrotaxanes* de cyclodextrines dont la formation et la dissociation sont contrôlées par un stimulus chimique (Figure 4.16).<sup>[115,135]</sup>

Dans ces deux exemples les structures PPRs sont pH-contrôlées et la modification de l'architecture est suivie, tantôt par RMN  $^1\text{H}$  tantôt par spectroscopie UV-Visible. Si dans le cas des travaux de l'équipe de Goh (b) le passage en condition acide permet le désenfilage total des  $\beta$ -CDs par la protonation des amines tertiaires, le co-polymère de l'équipe de Yui (a) est intéressant car seule la partie poly(éthylène imine) (PEI) est affectée par l'ajout d'un acide. Dans ce deuxième exemple il est alors possible d'imaginer une structure bouchonnée de type

polyrotaxane où le passage en condition acide n'induirait pas le désenfilage des  $\alpha$ -CDs mais plutôt un tassement ou un regroupement de celles-ci sur la partie PEG comme cela a été réalisé par l'équipe strasbourgeoise de Georges Hadziioannou en 2008.<sup>[136]</sup> Des exemples de déplacements thermiquement contrôlés de ce type ont aussi été étudiés pour la conception de gels thermo-sensibles.<sup>[137]</sup> Plus récemment l'équipe de J. F. Stoddart a rapporté la synthèse et l'étude d'un [2]rotaxane d' $\alpha$ -CD sur lequel la position du macrocycle dépend du degré d'oxydation de l'unité tétrathiafulvalène présente sur l'axe (Figure 4.17).<sup>[110]</sup> Par ajout d'eau oxygénée ou de Fe(III), il provoque l'oxydation de l'unité tétrathiafulvalène (en vert) dans sa forme dicationique induisant l'expulsion de la cyclodextrine de l'autre côté de l'axe. Il caractérise alors la position de la CD sur l'axe et son influence par RMN, spectroscopie UV-Visible, et voltammétrie cyclique.

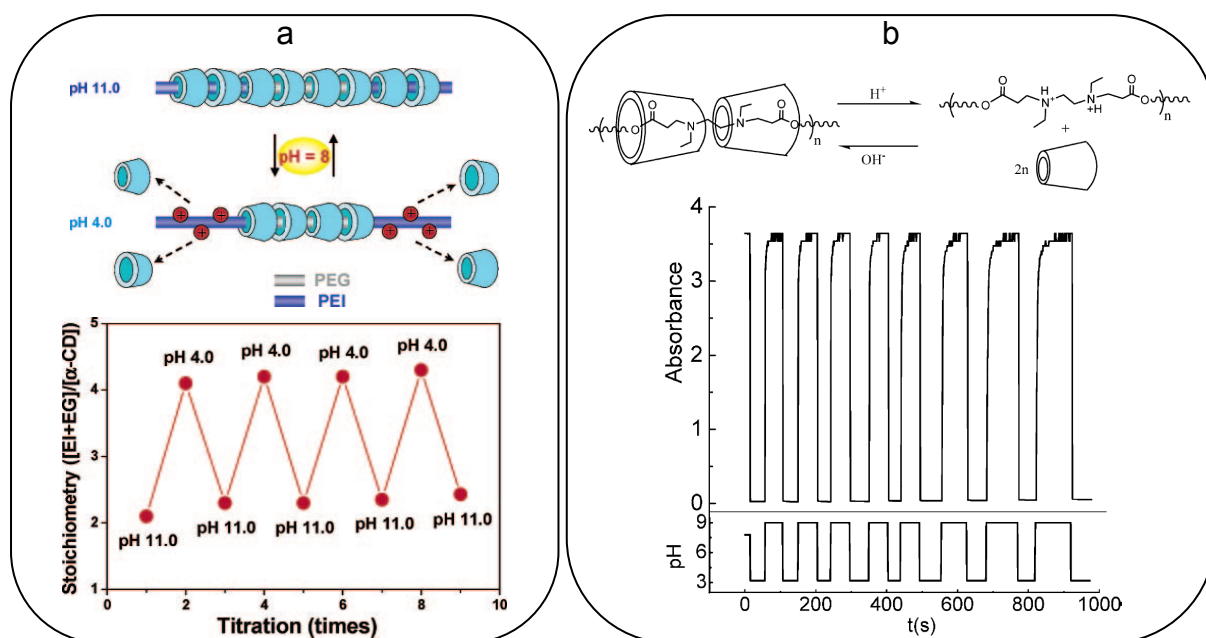


Figure 4.16 : Travaux des équipes de N. Yui (a)<sup>[135a]</sup> et S. H. Goh (b)<sup>[135b]</sup> sur des pseudopolyrotaxanes d' $\alpha$ - ou  $\beta$ -CDs respectivement.

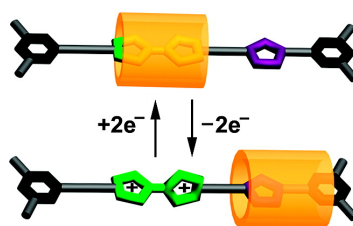


Figure 4.17 : [2]rotaxane d' $\alpha$ -CD bis-stable redox-sensible développé par Stoddart *et al.*<sup>[110]</sup>

Des exemples basés sur une isomérisation cis-trans d'un groupement azobenzène ont aussi été décrits par les groupes d'Akira Harada,<sup>[138]</sup> Hi Tian<sup>[139]</sup> ou encore Harry L. Anderson.<sup>[140]</sup> Par des stimuli lumineux ils parviennent à contracter un muscle (Figure 4.18) ou à choisir la position d'une cyclodextrine sur un axe. Ainsi, on trouve dans la littérature des exemples de rotaxanes commutables à base de cyclodextrines mais dans tous les cas le stimulus induit un changement au niveau du site de reconnaissance de l'axe et non de la CD. L'intérêt et l'originalité de la  $CD(NH_2)_6$  réside dans la possibilité d'agir directement sur le macrocycle, ce qui constitue à ma connaissance le premier exemple de ce genre.

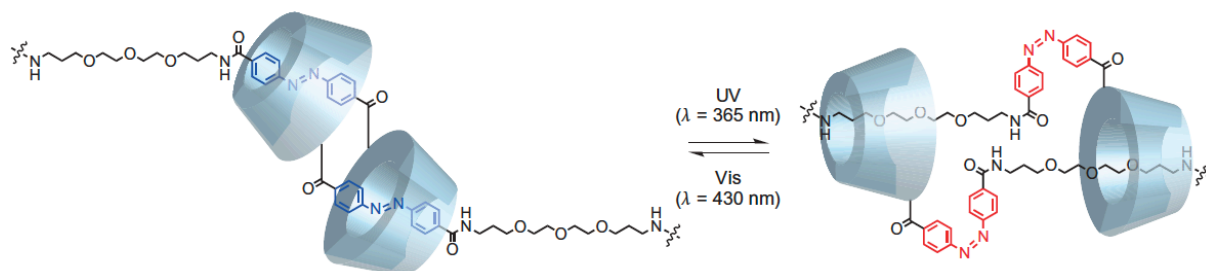


Figure 4.18 : Muscle moléculaire basé sur une isomérisation photochimique d'azobenzène développé par A. Harada *et al.*<sup>[138b]</sup>

### 3. Cycles d'enfilage/désenfilage de $CD(NH_2)_6$ sur l'axe modèle

Une étude plus détaillée a été réalisée sur le rotaxane de cyclodextrine hexa-amine (**105**) afin de déterminer la fatigue du système par la répétition de cycles d'enfilage/désenfilage. Les stimuli acido-basiques sont le carbonate de potassium, pour ajuster le pH à 10 et déclencher l'enfilage de la cyclodextrine, et le TFA pour acidifier jusqu'à pH 1 et induire le désenfilage. Quatre cycles successifs ont pu être effectués sur un mélange 1:1 à 2,8 mM (Figure 4.19) et permettent de mettre en évidence une fatigue relativement importante du système commutable. En effet, si le premier enfilage atteint 75% en complexe d'inclusion, rapidement, ce taux d'enfilage décroît cycle après cycle jusqu'à atteindre 22% au quatrième enfilage. Cette fatigue s'explique par l'augmentation de la force ionique à chaque modification de pH qui entraîne une stabilisation de la sphère de solvation des ammoniums de part et d'autre du monomère.<sup>[103]</sup> Cette stabilisation doit avoir pour effet d'augmenter la barrière énergétique du passage de la CD par le *pseudo*-bouchon et donc se traduire par une diminution de la constante de vitesse de formation du complexe d'inclusion entraînant la diminution de la constante de formation. Pourtant, si une diminution de la constante de vitesse de désenfilage est observée à pH 1, la vitesse d'enfilage à pH 10 reste constante. Nous avons pu vérifier l'absence de précipité après le 4<sup>ème</sup> désenfilage qui aurait pu induire la

diminution de l'enfilage atteint et, malgré la turbidité de la solution à chaque passage à pH 10, l'intégration des spectres RMN  $^1\text{H}$  confirme le maintien d'un équivalent de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  en solution pour un équivalent de monomère modèle (**24**). Cette fatigue du système pH-contrôlé semble donc attendue mais n'est pas encore totalement rationalisée.

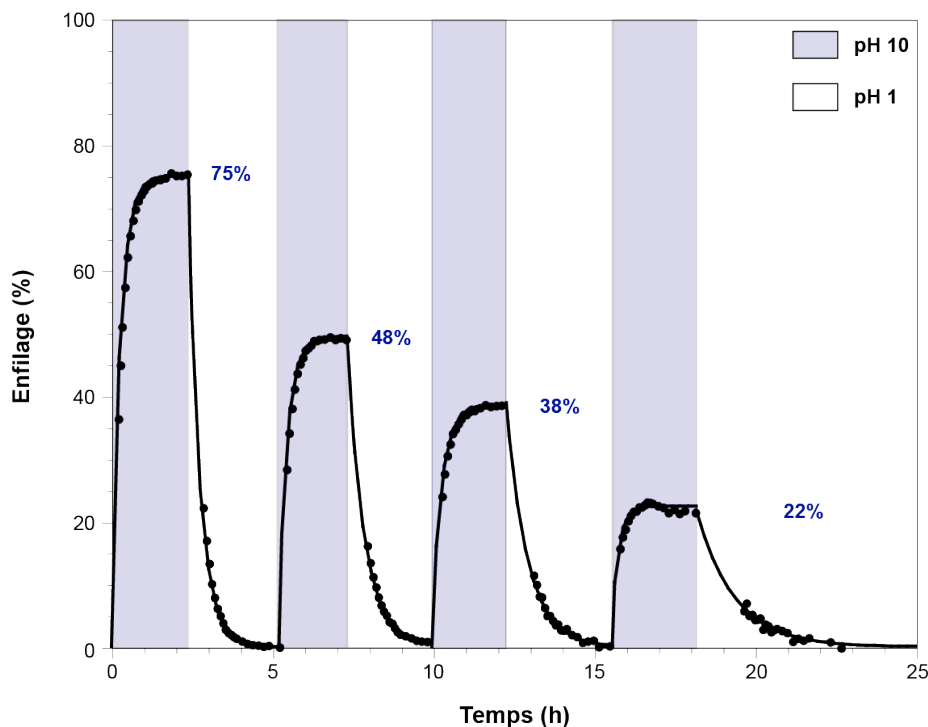


Figure 4.19 : Cycles d'enfilage (pH 10 -  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) et de désenfilage (pH 1 - TFA) de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  sur le monomère modèle **24** ( $c = 2,8 \text{ mM}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K)

Dans certains systèmes supramoléculaires basés sur des rotaxanes de cyclodextrines, la question de l'orientation privilégiée de la cyclodextrine lors de l'enfilage ou du désenfilage est posée.<sup>[109b,119,141]</sup> En effet, si on parvient à induire un sens privilégié à l'enfilage et au désenfilage alors on peut espérer amorcer par un stimulus extérieur un mouvement moléculaire unidirectionnel.<sup>[142]</sup>

#### 4. Étude du sens d'enfilage/désenfilage de $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$

Dans l'étude de notre rotaxane pH-contrôlé, nous nous sommes intéressés à la détermination du sens d'enfilage privilégié, s'il y en a un, de la CD hexa-amine sur le monomère modèle. De plus, nous nous sommes demandés quel phénomène gouvernait le désenfilage de la CD à pH 1 : est-ce l'augmentation de l'hydrophilicité de la CD, une déformation de la cavité de la CD, ou une répulsion électrostatique entre le col primaire chargé positivement et le *pseudo*-bouchon ammonium ?

Pour apporter une réponse à ces questions, nous avons entrepris la synthèse d'un axe dissymétrique de type alcane diammonium (**120**, Figure 4.20) possédant un *pseudo*-bouchon *per*-méthylé d'une part et un bouchon *per*-éthylé d'autre part décrit comme suffisamment volumineux pour empêcher l'enfilage de la CD native.<sup>[103]</sup> Sa synthèse démarre par la protection des amines primaires par des groupements '*Boc*' suivi de la déprotection sélective d'une des deux amines permettant la dissymétrisation du 1,12-dodécane bis-amine commercial (**115**).<sup>[143]</sup> La méthylation de l'amine primaire est effectuée en présence de carbonate de potassium et d'iodométhane dans le toluène à température ambiante. La caractérisation par RMN <sup>1</sup>H permet de valider le maintien du deuxième groupement '*Boc*' et la non méthylation du carbamate associé. Le groupement protecteur est ensuite clivé en condition acide avant d'effectuer la *per*-éthylation de l'amine primaire par l'iodoéthane dans l'acétonitrile. Le rendement sur les trois dernières étapes est supérieur à 45%, la purification de l'ensemble des sels étant réalisée sur le monomère dissymétrique final (**120**) par recristallisation dans l'acétone puis l'éthanol.

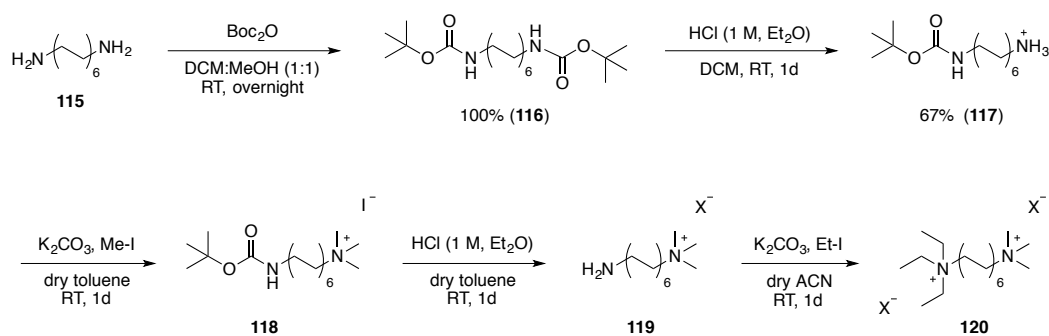


Figure 4.20 : Voie de synthèse de l'axe modèle dissymétrique (**120**)

Le bouchon *per*-éthylé ne permettant pas l'enfilage de la cyclodextrine, la dissymétrisation de cet axe devrait nous permettre, après enfilage de la CD hexa-amine, de déterminer si il existe un sens d'enfilage privilégié en comparant la proportion des deux isomères *pseudo*-[2]rotaxane possibles (Figure 4.21).

Le suivi cinétique de la formation du complexe d'inclusion a été réalisé sur le monomère dissymétrique (**120**) dans un mélange 1:1 à 2,8 mM dans  $\text{D}_2\text{O}$  à température ambiante et en condition basique (pH 10 -  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), suivi de son désenfilage à pH 1 (Figure 4.22). On peut constater que le pourcentage de complexe d'inclusion formé est assez faible (~ 23%) mais que le contrôle de l'enfilage et du désenfilage par la modification du pH fonctionne. L'enfilage (a) et le désenfilage (b) de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  peuvent être suivis par l'apparition ou la disparition des pics caractéristiques du *pseudo*-bouchon (bleu) et des

méthylènes de milieu de chaîne (violet). En particulier lors du désenfilage, les protons anomériques du complexe d'inclusion (en vert, 5,39 ppm) et de la forme libre (5.25 ppm) sont bien séparés.

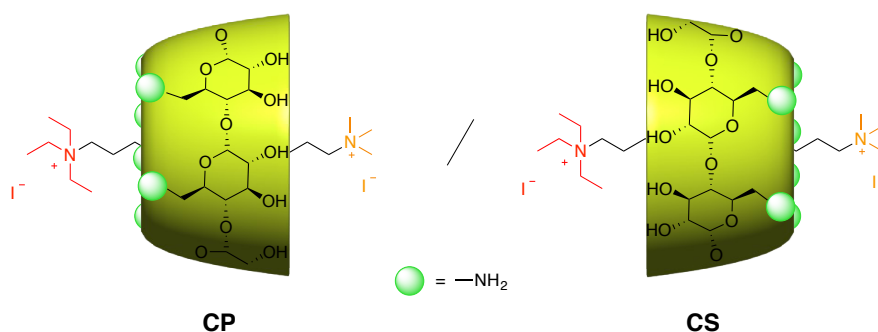


Figure 4.21 : Représentation des deux orientations possibles de **CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>** (**105**) sur le monomère dissymétrique (**120**) (isomères **CP** et **CS** = enfilage par le Col Primaire ou Secondaire)

Lorsque la CD s'enfile, le pic caractéristique des méthyles du *pseudo*-bouchon de l'axe dissymétrique, initialement sous forme de singulet, doit apparaître sous forme de trois singulets, un pour la forme libre, et deux pour les formes enfilées **CP** et **CS**. Si la cyclodextrine hexa-amine s'enfile (se désenfile) plus rapidement par l'un de ses cols, on devrait alors observer l'apparition ou la disparition plus rapide de l'un des singulets des formes enfilées. Ce phénomène n'est malheureusement pas clairement observable, ni pendant l'enfilage, ni durant le désenfilage, à cause de la superposition avec les signaux du méthylène en  $\alpha$  de l'ammonium *per*-éthylé à 3,22 ppm qui rend difficile l'interprétation. De plus il semble que l'un des singulets de la forme enfilée soit superposé à celui de la forme libre malgré une acquisition sur un spectromètre 600 MHz. Une expérience RMN TROESY du *pseudo*-[2]rotaxane de **CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>** sur l'axe dissymétrique a été réalisée pour mettre en évidence une corrélation particulière entre les H<sup>3</sup> et H<sup>5</sup> de la CD et les méthylènes en  $\alpha$ -, ou  $\beta$ - des bouchon et *pseudo*-bouchon. Seule une corrélation spatiale entre les méthylènes du milieu de chaîne et le H<sup>3</sup> pointant au centre de la cavité de la CD est observable, malheureusement, la superposition de l'ensemble des 8 méthylènes du centre de l'axe ne permet pas de conclure sur une orientation privilégiée.

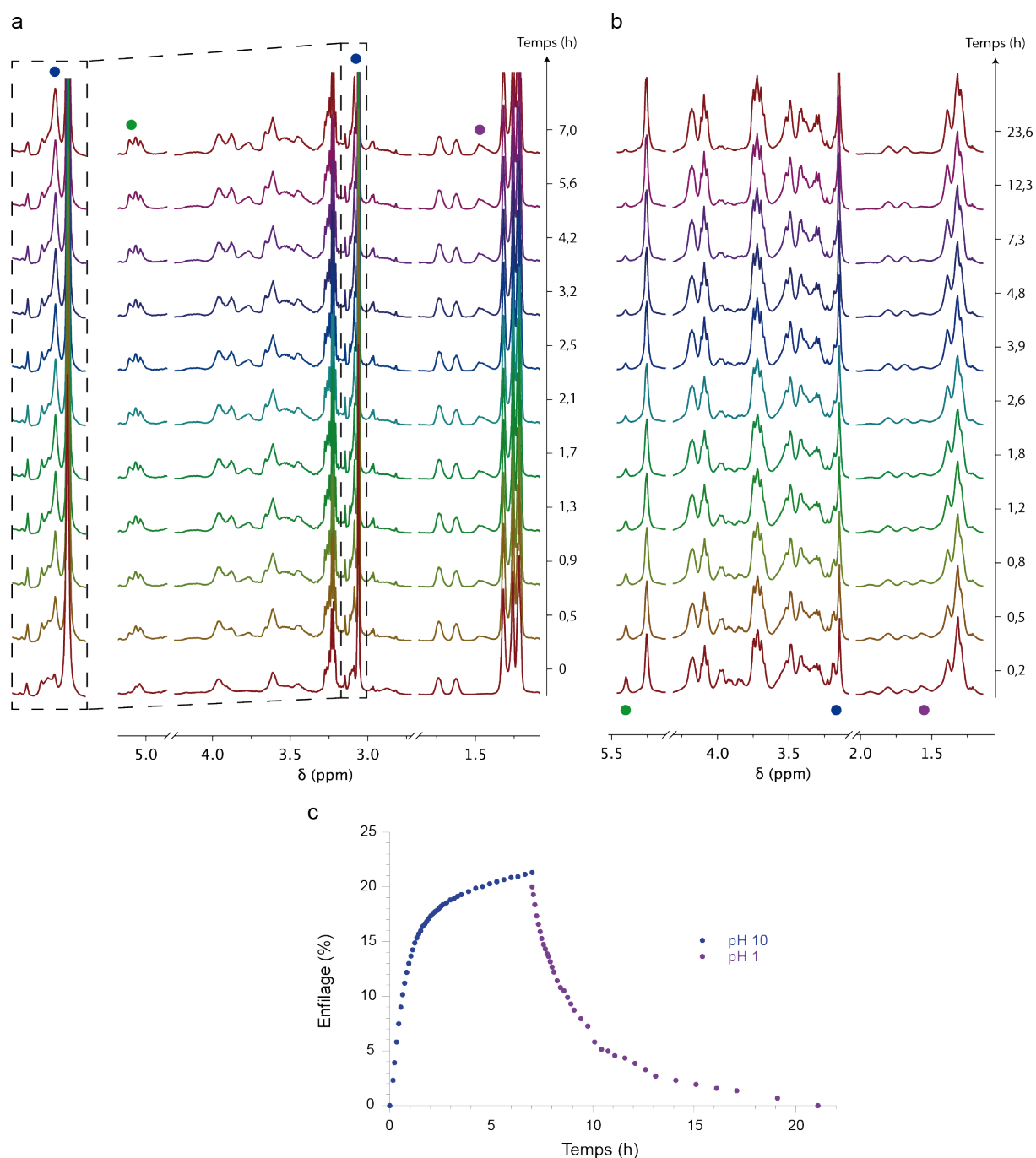


Figure 4.22 : Suivi RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) de l'enfilage (a) et du desenfilage (b) de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  sur l'axe dissymétrique (**120**) dans un mélange 1:1 à 2,8 mM. En bleu les méthyles du *pseudo*-bouchon, en vert les protons anomériques de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$ , en violet les méthylènes de l'axe enfilé ; c) Suivis cinétiques d'enfilage à pH 10 et de desenfilage à pH 1 de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  sur le monomère dissymétrique ( $c = 2,8$  mM ;  $\text{D}_2\text{O}$  ; 300 K).

Au cours de la rédaction de cette thèse, un article de M. Quiroga *et al.* a été publié avec un axe similaire ( $\text{Pr}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_{12}\text{NMe}_3^+$ ) et a permis de mettre en évidence une différence de vitesse d'association de la CD native en fonction de son orientation et d'estimer à 60% son enfilage par le col secondaire (Figure 4.23).<sup>[119]</sup> Dans leur étude, ils aboutissent à des

constantes de vitesse de déenfilage similaires quel que soit l'isomère *pseudo*-[2]rotaxane formé, leur permettant de faire l'hypothèse d'une pré-organisation hôte/invité (nommée « PC ») suivi de la formation du complexe d'inclusion. Ainsi, l'utilisation d'un axe dissymétrique *per*-méthylé/*per*-propylé semble permettre de conclure plus simplement, en partie grâce à l'absence du méthylène à 3,22 ppm qui facilite l'interprétation. Il serait intéressant d'utiliser cet axe avec la  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  pour voir si le même effet peut être observé.

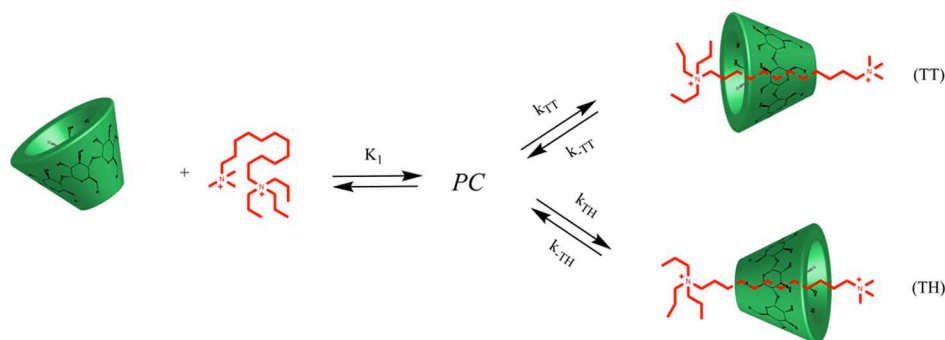


Figure 4.23 : Mécanisme de formation du *pseudo*-[2]rotaxane avec un axe dissymétrique (PC : pré-organisation du complexe d'inclusion)

## 5. Conclusion

Nous sommes parvenus à développer une structure *pseudo*-rotaxane de cyclodextrine fonctionnalisée dont la synthèse (association et dissociation) est contrôlée par le pH, ceci constitue un premier exemple remarquable d'activation directe sur la CD. Le stimulus acido-basique permet la protonation du col primaire de la cyclodextrine entraînant son déenfilage. L'étude du complexe d'inclusion de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  avec un axe dissymétrique a été réalisée afin de déterminer si un sens privilégié d'enfilage et de déenfilage pouvait être mis en évidence afin d'envisager la conception d'un mouvement moléculaire unidirectionnel basé sur un système pH-sensible mais l'analyse par RMN 1D et 2D n'a pas permis d'aboutir à de telles conclusions. L'utilisation d'un axe méthylé d'un côté et propylé de l'autre semble permettre de conclure sur un enfilage privilégié de la CD native par son col primaire, il sera donc intéressant de réaliser l'étude avec la CD hexa-amine. Le développement de ce système pH-contrôlé permet d'envisager des réactions réversibles de bouchonnage par l'enfilage de la CD hexa-amine aux extrémités d'un *pseudopolyrotaxane*.



### III. Polymérisation de *pseudo-rotaxanes*

La diversité des structures polyrotaxanes à base de cyclodextrines est constamment enrichie par le développement de nouveaux axes. S'ils étaient principalement obtenus par modifications de polymères commerciaux, les axes polymériques utilisés pour la synthèse de polyrotaxane sont de plus en plus « élaborés » avec (1) le couplage entre polymères pour obtenir des copolymères et polymères tri-blocs, (2) la fonctionnalisation des bouts de chaîne pour l'introduction de liaisons clivables ou en préparation de la réaction de bouchonnage, ou (3) par polymérisation et contrôle de la polydispersité et du degré de polymérisation du polymère. Le contrôle de la longueur moyenne des macromolécules est particulièrement intéressant pour étudier l'évolution des propriétés du polyrotaxane en fonction de sa taille caractéristique. La partie suivante relate le travail préliminaire réalisé sur la polymérisation de *pseudo-rotaxanes* comme voie de synthèse de PPRs et PRs de cyclodextrines.

#### 1. État de l'art

Les deux voies de synthèse les plus couramment utilisées pour la synthèse de polyrotaxanes de cyclodextrines sont l'enfilage suivi du bouchonnage, ou l'enfilage forcé. Pourtant, dès les années 1976, différents groupes s'intéressent à la polymérisation de monomères en présence de cyclodextrines pour l'obtention de polyrotaxanes (Figure 4.24).<sup>[144]</sup>

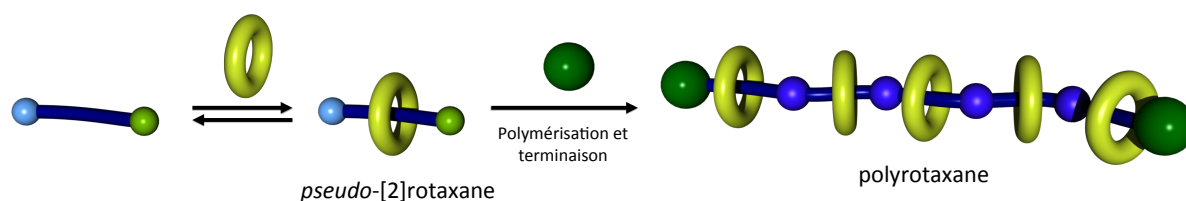


Figure 4.24 : Schéma de la polymérisation de *pseudo-rotaxanes* pour l'obtention d'un PR stable

Nous avons déjà discuté dans l'introduction de la polymérisation de *pseudo-rotaxanes* covalents à base de cyclodextrine développée par Jun Terao.<sup>[30b]</sup> D'autres groupes s'intéressent à la polymérisation de *pseudo-rotaxanes*, entre autres,<sup>[145]</sup> les groupes de Gerhard Wenz,<sup>[146]</sup> de Harry Anderson,<sup>[147]</sup> de Shingo Yamaguchi<sup>[145c]</sup> et d'Akira Harada<sup>[148]</sup> s'y essaient à partir des années 1996 en utilisant des couplages de Sonogashira, de Suzuki, par polymérisation de thiophènes et copolymérisation par couplage peptidique.

L'utilisation de cette méthode de synthèse par le groupe de Harry Anderson a pour but l'obtention de fil conducteur isolé. La copolymérisation des monomères **1** et **2** par couplage

de Suzuki en présence du bouchon **3** et de  $\beta$ -CD conduit à la formation de polyrotaxanes assez courts (8 unités monomériques) mais totalement recouverts avec environ 1,1  $\beta$ -CD par unité monomérique (déterminé par RMN  $^1\text{H}$ ).

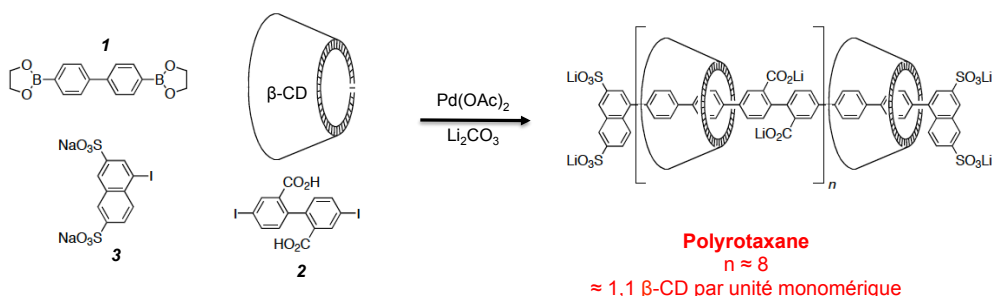


Figure 4.25 : Copolymérisation par couplage de Suzuki développée par le groupe de H. Anderson pour la synthèse de fil conducteur isolé.<sup>[147]</sup>

Dans la majorité des travaux cités précédemment, le travail est axé sur l'amélioration du recouvrement et du degré de polymérisation et une recherche de solubilité élevée en solvants organiques.<sup>[29b]</sup> Pour nos applications biomédicales, il nous faudra optimiser l'hydrosolubilité du polyrotaxane final et contrôler la polydispersité du polymère pour étudier l'influence de la longueur sur les propriétés des polyrotaxanes.

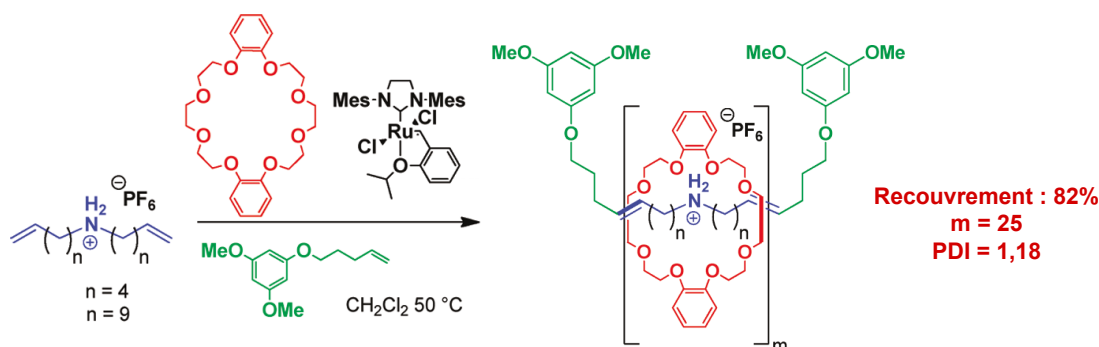


Figure 4.26 : Polymérisation de *pseudo*-[2]rotaxane par ADMet développée par Grubbs *et al.*<sup>[149]</sup>

En 2011, l'équipe de Robert H. Grubbs a publié ses travaux sur la polymérisation de *pseudo*-[2]rotaxanes d'éther couronne par métathèse acyclique de diènes (ADMet) (Figure 4.26).<sup>[149]</sup> Ce travail a attiré notre attention car il permet l'obtention d'un polyammonium relativement court (25 unités) et très largement recouvert (0,82 éther couronne par motif monomérique). L'axe polyammonium utilisé pour la synthèse des *pseudopolyrotaxanes* de cyclodextrines présentée dans le Chapitre 2 est très long mais nous ne connaissons pas sa longueur exacte. La synthèse d'un oligomère plus court est intéressante d'une part pour l'étude de sa toxicité en fonction de sa longueur, mais aussi pour réduire le temps caractéristique de l'enfilage des CDs sur le polymère. Nous avons donc tenté de transposer les

travaux présentés par l'équipe de R. H. Grubbs à la synthèse de PPRs de CDs par polymérisation de *pseudorotaxanes* de cyclodextrines.

## 2. Polymérisation par métathèse de diène

### a. Objectifs

Le projet est donc d'effectuer la synthèse des deux monomères dialcènes ( $n = 4$  ou  $9$ ) développés par ce groupe et d'effectuer la méthylation de l'amine secondaire (**121** et **122**, Figure 4.28), d'étudier l'affinité de ces monomères pour la cavité de la cyclodextrine et, le cas échéant, de réaliser la polymérisation dans l'eau des complexes d'inclusion formés (Figure 4.27). La méthylation permet d'incorporer dès le départ les *pseudo*-bouchons qui permettront la stabilité de la structure *pseudopolyrotaxane* finale à température ambiante. Un bouchon alcène (**123**) pourra être utilisé pour terminer la réaction de polymérisation et permettre d'évaluer la longueur de l'oligomère formé. Les deux monomères **121** et **122** seront comparés pour retenir le monomère présentant la meilleure constante de formation du complexe d'inclusion avec la cyclodextrine.

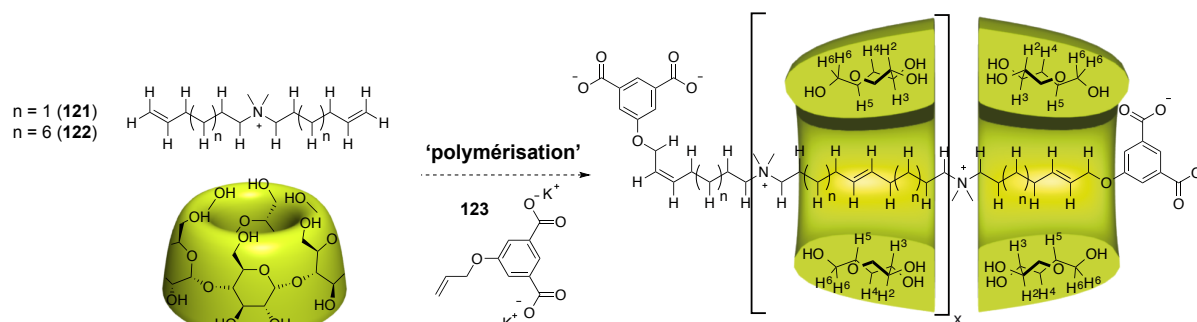
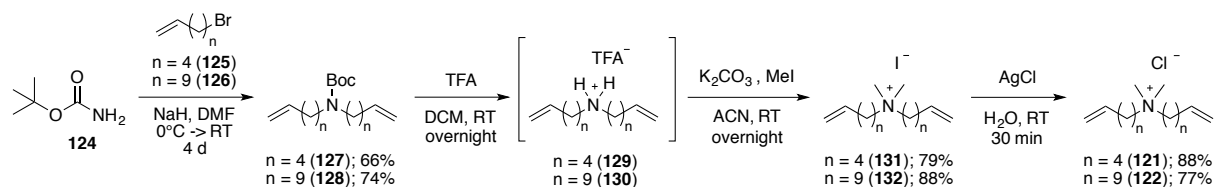


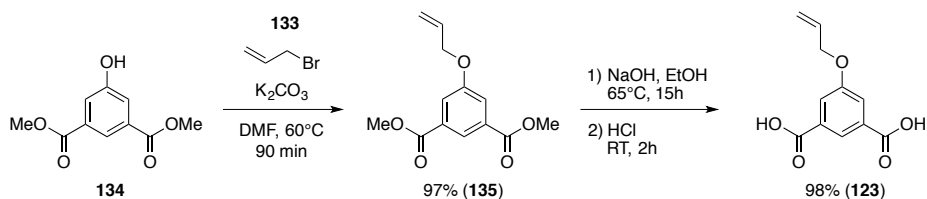
Figure 4.27 : Synthèse des complexes d'inclusion de CDs pour la polymérisation par métathèse

### b. Synthèse des monomères et bouchon alcène

La synthèse des monomères dialcène (**121** et **122**) (Figure 4.28) débute par la *N*-alkylation du dicarbonate de di-*tert*-butyle (**124**) par deux équivalents de bromure alcène (**125** ou **126**). Le groupement protecteur (Boc) est ensuite retiré en condition acide et l'amine secondaire méthyliée en présence d'iodure de méthyle pour donner les monomères dialcènes **131** et **132**. Pour permettre une meilleure solubilité dans l'eau des produits de polymérisation, l'échange du contre ion iodure par l'ion chlorure a été réalisé. Les monomères **121** et **122** sont obtenus avec des rendements globaux de 46 et 50% respectivement.


 Figure 4.28 : Synthèse des monomères **121** et **122**

L'utilisation de bouchons n'est pas nécessaire pour la stabilité de notre architecture car les ammoniums méthylés des monomères jouent le rôle de *pseudo*-bouchons, néanmoins ils permettent de terminer la réaction de polymérisation et l'intégration de leurs signaux RMN  $^1\text{H}$  devrait permettre de déterminer la taille moyenne des macromolécules. Sa synthèse (Figure 4.29), inspirée de celle des bouchons précédemment développée pour les **RotLn<sub>x</sub>**, consiste en l'introduction du bromure d'allyle (**133**) sur le diméthyl-5-hydroxyisophthalate (**134**) conduisant au bouchon utilisé par l'équipe de R. H. Grubbs. Une seconde étape permet l'hydrolyse des deux fonctions esters dans le but d'accroître l'hydrosolubilité du composé final (**123**).


 Figure 4.29 : Synthèse du bouchon alcène **123**

### c. Étude RMN du complexe d'inclusion

Avant d'effectuer les premiers tests de polymérisation, nous avons cherché à caractériser l'interaction des deux monomères avec la cavité de la cyclodextrine. La position centrale de l'ammonium sur l'axe ne lui permet pas de jouer un rôle *pseudo*-bouchonnant sur le monomère ce qui implique un régime d'échange rapide en RMN. Nous avons réalisé un ajout dosé de CD dans une solution du monomère **121** à une concentration de 6,0 mM dans l'eau deutérée (Figure 4.30).

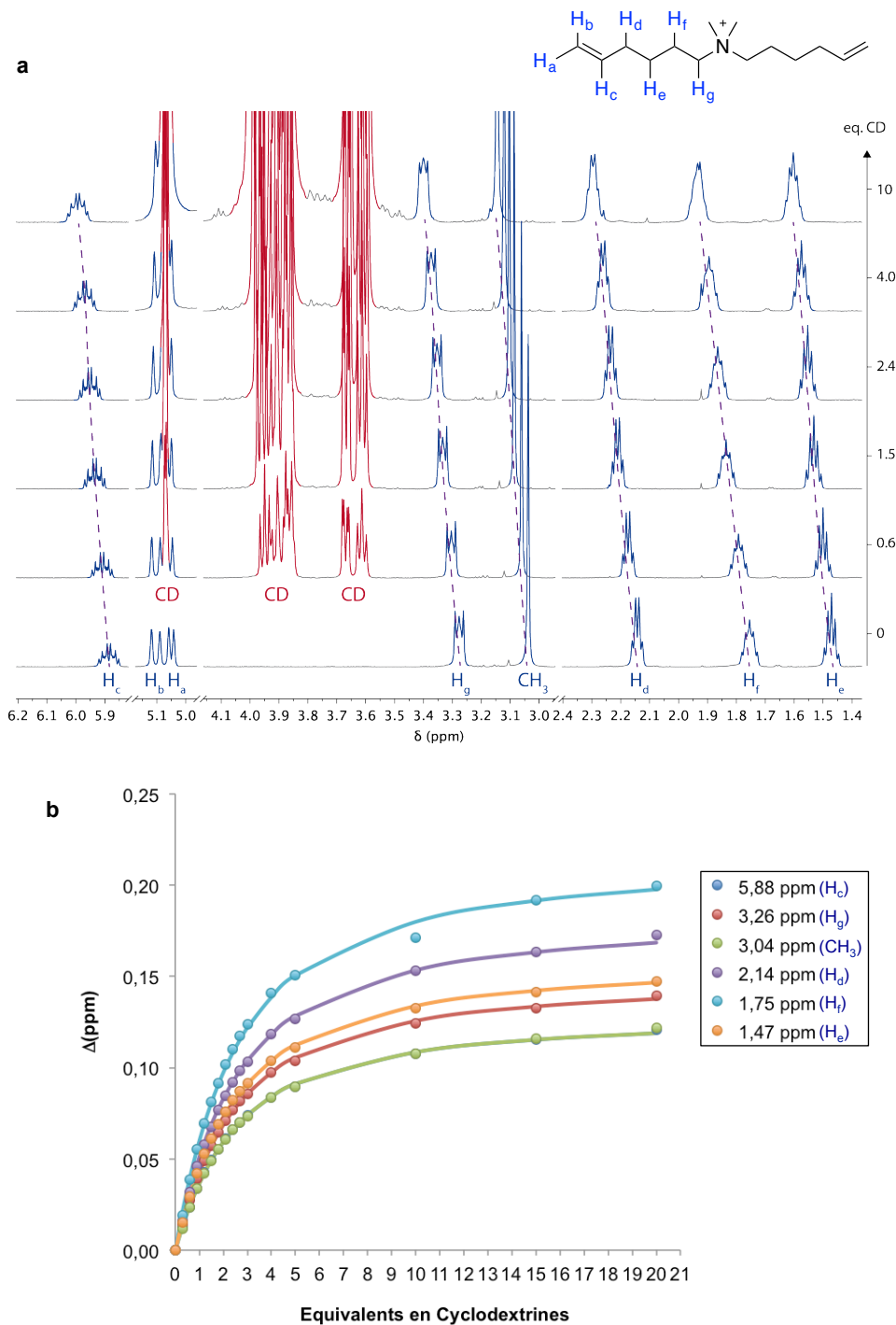


Figure 4.30 : a) Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) de l'ajout dosé de cyclodextrine dans une solution de **121** à 6,0 mM ; b) Différence de déplacement chimique des protons du monomère avant et après ajout de CD en fonction des équivalents de CD introduits (les données de «  $\text{H}_c$  » et «  $\text{CH}_3$  » sont exactement superposées).

On observe une variation de déplacement chimique pour l'ensemble des signaux des protons de l'axe en fonction des ajouts de CD. Cette variation est caractéristique de la formation d'un complexe d'inclusion en régime d'échange rapide et le déplacement chimique

observé est égal à la moyenne des déplacements chimiques de l'axe seul et du complexe d'inclusion (CI) pondéré par la fraction molaire ( $x$ ) de chacun d'entre eux (Equation 4.1).

$$\delta_{obs} = \frac{\delta_{axe} \cdot x_{axe} + \delta_{CI} \cdot x_{CI}}{2} \quad \text{Equation 4.1}$$

L'ajout de 20 équivalents en CD semble nécessaire pour que le déplacement chimique n'évolue plus. L'évolution du déplacement chimique des différents pics caractéristiques de l'axe est tracée en fonction du nombre d'équivalent en CD ajouté (b). La modélisation des six courbes donne accès à une constante d'association de 90 seulement pour un équilibre 1:1 entre hôte et invité. La modélisation pour un équilibre 2:1 (CD : axe) semble aberrante. Il faudrait compléter l'analyse par la détermination de la stœchiométrie du complexe par la méthode de Job.

La caractérisation du complexe d'inclusion a été réalisée sur une solution de monomère **121** en présence de 3 équivalents de CDs par RMN TROESY  $^1\text{H}$  (Figure 4.31). On observe bien des corrélations spatiales entre les protons  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_g$ ,  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_f$  et  $\text{H}_e$  de l'axe et les protons de la CD dans la zone de 3,8 à 4,0 ppm (caractéristique des  $\text{H}^3$ ,  $\text{H}^6$  et  $\text{H}^5$ ) prouvant l'inclusion de la chaîne alkyle dans la cavité de la CD. En particulier, les protons  $\text{H}_c$  de l'axe semblent être plus proches des  $\text{H}^5$  que des  $\text{H}^3$ , inversement, les méthylènes  $\text{H}_e$  et  $\text{H}_f$  sont plus proches des protons  $\text{H}^3$  de la cavité de la CD. Ces observations permettent d'avancer un sens d'enfilage des cyclodextrines avec le col secondaire face aux ammoniums *per*-méthylés.

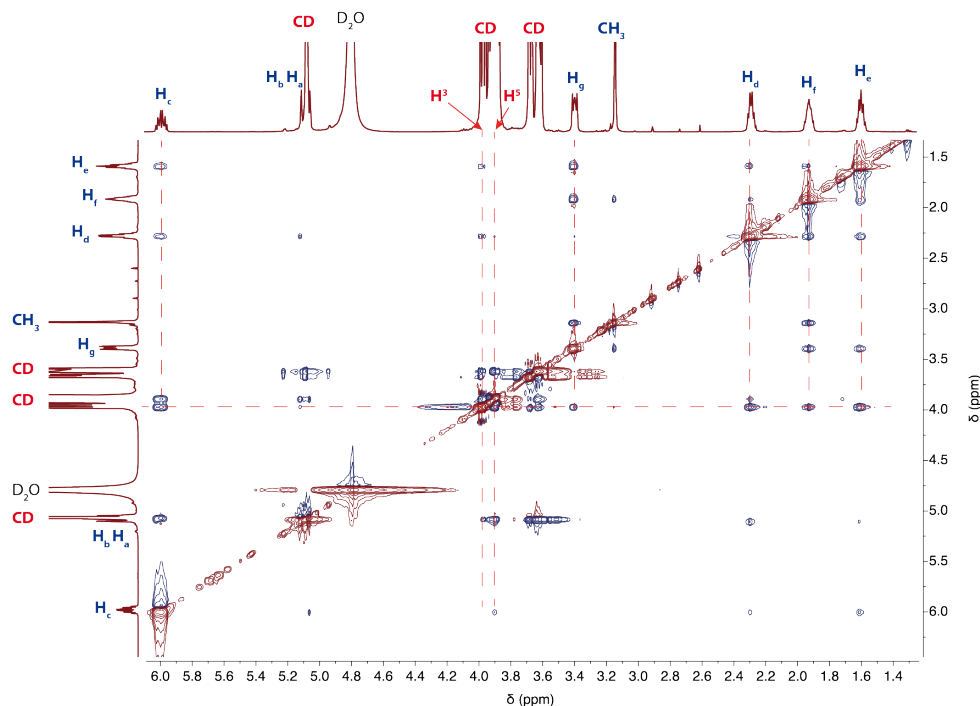


Figure 4.31 : Spectre RMN TROESY  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) d'une solution d'axe **121** ( $c = 0,24 \text{ M}$ ) en présence de 3 équivalents de CD.

Le monomère **122** s'est révélé beaucoup moins soluble dans l'eau et aucun signe de la formation d'un complexe d'inclusion n'a été observé dans D<sub>2</sub>O pure ou en mélange avec 20% d'acétone ou de méthanol deutérés.

#### d. Polymérisation des complexes d'inclusion

La polymérisation des *pseudo*-[2]rotaxanes d'éther couronne publiée par l'équipe de Grubbs est réalisée dans le dichlorométhane par métathèse acyclique de diènes catalysée par un complexe de Ruthénium appelé catalyseur de Grubbs-Hoveyda 2<sup>ème</sup> génération (Figure 4.32a) . Ce complexe ainsi que le catalyseur de Grubbs 2<sup>ème</sup> génération (b) ont été utilisés pour nos différentes tentatives de polymérisation. Néanmoins, leur solubilité dans l'eau pure s'est révélée insuffisante pour permettre leur réactivité.

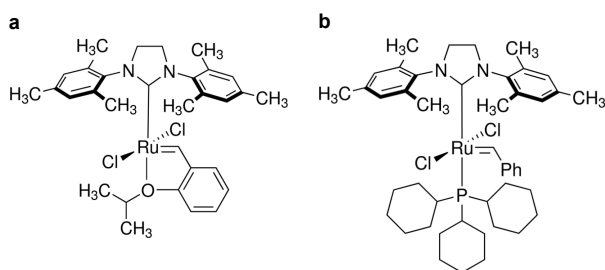


Figure 4.32 : a) Catalyseur de Grubbs-Hoveyda 2<sup>ème</sup> génération ; b) Catalyseur de Grubbs 2<sup>ème</sup> génération

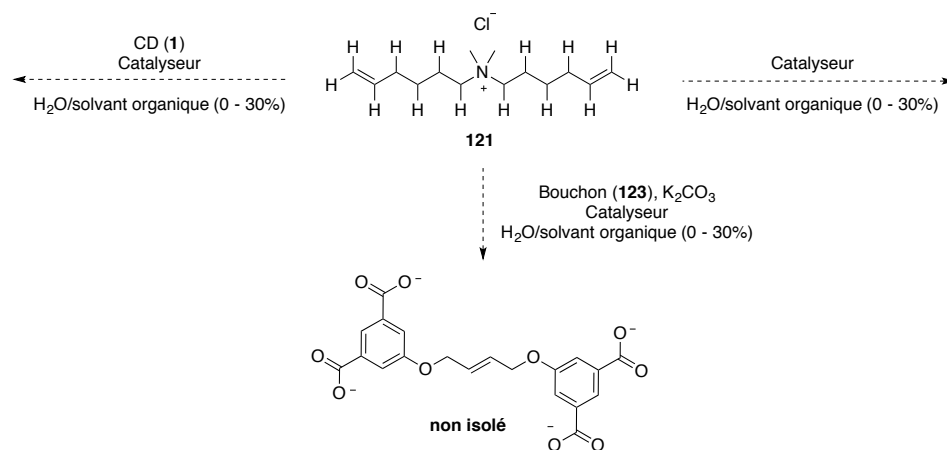


Figure 4.33 : Condition de polymérisation du monomère **121** (catalyseur : Grubbs 2<sup>ème</sup> génération ou Grubbs-Hoveyda 2<sup>ème</sup> génération ; solvant organique : acétone, méthanol ou dichlorométhane en différentes proportions)

Solubles dans l'acétone, le méthanol et le dichlorométhane nous avons un temps envisagé de réaliser la polymérisation dans un mélange de solvant, voir dans une émulsion en bain à ultrasons<sup>[150]</sup>. Cependant, nous avons pu observer que la formation du complexe d'inclusion était moitié moins élevée dans des mélanges de solvant eau/méthanol ou

eau/acétone à 20% en solvant organique. De plus, la polymérisation du monomère **121** en présence ou non de cyclodextrine s'est révélée inefficace malgré l'ajout de solvant organique à hauteur de 30%. Lorsque le monomère et le bouchon ont été introduits, seul le produit de couplage entre deux bouchons a été observé (Figure 4.33). Ces dernières années, des catalyseurs de Grubbs hydrosolubles pour la métathèse ont été développés mais ne sont pas encore disponible à la vente,<sup>[151]</sup> leur utilisation devrait permettre de poursuivre cette étude.

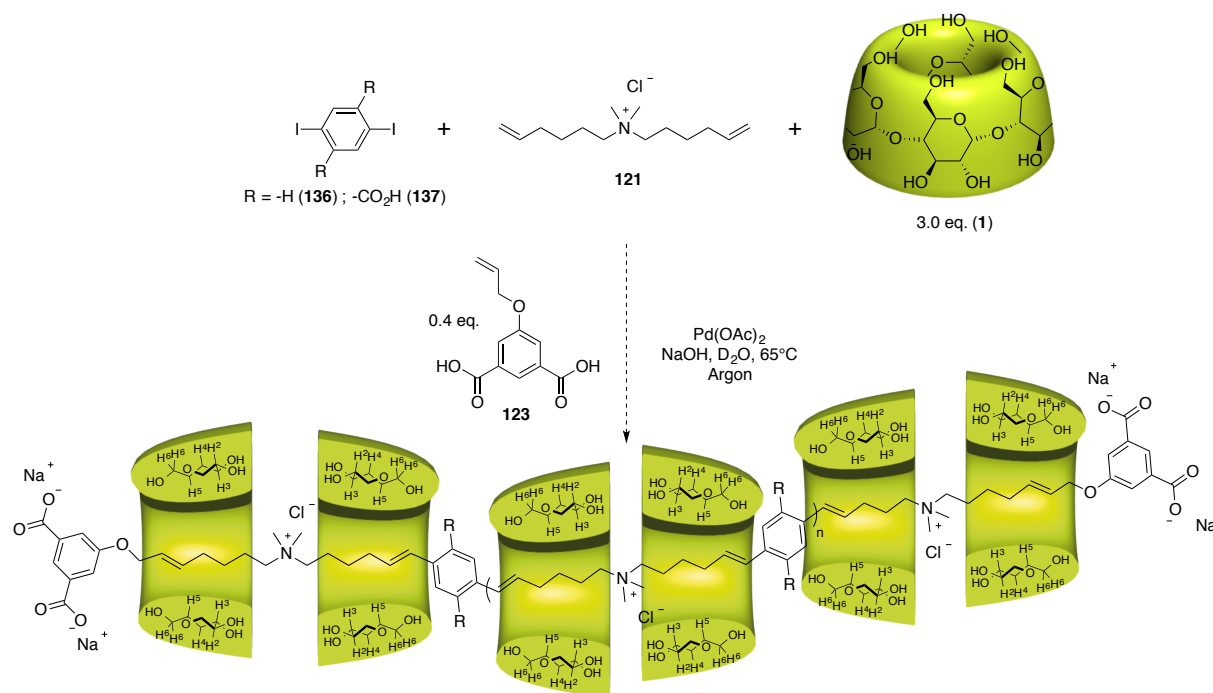


Figure 4.34 : Tentative de copolymérisation de *pseudo*-rotaxanes par réaction de Heck

Enfin, on pourrait envisager l'utilisation de ces monomères (**121** et **122**) pour la synthèse de polyammonium de longueur contrôlée mais le nombre d'étapes est relativement élevé. Afin de valoriser ces deux composés, nous nous sommes intéressés à leur copolymérisation avec des composés aryles (**136** et **137**) par réaction de Heck catalysée au palladium(II) (Figure 4.34). Le suivi par RMN <sup>1</sup>H de la réaction avec le *p*-diiodobenzène (**136**) n'a pas permis de mettre en évidence la formation de produit de polymérisation (pics caractéristiques de la double liaison C-C (**121**) et des protons aromatiques de **136** inchangés). Nous avons purifié le mélange réactionnel par filtration sur membrane pour retirer le palladium insoluble et le *p*-diiodobenzène (**136**) (peu soluble), puis le filtrat a été lavé par ultrafiltration sur membrane 3 kDa afin d'éliminer l'ensemble des CDs et monomères libres. Un résidu huileux a été récupéré sur la membrane mais la caractérisation de celui-ci n'a pu être réalisée du fait de son insolubilité. L'utilisation du monomère **137** devrait permettre, si



polymérisation il y a, d'accroître la solubilité dans l'eau du produit final, cependant dans ce cas, aucun résidu n'a été récupéré.

D'autres tentatives de copolymérisation, cette fois par réaction CuAAC, ont été réalisées et sont compilées dans la partie suivante.

### 3. Tests de copolymérisation

Pour la synthèse des [3]rotaxanes de cyclodextrines présenté dans le 2<sup>ème</sup> chapitre, nous avons synthétisé le 1,12-diazoture dodécane (**66**) et le bouchon **67**, ces deux composés ont été combinés au propargyl ether commercial (**138**), au dipropargyl tétraéthylène glycol (**139**) ou au dipropargyl phosphate de sodium (**140**)<sup>[152]</sup> pour leur copolymérisation par cycloaddition CuAAC (Figure 4.35).

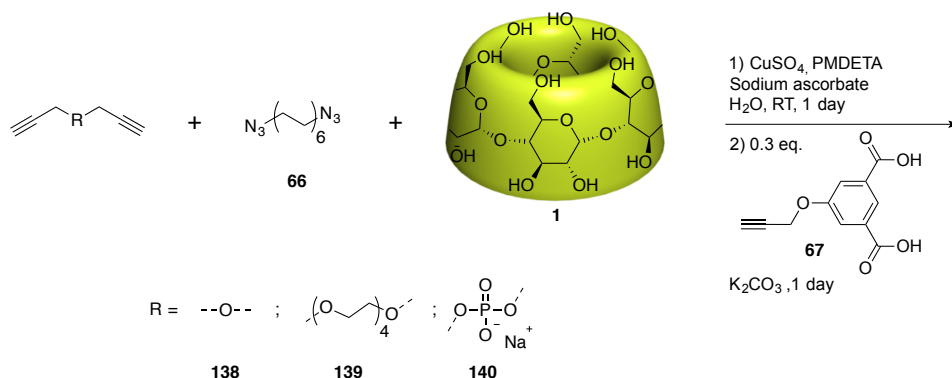


Figure 4.35 : Copolymérisation de *pseudo*-rotaxanes par CuAAC

Nous avons démontré dans le Chapitre 2 que le monomère C<sub>12</sub> (**66**) pouvait former un complexe d'inclusion avec deux équivalents de cyclodextrines. Les cyclodextrines peuvent aussi s'enfiler sur le tétraéthylène glycol mais leur constante d'affinité est plus faible pour cet axe que pour les chaînes alkyles.<sup>[80]</sup> Ainsi, l'utilisation de l'axe **139** devrait permettre d'apporter de l'hydrosolubilité au polymère. D'autre part, on a pu vérifier par RMN <sup>1</sup>H l'absence d'interaction entre la CD et le dipropargyl ether (**138**) ou le dipropargyl phosphate (**140**).

Les essais de polymérisation ont été réalisés en plusieurs étapes (Figure 4.35). Tout d'abord, le monomère **66** et l'un des monomères dialcyne (**138**, **139** ou **140**) sont introduits en présence de cyclodextrines (2 à 3 équivalents) dans l'eau. Un léger excès de l'axe **66** est introduit pour favoriser leur présence en bout de chaîne du polymère. La formation du complexe d'inclusion des CDs avec **66** se traduit par un mélange réactionnel trouble. On ajoute alors l'ensemble des réactifs pour la réaction de CuAAC en dégazant au préalable la solution. Après un jour de réaction, une solution de bouchon **67** à pH 10 (0,4 équivalent) est

introduite pour terminer la polymérisation en réagissant avec les fonctions azoture terminales pendant un jour de plus. Ces trois essais, avec **138**, **139** et **140** respectivement, se sont conclus par la même observation à savoir la formation d'un précipité. Ce précipité a été purifié par filtration d'abord, la dissolution totale du précipité, quelque soit le solvant utilisé, n'a pas été possible et seuls des pics caractéristiques d'espèces libres ont été observés en RMN  $^1\text{H}$ . La purification du précipité par ultrafiltration sur membrane de 3 kDa a permis de retirer les espèces libres (CDs, bouchon, monomères) tout en conservant un précipité sur la membrane. Les tentatives de dissolution de ce précipité dans  $\text{D}_2\text{O}$ , quel que soit le pH, dans l'acétone, l'acétonitrile, le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, le dichlorométhane ou le diméthylsulfoxyde deutérés (ainsi que différents mélanges de ces solvants) se sont montrées infructueuses et aucun signal n'est observé en RMN  $^1\text{H}$ . Néanmoins, le seul fait d'obtenir un précipité à l'issue de la réaction de polymérisation est un résultat en soi. Il semble se produire une réaction permettant la formation d'un agrégat ou de macromolécules suffisamment importante pour que l'on ne parvienne plus à dissoudre le composé.

#### 4. Polymérisation par couplage de phosphate

Nous avons poursuivi nos recherches en approfondissant l'utilisation des monomères porteurs de groupements phosphates. Dans le Chapitre 3 nous avons détaillé la synthèse de *pseudo*-[2] et [3]rotaxanes de cyclodextrines à partir de monomères modèles diphosphates. Pour valoriser le développement de leur synthèse et purification, nous avons envisagé leur polymérisation par couplage de phosphate.

##### a. État de l'art

Le couplage entre groupements phosphates menant à la formation d'une liaison pyrophosphate est principalement développé pour la synthèse de nucléotides oses et leur couplage en nucléotides oses diphosphates.<sup>[153]</sup> Basé sur l'activation de l'un des phosphates par un hétérocycle azoté suivi du couplage avec un second phosphate, il est largement décrit dans des solvants organiques (DMF, pyridine)<sup>[153a]</sup> mais très peu en solution aqueuse. En 2012, l'équipe danoise d'Ole Hindsgaul a publié une nouvelle méthode de couplage entre phosphates réalisable dans l'eau en 'one-pot' (Figure 4.36).<sup>[154]</sup> Partie de l'observation que le chlorure de 2-chloro-1,3-diméthylimidazolium (**DMC**) réagissait avec l'imidazole (**Im**) dans l'eau à température ambiante pour générer le chlorure de 2-imidazolyl-1,3-diméthylimidazolium (**ImIm**), l'équipe a développé l'activation de phosphate en

phosphorimidazole par l'**ImIm** en solution aqueuse. Ce phosphate activé peut être désactivé par hydrolyse, réagir avec un homologue non activé pour former un dimère ou avec un second composé phosphaté pour générer le produit de couplage. Nous avons choisi de mettre en pratique cette voie de synthèse pour la polymérisation des *pseudorotaxanes* de CDs diphosphates.

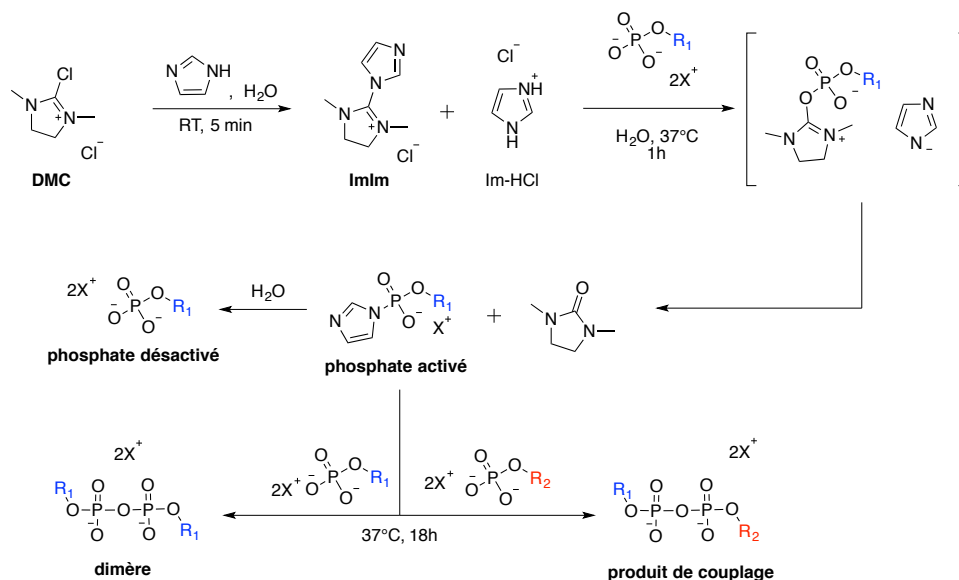


Figure 4.36 : Couplage de phosphates en solution aqueuse développé par O. Hindsgaul<sup>[154]</sup>

## b. Polymérisation du monomère modèle par couplage de phosphate

### i. Synthèse de l'oligomère

Les premiers essais de polymérisation ont été effectués sur des monomères modèles libres (C<sub>6</sub> et C<sub>8</sub>) (Figure 4.37).

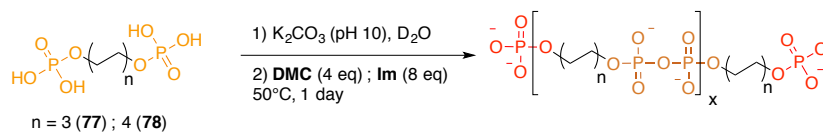


Figure 4.37 : Voie de synthèse des oligomères d'alcane diphosphate par couplage de phosphates

D'après les travaux de Tanaka *et al.*, on peut suivre par RMN <sup>31</sup>P l'activation du phosphate par **ImIm** et la formation des dimères (liaison pyrophosphate) à des déplacements chimiques d'environ -8 et -11 ppm respectivement. Nous avons pu visualiser l'activation des phosphates en RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} comme représenté sur la Figure 4.38a pour l'axe C<sub>6</sub>. Il semble que l'activation soit la plus élevée 30 minutes après l'ajout du **DMC** et de l'imidazole et qu'elle reste efficace après 2h. L'oligomère le plus long que nous sommes parvenus à synthétiser (**141**) contient 6 motifs monomériques et est issu de l'axe C<sub>8</sub>, la caractérisation par RMN <sup>1</sup>H

et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  est présentée sur la Figure 4.38 (b et c). Le spectre  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  de l'oligomère obtenu par précipitation dans le méthanol permet la détermination de la longueur moyenne de l'oligomère (6 motifs). La superposition du spectre  $^1\text{H}$  de l'axe  $\text{C}_8$  et de l'oligomère tous deux à pH 10 vient confirmer par son intégration la longueur de la chaîne, le pic à 3.86 ppm intégrant pour 4 des 24 protons et correspondant aux méthylènes en position  $\alpha$  de chacun des phosphates des bouts de chaîne.

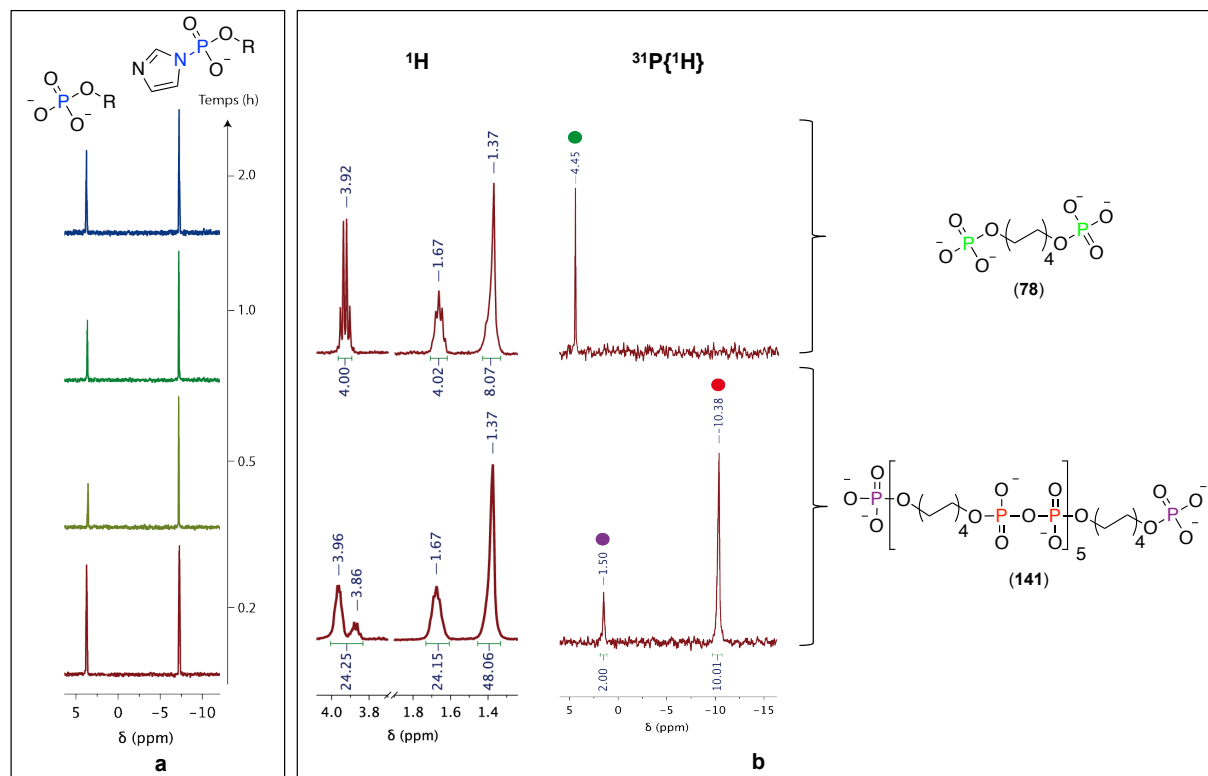


Figure 4.38 : a) Suivi par RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de l'activation des phosphates de l'axe  $\text{C}_6$  par **ImIm** ; b) Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 10) de l'axe  $\text{C}_8$  (**78**) (en haut) et de l'oligomère **141** à base de  $\text{C}_8$  (en bas) obtenu par couplage de phosphate.

La vérification des conditions réactionnelles pour l'obtention d'oligomères d'axes libres a été réalisée. Malgré les faibles degrés de polymérisation obtenus, cette voie de synthèse reste intéressante si nous parvenons à l'appliquer aux *pseudorotaxanes*. Néanmoins, en préambule, nous nous sommes demandés quel rôle joueraient les liaisons pyrophosphates sur l'architecture finale, ainsi nous nous sommes intéressés à l'enfilage de cyclodextrine native sur l'oligomère obtenu.

## ii. Enfilage de CD sur l'oligomère

L'étude de l'enfilage de CD sur les oligomères obtenus est intéressante pour connaître le rôle des pyrophosphates le long de la chaîne. Ainsi, s'ils se révèlent être des bouchons ne permettant pas le passage des CDs, la polymérisation des *pseudorotaxanes* permettra l'obtention de polyrotaxanes stables et surtout totalement recouverts.

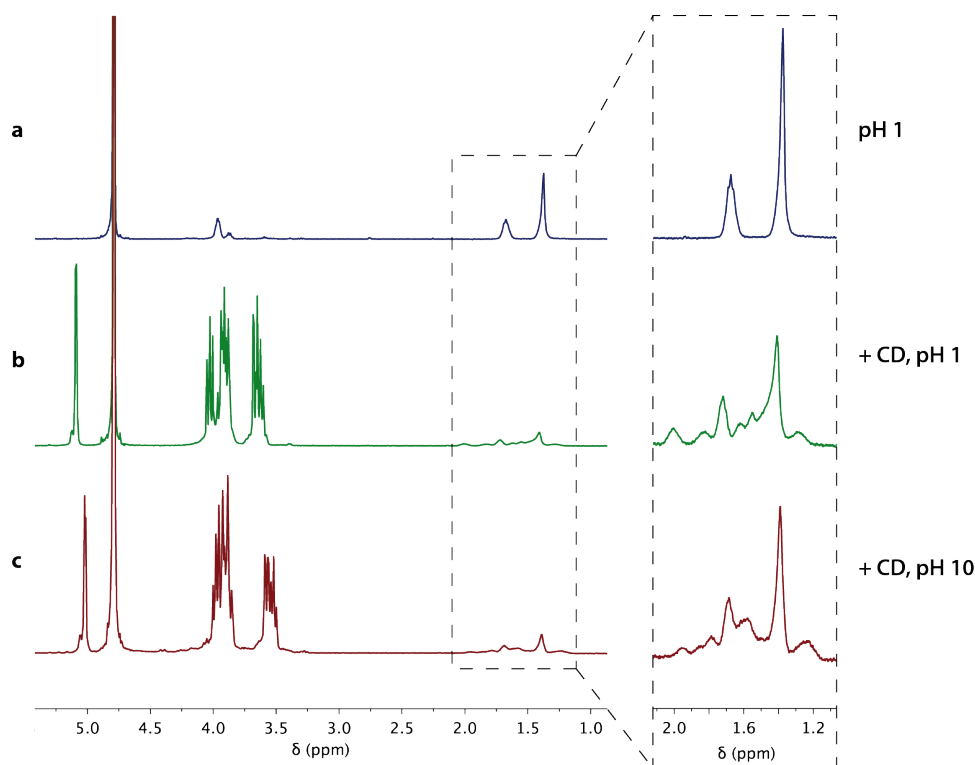


Figure 4.39 : a) RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de l'oligomère **141** à base d'axe  $\text{C}_8$  à pH 1; b) (a) + 8 équivalents de CD (pH 1,  $25^\circ\text{C}$ ); c) (b) +  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (pH 10)

L'enfilage des cyclodextrines effectué sur l'oligomère obtenu à partir de l'axe  $\text{C}_8$  (**141**) est présenté sur la Figure 4.39. Réalisé par ajout de 8 équivalents de CD (par motif) dans une solution d'oligomères dans l'eau deutérée conditionnée à pH 1 par ajout d'acide trifluoroacétique, sa caractérisation par RMN  $^1\text{H}$  permet de mettre en évidence l'interaction notable entre l'axe et les cyclodextrines principalement dans la zone de 1,1 à 2,1 ppm avec la dissymétrisation de la chaîne alkyle. Dans ces conditions de pH, seul un épaulement au niveau du pic caractéristique des protons anomériques de la CD libre est aperçu, l'ajout de carbonate de potassium jusqu'à pH 10 permet de diminuer légèrement la superposition entre les signaux des protons anomériques de la CD libre et enfilée pour parvenir à intégrer les signaux qui révèlent un enfilage de seulement 2.5 CDs par oligomères. Cet enfilage faible suppose que les CDs ne peuvent former des complexes d'inclusion qu'avec les deux motifs à chaque extrémité des oligomères et ne parviennent donc pas à passer les ponts pyrophosphates.

L'enfilage a été réalisé à plus haute température (50, 80°C) sans qu'on observe une augmentation du recouvrement. Ainsi, on peut penser que les pyrophosphates jouent le rôle de bouchon et inhibent l'enfilage des CDs le long de l'oligomère.

### c. Tentatives de polymérisation de *pseudo*-rotaxanes d'alcanediphosphate

Pour transposer les conditions de synthèse d'oligomères par couplage de phosphate aux *pseudorotaxanes*, il faut prendre plusieurs paramètres en considération :

- La température : la réaction est décrite à 37°C, testée à température ambiante, celle-ci ne semble pas fonctionner, néanmoins, la température peut être élevée jusqu'à 50°C. Nous avons pu vérifier que les rotaxanes en solution à pH 10 étaient stables à cette température.
- La concentration : les travaux de Tanaka *et al.* ont montré que la concentration en substrat menant aux meilleurs rendements était de 1 à 2 mol·L<sup>-1</sup>. Cette concentration est extrêmement élevée pour notre étude, les monomères, la CD et les rotaxanes n'étant pas suffisamment solubles dans l'eau quelque soit le pH.
- L'encombrement stérique du phosphate : on a vu tout au long de l'étude des *pseudorotaxanes* que la couronne primaire de la CD jouait un rôle important dans la stabilisation du *pseudo*-bouchon. Il faut donc s'assurer ici que le phosphate soit toujours disponible pour l'activation et le couplage, on privilégiera donc les *pseudo*-[2]rotaxanes dans un premier temps.
- La présence d'axe libre : il faut veiller lors de la préparation du rotaxane à minimiser la présence d'axe libre pour que la présence de pic caractéristique d'une liaison pyrophosphate soit attribuable au couplage entre rotaxanes et non entre axes libres.

Tous ces paramètres pris en compte, nous avons réalisé la polymérisation du *pseudo*-[2]rotaxane (**82**, axe C<sub>6</sub>) dans une solution saturée de cyclodextrine (mélange 1:1). La cyclodextrine a été enfilée à pH 1 avant que le pH ne soit rehaussé (> 12) par ajout d'hydroxyde de sodium, la polymérisation du rotaxane obtenu s'est effectuée à 50°C à une concentration en axe de 1,0 mol·L<sup>-1</sup> en présence de 4 équivalents de **DMC** et 8 d'imidazole. Après une nuit, la présence d'un singulet à -10.18 ppm a révélé la formation de liaisons pyrophosphate. Le mélange réactionnel a été précipité dans le méthanol puis filtré. Le précipité a ensuite été purifié par ultrafiltration sur une membrane de 3 kDa mais celle-ci s'est révélée inefficace puisque rien n'a été retenu par la membrane. La taille du composé formé

semble donc assez faible. Le composé a alors été purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex G25) et caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  à pH basique ( $> 12$ ) (Figure 4.40).

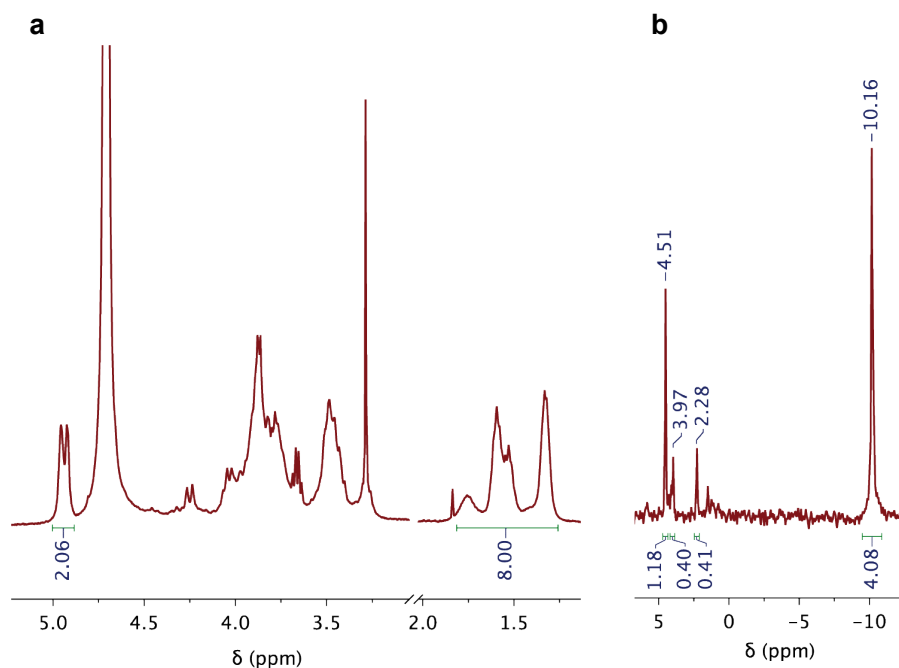


Figure 4.40 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (a) et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (b) (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH  $> 12$ ) de l'oligomère à base de  $\text{C}_6$  purifié par chromatographie d'exclusion stérique

Le spectre proton montre la présence de cyclodextrine dans le produit purifié et on observe un unique doublet caractéristique des protons anomériques. La chromatographie ayant été éluée à pH 7, on s'attend à ce que les CDs enfilées sur les extrémités des oligomères se désenfilent (déplacement de l'équilibre par dilution), ainsi la présence d'un unique doublet est cohérente et son déplacement chimique de 5,02 ppm est identique à celui des protons anomériques du *pseudo*-[2]rotaxane obtenu avec l'axe  $\text{C}_6$  à pH 10. Les méthylènes du milieu de la chaîne dans la zone 1.25 - 1.80 ppm semblent partiellement dédoublés et l'intégration entre l'axe et la cyclodextrine donne un rapport de une cyclodextrine pour trois motifs. Le spectre RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  après purification présente toujours le singulet à -10.16 ppm caractéristique des liaisons pyrophosphate et le singulet à 4.51 ppm caractéristique des phosphates terminaux. Deux singulets à 2.28 et 3.97 ppm sont observés et ont la même intégration. Ils sont certainement caractéristiques des phosphores proches de la CD. Le rapport d'intégration entre les phosphores terminaux et de milieu de chaîne indique un degré de polymérisation de 5. Ainsi, il y aurait en moyenne 1,7 cyclodextrines par macromolécule d'oligomère. La caractérisation de cet assemblage est encourageante et doit être poursuivie, notamment par des expériences RMN TROESY  $^1\text{H}$  et DOSY  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , pour permettre

de valider l'inclusion de l'axe dans la cavité des CDs et donner des indications quant à la position des CDs sur la macromolécule.

## 5. Conclusion

La possibilité de pouvoir polymériser et co-polymériser des *pseudorotaxanes* de cyclodextrines serait une réelle avancée pour la synthèse de polyrotaxanes fonctionnalisés. L'étude de monomères dialcènes pour la polymérisation par métathèse de diènes est intéressante en vue de pouvoir comparer les architectures obtenues aux *pseudopolyrotaxanes* décrits dans le Chapitre 2. La faible hydrosolubilité des catalyseurs de Grubbs commerciaux a rendu impossible la polymérisation dans l'eau mais l'utilisation de nouveaux catalyseurs hydrosolubles devrait nous permettre d'aller plus loin. Les tentatives de polymérisation par cycloaddition CuAAC ont donné des produits insolubles mais sont encourageantes. La combinaison de nouveaux monomères hydrosolubles pourrait permettre d'améliorer les propriétés des composés obtenus. La réaction de couplage de phosphate développée en solution aqueuse est particulièrement intéressante pour valoriser les nouveaux axes modèles et rotaxanes associés obtenus pendant cette thèse. Néanmoins, les tentatives d'applications de cette méthode sur nos structures sont encore peu abouties et méritent d'être approfondies pour développer les voies de synthèses de polyrotaxanes de cyclodextrines.

## IV. Conclusion

La toxicité des PPRs fonctionnalisés basés sur un polymère polycationique a nécessité la recherche de voies de *post*-fonctionnalisation permettant d'accroître sa biocompatibilité. La PEGylation, décrite comme une méthode efficace pour améliorer les propriétés d'hydrosolubilité, de circulation *in vivo* et la tolérance de nombreuses nanostructures pour des applications biomédicales, a été envisagée par couplage peptidique ou CuAAC sur l'architecture finale. Ces propriétés sont particulièrement intéressantes pour camoufler la structure et pouvoir envisager l'ajout d'un agent de ciblage permettant d'orienter l'accumulation du PPR. Si la PEGylation de PPRs de  $\text{CD}(\text{N}_3)$  et  $\text{CD}(\text{N}_3)_2$  s'est révélée possible lors de tests préliminaires, l'utilisation d'une cyclodextrine permettant le couplage avec un nombre plus important de chaînes PEG était nécessaire pour parvenir au camouflage efficace de l'assemblage. L'ambiguïté quant à la caractérisation du PPR- $\text{CD}(\text{CO}_2\text{H})_6$  et son recouvrement faible (30%) pour une PEGylation optimale nous a poussé à synthétiser la cyclodextrine  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$ , celle-ci s'est révélée intéressante pour la *post*-fonctionnalisation des



*PPRs* car elle présentait un taux d'enfilage élevé sur le monomère modèle. Les tentatives de formation du *PPR-CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>* ayant échoué, l'étude de la formation pH-contrôlée du *pseudo*-[2]rotaxane de cyclodextrine a été menée et s'est révélée concluante. Il est possible de contrôler l'enfilage et le désenfilage de la CD hexa-amine par un stimulus chimique acido-basique.

La PEGylation de la structure supramoléculaire n'ayant pu être réalisée, nous avons exploré la polymérisation de *pseudorotaxanes* comme voie d'accès à des structures polyrotaxanes. Ces études préliminaires sont encourageantes mais nécessitent des développements. L'utilisation d'un catalyseur de Grubbs hydrosoluble pourrait donner de la valeur au monomère dialcène développé qui présente une affinité pour la cavité de la cyclodextrine. La copolymérisation par cycloaddition CuAAC a mis en évidence la formation de composés insolubles intrigant qui nous pousse à penser que la polymérisation a eu lieu. La synthèse de nouveaux monomères est envisagée pour améliorer la solubilité des produits de synthèse. Enfin, la polymérisation par couplage de phosphate a été réalisée sur les axes modèles et *pseudo*-rotaxanes décrits dans le Chapitre 3. L'expertise acquise pour leur synthèse, purification et caractérisation serait sublimée par la maîtrise d'une voie de polymérisation pour la synthèse de *pseudopolyrotaxanes* de CDs.

---

## **CONCLUSION GENERALE**

---



Le travail de ces trois années de thèse a porté sur la réalisation de polyrotaxanes de cyclodextrines pour des applications biomédicales. En particulier, le développement d'une approche synthétique modulaire convergente a permis la synthèse de polyrotaxanes bimodaux par enfilage de cyclodextrines *pré-fonctionnalisées* par des agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique et des fluorophores pour la microscopie de fluorescence. La synthèse des différentes sondes a pu être optimisée d'une part avant de réaliser leur couplage par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre sur des cyclodextrines mono- et bis-azotures obtenues de manière sélective. Trois nouvelles sondes fluorescentes de la famille des cyanines ont été synthétisées pour bénéficier de leurs propriétés optiques dans le proche infrarouge. En particulier, une cyclodextrine fonctionnalisée par une cyanine 5 hydrosoluble a été obtenue. L'enfilage des cyclodextrines fonctionnalisées par ces sondes a été évalué sur un axe modèle représentant l'unité monomérique du polymère utilisé pour la synthèse de *pseudopolyrotaxanes*. La formation du complexe d'inclusion, un *pseudo*-[2]rotaxane, a été suivie par RMN permettant la détermination des constantes cinétiques et thermodynamiques associées.

Les propriétés relaxométriques de l'agent de contraste, le complexe paramagnétique monoamide-DO3A-Gd, ont été accentuées par sa fixation sur les cyclodextrines mono- et bis-azotures. Les cyclodextrines fonctionnalisées obtenues ont alors été utilisées pour la synthèse de [3]rotaxanes modèles pour l'IRM améliorant la relaxivité de l'agent de contraste grâce à l'augmentation du temps de corrélation rotationnelle due à l'architecture supramoléculaire. Ces rotaxanes modèles ont fait l'objet d'une étude *in vivo* chez la souris permettant de caractériser la tolérance des composés, leur biodistribution, leurs propriétés d'agent de contraste et leurs voies d'excrétion. Le [3]rotaxane de cyclodextrines mono-fonctionnalisées par l'agent de contraste a montré le meilleur rehaussement de contraste *in vivo* à 7 T (300 MHz), un temps de résidence augmenté par rapport à l'agent de contraste DOTA-Gd cliniquement utilisé et une filtration lente par les reins. Ces propriétés peuvent être particulièrement intéressantes pour la détection et le diagnostic de déficience rénale. L'extension de l'architecture supramoléculaire aux polyrotaxanes a été réalisée par l'utilisation d'un polyammonium sur lequel les cyclodextrines-sondes ont pu être enfilées par effet hydrophobe avec des taux de recouvrement de 25%. L'auto-assemblage, se faisant en une seule étape, permet de générer les *pseudopolyrotaxanes* en sélectionnant les sondes, leur proportion et le pourcentage d'enfilage final. Ainsi deux PPRs bimodaux ont été obtenus permettant de tirer profit des avantages de l'IRM et de la microscopie optique par fluorescence.

En parallèle de l'utilisation d'axes polycationiques pour la synthèse des PPRs, le développement d'un polyrotaxane anionique à base de polyphosphates a été réalisé. L'étude détaillée d'axes modèles, des alcanes diphosphates, pour la formation de complexes d'inclusion a permis de mettre en évidence la formation de *pseudo*-[2] et [3]rotaxanes en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. La barrière d'activation de l'enfilage des CDs peut être ajustée par contrôle du pH et donc de l'état de protonation des phosphates induisant une modification de l'équilibre rapide ou lent de la formation du *pseudo*-rotaxane. Par piégeage cinétique on accède alors à une voie de synthèse sélective et à la purification des *pseudo*-[2] et [3]rotaxanes. La caractérisation des *pseudo*-[3]rotaxanes réalisée par RMN multi-noyaux à 1 ou 2 dimensions, spectrométrie de masse et diffraction des rayons X a permis de montrer un arrangement stabilisé des cyclodextrines avec leur col secondaire face à face. En particulier, les analyses cinétiques et thermodynamiques de la série des octane-, décane- et dodécane-diphosphate confrontées aux structures cristallographiques mettent en lumière une coopérativité positive de la formation du *pseudo*-[3]rotaxane avec l'axe C<sub>8</sub> et négative avec l'axe C<sub>10</sub>. La taille de l'octane-diphosphate permet de satisfaire d'une part la reconnaissance des cols secondaires des cyclodextrines et d'autre part l'interaction des phosphates avec les cols primaires par liaisons hydrogène entraînant une stabilisation du [3]rotaxane. La contraction de la chaîne alkyle à dix carbones observée à l'état solide sur la structure [3]rotaxane permet de juger de la stabilisation apportée par les phosphates. Finalement, nous avons montré que l'élongation du monomère à 16 carbones permettait la formation de *pseudo*-[4] et [5]rotaxanes dont l'étude est toujours en cours. L'extension de l'architecture a été possible par la synthèse d'un poly(hexylène phosphate) sur lequel l'enfilage de cyclodextrines natives a été caractérisé par RMN DOSY <sup>1</sup>H et TROESY. Un taux de recouvrement supérieur à 40% et un auto-assemblage rapide sont observés et permettent d'envisager l'utilisation de ce polymère pour la synthèse de PPRs fonctionnalisés.

La valorisation des PPRs de cyclodextrines dans le domaine biomédical nécessite une hydrosolubilité, biocompatibilité et furtivité élevées. La PEGylation des PPRs polycationiques a été envisagée pour camoufler les charges et réduire leur agrégation *in vivo*. L'optimisation de la densité de cyclodextrines sur l'axe et la réduction de la longueur caractéristique du polymère ont aussi été étudiées par polymérisation de *pseudo*-rotaxanes comme voie de synthèse de polyrotaxanes biocompatibles. D'autre part, l'enfilage et la dissociation pH-contrôlés de la cyclodextrine hexa-amine sur le monomère modèle 1,12-diammonium dodécane ont été mis en évidence et pourraient être mis à profit pour le bouchonnage contrôlé d'architectures polyrotaxanes. Nous travaillons sur le contrôle d'un

sens d'enfilage privilégié pour réaliser un système permettant le mouvement unidirectionnel contrôlé d'une navette représentée par la  $CD(NH_2)_6$ .

Ces travaux de thèse avaient pour objectifs l'extension d'une bibliothèque de cyclodextrines fonctionnalisées par une approche modulaire, la synthèse de sondes fluorescentes pour l'imagerie par fluorescence dans le proche infrarouge et le développement d'un axe polymérique pour la synthèse de polyrotaxanes multimodaux pour des applications biomédicales. La synthèse d'une sonde fluorescente de la famille des cyanines a permis d'obtenir un fluorophore utilisable *in vivo* grâce à ses longueurs d'ondes d'absorption et d'émission dans le proche infrarouge. La cycloaddition catalysée au cuivre avec la cyclodextrine mono-azoture donne accès à la cyclodextrine fonctionnalisée dont l'hydrosolubilité a permis la formation de *pseudo*-[2]rotaxane avec l'axe modèle diammonium. Le polyammonium *per*-méthylé a été très largement étudié et une bibliothèque de PPRs mono- et bimodaux a été obtenue. Néanmoins, la toxicité élevée du composé final ne permettant pas son étude *in vivo*, l'amélioration de sa biocompatibilité a été envisagée ainsi que le développement d'axes supplémentaires. Différentes voies de PEGylation de l'architecture ont été investiguées mais leur avancement ne permet pas encore de nouvelles études *in vivo*. Pour autant, le développement des axes diphosphates et poly(alkylène phosphate) est prometteur pour poursuivre la synthèse de PPRs pour des applications biomédicales.

La chimie supramoléculaire est au cœur du développement de nouvelles architectures et permet de repousser les limites synthétiques. L'accès à des structures complexes à plusieurs niveaux rendu possible par l'auto-assemblage de briques primaires ouvre la voie à de nouvelles propriétés ou à leur amélioration. Le chimiste n'est alors plus celui qui impose le mariage de deux molécules mais celui qui propose à une communauté de cohabiter dans les meilleures conditions, libre à lui d'imaginer les couples qui se formeront.



---

## **EXPERIMENTAL SECTION**

---





## General Analytical and Synthetic Methods

$^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded at 400 or 600 MHz on BrukerAvance III spectrometers. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm from tetramethylsilane using residual solvent peaks for calibration. Mass spectrometry was performed by ESI on a Bruker microTOF spectrometer. Reagent grade tetrahydrofuran was distilled from sodium and benzophenone. Dichloromethane and acetonitrile were distilled from  $\text{CaH}_2$  under argon atmosphere. Tetrahydrofuran and triethylamine were degassed with a stream of argon for 30 min before being used in the Sonogashira coupling reactions. All other chemicals were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Flash column chromatography was performed using silica gel from Merck (40-63  $\mu\text{m}$ ) or GraceResolv High Resolution Flash Cartridges (particle size 40  $\mu\text{m}$ ). Thin layer chromatography was performed using aluminium plates pre-coated with silica gel 60 F254 0.20 mm layer thickness purchased from VWR. Microwave assisted reactions were done on a Milestone Microwave Synthesis Labstation or Biotage Initiator Microwave Synthesizer. Purification on size-exclusion chromatography was performed on Sephadex G-25. Infrared spectra were recorded on a BRUKER Tensor 27 IR with Harrick MVP 2 series ATR accessory. Absorption spectra were recorded on a JASCO V-670 spectrophotometer. The fluorescence emission spectra were recorded on a JASCO J-815 CD instrument. Filtration on membrane was performed on Magna Nylon Membrane Filter (47mm, 0.45  $\mu\text{m}$ ). Ultrafiltration was performed using PALL Microsep Advance Centrifugal Device 3K and 10K MWCO.

### NMR analysis

**DOSY experiment** was performed using LED pulse program with gradient amplitudes from 5 to 95% (16 pts). **NOESY experiment** was performed using 2.0 sec as relaxation delay ( $D1$ ) and 0.8 sec as mixing time ( $D8$ ). **TROESY experiment** was performed using  $D1 = 2$  sec and 0.2 sec as mixing ROESY pulse ( $p15$ ). **HOESY experiment** was performed using  $D1 = 0.1$  sec and  $D8 = 0.8$  sec.

**Kinetics studies on *per*-methylated 1,12-diammonium dodecane.** The threading process was monitored for 1:1 mixture of axis (2.8 mM) and each cyclodextrins in  $\text{D}_2\text{O}$  solvents by  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz or 400 MHz) at 300 K. The integration of suitable signal was plotted over

time. The curve was fitted with an exponential model ( $y = A(1 - \exp(-kt))$ ) giving the rate constant of the threading process.

**Threading kinetics on alkane-diphosphate (pH 10).** Alkane-diphosphate (1 eq.) was dissolved in deuterium oxide (1.0 ml;  $c = 2.8$  mM) at room temperature. Potassium carbonate was added until pH 10. Then, 2 equivalents of  $\alpha$ -cyclodextrin were added (only 1 equivalent for hexane-diphosphate) and  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  spectra were carried out immediately and then regularly on a period of 20 to 60 days until equilibrium was reached at 300 K. The integration of suitable signal was plotted over time. The curve was fitted with DYNAFIT software giving the rate constant of the threading process.<sup>[155]</sup>

**Titration experiments on alkane-diphosphate (pH 1 and 6).** Alkane-diphosphate (1 eq.) was dissolved in deuterium oxide (1.0 ml;  $c = 2.8$  mM) at room temperature. For titration at pH 6, the pH was adjusted by addition of potassium carbonate. First,  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  spectra were carried out. Then 0.15 to 0.20 equivalents of  $\alpha$ -cyclodextrin was added and  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  spectra were carried out until 2.2 to 5.0 equivalents of  $\alpha$ -cyclodextrin were added. Phosphorous signal at pH 6 was not enough define for a good interpretation.

**DOSY experiments on selectively prepared *pseudo*-[2] and [3]rotaxane of alkane-diphosphate.** Diffusion coefficients were determined by  $^1\text{H}$  DOSY NMR (400 MHz) experiments on selectively prepared rotaxanes samples at 15 mM in  $\text{D}_2\text{O}$  (pH 10, 25°C).

### ***In vitro* and *in vivo* contrast agent analysis**

**Relaxivity profiles.** Proton NMRD (nuclear magnetic relaxation dispersion) profiles were recorded on a Stellar SMARtracer Fast Field Cycling NMR relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements and controlled by a SMARtracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a Pt resistance temperature probe. The longitudinal relaxation rates ( $1/T_1$ ) were determined in water. The least-square fit of the  $^1\text{H}$  NMRD data were performed by using MicroMath Scientist version 2.0 (Salt Lake City, UT, USA).

**ICP-OES Measurements.** The exact contents in  $Gd^{3+}$  ion of the solutions used for the relaxivity profiles were determined by Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) measurements. These measurements were performed on a JobinYvon ULTIMA2 Spectrometer. Both standard solutions of  $Gd^{3+}$  and the samples were prepared in 5%  $HNO_3$  and the 342.246 nm band for  $Gd^{3+}$  (the most accurate of the three  $Gd^{3+}$  band) was used. All the measurements were repeated at least three times.

**Biodistribution.** Biodistribution studies were conducted *in vivo* by MRI to assess the uptake and clearance from kidney, muscle, spleen, liver more easily observable by MRI.

All animal work was performed in accordance with the institutional animal protocol guidelines in place at the University Paris Descartes, saisine CEEA34.JS.142.1 and approved by the Institute's Animal Research Committee.

Wild-type female 8 weeks BALB/c mice were anaesthetized by Isoflurane (1.5% air/ $O_2$  0.5/0.25  $L \cdot min^{-1}$ ) inhalation and placed in a dedicated contention cradle. 100  $\mu L$  of Gadolinium rotaxanes in saline 0.9% with an optimized concentration of 10 mM of Gd were intravenously injected via the tail vein while the mouse was in the scanner. For reproductibility studies, 6 mice were injected per contrast agents (n=6, 3 contrast agents, 18 mice).

Images were acquired at 7 Tesla (300 MHz) micro imaging spectrometer, equipped with a  $^1H$  radiofrequency linear coil of 4 cm inner diameter (Bruker, Karlsruhe Germany)

The scanning protocol was developed using Paravision 5.1 software.

DCE Dynamic contrast Enhanced sequence was recorded using Intragate Flash multislices for motion free artifacts T1 weighted sequence. The final images have a spatial resolution of 117  $\mu m$  x 117  $\mu m$  in plane.

The dynamic follow-up is measured during in a scan time of 40 min with 3 min 14s temporal resolution.

To study the biodistribution of the rotaxanes, several regions of interest (ROI) were monitored, the liver and the kidney. The corresponding MRI intensity related to the amount of the rotaxane contrast agent was plotted against time to visualize the uptake and clearance of scaffolds in the organs. Comparison with commercial Gd-DOTA (Guebert, France) as a reference was also performed at the corresponding concentration of Gd (10mM).

## Crystallography

A single crystal of each compound was selected, mounted onto a cryoloop, and transferred in a cold nitrogen gas stream. Intensity data were collected with a BRUKER Kappa-APEXII diffractometer with a copper microfocus source ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ). Data collection were performed with APEX2 suite (BRUKER). Unit-cell parameters refinement, integration and data reduction were carried out with SAINT program (BRUKER). SADABS (BRUKER) was used for scaling and multi-scan absorption corrections.

In the WinGX suite of programs, the structure were solved with SHELXD program and refined by full-matrix least-squares methods using SHELXL-14.

When possible, all non-hydrogen atoms were refined anisotropically. However, in some cases, the structural model is incomplete even for the main components. The solvent molecules are really numerous and the location of K cations, often disordered, is hard to achieve and only partially solved.

**Crystallization procedure for CD-rotaxane with alkane-diphosphate axle.** [3]RotCD of alkane-diphosphate crystallized in a 5 mL test tube by slow diffusion in a fridge of *N,N*-dimethylformamide into an aqueous solution of the product at pH 10 using potassium carbonate as base.

Crystal data and structure refinement for *pseudo*-[3]rotaxane-C<sub>8</sub> (84).

Identification code	shelx - 2(C36 H60 O30), C8 H16 O8 P2, 4 K, x H2O	
Empirical formula	C80 H99 K4 O110 P2	
Formula weight	3038.93	
Temperature	120(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Tetragonal	
Space group	P 42 21 2	
Unit cell dimensions	a = 23.4286(4) Å	α = 90°.
	b = 23.4286(4) Å	β = 90°.
	c = 24.2838(5) Å	γ = 90°.
Volume	13329.4(5) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.514 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	2.582 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	6260	
Crystal size	0.15 x 0.11 x 0.11 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	3.640 to 68.467°.	
Index ranges	-28 ≤ h ≤ 28, -23 ≤ k ≤ 27, -28 ≤ l ≤ 29	
Reflections collected	157970	
Independent reflections	12245 [R(int) = 0.0584]	
Completeness to theta = 67.679°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.661 and 0.537	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	12245 / 0 / 927	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.347	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0965, wR2 = 0.2718	
R indices (all data)	R1 = 0.1024, wR2 = 0.2833	
Absolute structure parameter	0.05(4)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	1.768 and -1.687 e.Å <sup>-3</sup>	

Crystal data and structure refinement for *pseudo*-[3]rotaxane-C<sub>10</sub> (86).

Identification code	shelx	
Empirical formula	C <sub>82</sub> H <sub>182.50</sub> K <sub>4</sub> O <sub>105</sub> P <sub>2</sub>	
Formula weight	3067.11	
Temperature	120(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Tetragonal	
Space group	P 43 21 2	
Unit cell dimensions	a = 23.3244(10) Å	α = 90°.
	b = 23.3244(10) Å	β = 90°.
	c = 48.784(3) Å	γ = 90°.
Volume	26540(3) Å <sup>3</sup>	
Z	8	
Density (calculated)	1.535 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	2.555 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	12964	
Crystal size	0.15 x 0.1 x 0.08 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	3.313 to 68.725°.	
Index ranges	-27 ≤ h ≤ 27, -27 ≤ k ≤ 28, -44 ≤ l ≤ 58	
Reflections collected	181638	
Independent reflections	24321 [R(int) = 0.0340]	
Completeness to theta = 67.679°	99.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.753 and 0.62	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	24321 / 0 / 1777	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.304	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0890, wR2 = 0.2636	
R indices (all data)	R1 = 0.0927, wR2 = 0.2710	
Absolute structure parameter	0.08(2)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	1.011 and -1.549 e.Å <sup>-3</sup>	

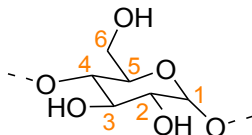
Crystal data and structure refinement for *pseudo*-[3]rotaxane-C<sub>12</sub> (**88**).

Identification code	shelx – 4(C36 H60 O30), 2(C8 H16 O8 P2), 8 K, x H2O	
Empirical formula	C166 H300 K8 O210 P4 (formule provisoire)	
Formula weight	6092.72	
Temperature	200(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21	
Unit cell dimensions	a = 22.944(3) Å	$\alpha = 90^\circ$ .
	b = 13.9699(15) Å	$\beta = 92.681(8)^\circ$ .
	c = 44.772(5) Å	$\gamma = 90^\circ$ .
Volume	14335(3) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.412 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	2.367 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	6376	
Crystal size	0.44 x 0.08 x 0.01 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.976 to 43.132°.	
Index ranges	-20 ≤ h ≤ 20, -12 ≤ k ≤ 12, -38 ≤ l ≤ 38	
Reflections collected	86404	
Independent reflections	19480 [R(int) = 0.0780]	
Completeness to theta = 43.132°	95.4 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.748 and 0.618	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	19480 / 3401 / 3296	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.309	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.1121, wR2 = 0.2770	
R indices (all data)	R1 = 0.1306, wR2 = 0.2996	
Absolute structure parameter	0.06(3)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.824 and -0.447 e.Å <sup>-3</sup>	

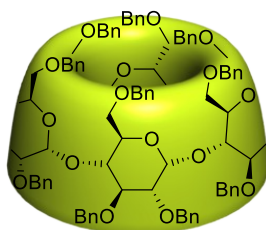


## Syntheses

Cyclodextrin's NMR were interpreted thanks to literature and 2D NMR. Protons and carbons are numbered from 1 to 6 on the glucopyranose sub-units of cyclodextrins as shown below.



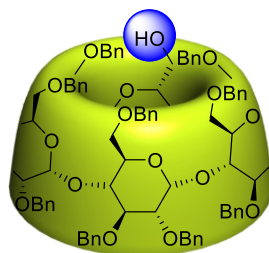
### Perbenzylated $\alpha$ -cyclodextrin (**2**)<sup>[95]</sup>



A 1 L round-bottom flask was charged with freeze-dried  $\alpha$ -cyclodextrin **1** (7 g, 10 mmol, 1 eq) and dimethylsulfoxide (150 mL). NaH (13 g, 0.54 mol, 45 eq) was added portionwise and the mixture was stirred at room temperature for 3 hours. Benzylchloride (40 mL, 0.4 mol, 40 eq) was added dropwise during 1 hour. The mixture was stirred for 16 hours at room temperature. 100 g of ice were carefully added and the mixture was extracted by 3x250 mL of diethylether and 150 mL of distilled water. The combined organic layers were dried on MgSO<sub>4</sub>, concentrated under vacuo and purified by column chromatography, using 9:1 v/v cyclohexane/ethylacetate as eluent to provide **2** as a white powder (24.6 g, 95 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.17-7.31 (m, 90H, aromatic-H), 5.13 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 6H, H<sup>1</sup>), 5.24-4.92 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 12H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.36-4.44 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 12H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.19 (t,  $J$  = 9.5 Hz, 6H, H<sup>3</sup>), 4.09 (t,  $J$  = 9.5 Hz, 6H, H<sup>4</sup>), 4.04 (dd,  $J$  = 11.5, 2.8 Hz, 6H, H<sup>6</sup>), 3.92 (d,  $J$  = 9.5 Hz, H<sup>5</sup>), 3.50-3.54 (m, 12H, H<sup>2</sup> and H<sup>6</sup>).

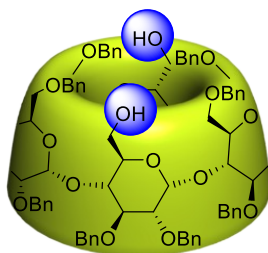
<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  126.9-128.3 (CH-aromatic), 98.6 (C<sup>1</sup>), 80.9 (C<sup>3</sup>), 79.2 (C<sup>4</sup>), 78.9 (C<sup>2</sup>), 73.3 (3xOCH<sub>2</sub>Ph), 75.6, 72.7, 71.5 (C<sup>5</sup>), 69.0 (C<sup>6</sup>).

**Monol-benzylated  $\alpha$ -cyclodextrin (**3**)**<sup>[96]</sup>

A 1 L round-bottom flask was charged with perbenzylated  $\alpha$ -cyclodextrin **2** (16 g, 6.1 mmol, 1 eq), distilled toluene (30 mL) and diisobutylaluminium hydride (62 mL, 92 mmol, 15 eq). The mixture was stirred at 50°C under nitrogen atmosphere for 30 min. The reaction was quenched by 200 g of ice. The aqueous layer was acidified to pH = 1 (HCl 1M) and the mixture was extracted by 3x200 mL of ethylacetate. The combined organic layers were dried on MgSO<sub>4</sub>, concentrated under vacuo and purified by flash chromatography, using cyclohexane/ethylacetate as eluent to provide **3** as a white powder (10.2 g, 67 %).

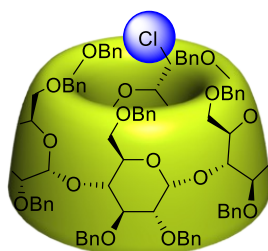
**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.07-7.27 (m, 90H), 5.44-5.55 (m, 2H), 5.30-5.42 (m, 2H), 5.14-5.26 (m, 2H), 4.76-4.99 (m, 12H), 4.63-4.73 (m, 2H), 4.26-4.60 (m, 20H), 4.15-4.26 (m, 2H), 4.05-4.16 (m, 6H), 3.82-4.05 (m, 16H), 3.62-3.77 (m, 4H), 3.52-3.61 (m, 3H), 3.37-3.52 (m, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  139.54, 139.49, 139.46, 139.42, 139.37, 139.35, 138.70, 138.61, 138.52, 138.45, 138.37, 138.34, 138.27, 138.23, 138.22, 138.11, 138.07, 128.50, 128.46, 128.44, 128.41, 128.37, 128.31, 128.26, 128.21, 128.19, 128.15, 128.10, 128.04, 127.98, 127.95, 127.93, 127.88, 127.82, 127.80, 127.78, 127.75, 127.73, 127.70, 127.66, 127.64, 127.60, 127.51, 127.49, 127.41, 127.35, 127.21, 127.15, 127.11, 127.05, 126.99, 126.91, 126.86, 98.88, 98.49, 98.25, 98.18, 98.09, 81.53, 81.48, 81.32, 81.13, 80.96, 80.88, 80.49, 80.35, 80.08, 79.78, 79.56, 79.32, 79.12, 78.63, 78.20, 77.36, 76.68, 76.30, 76.18, 75.94, 74.76, 73.85, 73.52, 73.49, 73.44, 73.34, 73.24, 73.10, 73.01, 72.56, 71.98, 71.86, 71.62, 71.56, 71.45, 69.55, 69.44, 69.17, 61.68, 27.07.

**Diol-benzylated  $\alpha$ -cyclodextrin (4)**<sup>[94]</sup>

A 1 L round-bottom flask was charged with perbenzylated  $\alpha$ -cyclodextrin **2** (16 g, 6.1 mmol, 1 eq), distilled toluene (30 mL) and diisobutylaluminium hydride (62 mL, 92 mmol, 15 eq). The mixture was stirred at 50°C under a gas flow of nitrogen for 30 min. The reaction was quenched by 200 g of ice. The aqueous layer was acidified to pH = 1 (HCl 1M) and the mixture was extracted by 3x200 mL of ethylacetate. The combined organic layers were dried on MgSO<sub>4</sub>, concentrated under vacuo and purified by flash chromatography, using cyclohexane/ethylacetate as eluent to provide **4** as a white powder (11.9 g, 80 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.31-7.11 (m, 80H, H arom.), 5.77 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 2H), 5.49 (d,  $J$  = 10.4 Hz, 2H), 5.23 (d,  $J$  = 10.7 Hz, 2H), 4.94 (d,  $J$  = 10.4 Hz, 2H), 4.93 (d,  $J$  = 11.8 Hz, 2H), 4.83 (d,  $J$  = 11.8 Hz, 2H), 4.81 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 4H), 4.76 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 2H), 4.75 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 2H), 4.60 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 2H), 4.59 (d,  $J$  = 12.4 Hz, 2H), 4.58 (d,  $J$  = 12.6 Hz, 2H), 4.54 (d,  $J$  = 12.6 Hz, 2H), 4.51-4.53 (m, 6H), 4.41 (d,  $J$  = 12.6 Hz, 2H), 4.36 (d,  $J$  = 12.6 Hz, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.14 (m, 2H), 4.06 (dd,  $J$  = 9.6 Hz,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4.04-3.73 (m, 22H), 3.67 (m, 2H), 3.61 (dd, 2H), 3.47-3.44 (m, 4H), 3.35 (m, 2H).

**Mono-chlorobenzylated  $\alpha$ -cyclodextrin (5)**<sup>[97]</sup>

A 1 L round-bottom flask was charged with monol-benzylated  $\alpha$ -cyclodextrin **3** (6 g, 2.4 mmol, 1 eq) and distilled dichloromethane (100 mL) under nitrogen atmosphere. Mesylchloride (0.46 mL, 5.9 mmol, 2.5 eq) and triethylamine (0.8 mL, 5.9 mmol, 2.5eq) were

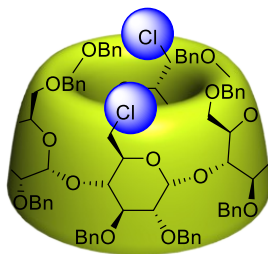
added via a syringe. The yellow mixture was stirred at room temperature for 2 hours. Dichloromethane was removed under vacuo and anhydrous dimethylformamide (80 mL) was added to the residue. The mixture was stirred at 100 °C for 12 hours, then purified by flash chromatography, using cyclohexane/ethylacetate to provide **5** as a white powder (4.2 g, 70%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.03-7.37 (m, 90H), 4.95-5.35 (m, 12H), 4.80-4.94 (m, 6H), 4.27-4.57 (m, 20H), 3.82-4.23 (m, 23H), 3.72 (m, 2H), 3.65 (m, 1H), 3.3-3.6 (m, 10H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 139.56, 139.46, 139.43, 139.37, 138.57, 138.52, 138.50, 138.47, 138.44, 138.42, 138.39, 138.33, 138.22, 128.44, 128.43, 128.40, 128.37, 128.32, 128.30, 128.26, 128.23, 128.22, 128.10, 128.08, 128.06, 127.99, 127.95, 127.86, 127.83, 127.81, 127.78, 127.74, 127.72, 127.70, 127.67, 127.63, 127.57, 127.53, 127.50, 127.48, 127.44, 127.38, 127.23, 127.12, 127.08, 127.04, 127.00, 126.95, 98.99, 98.84, 98.75, 98.67, 98.13, 81.24, 81.18, 81.12, 81.09, 80.95, 80.84, 80.20, 80.03, 79.91, 79.85, 79.78, 79.41, 79.37, 79.35, 79.25, 79.21, 79.16, 78.70, 75.87, 75.78, 75.72, 75.63, 75.35, 75.33, 73.65, 73.61, 73.55, 73.25, 73.01, 72.99, 72.83, 72.81, 72.07, 71.87, 71.78, 71.66, 71.27, 69.53, 69.46, 69.41, 69.13.

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>155</sub>H<sub>161</sub>O<sub>29</sub>ClNa) 2546.0768; found 2546.0830.

### Di-chlorobenzylated α-cyclodextrin (**6**)<sup>[97]</sup>



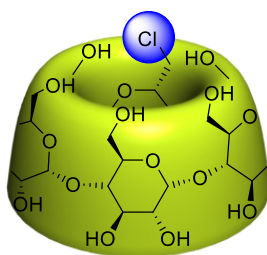
A 1 L round-bottom flask was charged with diol-benzylated α-cyclodextrin **4** (1 g, 0.44 mmol, 1 eq) and distilled dichloromethane (20 mL) under nitrogen atmosphere. Mesylchloride (0.13 mL, 1.66 mmol, 4 eq), imidazole (0.34 g, 4.97 mmol, 12 eq) and triethylamine (0.23 mL, 1.66 mmol, 4 eq) were added. The yellow mixture was stirred at room temperature for 2 hours. Dichloromethane was removed under vacuo and anhydrous dimethylformamide (5 mL) was added to the residue. The mixture was stirred at 100°C for 12 hours, and then purified by flash chromatography, using cyclohexane/ethylacetate to provide **6** as a white powder (740 mg, 74%).

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.62 – 6.70 (m, 80H), 5.17 (dd,  $J = 10.9, 2.6$  Hz, 2H), 5.11 (d,  $J = 3.3$  Hz, 2H), 5.06 (dd,  $J = 10.9, 2.6$  Hz, 2H), 4.98 – 4.91 (m, 2H), 4.88 (d,  $J = 3.3$  Hz, 3H), 4.75 (dd,  $J = 11.2, 8.7$  Hz, 6H), 4.60 – 4.45 (m, 2H), 4.43 – 4.22 (m, 18H), 4.12 – 3.72 (m, 24H), 3.64 (m,  $J = 21.0, 6.9$  Hz, 6H), 3.51 – 3.40 (m, 4H), 3.37 (d,  $J = 9.9$  Hz, 2H), 3.30 (d,  $J = 9.9$  Hz, 2H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  139.44, 139.37, 138.53, 138.37, 138.32, 138.20, 128.42, 128.31, 128.25, 128.10, 128.07, 127.96, 127.92, 127.83, 127.76, 127.68, 127.63, 127.58, 127.51, 127.44, 127.07, 127.03, 99.08, 98.87, 98.51, 81.02, 80.96, 80.78, 80.34, 80.25, 79.34, 79.20, 78.66, 75.89, 75.74, 75.20, 73.62, 73.24, 73.00, 72.75, 72.03, 71.73, 71.20, 69.47, 69.18

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{148}\text{H}_{154}\text{O}_{28}\text{Cl}_2\text{Na}$ ) 2473.9957; found 2473.9885.

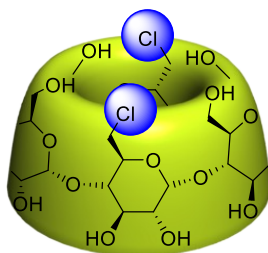
### Mono-chloro $\alpha$ -cyclodextrin (**7**)<sup>[93a]</sup>



A 500 mL round-bottom flask was charged with mono-chlorobenzylated  $\alpha$ -cyclodextrin **5** (4.9 g, 1.94 mmol, 1 eq),  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (10%) (2.45 g, 0.5 eq/w), distilled water (45 mL), acetic acid (45 mL) and distilled tetrahydrofuran (200 mL). The mixture was stirred under dihydrogen atmosphere at room temperature for 12 hours. After filtration on Celite plug, the residue was concentrated and freeze-dried to provide **7** as a white powder (1.8 g, 95%).

**$^1\text{H}$  NMR** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm)  $\delta$  5.04 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 5.02 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.99 (t,  $J = 3.0$  Hz, 4H), 4.13 – 3.71 (m, 24H), 3.65 – 3.44 (m, 12H).

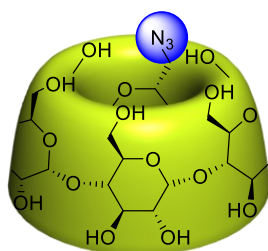
**$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  101.40, 101.38, 101.36, 101.33, 101.30, 101.25, 82.07, 81.50, 81.39, 81.21, 81.20, 81.17, 73.30, 73.28, 73.24, 72.83, 72.27, 72.00, 71.98, 71.94, 71.89, 71.64, 71.62, 71.53, 71.17, 60.53, 60.40, 60.34, 44.52.

**Di-chloro  $\alpha$ -cyclodextrin (8)**

A 100 mL round-bottom flask was charged with di-chlorobenzylated  $\alpha$ -cyclodextrin **6** (1.2 g, 0.49mmol, 1 eq), Pd(OH)<sub>2</sub>/C (0.6 g, 0.5 eq/w), distilled water (10 mL), acetic acid (10 mL) and distilled tetrahydrofurane (34 mL). The mixture was stirred under dihydrogen atmosphere at room temperature for 12 hours. After filtration on Celite plug, the residue was concentrated and freeze-dried to provide **8** as a white powder (490 mg, 99%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.05 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 2H), 5.02 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 2H), 5.01 – 4.97 (m, 2H), 4.08 – 3.86 (m, 4H), 3.84 – 3.72 (m, 20H), 3.67 – 3.41 (m, 12H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  101.37, 101.30, 82.14, 81.54, 81.44, 73.26, 73.23, 72.88, 72.31, 71.89, 71.61, 71.54, 71.20, 60.57, 44.49.

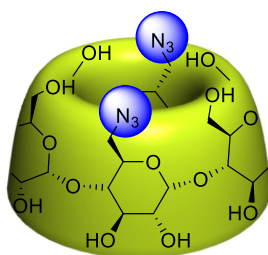
 **$\alpha$ -cyclodextrin-monoazide (9)**<sup>[93b]</sup>

Mono-chloro  $\alpha$ -cyclodextrin **7** (300 mg, 0.3 mmol, 1 eq) in anhydrous dimethylformamide (20 mL) and sodium azide (195 mg, 3 mmol, 10 eq) were charged in a microwave oven and heated at 150°C for 1 hour. The mixture was filtered at room temperature to remove salts and the residue was purified by flash chromatography, using 7:3 v/v acetonitrile/water as eluent to provide **9** as a light brown powder after freeze-drying (239 mg, 80%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.13 – 5.04 (m, 6H), 4.06 – 3.80 (m, 24H), 3.74 – 3.51 (m, 12H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  101.39, 101.36, 101.21, 82.14, 81.33, 81.20, 81.18, 73.27, 73.26, 73.24, 73.23, 72.97, 72.16, 72.00, 71.97, 71.94, 71.65, 71.63, 71.55, 71.53, 70.75, 60.50, 60.44, 60.39, 60.34, 51.24, 31.40.

**$\alpha$ -cyclodextrin-diazide (10)**<sup>[98]</sup>



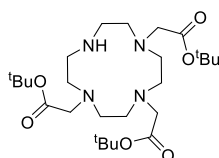
Sodium azide (195 mg, 3.0 mmol, 10 eq) was added to a stirred solution of dichloride  $\alpha$ -cyclodextrin **8** (302 mg, 0.3 mmol, 1 eq) in dry dimethylformamide (20 ml) under inert atmosphere. The mixture was stirred for 1 h under microwave at 150 °C. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography, using ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  10-30%, to yield a brown solid **10** (240 mg, 79%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.01 (m, 6H), 4.00 - 3.69 (m, 24H), 3.64 – 3.47 (m, 12H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  103.99, 103.81, 84.73, 83.90, 75.87, 75.65, 74.71, 74.51, 74.17, 74.10, 73.29, 63.00, 53.80.

HRMS (ESI):  $m/z$  calc  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_{28}\text{Na}$ ) 1045.3191; found 1045.3189.

**Compound 13**<sup>[99]</sup>



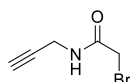
A round bottom flask was charged with cyclen (**11**) (1 g, 5.8 mmol, 1 eq) and *N,N*-dimethylacetamide (13 mL). Sodium acetate (2.37 g, 17.4 mmol, 3 eq) was added. The mixture was cooled to 0°C with an ice-bath. A solution of *tert*-butyl bromoacetate (**12**) (2.55 mL, 17.4 mmol, 3 eq) in *N,N*-dimethylacetamide (6 mL) was added drop-wise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. A precipitate was formed after 1 hour.

Water was poured in the reaction mixture until the solution became clear. NaHCO<sub>3</sub> was added portion-wise until the formation of a precipitate. It was filtered and washed with water. The precipitate was redissolved in chloroform and washed with water. The organic phase was dried and concentrated under vacuo until 10 mL of mixture. Diethylether (75 mL) was added. The precipitate formed was filtered and washed with cold diethylether. The product **13** was obtained as a white powder (2 g, 67%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.38 (s, 4H), 3.30 (s, 2H), 3.11 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H), 2.92 (s, 8H), 2.89 (s, 4H), 1.46 (s, 18H), 1.46 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.60, 169.74, 81.93, 81.78, 65.95, 58.33, 51.49, 49.35, 48.92, 47.65, 28.35, 28.31.

### 2-bromo-N-(prop-2-ynyl)acetamide (**14**)<sup>[156]</sup>

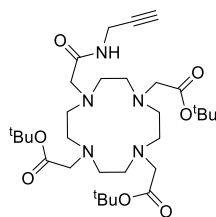


To a solution of bromoacetic acid (1 g, 7.1 mmol, 1 eq) in distilled dichloromethane (10 mL) cooled to 0°C with an ice-bath, propargylamine (460 μL, 7 mmol, 1 eq) was added via a syringe dropwise. A solution of dicyclohexylcarbonyldiimidazole (1.48 g, 7 mmol, 1 eq) in dichloromethane (5 mL) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography with cyclohexane/AcOEt to yield the amide **14** as a white solid (1.03 g, 82%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.08 (broad s, 1 H) 4.09 (dd, *J* = 5.3, 2.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 2.28 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.24, 78.65, 72.39, 30.11, 28.81.

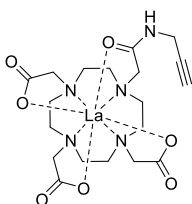


**Compound 15**<sup>[100a]</sup>

Under argon, **13** (3 g, 5.8 mmol, 1 eq), 2-bromo-*N*-(prop-2-ynyl)acetamide **14** (1.02 g, 5.80 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (2.61 g, 18.8 mmol, 3.24 eq) were dissolved in distilled acetonitrile (60 ml). The mixture was stirred at room temperature for 18 hours. Then, the solvent was removed and the product was dissolved in chloroform and washed by a solution of sodium carbonate 5% (3x10 ml). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. Chloroform was then removed under reduced pressure to yield a white solid **15** (3.41g, 96%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.24 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 5.6, 2.5 Hz, 2H), 3.37 (s, 2H), 3.26 (s, 4H), 3.09 (s, 2H), 2.95 – 2.87 (m, 4H), 2.82 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H), 2.69 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H), 2.50 (dd, *J* = 6.0, 3.3 Hz, 4H), 2.14 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.44 (s, 18H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.21, 170.94, 81.26, 81.05, 80.94, 70.29, 57.88, 56.69, 56.40, 55.41, 53.89, 52.65, 52.31, 28.72, 28.42, 28.39.

**Compound 16**<sup>[100a]</sup>

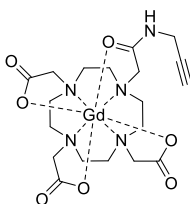
In a round bottom flask, **15** (3.17 g, 5.20 mmol) and trifluoroacetic acid (12 ml, 0.16 mol) in dichloromethane (40 ml) were stirred 24 h at room temperature. Diethylether (110 ml) was added to yield a white precipitate. The precipitate was filtered, washed with diethylether and dried to yield a white solid. Then in a round bottom flask, the white solid (1.17 g, 1.50 mmol, 1 eq), lanthanum(III) nitrate hexahydrate (0.71 g, 1.65 mmol, 1.1 eq) in distilled water (12 ml) was stirred ten minutes at room temperature. Then, a solution of sodium hydroxide (1M, 7 ml)

was added slowly to maintain the pH at 7 (controlled by pH paper indicator). The solution was stirred at room temperature overnight. Solvent was removed and the product was purified by flash chromatography using ACN/H<sub>2</sub>O 20-40% to obtain a white solid **16** (0.85 g, 98%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4.05 (s, 2H), 3.95 – 2.17 (m broad, 25H).

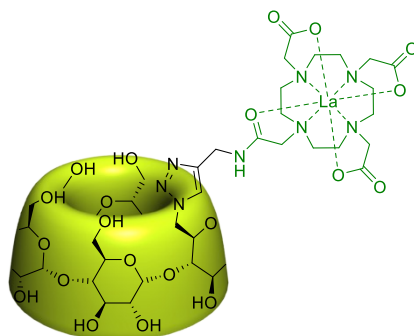
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 179.50, 179.38, 175.28, 60.96, 60.73, 58.62, 53.56, 49.76, 29.49.

### Compound 17<sup>[100a]</sup>



In a round bottom flask, **15** (3.17 g, 5.20 mmol) and trifluoroacetic acid (12 ml, 0.16 mol) in dichloromethane (40 ml) were stirred 24 h at room temperature. Diethylether (110 ml) was added to yield a white precipitate. The precipitate was filtered, washed with diethylether and dried to yield a white solid. Then in a round bottom flask, the white solid (1.17 g, 1.50 mmol, 1 eq), gadolinium(III) chloride hexahydrate (0.62 g, 1.65 mmol, 1.1 eq) in distilled water (12 ml) was stirred ten minutes at room temperature. Then, a solution of sodium hydroxide (1M, 9 ml) was added slowly to maintain the pH at 7 (controlled by pH paper paper indicator). The solution was stirred at room temperature overnight. Solvent was removed and the product was purified by flash chromatography using ACN/H<sub>2</sub>O 10-40% to obtain a white solid **17** (0.86 g, 96%).

**MS (ESI):** *m/z* 619.12 [M+Na]<sup>+</sup>

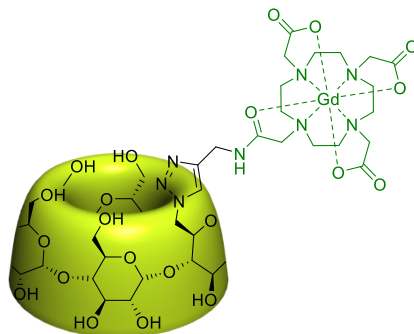
**Compound 18: CDLa<sup>[101]</sup>**

A solution of **16** (127 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) and CD(N<sub>3</sub>) (**9**) (200 mg, 0.20 mmol, 1 eq) in dimethylformamide (5 ml) and distilled water (5 ml) in a Schlenk-flask was flushed with argon for 10 minutes. Then, copper(II) sulfate pentahydrate (30 mg, 0.12 mmol), *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (20 mg, 25 μl, 0.12 mmol) and sodium ascorbate (47 mg, 0.24 mmol) were added. The solution was stirred under argon at room temperature overnight. The solvents were removed and the product was purified by flash chromatography, using ACN/H<sub>2</sub>O 10-50% as eluent, to yield the white solid **18** (242 mg, 77%).

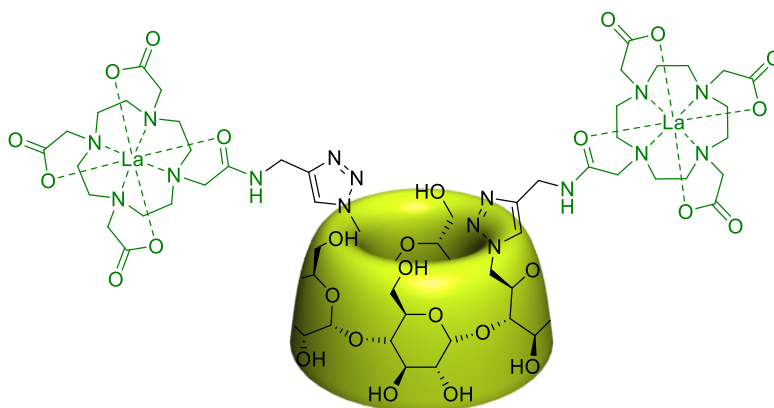
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.06 (s, 1H), 5.22 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.18 – 5.07 (m, 4H), 5.03 (m, 2H), 4.71 – 4.54 (m, 3H), 4.21 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.13 – 3.84 (m, 19H), 3.80 (dd, *J* = 12.3, 4.6 Hz, 2H), 3.76 – 3.50 (m, 16H), 3.51 – 2.21 (m, 22H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 179.45, 179.24, 175.53, 143.34, 101.50, 101.47, 101.33, 101.32, 100.99, 73.30, 73.26, 73.20, 73.03, 72.80, 72.17, 72.02, 71.96, 71.94, 71.66, 71.64, 71.52, 71.43, 69.58, 60.54, 60.46, 60.41, 59.16, 53.68, 51.36, 49.38, 34.92.

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>55</sub>H<sub>87</sub>LaN<sub>8</sub>O<sub>36</sub>Na) 1597.4186; found 1597.4179.

**Compound 19: CDGd<sup>[101]</sup>**

A solution of **17** (131 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) and CD(N<sub>3</sub>) (**9**) (200 mg, 0.20 mmol) in dimethylformamide (5 ml) and distilled water (5 ml) in a Schlenk-flask was flushed with argon for 10 minutes. Then, copper(II) sulfate pentahydrate (30 mg, 0.12 mmol), *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (20 mg, 25  $\mu$ l, 0.12 mmol) and sodium ascorbate (47 mg, 0.24 mmol) were added. The solution was stirred under argon at room temperature overnight. The solvents were removed and the product was purified by flash chromatography using ACN/H<sub>2</sub>O 10-50% as eluent to yield the white solid **19** (255 mg, 80%). **HRMS (ESI):** *m/z* calc [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>55</sub>H<sub>87</sub>GdN<sub>8</sub>O<sub>36</sub>Na) 1616.4423; found 1616.4371.

**Compound 20: CDLa<sub>2</sub><sup>[101]</sup>**

A solution of **16** (124 mg, 0.22 mmol, 2.2 eq) and CD(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**10**) (100 mg, 0.10 mmol, 1 eq) in dimethylformamide (2.5 ml) and distilled water (2.5 ml) in a Schlenk was flushed with argon for 10 minutes. Then, copper(II) sulfate pentahydrate (30 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq), *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (25  $\mu$ l, 0.12 mmol, 1.2 eq) and sodium

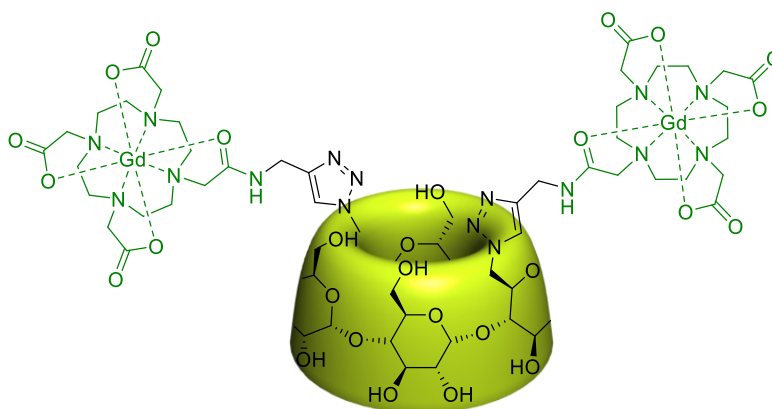
ascorbate (47 mg, 0.24 mmol, 2.4 eq) were added. The solution was stirred under argon at room temperature overnight. The solvents were removed and the product was purified by flash chromatography using ACN/H<sub>2</sub>O 10-70% to yield the white solid **20** (150 mg, 70%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.06 (s, 2H), 5.21 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 5.15 (d, *J* = 13.7 Hz, 2H), 5.05 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.67 (t, *J* = 12.7 Hz, 3H), 4.60 (s, 2H), 4.40 – 4.22 (s broad, 2H), 4.05 (m, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 6H), 3.97 (d, *J* = 10.3 Hz, 6H), 3.83 – 3.73 (m, 5H), 3.73 – 3.66 (m, 5H), 3.64 – 3.53 (m, 11H), 3.52 – 2.27 (m, 49H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 179.45, 179.23, 175.53, 101.66, 101.44, 100.72, 83.04, 81.56, 80.45, 73.22, 72.88, 72.84, 72.33, 71.61, 71.49, 71.43, 60.80, 60.53, 59.18, 58.44, 53.52, 51.39, 49.25, 34.81.

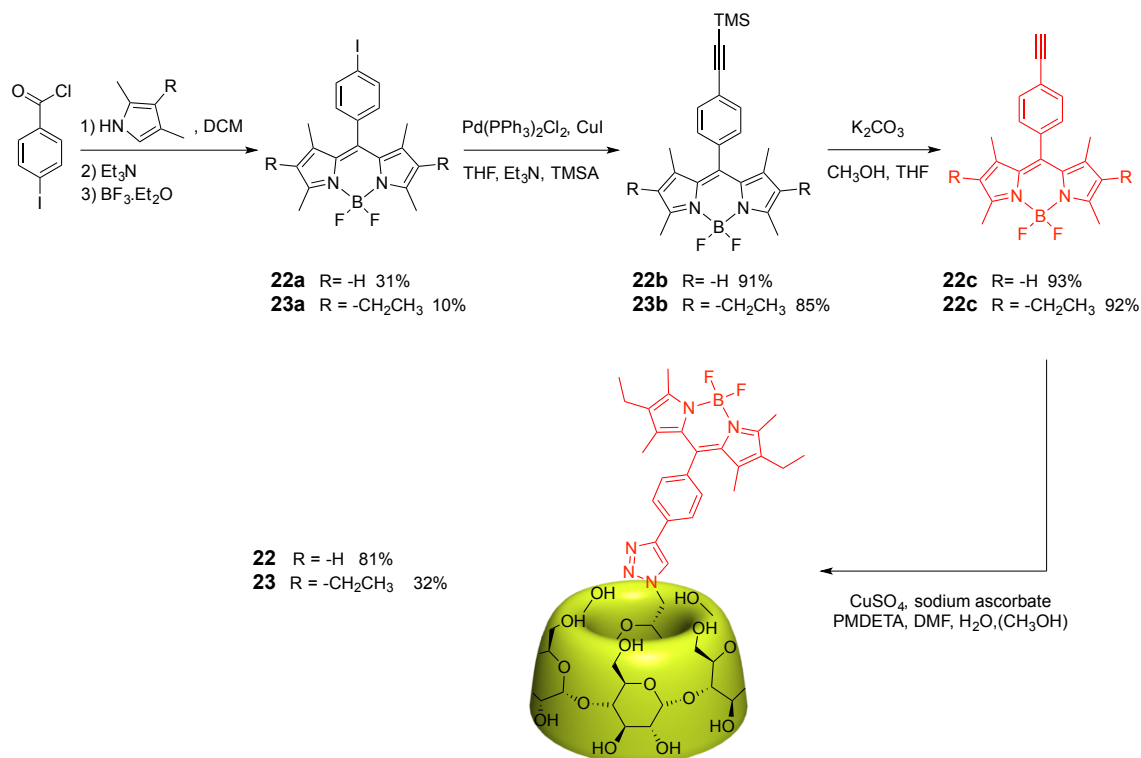
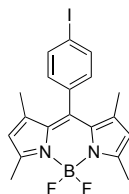
**HRMS (ESI):** *m/z* calc [M+2Na]<sup>2+</sup> (C<sub>74</sub>H<sub>114</sub>La<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>42</sub>Na<sub>2</sub>) 1111.2594; found 1111.2527 (100%), [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>74</sub>H<sub>114</sub>La<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>42</sub>Na) 2199.5296; found 2199.5287 (50%).

**Compound 21: CDGd<sub>2</sub><sup>[101]</sup>**



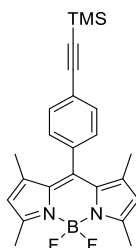
A solution of **17** (128 mg, 0.22 mmol, 2.2 eq) and CD(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**10**) (100 mg, 0.10 mmol, 1 eq) in dimethylformamide (2.5 ml) and distilled water (2.5 ml) in a Schlenk was flushed with argon for 10 minutes. Then, copper(II) sulfate pentahydrate (30 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq), *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (25 μl, 0.12 mmol, 1.2 eq) and sodium ascorbate (47 mg, 0.24 mmol, 2.4 eq) were added. The solution was stirred under argon at room temperature overnight. The solvents were removed and the product was purified by flash chromatography using ACN/H<sub>2</sub>O 10-70% to yield the white solid **21** (193 mg, 88%).

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [M+2Na]<sup>2+</sup> (C<sub>74</sub>H<sub>114</sub>Gd<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>42</sub>Na<sub>2</sub>) 1130.2771; found 1130.2810 (100%), [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>74</sub>H<sub>114</sub>Gd<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>42</sub>Na) 2237.5651; found 2237.5664 (100%).

CD-BODIPY (22) and CD-BODIPY-*Et* (23)Compound 22a<sup>[157]</sup>

Para-iodobenzoyl chloride (2.94 g, 11.1 mmol, 1 eq) was added to a 250 mL round bottom flask under argon atmosphere and then was dissolved in 100 mL of distilled dichloromethane. 2,4-dimethylpyrrole (2.5 mL, 17 mmol, 2.2 eq) was added via a syringe at room temperature and the mixture was stirred 15 hours at reflux. It was then cooled to room temperature, and triethylamine (5 mL) and borontrifluoride etherate (5 mL) were added dropwise. The mixture was heated at reflux for 2 hours. The solvent was removed in vacuo. The residue was washed with 3x50 mL of distilled water and purified on silica gel column using 98:2 v/v cyclohexane/EtOAc as eluent to give **22a** as an orange solid with metallic luster (1.55 g, 31%).

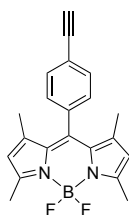
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.99 (s, 2H), 2.55 (s, 5H), 1.42 (s, 7H).

**Compound 22b**<sup>[157]</sup>

In a Schlenk tube, **22a** (1.4 g, 3.11 mmol, 1 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub> (218 mg, 0.31 mmol, 0.1 eq) and CuI (118 mg, 0.62 mmol, 0.2 eq) were added under argon atmosphere. Distilled tetrahydrofurane (40 mL) and triethylamine (20 mL) were degassed by argon bubling for 30 min and added to the schlenk. The mixture was stirred for 10 min and TMSA (0.57 mL, 4.04 mmol, 1.3 eq) was added dropwise via a syringe. The mixture was stirred at room temperature overnight and purified by flash column chromatography, using cyclohexane/ethylacetate (98:2) as eluent to provide **22b** as an orange solid (1.19 g, 91%).

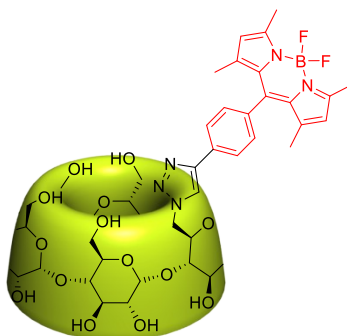
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 2.55 (s, 6H), 1.40 (s, 6H), 0.28 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.91, 143.13, 140.90, 135.36, 132.85, 131.31, 128.23, 124.09, 121.49, 104.34, 95.98, 14.74, 0.04.

**Compound 22c**<sup>[158]</sup>

A 250 mL round-bottomed flask was charged with **22b** (1.1g, 2.64 mmol, 1 eq) and tetrahydrofurane (25 mL). Methanol (25 mL) and potassium carbonate (730 mg, 5.28 mmol, 2 eq) were added. The mixture was stirred for 2 hours at room temperature and purified on silica plug with dichloromethane and cyclohexane as eluent to provide **22c** as dark red solid (854 mg, 93%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.26 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 3.18 (s, 1H), 2.55 (s, 6H), 1.40 (s, 6H).

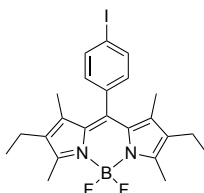
**Compound 22: CD-BODIPY<sup>[80]</sup>**

A 50 mL round-bottom flask was charged with  $\alpha$ -cyclodextrin-monoazide **9** (257 mg, 0.26 mmol, 1 eq), **22c** (90 mg, 1.2 eq) and water (5 mL) under argon. Copper sulfate pentahydrate (25 mg, 0.1 mmol, 0.4 eq), sodium ascorbate (81 mg, 0.41 mmol, 1.6 eq) and PMDETA (18 mg, 0.41 mmol, 0.4 eq) in dimethylformamide (10 mL) were added. The mixture was stirred overnight at room temperature and concentrated under vacuo. The residue was purified by flash column chromatography, using 8:2 v/v acetonitrile/water as eluent. The dark red solid obtained was freeze-dried to provide **22** as a red powder (283 mg, 81%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.57 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.20 (s, 2H), 5.38-5.66 (m, 16H), 5.11 (m, 2H), 4.75-4.93 (m, 10H), 4.45-4.63 (m, 6H), 4.11 (m, 2H), 3.40-3.86 (m, 36H), 2.46 (s, 6H), 1.43 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  155.40, 145.84, 143.26, 142.15, 133.77, 132.01, 131.17, 128.91, 126.44, 126.41, 124.09, 102.53, 102.44, 102.23, 102.16, 73.73, 73.51, 73.26, 72.78, 72.60, 72.55, 72.46, 72.43, 72.18, 69.97, 60.67, 60.45, 60.35, 60.08, 50.73, 40.52, 14.68.

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>57</sub>H<sub>78</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>29</sub>Na) 1368.4745; found 1368.4791.

**Compound 23a<sup>[159]</sup>**

3-Ethyl-2,4-dimethylpyrrole (3.4 ml, 22.8 mmol) was added slowly to a stirred solution of 4-Iodobenzoyl chloride (3.0 g, 11.3 mmol) in dry dichloromethane (120 ml) under argon. The

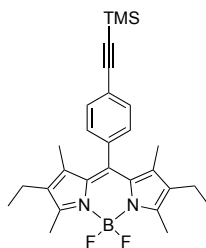


mixture was stirred at reflux (45 °C) for 20 h under argon. The solution was cooled down to room temperature. Triethylamine (5 ml, 35.9 mmol) was added dropwise to the stirred mixture. Then, boron trifluoride diethyl etherate (5 ml, 40.5 mmol) was added dropwise. The solution was stirred for 4 h at reflux (45°C). The mixture was washed with water (3x50 ml) and dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (Cy/AcOEt 0-5%) was performed to yield a red solid (590 mg, 10%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 2.52 (s, 6H), 2.30 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H), 1.32 (s, 6H), 0.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H).

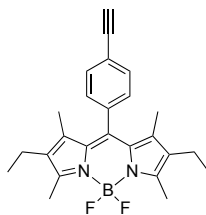
**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.1, 138.5, 138.2, 138.1, 135.4, 133.0, 130.5, 130.3, 94.5 (C<sub>q</sub>), 17.1 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 12.5 (CH<sub>3</sub>), 12.0 (CH<sub>3</sub>).

### Compound 23b<sup>[159]</sup>



**23a** (400 mg, 0.79 mmol), bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (55 mg, 0.08 mmol), and copper(I) iodide (30 mg, 0.16 mmol) were introduced under argon in a Schlenk flask. THF and Et<sub>3</sub>N were degassed with a stream of argon for 30 minutes. The solvents were added to the Schlenk flask. Trimethylsilylacetylene (TMSA) (0.15 ml, 1.03 mmol) was added slowly. The solution was stirred for 6 hours. The solvents were removed in vacuo. The solid was purified by flash chromatography, using Cy/AcOEt 0-5%, to yield a red solid (320 mg, 85%).

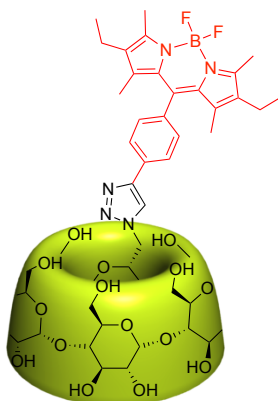
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.53 (s, 6H), 2.30 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H), 1.30 (s, 6H), 0.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H), 0.29 (s, 9H).

**Compound 23c**<sup>[159]</sup>

A solution of **23b** (320 mg, 0.67 mmol) and potassium carbonate (185 mg, 1.34 mmol) in methanol (5 ml) and tetrahydrofuran (5 ml) was stirred for 30 minutes. Then, dichloromethane (20 ml) was added to the mixture. The mixture was filtered on a silica plug and the solvents were evaporated under reduced pressure to yield a red powder (250 mg, 92%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.18 (s, 1H), 2.53 (s, 6H), 2.30 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.30 (s, 6H), 0.98 (t, *J* = 7.6 Hz, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.1 (C<sub>q</sub>), 139.0 (C<sub>q</sub>), 138.2 (C<sub>q</sub>), 136.5 (C<sub>q</sub>), 133.0 (C<sub>q</sub>), 132.8 (CH), 130.5 (C<sub>q</sub>), 128.5 (CH), 122.7, 83.0, 78.4 (C<sub>q</sub>), 17.1 (CH<sub>2</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 12.5 (CH<sub>3</sub>), 11.9 (CH<sub>3</sub>).

**Compound 23: CD-BODIPY-Et**<sup>[101]</sup>

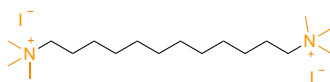
A solution of **23c** (73 mg, 0.18 mmol),  $\alpha$ -cyclodextrin-N<sub>3</sub> (**9**) (150 mg, 0.15 mmol), copper(II) sulfate pentahydrate (30 mg, 0.12 mmol), sodium ascorbate (47 mg, 0.24 mmol) and *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (21 mg, 25  $\mu$ l, 0.12 mmol) were introduced in a Schlenk flask under argon pressure. Dimethylformamide (15 ml), methanol (5 ml) and distilled water (15 ml) were stirred under argon for 30 minutes. Then, the solvents were added

into the Schlenk flask. The mixture was stirred at 40°C for 6 hours under argon pressure. The solvents were removed and the product was purified by flash chromatography using ACN/H<sub>2</sub>O 5-30% to yield **23** as a red solid (68 mg, 32%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.56 (s, 1H, triaz), 8.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.49 (t, *J* = 31.9 Hz, 20H), 5.11 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.82 (m, 8H), 3.80 (dd, *J* = 10.7, 5.5 Hz, 9H), 2.44 (s, 6H), 2.36 – 2.24 (q broad, 4H), 1.34 (s, 6H), 0.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H).

**HRMS (ESI):** *m/z calc* [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>61</sub>H<sub>86</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>29</sub>Na) 1424.5362; found 1424.5407.

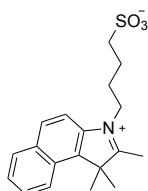
### Permethylated diaminododecane (**24**)



In a round bottom flask was added 1,12-diaminododecane (500 mg, 2.36 mmol, 1 eq), distilled acetonitrile (15 ml) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.72 g, 12.5 mmol, 5 eq). Iodomethane (1.6 ml, 25.0 mmol, 10 eq) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 18 hours. The product was purified by flash chromatography (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) to obtain a pale orange solid (1.30, 99 %)

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.71 – 3.55 (m, 4H), 3.43 (s, 18H), 2.11 (bs, 4H), 1.71 (bs, 8H), 1.67 (bs, 8H).

### Compound **28**<sup>[104a]</sup>



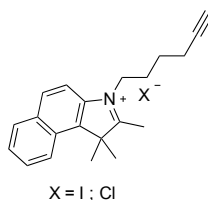
To a degassed solution of 1,1,2-trimethyl[1H]benz[e]indole (**27**) (1.0 g, 4.78 mmol, 1.0 eq) in 1,2-dichlorobenzene (5 ml) was added 1,4-butanediol (**28**) (0.74 ml, 7.17 mmol, 1.5 eq). The solution was heated at 120°C overnight. The solution was then allowed to return to room temperature. A dark precipitate was filtered, washed with acetone and dried under vacuum to yield a gray powder (1.4 g, 85%).

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.36 (d,  $J$  = 8.4, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 8.23 – 8.18 (m, 2H), 7.75 (m, 2H), 4.61 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.53 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.08 – 1.99 (m, 2H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.75 (s, 6H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  196.4 (C<sub>q</sub>), 138.6 (C<sub>q</sub>), 136.9 (C<sub>q</sub>), 133.0 (C<sub>q</sub>), 130.6 (CH), 129.7 (CH), 128.3 (CH), 127.2 (CH), 123.4 (CH), 113.5 (CH), 55.4 (C<sub>q</sub>), 50.1 (CH<sub>2</sub>), 47.5 (CH<sub>2</sub>), 26.2 (CH<sub>2</sub>), 22.1 (CH<sub>2</sub>), 21.6 (CH<sub>3</sub>), 13.6 (CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI):**  $m/z$  calc [C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>SH]<sup>+</sup> 346.15; found 346.15, [C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>SNa]<sup>+</sup> 368.13; found 368.13.

### Compound 33<sup>[106]</sup>

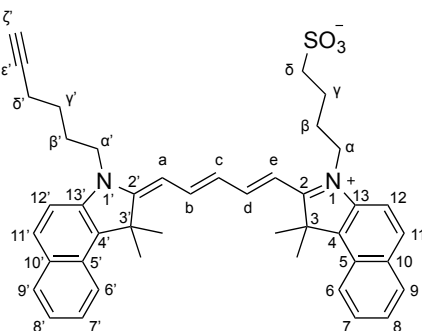


To a suspension of potassium iodide (1.72 g, 11.5 mmol, 3.0 eq) in acetonitrile (4 ml), 6-chlorohexyne (**32**) (0.7 ml, 5.73 mmol, 1.5 eq) was added and the resulting mixture was stirred at 50°C for 15 minutes. Then, 1,1,2-trimethyl[1H]benz[e]indole (**27**) (0.8 g, 3.82 mmol, 1.0 eq) and acetonitrile (3 ml) were added. The mixture was heated at reflux overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol (0-5%)) to yield a green solid (513 mg, 34-43%).

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.37 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.30 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 8.22 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.16 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 7.82-7.70 (m, 2H), 4.61 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.82 (t,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 2.28 (td,  $J$  = 7.0, 2.7 Hz, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 2H), 1.77 (s, 6H), 1.72 – 1.62 (m, 2H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  196.4 (C<sub>q</sub>), 138.5 (C<sub>q</sub>), 137.0 (C<sub>q</sub>), 133.0 (C<sub>q</sub>), 130.6 (CH), 129.7 (CH), 128.4 (CH), 127.2 (CH), 127.2 (C<sub>q</sub>), 123.4 (CH), 113.2 (CH), 83.9 (CH), 71.7 (CH), 55.5 (C<sub>q</sub>), 47.3 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 24.8 (CH<sub>2</sub>), 21.6 (CH<sub>3</sub>), 17.3 (CH<sub>2</sub>), 13.9 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N]<sup>+</sup> 290.1903; found 290.1904.

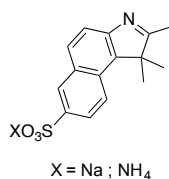
**Compound 26**<sup>[106]</sup>

A solution of benzindolium sulfonate (**29**) (82 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and 3-anilinoacrolein anil (**30**) (64 mg, 0.29 mmol, 1.2 eq) in acetic anhydride (1.5 ml) was heated at reflux under argon for 30 minutes. The solution was allowed to return to room temperature and then, a solution of benzindolium hexyne (**33**) (104 mg, 0.25 mmol, 1.1 eq) in anhydrous pyridine (1.3 ml) was added. The resulting solution was stirred at room temperature under argon for 4 days. The reaction mixture was precipitated with diethyl ether and the precipitate was filtered off, washed with diethyl ether and dried under reduced pressure. The solid was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol (0-7%)) to yield the petrol blue product (135 mg, 85%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.45 (td, *J* = 13.7, 4.7 Hz, 2H, H<sub>b/d</sub>), 8.25 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub> or H<sub>6'</sub>), 8.23 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H; H<sub>6</sub> or H<sub>6'</sub>), 8.10 – 8.02 (m, 4H, H<sub>9/9'</sub>, H<sub>11/11'</sub>), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>12</sub>), 7.74 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H<sub>12'</sub>), 7.67 (m, 2H, H<sub>7/7'</sub>), 7.50 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>8/8'</sub>), 6.65 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 6.47 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, H<sub>e</sub>), 6.38 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 4.25 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H, H<sub>a/a'</sub>), 2.82 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>ζ'</sub>), 2.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H<sub>δ</sub>), 2.27 (td, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2H, H<sub>δ'</sub>), 1.97 (s, 6H; -CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 6H; -CH<sub>3</sub>), 1.87 (m, 4H, H<sub>β/β'</sub>), 1.78 (m, 2H, H<sub>γ</sub>), 1.61 (quint, 2H, H<sub>γ'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 173.9, 173.2 (C<sub>2/2'</sub>), 153.1, 152.6 (C<sub>b/d</sub>), 139.7, 139.6 (C<sub>13/13'</sub>), 133.2, 132.9 (C<sub>4/4'</sub>), 131.3, 131.2 (C<sub>10/10'</sub>), 130.3, 130.2 (C<sub>11/11'</sub>), 129.9 (C<sub>9/9'</sub>), 127.6 (C<sub>7/7'</sub>), 127.6, 127.5 (C<sub>5/5'</sub>), 125.8 (C<sub>c</sub>), 124.8, 124.6 (C<sub>8/8'</sub>), 122.1 (C<sub>6/6'</sub>), 111.7 (C<sub>12</sub>), 111.5 (C<sub>12'</sub>), 103.4, 102.7 (C<sub>a/e</sub>), 84.0 (C<sub>ε'</sub>), 71.7 (C<sub>ζ'</sub>), 50.7 (C<sub>δ</sub>), 43.6, 42.9 (C<sub>a/a'</sub>), 26.8 (2xCH<sub>3</sub>), 26.7 (2xCH<sub>3</sub>), 26.3, 26.2 (C<sub>β/β'</sub>), 25.0 (C<sub>γ'</sub>), 22.4 (C<sub>γ</sub>), 17.4 (C<sub>δ'</sub>).

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [C<sub>43</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>SNa]<sup>+</sup> 693.3121; found 693.3108.

**UV-visible:** $\lambda_{\text{max abs}} = 694 \text{ nm}$  (dichloromethane) $\lambda_{\text{max abs}} = 680 \text{ nm}$  (water/acetonitrile (8:2)) $\varepsilon = 16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (in both solvents)**Fluorescence:** $\lambda_{\text{max em}} = 711 \text{ nm}$  (dichloromethane) $\lambda_{\text{max em}} = 698 \text{ nm}$  (water/acetonitrile (8:2))**Compound 35**<sup>[107a,b]</sup>

First step: In a round bottom flask, a suspension of 6-amino-1-naphthalen sulfonic acid (**36**) (4.0 g, 17.92 mmol, 1.0 eq) in hydrochloric acid 6M (40 ml) was mechanically stirred at 0°C in the dark. Then, a solution of sodium nitrite (3.7 g, 53.62 mmol, 3.0 eq) in distilled water (15 ml) was added dropwise by keeping the mixture between 0 - 5°C. Cold distilled water was added in small amount (5 ml) to keep the temperature below 5°C and reduce the viscosity. Finally, a solution of stannous chloride (16.2 g, 71.79 mmol, 4 eq) in hydrochloric acid 12M (20ml) was added dropwise to the mixture at 0 – 5°C. The mixture was mechanically stirred at 0 – 5°C for 2h and then the solution was allowed to return to room temperature overnight. The precipitate was filtered and washed with distilled water. The precipitate was then recrystallized in water to yield a pale pink powder (3.0 g). The hydrazine **37** obtained was directly used in the second step.

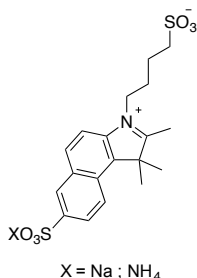
Second step: In a round bottom flask, a solution of hydrazine **37** (400 mg, 1.68 mmol, 1.0 eq) and methylbutanone (**38**) (0.54 ml, 5.04 mmol, 3 eq) in glacial acetic acid (4 ml) was refluxed at 135°C overnight. Then solvent was removed under reduced pressure and the product purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol (0-10%)) to yield a pale brown product (benzindole-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, **35**) (58% two steps).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.23 (d,  $J = 1.7 \text{ Hz}$ , 1H), 8.08 (d,  $J = 8.7 \text{ Hz}$ , 1H), 7.96 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 1H), 7.79 (dd,  $J = 8.7, 1.7 \text{ Hz}$ , 1H), 7.70 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 1H), 2.32 (s, 3H), 1.47 (s, 6H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  189.75 ( $\text{C}_q$ ), 151.05 ( $\text{C}_q$ ), 143.97 ( $\text{C}_q$ ), 138.75 ( $\text{C}_q$ ), 130.74 ( $\text{C}_q$ ), 129.27 ( $\text{C}_q$ ), 127.94 (CH), 125.55 (CH), 124.64 (CH), 122.2 (CH), 119.84 (CH), 22.07 ( $2\times\text{CH}_3$ ), 14.96 ( $\text{CH}_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc [ $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{S}$ ] $^-$  288.0700; found 288.0693.

### Compound 39<sup>[105]</sup>



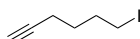
To a degassed solution of benzindole- $\text{SO}_3^-$  (**35**) (150 mg, 0.49 mmol, 1.0 eq) in 1,2-dichlorobenzene (2.0 ml) was added 1,4-butanedisulfone (**28**) (0.10 ml, 0.98 mmol, 2.0 eq). The solution was heated at  $120^\circ\text{C}$  under argon overnight. Then, the solution was allowed to return to room temperature. A dark purple precipitate was filtered and washed with toluene. The precipitate was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol (0-30%)) to yield a purple solid (benzindolium- $(\text{SO}_3^-)_2$  (**39**)) (131 mg, 63%).

**$^1\text{H}$  NMR** (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.40 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.34 (t,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 8.19 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.95 (dd,  $J = 8.8, 1.7$  Hz, 1H), 4.59 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 2.93 (s, 3H), 2.55 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 2.06 – 1.98 (m, 1H), 1.83 – 1.76 (quint,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 1.74 (s, 6H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  196.38 ( $\text{C}_q$ ), 146.55 ( $\text{C}_q$ ), 139.02 ( $\text{C}_q$ ), 136.78 ( $\text{C}_q$ ), 132.46 ( $\text{C}_q$ ), 131.31 (CH), 126.94 ( $\text{C}_q$ ), 126.33 (CH), 125.65 (CH), 123.18 (CH), 113.79 (CH), 55.43 ( $\text{C}_q$ ), 50.17 (CH), 47.57 (CH), 26.24 ( $\text{CH}_2$ ), 22.17 ( $\text{CH}_2$ ), 21.55 ( $2\times\text{CH}_3$ ), 13.66 ( $\text{CH}_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc [ $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_6\text{S}_2$ ] $^-$  424.0894; found 424.0897.

### Compound 42<sup>[160]</sup>

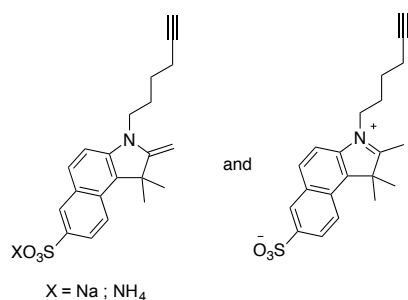


To a stirred solution of sodium iodide (11.7 g, 78 mmol, 6 eq) in acetone (60 ml) was added dropwise 6-chlorohexyne (**32**) (1.58 ml, 13 mmol, 1 eq). The mixture was refluxed overnight.

The solvent was then evaporated and distilled water (60 ml) was added. The aqueous layer was extracted with diethylether (3x60 ml). The combined organics layers were washed with brine (150 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to give a pale yellow oil (2.66 g, 98%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.23 (td, *J* = 7.0, 2.6 Hz, 2H), 2.03-1.89 (m, 3H), 1.70-1.57 (m, 2H).

### Compound 40b



To a degassed solution of benzindole-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (**35**) (100 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq) in 1,2-dichlorobenzene and methanol (3:1, 4.0 ml) was added iodohexyne (**42**) (0.22 ml, 1.00 mmol, 3.0 eq). The solution was heated under microwave at 120°C for 2h, 130°C for 2h and 140°C for 2h. Then, the solution was allowed to return to room temperature. The mixture was poured in toluene (20 ml) and filtered. The precipitate was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol (0-30%)) to yield a dark solid (**40b**) (61 mg, 56%).

#### Enamine:

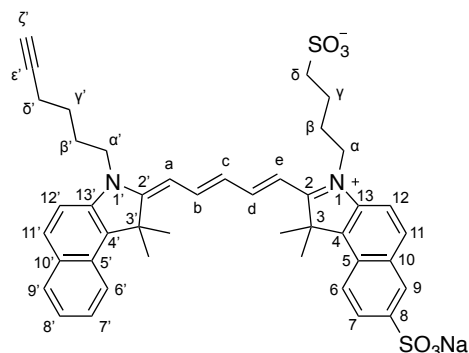
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.01 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.63 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.21 – 2.16 (m, 2H), 1.71 – 1.61 (m, 2H), 1.55 (s, 6H), 1.54 – 1.47 (m, 2H).

#### Imine :

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.41 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.35 (dd, *J* = 10.5, 8.8 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 1H), 4.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.93 (s, 3H), 2.82 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.28 (td, *J* = 7.0, 2.6 Hz, 2H), 1.98 (broad q, 2H), 1.76 (s, 6H), 1.67 (m, 2H).

**MS (ESI):** *m/z* calc [C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>S]<sup>-</sup> 368.13; found 368.25.



**Compound 46**<sup>[106]</sup>

A solution of benzindolium hexyne (**33**) (47 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq) and 3-anilinoacrolein anil (**30**) (30 mg, 0.13 mmol, 1.2 eq) in acetic anhydride (1.0 ml) was heated at reflux under argon for 1h. The solution was allowed to return to room temperature and then, benzindolium-(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub> (**39**) (53 mg, 0.12 mmol, 1.1 eq), acetic anhydride (1 ml) and anhydrous pyridine (1.0 ml) were added. The resulting solution was stirred at 50°C under argon for 4 hours and then at room temperature for 3 days. The reaction mixture was precipitated with diethyl ether and the precipitate was filtered off, washed with diethyl ether and dried under reduced pressure. The solid was purified by flash chromatography (dichloromethane/methanol (0-30%)) to yield the petrol blue product **46** (22 mg, 25%).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.44 (td, *J* = 12.5, 4.1 Hz, 2H, H<sub>b/d</sub>), 8.26 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 8.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H<sub>11</sub>), 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>9'</sub> or H<sub>11'</sub>), 8.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H; H<sub>9'</sub> or H<sub>11'</sub>), 7.86 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H<sub>12</sub>), 7.74 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H<sub>12'</sub>), 7.67 (ddd, *J* = 8.8, 6.7, 1.3 Hz, 1H, H<sub>7'</sub>), 7.51 (broad ddd, 1H, H<sub>8'</sub>), 6.65 (t, *J* = 12.5 Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 6.45 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, H<sub>a</sub> or H<sub>e</sub>), 6.38 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H; H<sub>a</sub> or H<sub>e</sub>), 4.28 – 4.20 (m, 4H, H<sub>α/α'</sub>), 2.81 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H<sub>ζ'</sub>), 2.54 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>δ</sub>), 2.26 (td, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2H, H<sub>δ'</sub>), 1.97 (s, 6H), 1.95 (s, 6H), 1.89 – 1.82 (m, 4H, H<sub>β/β'</sub>), 1.82 – 1.75 (m, 2H, H<sub>γ</sub>), 1.61 (m, 2H, H<sub>γ'</sub>).

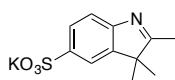
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 173.87, 173.41, 153.11, 152.74 (C<sub>b/d</sub>), 144.35, 140.15, 139.78, 133.31, 133.07, 131.25, 131.04, 130.53, 130.31, 129.94, 127.76, 127.67, 127.32, 126.04, 125.95 (C<sub>c</sub>), 125.78, 124.74, 122.17, 121.86, 112.06, 111.56, 103.46, 102.83, 84.13, 79.22, 79.00, 78.78, 71.75 (C<sub>ζ'</sub>), 50.73, 50.67, 50.61 (C<sub>δ</sub>), 48.65, 43.71, 43.00 (C<sub>α/α'</sub>), 40.06, 30.74, 26.92 (2xCH<sub>3</sub>), 26.77 (2xCH<sub>3</sub>), 26.34, 26.23 (C<sub>β/β'</sub>), 25.08 (C<sub>γ'</sub>), 22.50 (C<sub>γ</sub>), 21.11, 17.47 (C<sub>δ'</sub>).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc  $[C_{43}H_{45}N_2O_6S_2]^-$  749.2725; found 749.2706.

**UV-visible:**  $\lambda_{\max \text{ abs}}$  = 680 nm (water)

**Fluorescence:**  $\lambda_{\max \text{ em}}$  = 694 nm (water)

**Compound 49**<sup>[107c]</sup>



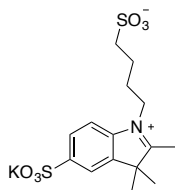
To a solution of hydrazinobenzenesulfonic acid (**48**) (5.0 g, 26.6 mmol, 1 eq) in acetic acid (15.0 mL) was added methylbutanone (**38**) (4.6 g, 53.2 mmol, 2 eq). The solution was stirred at 135°C for 4h. Solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in methanol (37 mL) and added dropwise to a stirred solution of potassium hydroxide (1.5 g) in 2-propanol (37 mL). The precipitate was filtered and washed with diethyl ether to yield a beige powder (6.11 g, 83%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.62 (dd,  $J$  = 1.7, 0.6 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.33 (dd,  $J$  = 7.9, 0.6 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 1.24 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  188.74, 153.53, 145.23, 125.05, 119.11, 118.07, 61.97, 53.20, 25.45, 22.48, 15.11.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc  $[C_{11}H_{12}NO_3S]^-$  238.0543; found 238.0545.

**Compound 50**<sup>[104a]</sup>



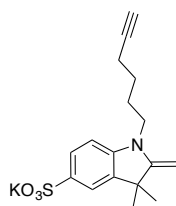
In a sealed vial, butanesultone (**28**) (0.60 mL, 5.40 mmol, 3 eq) was added to a solution of 2,3,3-trimethylindolenium-5-sulfonate (**49**) (500 mg, 1.80 mmol, 1 eq) in acetonitrile (5 mL). The solution was degassed with argon and then stirred and heated under microwaves irradiation at 150°C for 3x1h. Solvent was removed and the product purified by flash chromatography (acetonitrile/water (0-15%)) to yield a pink powder (451 mg, 61%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.01 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 4.46 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.84 (s, 3H), 2.55 – 2.51 (m, 2H), 2.01 – 1.89 (m, 2H), 1.81 – 1.70 (m, 2H), 1.54 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 199.93, 148.57, 143.48, 128.54, 122.32, 116.66, 56.22, 51.13, 30.35, 27.35, 26.30, 25.76, 23.77, 23.24, 22.65.

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 374.0738; found 374.0725.

## Compound 51



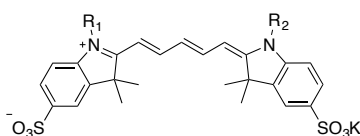
In a sealed vial, iodohexyne (**42**) (1.5 g, 7.2 mmol, 4 eq) was added to a solution of 2,3,3-trimethylindolenium-5-sulfonate (**49**) (500 mg, 1.80 mmol, 1 eq) in acetonitrile (8 mL). The solution was degassed with argon and then stirred and heated at 120°C for 1h. Solvent was removed and the product purified by flash chromatography (acetonitrile/water (0-10%)) to yield a beige powder (180 mg, 28%).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.41 – 7.33 (m, 2H), 6.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 19.3, 2H), 3.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H), 2.20 (dt, *J* = 7.0, 2.9 Hz, 2H), 1.74 – 1.59 (m, 2H), 1.54 – 1.41 (m, 2H), 1.27 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 162.23, 148.91, 138.51, 136.06, 127.43, 120.94, 119.55, 105.19, 84.60, 69.86, 64.98, 44.94, 42.58, 30.35, 27.12, 26.23, 18.86.

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>S]<sup>-</sup> 318.1169; found 318.1163.

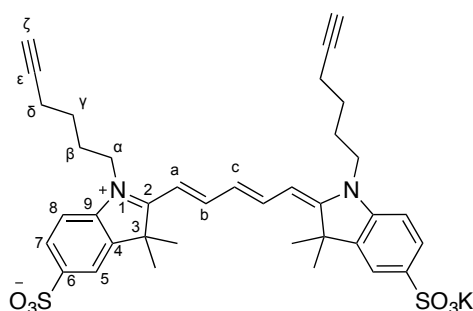
## Cyanine 5 (**60**, **61**, **62**)<sup>[106]</sup>



To a solution of 3-anilino-acroleine anil (**30**) (28 mg, 0.13 mmol, 1.05 eq) in a mixture of acetic acid and acetic anhydride (1.5 mL, 1:1) was added 2,3,3-trimethyl-5-sulfo-1-(4-sulfo-

butyl)-3*H*-indolium (**50**) (50 mg, 0.12 mmol, 1 eq). The solution was refluxed at 140°C for 4h30 and then allowed to return to room temperature. To this solution, 2,3,3-trimethyl-5-sulfo-1-hexyne-3*H*-indolium (**51**) (42 mg, 0.13 mmol, 1.1 eq) and triethylamine (0.75 mL) were added. The mixture was stirred at room temperature overnight. Solvents were removed under reduced pressure and products were purified by flash chromatography (acetonitrile/water (0-15%)) to yield three cyanines 5 (**60**, **61** and **62**).

**Compound 60** (7.9 mg ; 9%)



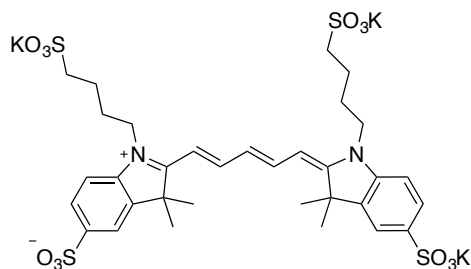
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.36 (t,  $J = 13.5$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7.81 (d,  $J = 1.6$  Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 7.64 (dd,  $J = 8.2, 1.6$  Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 7.34 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H<sub>8</sub>), 6.58 (t,  $J = 12.4$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 6.34 (d,  $J = 13.5$  Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 4.12 (broad t,  $J = 7.4$  Hz, 4H, H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.79 (t,  $J = 2.6$  Hz, 2H, H <sub>$\zeta$</sub> ), 2.24 (td,  $J = 7.0, 2.6$  Hz, 4H, H <sub>$\delta$</sub> ), 1.83 – 1.74 (m, 4H, H <sub>$\beta$</sub> ), 1.69 (s, 12H, 4xCH<sub>3</sub>), 1.60 – 1.50 (m, 4H, H <sub>$\gamma$</sub> ).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  173.10 (C<sub>2</sub>), 154.33 (C<sub>b</sub>), 145.25 (C<sub>9</sub>), 141.99 (C<sub>6</sub>), 140.52 (C<sub>4</sub>), 126.10 (C<sub>c</sub>), 125.91 (C<sub>7</sub>), 119.96 (C<sub>5</sub>), 110.18 (C<sub>8</sub>), 103.54 (C<sub>a</sub>), 84.08 (C <sub>$\epsilon$</sub> ), 71.67 (C <sub>$\zeta$</sub> ), 48.95 (C<sub>3</sub>), 43.05 (C <sub>$\alpha$</sub> ), 27.14 (4xCH<sub>3</sub>), 26.06 (C <sub>$\beta$</sub> ), 25.06 (C <sub>$\gamma$</sub> ), 17.40 (C <sub>$\delta$</sub> ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc [C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 673.2412; found 673.2411.

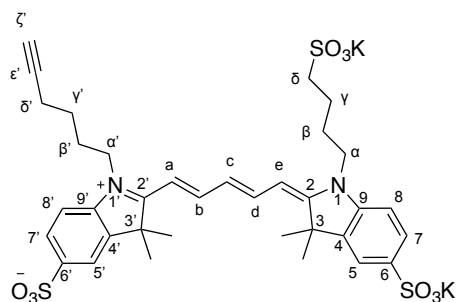
**UV-visible:**  $\lambda_{\max \text{ abs}}$  = 648 nm (water)

**Fluorescence:**  $\lambda_{\max \text{ em}}$  = 665 nm (water)

**Compound 61** (16.5 mg ; 15%)

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.01 (t,  $J = 13.4$  Hz, 2H), 7.85 (s, 2H), 7.82 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.37 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.58 (t,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 6.27 (d,  $J = 13.4$  Hz, 2H), 4.14 (d,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 3.00 (t,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 2.02 – 1.94 (m, 4H), 1.91 (d,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 1.65 (s, 12H).

**MS (ESI):**  $m/z$  calc  $[\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_4]^-$  829.12; found 829.02.

**Compound 62** (16.1 mg ; 16%)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.35 (td,  $J = 12.5, 3.7$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{b/d}}$ ), 7.81 (dd,  $J = 4.1, 1.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{5/5'}}$ ), 7.64 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{7/7'}}$ ), 7.35 (dd,  $J = 15.9, 8.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{8/8'}}$ ), 6.60 (t,  $J = 12.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{c}}$ ), 6.37 (dd,  $J = 33.6, 12.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{a/e}}$ ), 4.11 (broad s, 4H,  $\text{H}_{\text{a/a'}}$ ), 2.80 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{z}}$ ), 2.53 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{d}}$ ), 2.24 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{d}}$ ), 1.80 – 1.73 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{b/b'}}$ ), 1.69 (s, 12H,  $4 \times \text{CH}_3$ ), 1.62 – 1.55 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{y}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  173.24, 172.63 ( $\text{C}_{\text{2,2'}}$ ), 154.44, 153.97 ( $\text{C}_{\text{b/d}}$ ), 145.21, 145.01 ( $\text{C}_{\text{9/9'}}$ ), 142.02, 141.88 ( $\text{C}_{\text{6/6'}}$ ), 140.57, 140.40 ( $\text{C}_{\text{4/4'}}$ ), 126.06 ( $\text{C}_{\text{7/7'}}$ ), 126.04 ( $\text{C}_{\text{c}}$ ), 119.87 ( $\text{C}_{\text{5/5'}}$ ), 110.33, 109.96 ( $\text{C}_{\text{8/8'}}$ ), 103.89, 103.26 ( $\text{C}_{\text{a/e}}$ ), 84.01 ( $\text{C}_{\text{e}}$ ), 71.65 ( $\text{C}_{\text{z}}$ ), 50.53 ( $\text{C}_{\text{d}}$ ), 48.92, 48.78 ( $\text{C}_{\text{3/3'}}$ ), 43.57 ( $\text{C}_{\text{a/a'}}$ ), 27.15, 27.06 ( $4 \times \text{CH}_3$ ), 25.94, 25.89 ( $\text{C}_{\text{b/b'}}$ ), 25.01 ( $\text{C}_{\text{y}}$ ), 22.40 ( $\text{C}_{\text{y}}$ ), 17.35 ( $\text{C}_{\text{d}}$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc  $[\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_3\text{K}]^-$  767.1385; found 767.1507.

**UV-visible:**

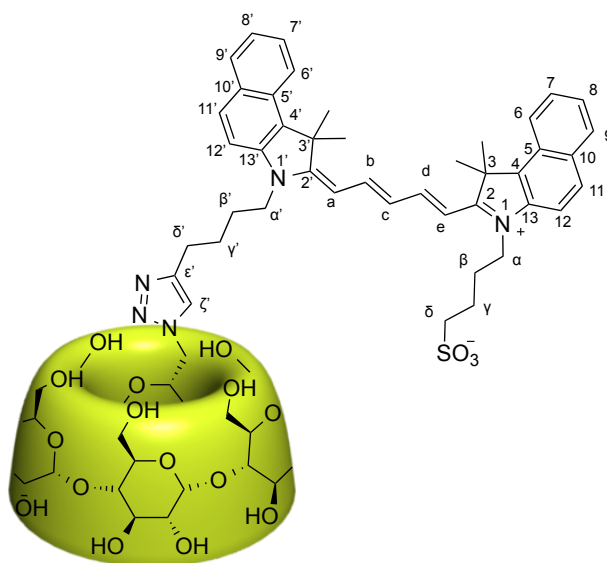
$\lambda_{\text{max abs}} = 650 \text{ nm}$  (methanol);  $\epsilon$  (methanol) =  $76 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\lambda_{\text{max abs}} = 648 \text{ nm}$  (water);  $\epsilon$  (water) =  $89 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**Fluorescence:**

$\lambda_{\text{max em}} = 668 \text{ nm}$  (methanol)

$\lambda_{\text{max em}} = 664 \text{ nm}$  (water)

**Compound 63**<sup>[101]</sup>

Monoazide  $\alpha$ -cyclodextrin (**9**) (54 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq), **26** (40 mg, 0.06 mmol, 1.1 eq), copper(II) sulfate pentahydrate (11 mg, 0.04 mmol, 0.8 eq), sodium ascorbate (17 mg, 0.09 mmol, 1.6 eq), and PMDETA (9  $\mu\text{L}$ , 0.04 mmol, 0.8 eq) were stirred under argon in a Schlenk flask. The degassed solution of dimethylformamide (1.5 ml), distilled water (1.5 ml) and methanol (1 ml) was then added in the Schlenk flask. The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvents were removed under reduced pressure and the product purified by flash chromatography (acetonitrile/water (0-30%)) to yield a blue product (70 mg, 77%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.45 (td,  $J = 13.7, 4.7 \text{ Hz}$ , 2H, H<sub>b/d</sub>), 8.27 (d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ , 1H, H<sub>6</sub> or H<sub>6'</sub>), 8.25 (d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ , 1H; H<sub>6</sub> or H<sub>6'</sub>), 8.13 – 8.02 (m, 4H, H<sub>9/9'/11/11'</sub>), 7.79 (d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , 1H, H<sub>12</sub>), 7.77 (s, 1H, H<sub>7'</sub>), 7.73 (d,  $J = 8.9 \text{ Hz}$ , 1H, H<sub>12'</sub>), 7.68 (m, 2H, H<sub>7/7'</sub>), 7.51 (m, 2H, H<sub>8/8'</sub>), 6.67 (t,  $J = 12.1 \text{ Hz}$ , 1H, H<sub>c</sub>), 6.44 (d,  $J = 13.7 \text{ Hz}$ , 1H, H<sub>e</sub>), 6.39 (d,  $J = 13.7 \text{ Hz}$ , 1H, H<sub>a</sub>), 5.66-5.38 (m, 12H, OH CD), 5.02 (s, 1H, H<sup>1</sup>), 4.88-4.74 (m, 5H, H<sup>1</sup>), 4.60-4.46 (m,

8H, CD), 4.44 (t, 1H, CD), 4.29-4.20 (s broad, 4H,  $H_{\omega/\alpha'}$ ), 3.99 (m, 1H,  $H^5$ ), 3.84-3.72 (m, 12H, CD), 3.70-3.54 (m, 14H, CD), 2.74-2.66 (s broad, 2H,  $H_{\delta'}$ ), 2.55 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $H_{\delta}$ ), 1.98 (s, 6H,  $-CH_3$ ), 1.97 (s, 6H,  $-CH_3$ ), 1.90-1.74 (m, 8H,  $H_{\gamma/\gamma'/\beta/\beta'}$ ).

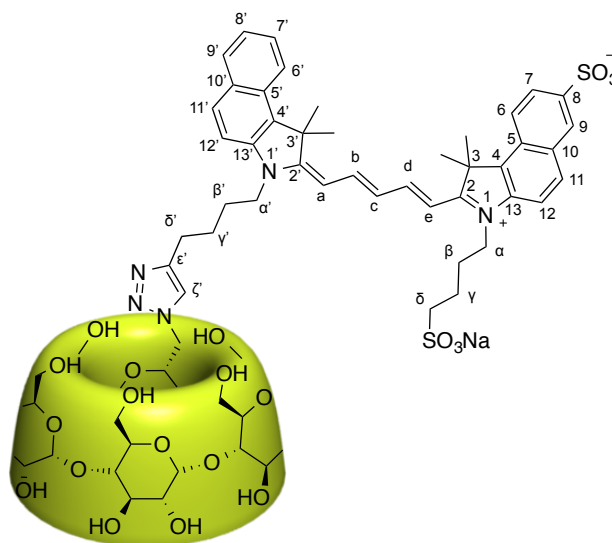
$^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  173.82, 173.36, 153.00, 152.71, 146.18, 139.74, 139.70, 133.24, 133.03, 131.32, 131.22, 130.32, 129.93, 127.69, 127.63, 127.58, 125.88, 124.77, 124.68, 123.72, 122.13, 111.76, 111.56, 103.28, 102.78, 102.04, 101.95, 101.69, 82.95, 82.29, 82.06, 73.30, 73.25, 73.06, 72.70, 72.30, 72.19, 72.10, 72.03, 71.94, 71.75, 69.78, 69.08, 63.02, 59.96, 59.65, 50.74, 50.63, 50.61, 49.91, 43.61, 43.30, 40.06, 26.87, 26.81, 26.24, 26.04, 24.66, 23.75, 22.43.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc  $[C_{79}H_{105}N_5SO_{32}Na]^+$  1690.6356; found 1690.6271.

**UV-visible:**  $\lambda_{max\ abs} = 680$  nm (water/acetonitrile (8:2))

**Fluorescence:**  $\lambda_{max\ em} = 698$  nm (water/acetonitrile (8:2))

### Compound **64**<sup>[101]</sup>



Monoazide  $\alpha$ -cyclodextrin (**9**) (28 mg, 0.03 mmol, 1.0 eq), **46** (21 mg, 0.03 mmol, 1.0 eq), copper(II) sulfate pentahydrate (4.3 mg, 0.02 mmol, 0.6 eq), sodium ascorbate (6.7 mg, 0.03 mmol, 1.2 eq), and PMDETA (3.6  $\mu$ L, 0.02 mmol, 0.6 eq) were stirred under argon in a Schlenk flask. The degassed solution of dimethylformamide (1.25 ml) and distilled water (1.25 ml) was then added in the Schlenk flask. The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvents were removed under reduced pressure and the product purified by flash chromatography (acetonitrile/water (0-30%)) to yield a blue product **64** (30 mg, 60%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.43 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>b/d</sub>), 8.26 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.25 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 8.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>11</sub>), 8.06 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>9'/11'</sub>), 7.86 (dd, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>12</sub>), 7.76 (s, 1H, H<sub>5'</sub>), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>12'</sub>), 7.67 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>7'</sub>), 7.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sub>8'</sub>), 6.67 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 6.45 (d, *J* = 13.7, 1H, H<sub>a</sub> or H<sub>e</sub>), 6.38 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H; H<sub>a</sub> or H<sub>e</sub>), 5.67 – 5.35 (m, 12H, CD), 5.01 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 4.91 – 4.49 (m, 6H, CD), 4.46 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.23 (s broad, 4H, H<sub>ω/α'</sub>), 3.98 (s, 1H, H<sup>5</sup>), 3.85 – 3.54 (m, 26H, CD), 3.17 (m, 3H), 2.70 (s broad, 2H, H<sub>δ'</sub>), 2.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>δ</sub>), 1.96 (s, 6H, -CH<sub>3</sub>(3')), 1.95 (s, 6H, -CH<sub>3</sub>(3)), 1.80 (m, 8H, H<sub>γ/γ'/β/β'</sub>).

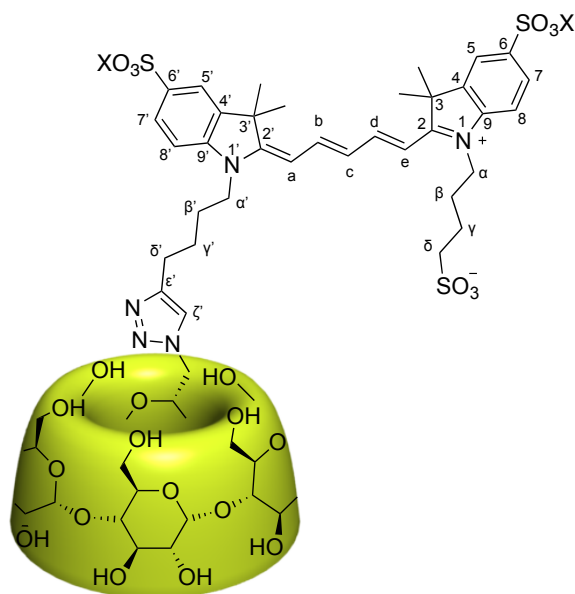
**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 173.78, 173.57, 171.91, 144.24, 140.24, 139.79, 133.20, 131.30, 131.08, 130.52, 130.38, 130.00, 127.80, 127.69, 127.39, 126.08, 126.02, 125.79, 124.81, 123.82, 122.20, 121.92, 112.10, 111.61, 102.94, 102.11, 102.02, 101.74, 83.05, 82.34, 82.10, 73.31, 73.11, 72.77, 72.37, 72.25, 72.18, 72.14, 72.07, 71.99, 69.89, 60.03, 50.74, 50.66, 43.72, 40.06, 31.39, 29.11, 26.96, 26.92, 26.83, 26.27, 26.09, 24.73, 22.49.

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [C<sub>79</sub>H<sub>104</sub>N<sub>5</sub>O<sub>35</sub>S<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 1746.5959; found 1746.6028.

**UV-visible:** λ<sub>max abs</sub> = 681 nm (water)

**Fluorescence:** λ<sub>max em</sub> = 698 nm (water)



**Compound 65**<sup>[101]</sup>

Monoazide  $\alpha$ -cyclodextrin (**9**) (22 mg, 0.022 mmol, 1.1 eq), Cyanine5-(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>3</sub> (**62**) (16 mg, 0.020 mmol, 1.0 eq), copper(II) sulfate pentahydrate (3.0 mg, 0.012 mmol, 0.6 eq), sodium ascorbate (4.7 mg, 0.024 mmol, 1.2 eq), and PMDETA (2.5  $\mu$ L, 0.012 mmol, 0.6 eq) were stirred under argon in a Schlenk flask. The degassed solution of distilled water (1.5 ml) was then added in the Schlenk flask. The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the product purified by flash chromatography (acetonitrile/water (0-30%)) to yield a blue product (33 mg, 92%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.39 – 8.30 (m, 2H, H<sub>b/d</sub>), 7.80 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 2H, H<sub>5/5'</sub>), 7.74 (s, 1H, H <sub>$\zeta$</sub> ), 7.63 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, H<sub>7/7'</sub>), 7.33 (dd,  $J$  = 32.0, 8.1 Hz, 2H, H<sub>8/8'</sub>), 6.61 (t,  $J$  = 12.2 Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 6.36 (dd,  $J$  = 32.0, 13.5 Hz, 2H, H<sub>a/e</sub>), 5.65 – 5.35 (m, 12H, CD), 5.02 (s, 1H, H<sup>1</sup>), 4.93 – 4.35 (m, 14H), 4.09 (broad s, 4H, H <sub>$\alpha/\alpha'$</sub> ), 3.97 (broad s, 1H, H<sup>5</sup>), 3.87 – 3.52 (m, 36H, CD), 2.67 (broad s, 2H, H <sub>$\delta$</sub> ), 2.61 (m, 2H, H <sub>$\delta$</sub> ), 1.81 – 1.70 (m, 6H), 1.69 (s, 12H, 4xCH<sub>3</sub>(3/3')).

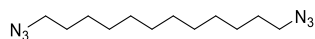
**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  173.44, 173.14, 172.64, 154.53 (C<sub>b/d</sub>), 149.92, 142.01, 141.85, 140.44, 140.44, 129.49, 129.49, 126.52 (C<sub>7/7'</sub>), 126.04 (C<sub>c</sub>), 123.69 (C <sub>$\zeta$</sub> ), 119.87 (C<sub>5/5'</sub>), 110.72, 110.44 (C<sub>8/8'</sub>), 104.24, 103.79 (C<sub>a/e</sub>), 112.94, 101.94, 101.67 (C<sup>1</sup><sub>triazol</sub>), 94.71, 94.57, 82.03, 76.46, 76.32, 73.23, 73.07, 72.08, 71.92, 70.04 (C<sup>5</sup>), 59.92, 50.55 (C <sub>$\delta$</sub> ), 48.91, 48.79, 43.53 (C <sub>$\alpha/\alpha'$</sub> ), 40.06, 27.14, 27.06, 25.97, 25.87 (C <sub>$\delta$</sub> ), 24.60, 22.41.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc [C<sub>71</sub>H<sub>99</sub>N<sub>5</sub>O<sub>38</sub>S<sub>3</sub>]<sup>2-</sup> 862.7571; found 862.7600.

**UV-visible:**  $\lambda_{\max \text{ abs}} = 649 \text{ nm (water)}$ ;  $\epsilon \text{ (water)} = 112000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**Fluorescence:**  $\lambda_{\max \text{ em}} = 664 \text{ nm (water)}$

### 1,12-diazidododecane (66)<sup>[161]</sup>



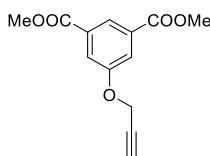
Under argon, a solution of 1,12-dibromododecane (0.5 g, 1.5 mmol) and sodium azide (0.4 g, 6.2 mmol) in dry dimethylformamide (5 ml) was stirred at 80 °C for 24 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure and water (50 ml) was added. The product was extracted with dichloromethane (150 ml). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. Evaporation of the filtrate yielded a brown oil (380 mg, 99%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.26 (t,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , 4H), 1.65 – 1.55 (q,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , 4H), 1.42 – 1.25 (m, 16H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  51.65, 29.63, 29.60, 29.29, 28.99, 26.87.

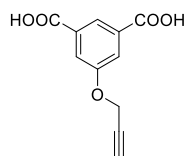
### Compound 67<sup>[110]</sup>

#### Dimethyl 5-(propargyloxy)isophthalate



In a round bottom flask was added dimethyl-5-hydroxyisophthalate (300 mg, 1.43 mmol), 3 mL of anhydrous DMF and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (395 mg, 2.86 mmol). Propargylbromide (80% in toluene) (293  $\mu$ L, 2.14 mmol) was added drop-wise. The reaction was stirred at room temperature for 15 hours under nitrogen. It was poured in 10 mL of water. A white precipitate was formed. It was filtered and washed with water to obtain the product as a white solid (290 mg, 82%).

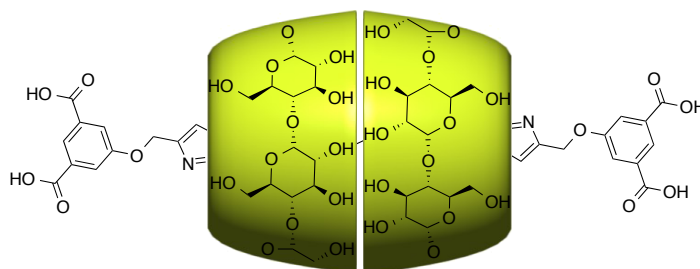
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.33 (t,  $J = 1.4 \text{ Hz}$ , 1H), 7.83 (d,  $J = 1.4 \text{ Hz}$ , 2H), 4.78 (d,  $J = 2.4 \text{ Hz}$ , 2H), 3.94 (s, 6H), 2.55 (t,  $J = 2.4 \text{ Hz}$ , 1H).

**5-(propargyloxy)isophthalic acid (67)**<sup>[162]</sup>

In a round bottom flask was added dimethyl 5-(propargyloxy)isophthalate (290 mg, 1.16 mmol), 2 mL of THF, 2 mL of water, 2 mL of MeOH and NaOH (285 mg, 5.82 mmol). The reaction was stirred at 70°C for 3 hours. THF and MeOH were evaporated from the mixture. 10 mL of HCl 1M was added. The white precipitate was filtered and washed with water to obtain the product (240 mg, 94%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.33 (s, 2H), 8.11 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 4.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.63 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.29, 157.32, 132.64, 122.91, 119.62, 78.94, 78.67, 55.98.

**[3]Rot-CD (68)**

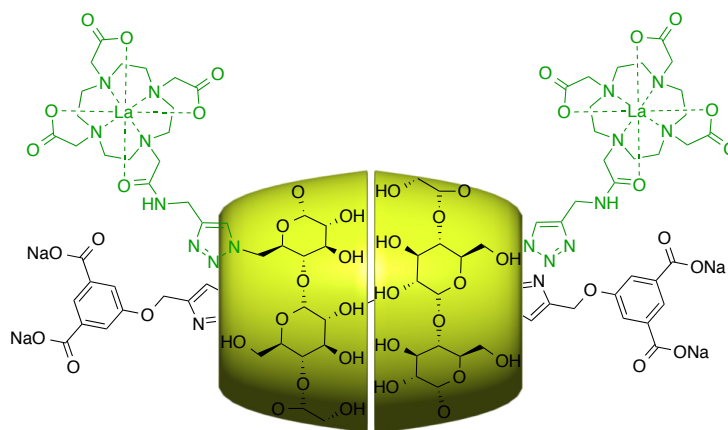
A mixture of 1,12-diazidododecane (**66**) (30 mg, 0.12 mmol) and α-CD (**1**) (231 mg, 0.24 mmol) in distilled water (2.5 mL) was stirred at room temperature for 15 min under inert atmosphere. Then, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (98 mg, 0.71 mmol), 5-(propargyloxy)isophthalate (**67**) (54 mg, 0.26 mmol), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (18 mg, 0.07 mmol), PMDETA (25 μL, 0.12 mmol) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 15 hours at room temperature under inert atmosphere. HCl 1M was poured in the reaction. The precipitate was filtered and washed with water and acetone. MeOH was added to dissolve the solid and then water was added. The precipitate was filtered again and washed with water and acetone. The last procedure was repeated 2 times to yield a white powder (47 mg, 30%).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.33 (s, 4H), 8.11 (s, 2H), 8.09 (s, 2H), 7.72 (s, 4H), 5.78 (s, 12H), 5.55 (s, 12H), 5.18 (d, *J* = 4.6 Hz, 4H), 4.77 (s, 12H), 4.45 (s, 12H), 4.25 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.76 (m, 12H), 3.62 (t, *J* = 9.5 Hz, 24H), 3.49 (d, *J* = 10.8 Hz, 12H), 3.43 (m, 12H), 3.24 (t, *J* = 7.7 Hz, 12H), 3.17 (s, 6H), 1.85 (d, *J* = 10.2 Hz, 4H), 1.49 – 1.32 (m, 16H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 206.49, 166.36, 158.34, 141.72, 132.64, 123.70, 122.58, 119.07, 102.15, 81.60, 73.38, 72.20, 71.99, 61.79, 59.39, 49.90, 48.60, 31.17, 30.70, 30.67, 30.33, 27.44

**HRMS (ESI):** *m/z* calc [M-2H]<sup>2-</sup> (C<sub>106</sub>H<sub>158</sub>N<sub>6</sub>O<sub>70</sub>) 1317.4500; found 1317.4431.

### RotLa<sub>2</sub> (69)



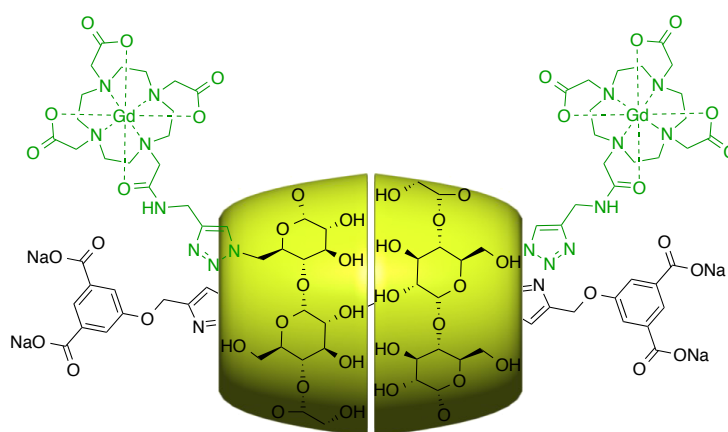
A solution of diazidododecane (**66**) (10 mg, 0.04 mmol) and CDLa (**18**) (125 mg, 0.08 mmol) in distilled water (1.5 ml) was stirred under argon until the solution became cloudy (15 minutes). Then, 5-(propargyloxy)isophthalic acid (**67**) (18 mg, 0.09 mmol), sodium bicarbonate (13 mg, 0.16 mmol), copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.024 mmol), *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (7 mg, 8 μl, 0.04 mmol) and sodium ascorbate (10 mg, 0.05 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature under argon for 24 hours. Water was removed. The solid was purified by size-exclusion chromatography in water to yield the rotaxane **69** (61 mg, 39%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.26 (s, 2H, triaz-cap/axis), 7.95 (s, 2H, H<sub>para</sub> arom. cap), 7.88 (s, 2H, triaz-CD), 7.63 (s, 4H, H<sub>ortho</sub> arom. cap), 5.39 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-cap), 5.19 (s, 2H), 5.10 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H anomeric), 5.09 – 5.00 (m, 10H, CD anomeric), 4.60 – 4.29 (m, 10H), 4.01 – 3.46 (m, 72H), 3.33 – 2.20 (m, 48H), 2.10 – 1.80 (s broad, 4H, axis), 1.65 – 1.30 (s broad, 16H, -CH<sub>2</sub>- axis).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  175.27, 143.57, 143.08, 126.16, 124.78, 102.63, 102.53, 102.48, 102.44, 102.40, 102.19, 80.94, 80.89, 80.72, 73.92, 73.40, 72.69, 72.26, 72.21, 71.94, 71.90, 71.83, 71.64, 60.95, 59.86, 59.75, 59.66, 59.57, 58.92, 50.76, 48.86, 42.92, 34.93, 31.51, 31.31, 27.95.

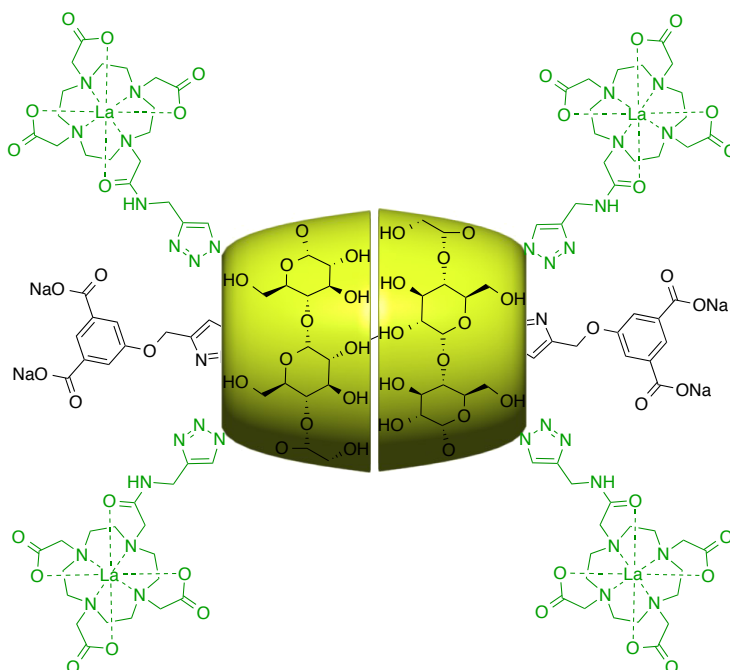
HRMS (ESI):  $m/z$  calc  $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$  ( $\text{C}_{144}\text{H}_{211}\text{La}_2\text{N}_{22}\text{O}_{82}$ ) 1279.3720; found 1279.3663.

### RotGd<sub>2</sub> (70)



A solution of diazidododecane (**66**) (10 mg, 0.04 mmol) and CDGd (**19**) (126 mg, 0.08 mmol) in distilled water (1.5 ml) was stirred under argon until the solution became cloudy (15 minutes). Then, 5-(propargyloxy)isophthalic acid (**67**) (18 mg, 0.09 mmol), sodium bicarbonate (13 mg, 0.16 mmol), copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol), *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (7 mg, 8  $\mu\text{l}$ , 0.04 mmol) and sodium ascorbate (10 mg, 0.05 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature under argon for 24 hours. Water was removed. The solid was purified by size-exclusion chromatography in water to yield the rotaxane **70** (55 mg, 36%).

HRMS (ESI):  $m/z$  ( $\text{M} = \text{C}_{144}\text{H}_{214}\text{Gd}_2\text{N}_{22}\text{O}_{82}$ ) calc 1938.5818, 1292.0521, 968.7871 ( $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ ,  $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ ,  $[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$ ); found 1938.5677, 1292.0485, 968.8020.

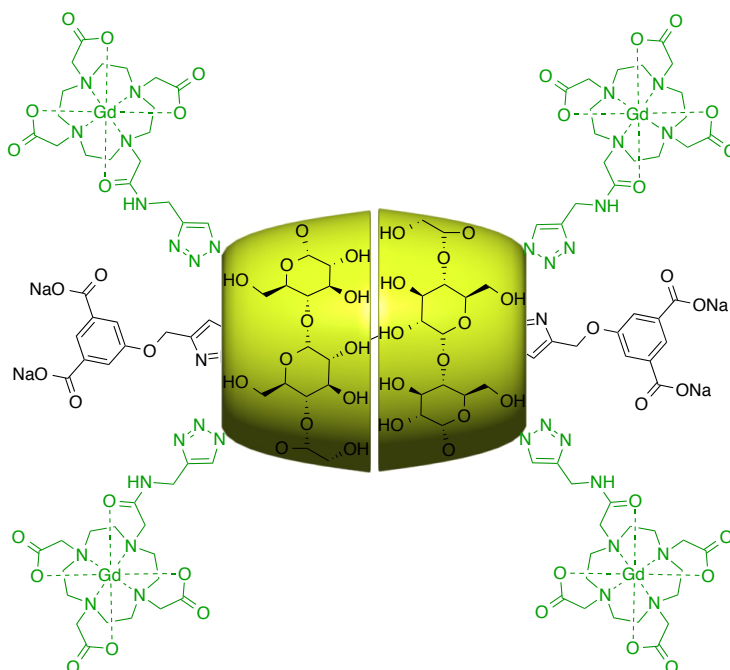
**RotLa<sub>4</sub> (71)**

A solution of diazidododecane (**66**) (5.8 mg, 0.02 mmol) and CDLa<sub>2</sub> (**20**) (100 mg, 0.05 mmol) in distilled water (1.0 ml) was stirred under argon until the solution became cloudy (15 minutes). Then, 5-(propargyloxy)isophthalic acid (**67**) (10.4 mg, 0.05 mmol), sodium bicarbonate (7.7 mg, 0.09 mmol), copper(II) sulfate pentahydrate (3.4 mg, 0.01 mmol), PMDETA (4 mg, 5  $\mu$ l, 0.02 mmol) and sodium ascorbate (5.5 mg, 0.028 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature under argon for 24 hours. Water was removed. The solid was purified by size-exclusion chromatography to yield the rotaxane **71** (43 mg, 37%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.29 (s, 2H, triaz-cap/axis), 7.92 (s, 6H, 4H triaz-CD, 2H<sub>para</sub> arom. cap), 7.56 (s, 4H, H<sub>ortho</sub> arom. cap), 5.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-cap), 5.19 (s, 4H), 5.08 (s, 10H), 4.70 – 4.33 (m, 16H), 4.07 – 3.44 (m, 88H), 3.40 - 2.26 (m, 92H), 2.08 – 1.92 (s broad, 4H), 1.48 (s, 16H, -CH<sub>2</sub>- axis).

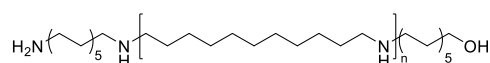
**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  179.52, 179.17, 175.35, 173.38, 157.46, 143.28, 138.35, 126.19, 122.64, 117.60, 102.67, 102.36, 80.94, 80.75, 73.88, 73.36, 72.63, 72.04, 71.86, 71.63, 61.05, 59.80, 59.22, 50.86, 34.97, 31.44, 31.33, 31.22, 30.24, 28.09.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc [M-3H]<sup>3-</sup> (C<sub>182</sub>H<sub>265</sub>La<sub>4</sub>N<sub>38</sub>O<sub>94</sub>) 1680.7798; found 1680.7815.

**RotGd<sub>4</sub> (72)**

A solution of diazidododecane (**66**) (5.8 mg, 0.02 mmol) and CDGd<sub>2</sub> (**21**) (101 mg, 0.05 mmol) in distilled water (1.0 ml) was stirred under argon until the solution became cloudy (15 minutes). Then, 5-(propargyloxy)isophthalic acid (**67**) (10.0 mg, 0.049 mmol), sodium bicarbonate (7.8 mg, 0.09 mmol), copper(II) sulfate pentahydrate (3.4 mg, 0.01 mmol), PMDETA (4 mg, 5  $\mu$ l, 0.02 mmol) and sodium ascorbate (5.6 mg, 0.03 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature under argon for 24 hours. Water was removed. The solid was purified by size-exclusion chromatography (61 mg, 52%).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  ( $M = C_{182}H_{268}Gd_4N_{38}O_{94}$ ) calc 1706.1392, 1279.3527, 1023.0803 ( $[M-3H]^{3-}$ ,  $[M-4H]^{4-}$ ,  $[M-5H]^{5-}$ ); found 1706.1448, 1279.3625, 1023.0903.

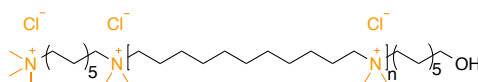
**Poly(iminoundecamethylene) (74)**<sup>[20]</sup>

Reprecipitated polyamide 11 (**73**) (2 g, 10.97 mmol of monomers, 1 eq), 80 mL of distilled THF, and 25 mL of BH<sub>3</sub>·Me<sub>2</sub>S at 2 M in THF (45 mmol, 4 eq) were stirred for 16 hours at reflux. After allowing the reaction mixture to cool to room temperature, 20 mL of acetic acid was added to the mixture. It was stirred again for 15 hours at reflux. The reaction mixture was

cooled to room temperature and 600 mL of NaOH at 10% was poured. A gel was formed. It was filtered and dried and then extracted with  $\text{CHCl}_3$  in a Soxhlet apparatus to get the polyamine **74** as a pale yellow solid (1.2 g, 67%).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.57 (t,  $J = 7.2$  Hz, 4H), 1.47 (broad s, 4H), 1.27 (broad s, 14H).

**Poly((*N,N*-dimethylammonio)undecamethylene chloride) (75)**<sup>[113]</sup>



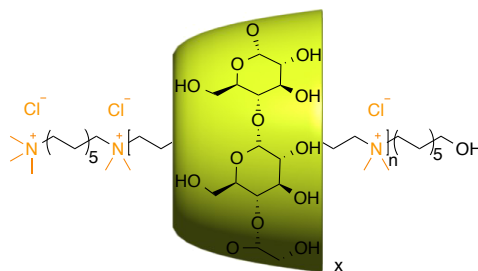
A solution of Poly(iminoundecamethylene) (**74**) (300 mg), sodium carbonate (470 mg, 4.4 mmol) and iodomethane (0.27 ml, 4.4 mmol) in methanol (20 ml) was prepared in a round-bottom flask. The mixture was stirred overnight under reflux (80°C). The solution was then brought to room temperature and a solution of ammonium hydroxide (30%, 4.5 ml) was added. The mixture was stirred for 3 hours at room temperature. Then solvents were removed under reduced pressure (80%). The polymer was dissolved by addition of methanol (25 ml), and hydrochloric acid (1M, 50 ml) was added. The solution was stirred overnight at room temperature. Solvents were removed to yield a brown solid (380 mg, 100%).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.45 – 3.37 (m, 4H), 3.16 (s, 6H), 1.83 (t,  $J = 8.4$  Hz, 4H), 1.55 – 1.32 (m, 14H).

**General procedure for polyrotaxane synthesis based on polyammonium.** Polyammonium (**75**) and functionalized CD were mixed in water (or a mix of water and MeOH). Proportion of total CD is one equivalent for one monomer unit. The reaction mixture was stirred to a suitable temperature for several days. PPRs were purified by ultrafiltration on 10 kDa membrane.



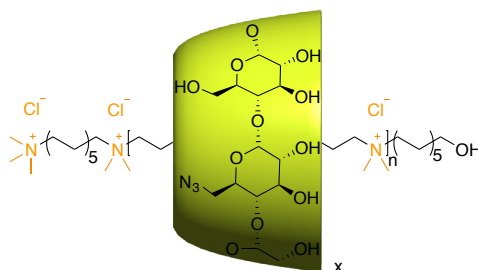
**PPR-CD (76)**



A solution of polyammonium **75** (2.8 mg) and  $\alpha$ -cyclodextrin (100 mg, 0.10 mmol) in H<sub>2</sub>O (0.5 mL) was heated at 80°C for 3.5 days. The polyrotaxane was purified by dialysis or ultrafiltration to reach pure *PPR* at 46% yield.

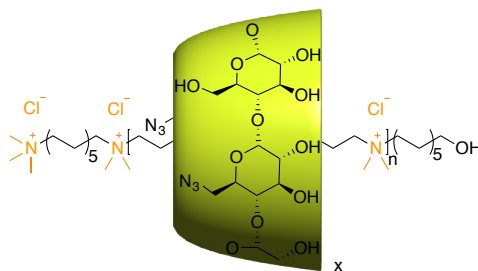
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.13 – 5.09 (broad d, CD), 4.05 – 3.80 (m, CD), 3.74 – 3.56 (m, CD), 3.35 (m), 3.32 – 3.22 (m), 3.17 – 3.00 (m, axle), 1.87 (broad s, axle), 1.81 – 1.69 (broad m, axle), 1.52 (broad s, axle), 1.41 – 1.24 (broad m, axle).

**PPR1**



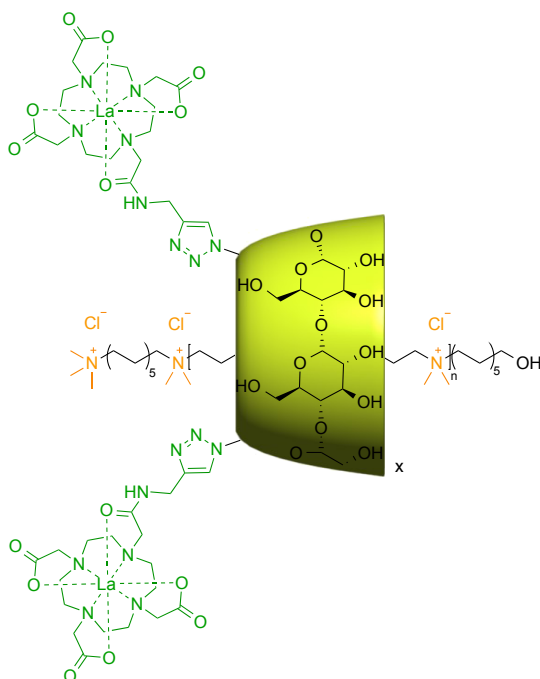
A solution of polyammonium **75** (20 mg) and CD(N<sub>3</sub>) (**9**) (86 mg, 0.09 mmol) in H<sub>2</sub>O (4.0 mL) was heated at 80°C for 13 days. The product was washed and purified by ultrafiltration to reach pure *PPR1*.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.13 (broad s, CD), 3.91 (broad m, CD), 3.73 (m, CD), 3.31 (m), 3.20 – 3.02 (m, axle), 1.83 (m, axle), 1.65 – 1.24 (m, axle).

**PPR2**

A solution of polyammonium **75** (20 mg) and CD(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**10**) (88 mg, 0.09 mmol) in H<sub>2</sub>O (4.0 mL) was heated at 80°C for 14 days. The product was washed and purified by ultrafiltration to reach pure **PPR2**.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.13 (s, CD), 3.93 (broad m, CD), 3.72 (broad s, CD), 3.30 (m), 3.09 (m, axle), 1.82 (broad m, axle), 1.66 – 1.22 (broad m, axle).

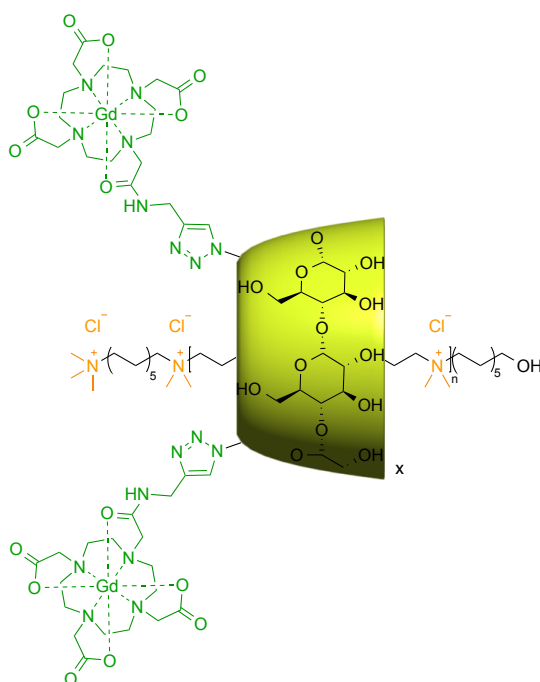
**PPR5**

A solution of polyammonium **75** (5.0 mg) and **20** (47 mg, 0.02 mmol) in D<sub>2</sub>O (2 ml) was stirred at 80°C for a week. The product was washed by distilled water and purified by ultrafiltration to yield a solid (12 mg, 23%).

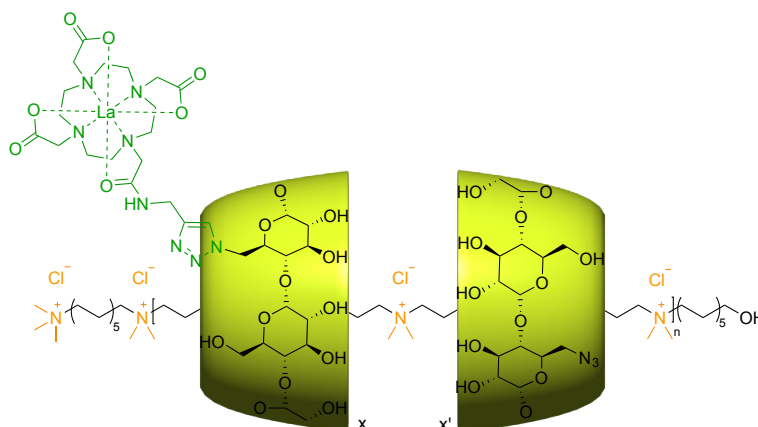
## Experimental Section

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.08 (s, triaz.), 5.32 – 4.97 (m, H anomeric), 4.63 (s, CD), 4.20 – 2.97 (m, CD and axle), 2.75 – 2.30 (s broad, axle), 2.00 – 1.64 (m, axle), 1.65 – 1.06 (m, axle).

### PPR7

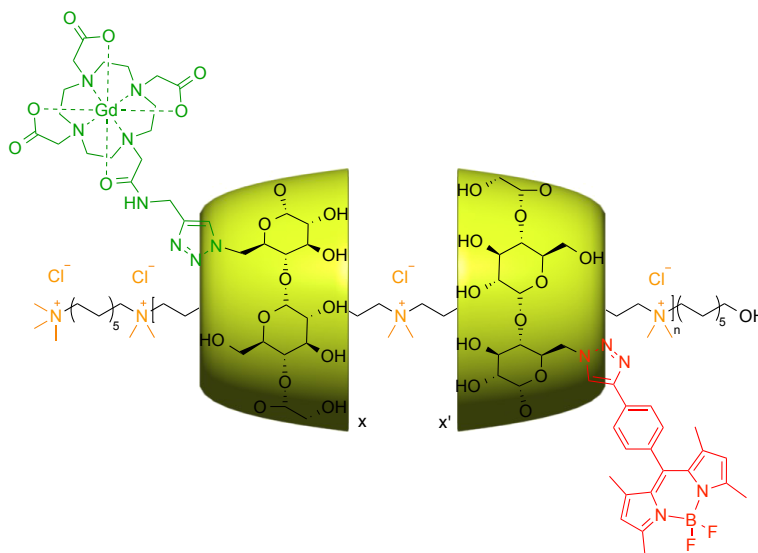


A solution of polyammonium **75** (5.0 mg) and **21** (47 mg, 0.02 mmol) in  $\text{D}_2\text{O}$  (2 ml) was stirred at  $80^\circ\text{C}$  for a week. Methanol (0.2 ml) was added. The product was washed by distilled water and purified by ultrafiltration to yield a solid (10 mg, 19%).

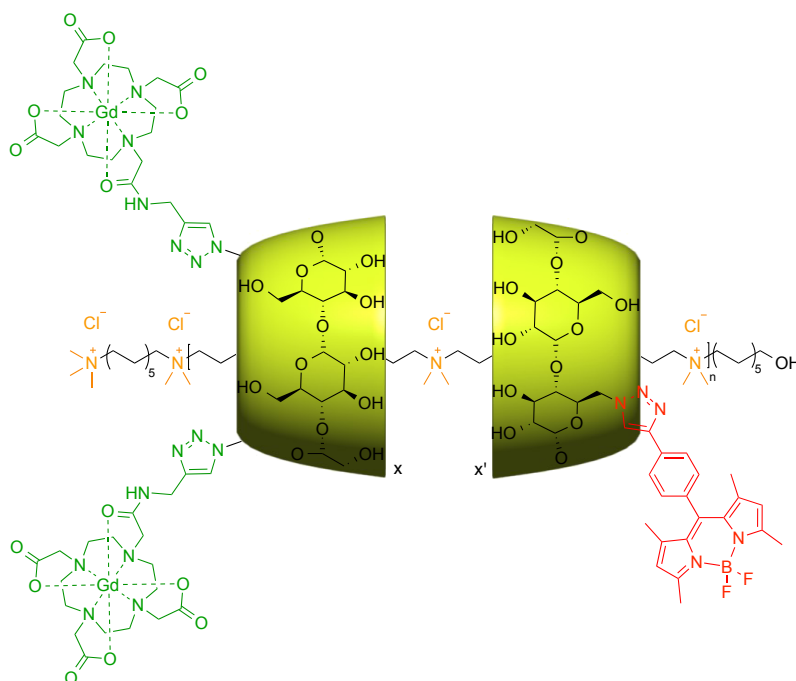
**PPR8**

A solution of polyammonium **75** (20 mg), **9** (43 mg, 0.04 mmol) and **18** (67 mg, 0.04 mmol) in H<sub>2</sub>O (4 ml) was stirred at 80°C for 10 days. The product was washed by distilled water and purified by ultrafiltration to yield a solid (43 mg, 33%).

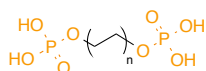
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.07 (s, H triaz), 5.13 (s, H anomeric), 3.93 (broad m, CD), 3.80 – 3.55 (m, CD), 3.34 (broad m), 3.21 – 2.99 (m, axle), 1.83 (m, axle), 1.67 – 1.15 (m, axle).

**PPR10**

A solution of polyammonium **75** (7.5 mg) and **19** (41 mg, 0.026 mmol) in H<sub>2</sub>O (3 ml) was stirred at 80°C for 24 hours. Methanol (0.3 ml) and **22** (9.0 mg, 0.006 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 60°C for 3 days. The product was washed by a solution of methanol and distilled water (1:9) and purified by ultrafiltration to yield a solid (16 mg, 28%).

**PPR11**

A solution of polyammonium **75** (10.0 mg) and **21** (95 mg, 0.043 mmol) in H<sub>2</sub>O (3 ml) was stirred at 80°C for 24 hours. Methanol (0.3 ml) and **22** (17 mg, 0.013 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 60°C for 3 days. The product was washed by a solution of methanol and distilled water (1:9) and purified by ultrafiltration to yield a solid (27 mg, 22%).

**General procedure for alkanedisphosphate synthesis**<sup>[117]</sup>

POCl<sub>3</sub> (7.6 mmol, 2.8 eq.) was added to a degassed solution of alkanediol (2.7 mmol, 1 eq.) in dry toluene (20 mL). The mixture was heated at 100°C under argon for 3h. Then, toluene and excess of POCl<sub>3</sub> were removed under reduced pressure. Dry toluene (20 mL) was added and removed again under high vacuum. This step was repeated twice to removed all excess of POCl<sub>3</sub>. Distilled water (25 mL) was added to the residue and the mixture was heated under reflux for 1.5h. Water was removed to give a white powder.

**Compound 77**

n = 3 : 0.75 g ; 100% yield

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.98 (q,  $J = 6.6$  Hz, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-O}$ ), 1.76 – 1.62 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 1.46 (m, 4H,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  67.71, 67.63, 31.37, 31.27, 30.32, 26.17.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (122 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  0.12.

$\text{pK}_{\text{a}1} \approx 1.7$  ;  $\text{pK}_{\text{a}2} \approx 7.1$

**Compound 78**

n = 4: 0 ; 81 g ; 98% yield

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.97 (q,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 1.73 – 1.63 (m, 4H), 1.48 – 1.33 (m, 8H).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  67.80, 67.74, 31.45, 31.38, 30.14, 26.53.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  0.67.

$\text{pK}_{\text{a}1} \approx 1.1$  ;  $\text{pK}_{\text{a}2} \approx 7.1$

**Compound 79**

n = 5: 0.90 g ; 100% yield

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.96 (q,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 1.71 – 1.62 (m, 4H), 1.47 – 1.31 (m, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  67.81, 67.75, 31.50, 31.43, 30.55, 30.24, 26.62.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  0.69 (t,  $J = 7.1$  Hz).

$\text{pK}_{\text{a}1} \approx 1.6$  ;  $\text{pK}_{\text{a}2} \approx 7.1$

**Compound 80**

n = 6: 0.95 g ; 97% yield

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.96 (q,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 1.72 – 1.60 (m, 4H), 1.45 – 1.25 (m, 16H).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  67.81, 67.75, 31.51, 31.43, 30.64, 30.28, 26.63.

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  0.68 (t,  $J = 6.9$  Hz).

$\text{pK}_{\text{a}1} \approx 2.3$  ;  $\text{pK}_{\text{a}2} \approx 7.3$  (low water solubility in acidic condition)

### Compound 81

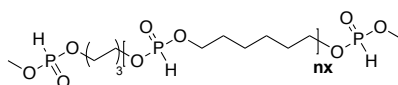
n = 8: 1.13 g ; 100 % yield

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.96 (q,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 1.71 – 1.62 (m, 4H), 1.45 – 1.26 (m, 24H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  67.83, 67.77, 31.51, 31.44, 30.74, 30.68, 30.66, 30.30, 26.63.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  0.12.

### General procedure for the synthesis of poly(hexylene phosphite) (**91**; **92**; **93**)<sup>[120c]</sup>



A solution of dry 1,6-hexanediol (**90**) (10 g, 85 mmol, 1 eq) and distilled dimethylphosphite (**89**) (9.3 ml, 0.1 mol, 1.2 eq) in distilled 1,2-dichlorobenzene (100 ml) was stirred and distilled at 120°C under reduced pressure for 20h and at 130°C for 30h. Solvent and dimethylphosphite were regularly added to reduce the viscosity of the solution and keep going the polycondensation. Under reduced pressure, the solution was then warmed at 140, 150, 160 and 170°C for 50 hours more. The degree of polymerization was followed by  $^{31}\text{P}$  NMR and three macromolecule lengths were selected:  $n_x = 14$  (**91**) after 64h;  $n_x = 25$  (**92**) after 85h;  $n_x = 77$  (**93**) after 100h.

### Compound 91

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.76 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 14H), 6.74 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 2H), 4.02 (m, 60H), 3.72 (d,  $^3J_{\text{P-H}} = 12.0$  Hz, 6H), 1.67 (m, 60H), 1.39 (m, 60H).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.76 (2P), 8.37 (14).

### Compound 92

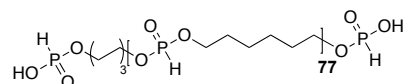
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.76 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 25H), 6.74 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 2H), 4.02 (m, 104H), 3.72 (d,  $^3J_{\text{P-H}} = 12.0$  Hz, 6H), 1.67 (m, 104H), 1.39 (m, 104H).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.76 (2P), 8.37 (25).

**Compound 93**

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.76 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 77H), 6.74 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 2H), 4.02 (m, 312H), 3.72 (d,  $^3J_{\text{P-H}} = 12.0$  Hz, 6H), 1.67 (m, 312H), 1.39 (m, 312H).

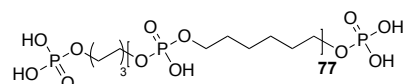
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.76 (2P), 8.37 (77).

**Demethylated poly(hexylene phosphite) (95)<sup>[121]</sup>**

To a solution of poly(hexylene phosphite) (**93**) (660 mg, 0.05 mmol, 1 eq) in dry acetonitrile (15 ml) was added 1-methylimidazole (**94**) (0.22 ml, 2.73 mmol, 60 eq). The solution was stirred at 80°C for one week. Solvent was removed and the polymer was used without further purification in the next step.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.76 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 77H), 6.74 (d,  $^1J_{\text{P-H}} = 696.0$  Hz, 2H), 4.02 (m, 312H), 1.67 (m, 312H), 1.39 (m, 312H).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.81.

**Poly(hexylene phosphate) (99)<sup>[122]</sup>**

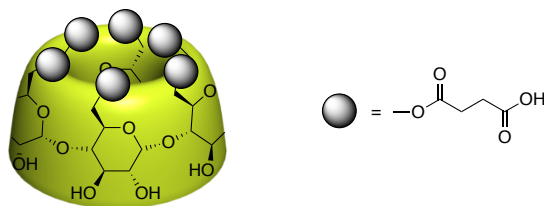
To a stirred solution of demethylated poly(hexylene phosphite) (**95**) (650 mg, 4.0 mmol of polymeric unit, 3 eq) in dry acetonitrile (6 ml) was added trichloroisocyanuric acid (**96**) (312 mg, 1.3 mmol, 1 eq). The solution was stirred at room temperature overnight. Isocyanuric acid (**97**) was filtered off and the solution was concentrated to 2 ml. The poly(hexylene chlorophosphate) (**98**) was hydrolyzed by addition of distilled water (0.07 ml, 4.0 mmol, 1 eq) and the solution was stirred for 1h at room temperature. Acetonitrile was removed and the residue was dissolved in distilled water (120 ml) at 50°C and in ultrasonic bath. The mixture was then purified by ultrafiltration (3 kDa membrane). The residue was lyophilized to give the poly(hexylene phosphate) (**99**).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.99 – 3.82 (m, 4H), 1.60 (m, 4H), 1.36 (m, 4H).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0.52.



**CD-hexaacide (101)**<sup>[129]</sup>

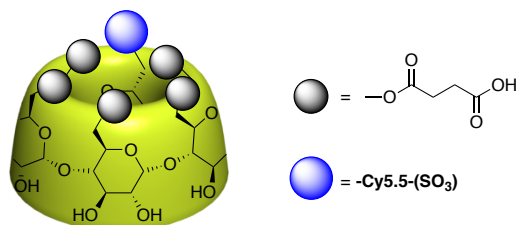


A solution of native  $\alpha$ -cyclodextrine (**1**) (200 mg, 0.21 mmol, 1 eq) and succinic anhydride (**100**) (630 mg, 6.3 mmol, 30 eq) in dry pyridine (3 ml) was prepared under argon and stirred overnight at room temperature. The solution was poured into diethyl ether (50 ml). The precipitate was filtered off and dried to give a white powder (240 mg, 75%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  4.25 (s, 6H), 3.20 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 6H), 3.07 (m, 18H), 2.82 (m, 12H), 1.78 (t,  $J$  = 1.6 Hz, 24H).

HRMS (ESI):  $m/z$  calc [C<sub>60</sub>H<sub>84</sub>O<sub>48</sub>-H]<sup>-</sup> 1571.4059; found 1571.4130.

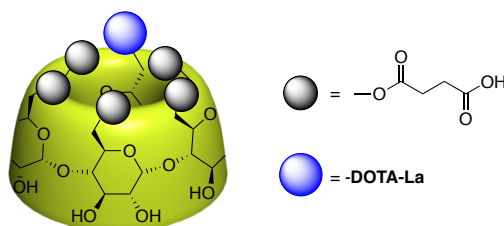
**CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>)-(CO<sub>2</sub>H)<sub>x</sub> (102)**<sup>[129]</sup>



A solution of CD-Cy5.5-(SO<sub>3</sub>) (**63**) (40 mg, 0.02 mmol, 1 eq) and succinic anhydride (**100**) (70 mg, 0.72 mmol, 30 eq) in dry pyridine (1.5 ml) was prepared under argon and stirred overnight at room temperature. The solution was poured into diethyl ether (20 ml). The precipitate was filtered off and dried to give a white powder (24 mg).

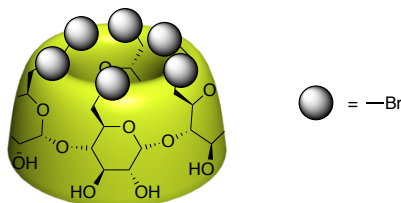
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.44 (t,  $J$  = 13.0 Hz, 2H), 8.25 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 8.06 (m, 5H), 7.78 (d,  $J$  = 9.4 Hz, 2H), 7.72 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.52 (m, 2H), 6.67 (t,  $J$  = 12.1 Hz, 1H), 6.41 (m, 2H), 5.48 (broad m, 12H), 5.03 (broad m), 4.82 (broad m), 4.24 (broad s), 3.78 (broad m, 4H), 3.72- 2.91 (broad m), 2.70 (borad m), 2.54-2.29 (borad m) 1.97 (s, 12H), 1.83 (broad m).

MS (ESI):  $m/z$  calc [C<sub>99</sub>H<sub>125</sub>N<sub>5</sub>O<sub>47</sub>S-H]<sup>-</sup> 2166.73; found 2166.61.

**CDLa-(CO<sub>2</sub>H)<sub>x</sub> (103)**<sup>[129]</sup>

A solution of CDLa (**18**) (50 mg, 0.03 mmol, 1 eq) and succinic anhydride (**100**) (95 mg, 0.95 mmol, 30 eq) in dry pyridine (1.5 ml) was prepared under argon and stirred overnight at room temperature. The solution was poured into diethyl ether (20 ml). The precipitate was filtered off and dried to give a white powder (30 mg).

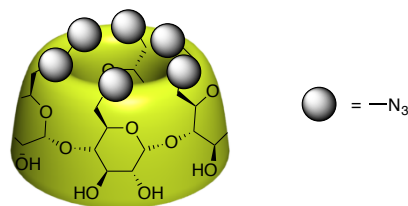
**MS (ESI):**  $m/z$  calc  $[C_{75}H_{107}LaN_8O_{51}-2H]^{2-}$  1036.26; found 1036.29.

**CD(Br)<sub>6</sub> (111)**<sup>[131]</sup>

To a solution of native  $\alpha$ -cyclodextrine (**1**) (510 mg, 0.51 mmol, 1 eq) in dry DMF (20 ml) was added *N*-bromosuccinimide (1.1 g, 6.2 mmol, 12 eq) then triphenylphosphine (1.6 g, 6.2 mmol, 12 eq). The solution was stirred at 90°C overnight. The solution was concentrated (10 ml) and a solution of sodium hydroxide saturated in methanol was added dropwise to reach pH 9. The resulting mixture was stirred for 2h at room temperature. Then, the mixture was poured into a solution of distilled water and ice (400 ml) and the precipitate was filtered off and washed with methanol to give a white powder (372 mg, 54%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  5.93 – 5.40 (m, 12H), 4.94 (d,  $J = 3.3$  Hz, 6H), 3.95 - 3.70 (m, 24H), 3.48 – 3.28 (m, 12H).

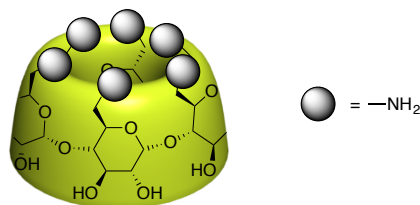
**MS (ESI):**  $m/z$  calc  $[C_{36}H_{54}Br_6O_{24}+Na]^+$  1372.79; found 1373.24.

**CD(N<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (104)**<sup>[132]</sup>

A solution of **111** (300 mg, 0.22 mmol, 1 eq) and sodium azide (145 mg, 2.2 mmol, 10 eq) in dry DMF (10 ml) was stirred at 60°C overnight. Solvent was partially removed (until 5 ml) and then poured into a solution of distilled water and ice (30 ml). The precipitate was filtered and dried to give a white solid (195 mg, 79%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5.65 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 5.48 (d, *J* = 2.7 Hz, 6H), 4.89 (d, *J* = 3.5 Hz, 6H), 3.85 – 3.69 (m, 24H), 3.59 (dd, *J* = 13.3, 7.0 Hz, 6H), 3.44 – 3.34 (m, 6H).

**MS (ESI)**: *m/z* calc [C<sub>36</sub>H<sub>54</sub>N<sub>18</sub>O<sub>24</sub>+Na]<sup>+</sup> 1145.35; found 1145.88.

**CD(NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (105)**<sup>[132]</sup>

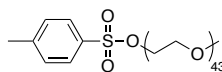
A solution of **104** (180 mg, 0.16 mmol, 1 eq) and triphenylphosphine (670 mg, 2.6 mmol, 16 eq) in DMF (10 ml) was stirred overnight at room temperature. Ammonium hydroxide solution (30%, 6 ml) was added dropwise and the resulting suspension was vigorously stirred over a day. Solvents were removed and the residue was dissolved in ethanol, the suspension was stirred in ultrasonic bath for 30 minutes. The white precipitate was filtered and washed with ethanol. The product was dissolved in distilled water and hydrochloric acid was added dropwise to reach pH 1. The product was filtered to removed precipitated impurities. The filtrate was lyophilized to give **105** as a white powder (142 mg, 92%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.21 (d, *J* = 3.2 Hz, 6H, **H**<sup>1</sup>), 4.27 (ddd, *J* = 9.7, 6.1, 3.5 Hz, 6H, **H**<sup>5</sup>), 4.07 (dd, *J* = 10.1, 8.5 Hz, 6H, **H**<sup>3</sup>), 3.72 (dd, *J* = 10.1, 3.2 Hz, 6H, **H**<sup>2</sup>), 3.68 – 3.61 (m, 6H, **H**<sup>4</sup>), 3.51 (dd, *J* = 13.6, 3.5 Hz, 6H, **H**<sup>6a</sup>), 3.34 (dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, 6H, **H**<sup>6b</sup>).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc  $[C_{36}H_{66}N_6O_{24}+H]^+$  967.4201; found 967.4167.

### PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> (106)

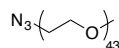
#### Tosylated monomethylether PEG<sub>2000</sub>



To a solution of monomethylether PEG<sub>2000</sub> (6.0 g, 3.2 mmol, 1 eq) and 4-dimethylaminopyridine (100 mg, 0.8 mmol, 0.3 eq) in dry dichloromethane (160 ml) and triethylamine (2.2 ml, 16 mmol, 5 eq) was added a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (1.8 g, 9.5 mmol, 3 eq) in dry dichloromethane (80 ml). The solution was stirred overnight at room temperature. The solution was washed by hydrochloride acid (1M, 100 ml) and distilled water (2x100 ml), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue as dissolved in methanol (25 ml) and the solution was poured into diethyl ether (200 ml). The resulting suspension was stored overnight in the fridge. The precipitate was collected by filtration and dried under vacuum to give a white wax (6.5 g, 100%)

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.78 (dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz, 2H), 7.33 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 4.17 – 4.12 (m, 2H), 3.63 (s, 170H), 3.37 (s, 3H), 2.44 (s, 3H).

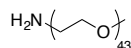
#### Monoazide monomethylether PEG<sub>2000</sub>



A solution of tosylated monomethylether PEG<sub>2000</sub> (6.4 g, 3.2 mmol, 1 eq) and sodium azide (315 mg, 4.8 mmol, 1.5 eq) in acetonitrile (30 ml) was stirred and refluxed overnight. At room temperature, distilled water (30 ml) was added and the mixture extracted with dichloromethane (4x30 ml). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated to give a white wax (5.5 g, 89%).

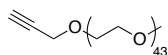
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.67 – 3.61 (m, 170H), 3.38 (t,  $J = 5.23$  Hz, 2H), 3.37 (s, 3H).

**MS (ESI):**  $m/z$  calc  $[(C_2H_4O)_{40}N_3CH_3+Na]^+$  1841.07; found 1841.77.

**mPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> (106)**

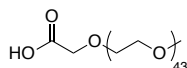
A solution of monoazide monomethylether PEG<sub>2000</sub> (1.06 g, 0.52 mmol, 1 eq) and triphenylphosphine (340 mg, 1.3 mmol, 2.5 eq) in distilled tetrahydrofuran (40 ml) was stirred overnight under argon. Solvent was removed and the residue purified by flash chromatography (DCM:MeOH) to give **106** as a white wax (830 mg, 80%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.93 (broad s, 2H), 3.64 (s, 170H), 3.40 (t, *J* = 5.56 Hz, 2H), 3.37 (s, 3H).

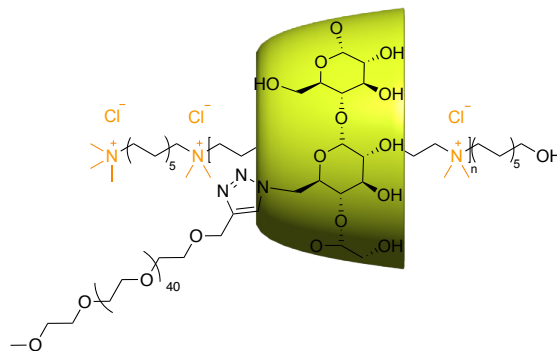
**PEG<sub>2000</sub>-alkyne (107)**

A solution of monomethylether PEG<sub>2000</sub> (1.0 g, 0.53 mmol, 1 eq) in dry DMF (10 ml) was prepared under argon and stirred at 0°C in ice bath. Sodium hydride (60%, 73 mg, 1.84 mmol, 3.5 eq) was added slowly at 0°C. Then, a solution of propargyl bromide in toluene (80%, 0.18 ml, 3 eq) was added dropwise at 0°C. The solution was stirred under argon and allowed to return to room temperature for 4 hours. Distilled water (20 ml) was added slowly and the resulting mixture was extracted with dichloromethane (3x15 ml). Organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and solvents were removed. The residue was dissolved in methanol (10 ml) and the solution was poured into diethyl ether. The precipitate was filtered and dried to give the product **107** as a pale brown solid (0.86 g, 84%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.64 (s, 172H), 3.37 (s, 3H), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

**PEG<sub>2000</sub>-CO<sub>2</sub>H (108)**<sup>[163]</sup>

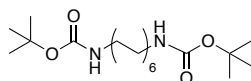
To solution of monomethylether PEG<sub>2000</sub> (2.2 g, 1.16 mmol, 1 eq) in dry tetrahydrofuran (10 ml) stirred at 0°C under argon was added slowly sodium hydride (60%, 70 mg, 1.74 mmol, 1.5 eq). The solution was stirred and reach room temperature for 1h. Then, ethyl bromoacetate (0.15 ml, 1.39 mmol, 1.2 eq) was added dropwise to the solution. The resulting mixture was stirred at 50°C overnight under argon. Solvent was removed, and methanol (8 ml) and a solution of lithium hydroxide (1M, 8 ml) were added to hydrolyzed the ester. The solution was stirred overnight. Methanol was removed and hydrochloric acid (1M) was added to reach pH 1. The mixture was extracted with dichloromethane (3x20 ml). Organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and solvent was removed to yield **108** as a white powder (2.3 g, 100%).  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.14 (s, 1.4H), 3.63 (s, 172H), 3.37 (s, 3H).

**PEGylation of PPR-CD(N<sub>3</sub>) (109)**

To a solution of PPR-CD(N<sub>3</sub>) covered at 70% (10 mg, 7.6 μmol, 1 eq) in distilled water (1.0 ml) was added **107** (22 mg, 11.4 μmol, 1.5 eq). The solution was degassed and copper(II) sulfate pentahydrate (1.5 mg, 6.1 μmol), sodium ascorbate (2.4 mg, 12.2 μmol) and *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylenetriamine (1.1 mg, 1.27 μl, 6.1 μmol) were added. The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The pseudopolyrotataxane was purified by ultrafiltration on 10 kDa membrane and washed with distilled water to give a white powder (12.8 mg, 42% of PEGylation yield).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.13 (s, H<sub>triazole</sub>), 5.14 (s, CD), 3.92 (m, CD), 3.75 (m, PEG and CD), 3.43 (s, PEG), 3.42 – 3.20 (m, axle), 3.22 – 2.97 (m, axle), 1.84 (m, axle), 1.67 – 1.17 (m, axle).

**Compound 116**<sup>[143]</sup>

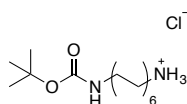


To a solution of 1,12-diaminododecane (**115**) (0.50 g, 2.5 mmol, 1eq) in a mixture of methanol and dichloromethane (1:1, 20 ml) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (1.09 g, 5 mmol, 2 eq). The solution was stirred over weekend at room temperature. Solvents were removed to give **116** as a white powder (1.0 g, 100%)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.49 (broad s, 2H), 3.10 (m, 4H), 1.46 (m, 4H), 1.44 (s, 18H), 1.36 – 1.20 (m, 16H).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.90, 79.03, 40.79, 30.23, 29.67, 29.43, 28.59, 26.95.

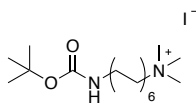
**Compound 117**<sup>[143]</sup>



To a solution of **116** (1.0 g, 2.47 mmol, 1 eq) in dichloromethane (8 ml) was added dropwise a solution of hydrogen chloride in diethyl ether (1M, 8 ml). The resulting mixture was vigorously stirred overnight. The white precipitate was collected by filtration on membrane and washed with diethyl ether to yield the product **117** (0.5 g, 67%).

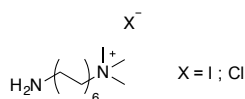
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.00 (broad s, 3H, -NH<sub>3</sub>), 6.73 (broad t, 1H, -NH-), 2.88 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-), 2.73 (broad s, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub>), 1.54 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub>), 1.36 (s, 9H, -O(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.40 – 1.19 (m, 18H, -CH<sub>2</sub>-).

**MS (ESI):** *m/z* calc [M+H]<sup>+</sup> 301.28; found 301.50

**Compound 118**

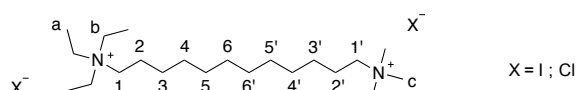
A solution of **117** (200 mg, 0.58 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (320 mg, 2.3 mmol, 4 eq) in distilled toluene (10 ml) was prepared under argon. Methyl iodide (0.21 ml, 3.3 mmol, 6 eq) was added dropwise and the solution was stirred overnight under argon at room temperature. Ammonium hydroxide solution (30%, 20 ml) was added to neutralized excess of methyl iodide and the solution vigorously stirred for 2h. Solvents were removed and the product purified by silica plug (eluent DCM:MeOH(2%)). The product was collected, dried and used without any further purification in next step.

**MS (ESI):**  $m/z$  calc  $[M]^+$  343.33; found 343.08.

**Compound 119**

To a solution of **118** (200 mg, 0.58 mmol) in toluene (25 ml) was added hydrogen chloride in diethyl ether (1M, 3 ml). The solution was stirred overnight at room temperature. Solvents were removed and the residue purified by flash chromatography (DCM:MeOH) to give a white solid containing salts.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.44 – 3.35 (m, 2H), 3.16 (s, 9H), 2.97 – 2.89 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.47 – 1.30 (m, 16H).

**Compound 120**

To a solution of **119** (215 mg, 0.58 mmol, 1 eq) and potassium carbonate (400 mg, 2.9 mmol, 5 eq.) in distilled acetonitrile (20 ml) was added dropwise ethyl iodide (0.23 ml, 2.9 mmol, 5



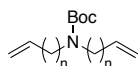
eq). The solution was stirred at room temperature overnight and then neutralized by addition of ammonium hydroxide solution (30%, 7 ml). Solvents were removed and the residue was recrystallized in acetone (x2) and ethanol (x3) to yield a pale brown powder (152 mg, 45%).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.47 (m, 2H,  $\text{H}_{1'}$ ), 3.42 (q,  $J = 7.3$  Hz, 6H,  $\text{H}_{\text{b}}$ ), 3.30 (m, 2H,  $\text{H}_{1'}$ ), 3.26 (s, 9H,  $\text{H}_{\text{c}}$ ), 1.93 (m, 2H,  $\text{H}_{2'}$ ), 1.86 – 1.78 (m, 2H,  $\text{H}_{2'}$ ), 1.51 (m, 8H,  $\text{H}_{3,3',4,4'}$ ), 1.44 (broad s, 8H,  $\text{H}_{5,5',6,6'}$ ), 1.41 (m, 9H,  $\text{H}_{\text{a}}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  67.05 ( $\text{C}_{1'}$ ), 57.05 ( $\text{C}_1$ ), 53.34, 53.31, 53.29 (3x $\text{C}_{\text{c}}$ ), 52.85, 52.83, 52.81 (3x $\text{C}_{\text{b}}$ ), 28.68, 28.60, 28.56, 28.33, 28.31, 25.79, 25.60, 22.52 ( $\text{C}_{2'}$ ), 21.19 ( $\text{C}_2$ ), 7.26 (3x $\text{C}_{\text{a}}$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc [ $\text{C}_{21}\text{H}_{48}\text{N}_2$ ] $^{2+}$  164.1903; found 164.1905

### Compounds **127** ( $n = 4$ ) and **128** ( $n = 9$ )<sup>[149]</sup>



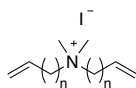
A solution of sodium hydride (60%, 140 mg, 3.6 mmol, 2.1 eq) and bromo-alkene (**125** or **126**) (3.5 mmol, 2.0 eq) in dry DMF (16 ml) was prepared under argon and stirred at 0°C in ice bath. A solution of *tert*-butyl carbamate **124** (200 mg, 1.7 mmol, 1 eq) in dry DMF (4 ml) was added dropwise at 0°C over 20 minutes. The resulting mixture was allowed to return to room temperature and stirred under argon over 4 days. The solution was poured slowly into a solution of distilled water and ice (100 ml) and extracted with diethyl ether (3x100 ml). Combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and solvents were evaporated to give a solid (66% (**127**) ; 74% (**128**)).

**127:**  $n = 4$

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.79 (ddt,  $J = 17.0, 10.2, 6.7$  Hz, 2H), 4.99 (dq,  $J = 17.0, 1.7$  Hz, 2H), 4.96 – 4.92 (m, 2H), 3.15 (t,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 2.10 – 2.01 (m, 4H), 1.57 – 1.47 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.41 – 1.31 (m, 4H).

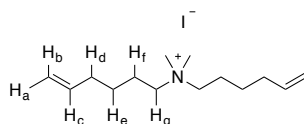
**128:**  $n = 9$

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.81 (ddt,  $J = 16.9, 10.1, 6.6$  Hz, 2H), 5.02 – 4.95 (m, 2H), 4.93 (m, 2H), 3.13 (t,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 2.10 – 1.98 (m, 4H), 1.49 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.37 (m, 4H), 1.34 – 1.24 (m, 20H).

**Compounds 131 (n = 4) and 132 (n = 9)**<sup>[149]</sup>

To a stirred solution of Boc-dialkeneamine (**127** or **128**) (1.0 mmol, 1 eq) in dichloromethane (10 ml) was added trifluoroacetic acid. The solution was stirred at room temperature overnight. Solvent was removed and the residue was dissolved in acetonitrile (6 ml). Potassium carbonate (3 eq) was added and then methyl iodide (2.2 eq). The solution was stirred at room temperature overnight. A solution of ammonium hydroxide (30%, 5 ml) was added, and the solution was stirred 2h. Solvents were evaporated and the residue recrystallized in hot acetone and impurities were filtered off. Acetone was removed and the same operation was performed with dichloromethane to give the product (79% (**131**), 88% (**132**)).

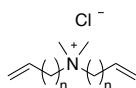
**131:** n = 4



<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.89 (ddt, *J* = 17.1, 10.3, 6.7 Hz, 2H, **H<sub>c</sub>**), 5.11 (dq, *J* = 17.1, 1.7 Hz, 2H, **H<sub>b</sub>**), 5.06 (m, 2H, **H<sub>a</sub>**), 3.31 – 3.26 (m, 4H, **H<sub>g</sub>**), 3.04 (s, 6H, -CH<sub>3</sub>), 2.21 – 2.10 (m, 4H, **H<sub>d</sub>**), 1.82 – 1.70 (m, 4H, **H<sub>f</sub>**), 1.48 (p, 4H, **H<sub>e</sub>**).

**132:** n = 9

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.88 – 5.75 (m, 2H), 5.01 (d, *J* = 17.0 Hz, 2H), 4.95 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 3.55 (broad s, 4H), 3.37 (s, 6H), 2.07 (m, 4H), 1.81 (broad s, 4H), 1.39 (m, 24H).

**Compounds 121 (n = 4) and 122 (n = 9)**

To a solution of dialkene (**131** or **132**) (0.4 mmol, 1 eq) in distilled water (6 ml) was added silver chloride (56 mg, 0.4 mmol, 1 eq). The solution was stirred overnight. The solution was filtered to removed silver iodide. Water was removed from the filtrate and the residue dissolved in methanol and filtrated. Solvent was evaporated to give the solid (88% (**121**), 77% (**122**)).

**121:**  $n = 4$

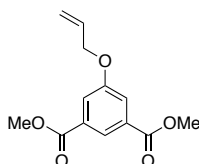
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.84 (m, 2H), 5.04 (m, 4H), 3.30 – 3.16 (m, 4H), 3.06 – 2.95 (m, 6H), 2.17 – 2.01 (m, 4H), 1.82 – 1.64 (m, 4H), 1.43 (m, 4H).

**122:**  $n = 9$

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  6.05 (ddt,  $J = 17.0, 10.2, 6.7$  Hz, 2H), 5.22 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 2H), 5.17 (m, 2H), 3.59 – 3.50 (m, 4H), 3.31 (s, 6H), 2.34 – 2.24 (m, 4H), 2.00 (m, 4H), 1.71 – 1.52 (m, 24H).

### 5-Allyloxy-isophthalic acid (**123**)

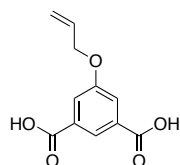
Dimethyl-5-allyloxyisophthalate (**135**)<sup>[149]</sup>



A solution of dimethyl-5-hydroxyisophthalate (**134**) (1.0 g, 4.8 mmol, 1 eq), allyl bromide (**133**) (0.62 ml, 7.1 mmol, 1.5 eq) and potassium carbonate (1.3 g, 9.5 mmol, 2 eq) in DMF (8 ml) was stirred at 60°C for 1.5h. The solution was allowed to return to room temperature, then poured into distilled water (30 ml) and filtered. The precipitate was washed with distilled water and dried (1.2 g, 97%).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.27 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.76 (d,  $J = 1.5$  Hz, 2H), 6.05 (ddt,  $J = 17.3, 10.5, 5.2$  Hz, 1H), 5.44 (dq,  $J = 17.3, 1.5$  Hz, 1H), 5.32 (dq,  $J = 10.5, 1.5$  Hz, 1H), 4.62 (dt,  $J = 5.2, 1.5$  Hz, 2H), 3.93 (s, 6H).

5-Allyloxy-isophthalic acid (**123**)<sup>[162]</sup>

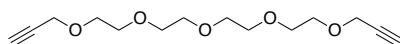


To a solution of dimethyl-5-allyloxyisophthalate (**135**) (1.0 g, 4.6 mmol, 1 eq) in ethanol (10 ml) was added a solution of sodium hydroxide (0.7 g, 18.5 mmol, 4 eq) in distilled water

(5 ml). The resulting mixture was stirred at 65°C overnight. Solvents were removed and the residue dissolved in hydrochloric acid (2M, 30 ml). The solution was extracted with ethyl acetate (3x30 ml). Organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and solvent was evaporated to give a white solid (1.0 g, 98%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.24 (broad s, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.66 (s, 2H), 6.04 (m, 1H), 5.48 – 5.34 (m, 1H), 5.34 – 5.23 (m, 1H), 4.70 (s, 2H).

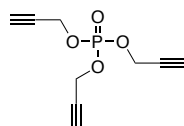
### Dipropargyl tetraethylene glycol (139)



A solution of tetraethylene glycol (2.5 ml, 14.5 mmol, 1 eq) in dry DMF (30 ml) was prepared under argon and stirred at 0°C in ice bath. Sodium hydride (6.5 g, 43.4 mmol, 3.5 eq) was added slowly at 0°C. Then, a solution of propargyl bromide in toluene (80%, 6.5 g, 43.5 mmol, 3 eq) was added dropwise at 0°C. The solution was allowed to return to room temperature and stirred for 2 days. Distilled water (30 ml) was added to neutralize excess of sodium hydride. The solution was then extracted with dichloromethane (3x100 ml) and organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and solvents were evaporated. The residue was purified by flash chromatography (cyclohexane:ethyl acetate) to give **139** as a pale orange oil (3.53 g, 90%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H), 3.72 – 3.66 (m, 8H), 3.66 (s, 8H), 2.42 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H).

### Tripropargylphosphate<sup>[152]</sup>



To a solution of propargyl alcohol (3.3 ml, 58.0 mmol, 3 eq) in distilled dichloromethane (50 ml) were added 4-dimethylaminopyridine (245 mg, 2.0 mmol, 0.1 eq) and triethylamine (16.3 ml, 120 mmol, 6 eq). The solution was stirred and cooled down to 0°C, then POCl<sub>3</sub> (1.86 ml, 20 mmol, 1 eq) was added dropwise. The solution was stirred at 0°C for 1h and then allowed to return to room temperature. Distilled water (60 ml) was added and the mixture was

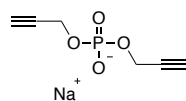
extracted with dichloromethane (3x60 ml). Organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and solvents were removed. The residue was purified by flash chromatography (cyclohexane:ethyl acetate) to give a pale white oil (1.6 g, 38%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.71 (dd, *J* = 10.1, 2.5 Hz, 6H), 2.60 (t, *J* = 2.5 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 76.61, 76.62, 55.69 (d, *J* = 4.7 Hz).

<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.75

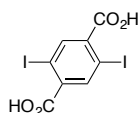
### Sodium dipropargylphosphate (140)<sup>[152]</sup>



To a solution of tripropargylphosphate (1.58 g, 7.5 mmol, 1 eq) in acetonitrile (12 ml) was added a solution of sodium hydroxide (300 mg, 7.5 mmol, 1 eq) in distilled water (3 ml). The solution was stirred at 80°C for 5h. Solvents were evaporated and the residue was purified by flash chromatography (cyclohexane:ethyl acetate) to give **140** as a white solid (1.44 g, 98%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4.64 – 4.56 (m, 4H), 3.00 (m, 2H).

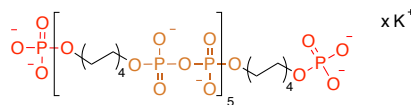
### 1,4-diiodobenzene-2,5-dicarboxylic acid (137)<sup>[162]</sup>



To a solution of 1,4-diiodobenzene-2,5-dimethylester (1.0 g, 2.25 mmol, 1 eq) in ethanol (10 ml) was added a solution of sodium hydroxide (0.36 g, 9.0 mmol, 4 eq) in distilled water (5 ml). The resulting mixture was stirred at 65°C overnight. Solvents were removed and hydrochloric acid (1M, 12 ml) was added. The solution was stirred 30 minutes and then extracted with ethyl acetate (3x30 ml). Organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and solvent was evaporated to give a yellow powder (0.88 g, 94%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.15 (s, 2H).

HRMS (ESI): *m/z* calc [M-H]<sup>-</sup> 416.8126; found 416.8133.

**Oligomer of C<sub>8</sub> (141)**<sup>[154]</sup>

To a solution of octane-diphosphate (**78**) (100 mg, 0.33 mmol) in deuterium oxide (0.43 ml) at pH 10 (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) were added DMC (221 mg, 1.31 mmol, 4 eq) and imidazole (178 mg, 2.61 mmol, 8 eq). The resulting mixture was stirred overnight at 50°C. Then, methanol (25 ml) was added and the solution was filtered to get the oligomer (**141**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4.03 – 3.91 (m, 20H), 3.91 – 3.85 (m, 4H), 1.67 (m, 24H), 1.38 (m, 48H).

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 1.50 (2P), -10.38 (10P).

### General procedure for the polymerisation of *pseudo*-rotaxanes

**Heck reaction:** Palladium(II) acetate was used in 0.2 equivalent per monomer. Polymerisation was performed in distilled water at 65°C under argon for 3 days. Reactifs were used in following proportions: monomers (1 eq, c = 10 to 40 mM) ; cyclodextrin (2 eq) ; cap **123** (0.4 eq) ; Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.2 eq).

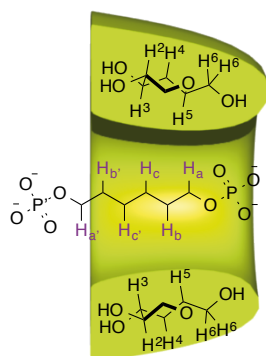
**Copper(I)catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC):** Copper(II) sulfate was used in 0.6 equivalent per monomer and reduced *in situ* by addition of sodium ascorbate (1.2 eq). *N,N,N',N'',N''*-Pentamethyldiethylenetriamine was used to increase the solubility of copper and protected the oxidation (0.6 eq). Polymerisation was performed at room temperature under argon for 1 to 3 days. Reactifs were used in following proportions: monomers (1 eq, c = 25 mM) ; cap **67** (0.3 eq) ; cyclodextrin (3 eq) ; CuSO<sub>4</sub> (0.6 eq) ; PMDETA (0.6 eq) ; sodium ascorbate (1.2).

**Acyclic Diene Metathesis (ADMet):** Both Grubbs and Hoveyda-Grubbs Catalysts 2<sup>nd</sup> Generation were used. Solvents (distilled water, methanol, acetone, dichloromethane) were degassed and polymerisation performed under argon in the dark at 40 to 50°C for 1 to 3 days. Ultrasonic assistance and emulsion of non miscible solvents have been tried. Reactifs were

used in following proportions: monomer (1 eq,  $c = 6.0$  to  $80$  mM) ; cap **123** (0.4 eq) ; catalyst (0.025 to 0.05 eq) ; cyclodextrin (2 eq).

### Selective preparation of [2] and [3]Rotaxane of alkane-diphosphate

#### *Pseudo*-[2]rotaxane- $C_6$ (**82**)

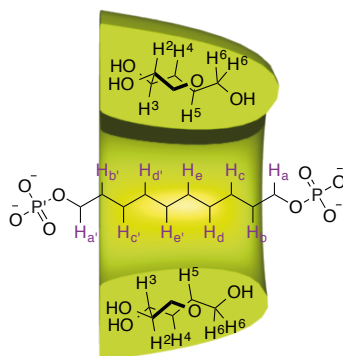


*Pseudo*-[2]RotCD of  $C_6$  (**82**) was prepared by addition of  $\alpha$ -cyclodextrin (2 eq.) to a solution of hexane-diphosphate (**77**) in deuterium oxide (1.0 ml;  $c = 15$  mM) previously adjusted to pH 10 by addition of potassium carbonate. The solution was allowed to return to the equilibrium overnight at room temperature.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.04 (d,  $J = 3.4$  Hz, 6H,  $\text{H}^1$ ), 4.37 (dd,  $J = 12.8, 2.0$  Hz, 6H,  $\text{H}^6$ ), 4.14 (ddd,  $J = 10.2, 8.7, 2.0$  Hz, 6H,  $\text{H}^5$ ), 3.99 (dt,  $J = 9.6, 8.7$  Hz, 6H,  $\text{H}^3$ ), 3.91 – 3.83 (m, 4H,  $\text{H}_{a,f}$ ), 3.64 – 3.59 (m, 6H,  $\text{H}^2$ ), 3.52 (dd,  $J = 12.8, 8.7$  Hz, 6H,  $\text{H}^6$ ), 3.40 (dd,  $J = 10.2, 8.7$  Hz, 6H,  $\text{H}^4$ ), 1.95 – 1.83 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 1.83 – 1.73 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ), 1.63 (m, 2H,  $\text{H}_d$ ), 1.49 (m, 2H,  $\text{H}_c$ ).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.60 (s, 1P,  $\text{P}^?$ , outside/ $2^{\text{nd}}$ ary rim side), 3.44 (s, 1P, P, inside/ $1^{\text{st}}$ ary rim side).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  calc  $[(\text{C}_6\text{H}_{16}\text{O}_8\text{P}_2)(\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{30})-2\text{H}]^{2-}$  624.1672; found 624.1708.

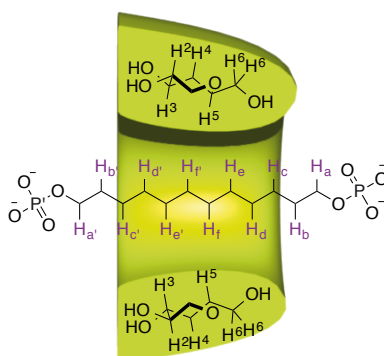
**Pseudo-[2]rotaxane-C<sub>10</sub> (85)**

*Pseudo*-[2]RotCD of C<sub>10</sub> (**85**) was prepared by addition of  $\alpha$ -cyclodextrin (1 eq.) to a solution of decane-diphosphate (**79**) in deuterium oxide (1.0 ml; c = 15 mM) previously adjusted to pH 10 by addition of potassium carbonate. The solution was allowed to return to the equilibrium for a week at room temperature.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.09 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 6H, H<sup>1</sup>), 4.04 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 6H, H<sup>3</sup>), 3.98 – 3.81 (m, 20H, H<sup>5,6</sup>, H<sub>a</sub>), 3.79 – 3.70 (m, 2H, H<sub>a'</sub>), 3.67 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 6H, H<sup>4</sup>), 3.59 (dd,  $J$  = 10.0, 3.3 Hz, 6H, H<sup>2</sup>), 1.80 – 1.68 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 1.68 – 1.52 (m, 4H, H<sub>b'</sub>), 1.51 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.10 (m, 8H).

**<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  4.04 (P<sup>3</sup>), 3.77 (P).

**MS (ESI):**  $m/z$  calc [(C<sub>10</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>P<sub>2</sub>)(C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>30</sub>)-2H]<sup>2-</sup> 652.20; found 652.19.

**Pseudo-[2]rotaxane-C<sub>12</sub> (87)**

*Pseudo*-[2]RotCD of C<sub>12</sub> (**87**) was prepared by addition of  $\alpha$ -cyclodextrin (1 eq.) to a solution of dodecane-diphosphate (**80**) in deuterium oxide (1.0 ml; c = 15 mM) previously adjusted to



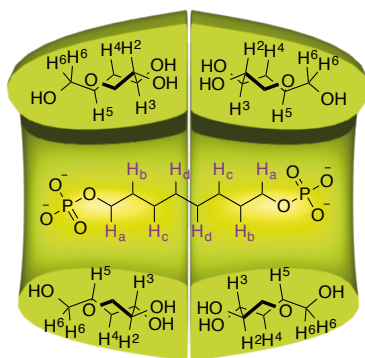
pH 10 by addition of potassium carbonate. The solution was allowed to return to the equilibrium for a week at room temperature.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.10 (d,  $J = 3.3$  Hz, 6H,  $\text{H}^1$ ), 4.03 (t,  $J = 9.4$  Hz, 6H,  $\text{H}^3$ ), 3.97 – 3.90 (m, 12H,  $\text{H}^6$ ), 3.89 – 3.83 (m, 8H,  $\text{H}^5$ ,  $\text{H}_a$ ), 3.80 – 3.72 (m, 2H,  $\text{H}_a'$ ), 3.69 (t,  $J = 9.4$  Hz, 6H,  $\text{H}^4$ ), 3.60 (dd,  $J = 10.0, 3.3$  Hz, 6H,  $\text{H}^2$ ), 1.80 – 1.69 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 1.67 – 1.52 (m, 4H,  $\text{H}_{b',c}$ ), 1.52 – 1.41 (m, 2H), 1.41 – 1.28 (m, 8H), 1.28 – 1.16 (m, 4H).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.06 ( $\text{P}'$ ), 3.77 ( $\text{P}$ ).

HRMS (ESI):  $m/z$  calc  $[(\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{P}_2)(\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{30})\text{-}2\text{H}]^{2-}$  666.2142; found 666.2151.

### *Pseudo*-[3]rotaxane- $\text{C}_8$ (**84**)

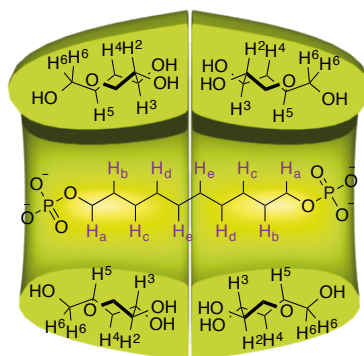


*Pseudo*-[3]RotCD of  $\text{C}_8$  (**84**) was prepared at room temperature by addition of  $\alpha$ -cyclodextrin (2.6 eq.) to a solution of octane-diphosphate (**78**) in deuterium oxide (1.0 ml;  $c = 15$  mM; pH 1). Then, pH was adjusted to 10 by addition of potassium carbonate.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.01 (d,  $J = 3.4$  Hz, 12H,  $\text{H}^1$ ), 4.46 (d,  $J = 12.9$  Hz, 12H,  $\text{H}^6$ ), 4.21 – 4.13 (m, 12H,  $\text{H}^5$ ), 3.89 (m, 16H,  $\text{H}^3$ ,  $\text{H}_a$ ), 3.62 – 3.54 (m, 12H,  $\text{H}^2$ ), 3.46 (dd,  $J = 12.9, 9.3$  Hz, 12H,  $\text{H}^6$ ), 3.43 – 3.36 (t,  $J = 9.3$  Hz, 12H,  $\text{H}^4$ ), 2.04 – 1.94 (m, 4H,  $\text{H}_b$ ), 1.53 (m, 8H,  $\text{H}_{c,d}$ ).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.41.

HRMS (ESI):  $m/z$  calc  $[(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_8\text{P}_2)(\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{30})\text{-}2\text{H}]^{2-}$  1124.3413; found 1124.3457.

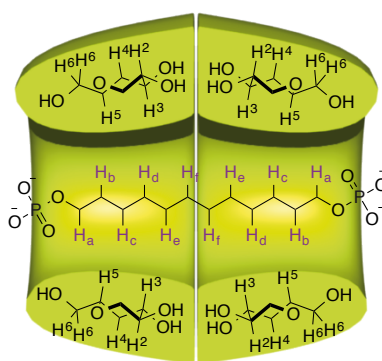
**Pseudo-[3]rotaxane-C<sub>10</sub> (86)**

*Pseudo*-[3]RotCD of C<sub>10</sub> (**86**) was prepared at room temperature by addition of  $\alpha$ -cyclodextrin (2.2 eq.) to a solution of decane-diphosphate (**79**) in deuterium oxide (1.0 ml; c = 15 mM; pH 1). Then, pH was adjusted to 10 by addition of potassium carbonate.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.00 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 12H, H<sup>1</sup>), 4.31 (d,  $J$  = 10.7 Hz, 12H, H<sup>6</sup>), 4.11 – 4.02 (m, 12H, H<sup>5</sup>), 3.89 (t,  $J$  = 9.3 Hz, 12H, H<sup>3</sup>), 3.85 – 3.77 (m, 4H, H<sub>a</sub>), 3.59 – 3.48 (m, 24H, H<sup>2,6</sup>), 3.43 (t,  $J$  = 9.3 Hz, 12H, H<sup>4</sup>), 1.87 – 1.75 (m, 4H, H<sub>b</sub>), 1.66 – 1.58 (broad s, 8H, H<sub>d,e</sub>), 1.56 – 1.42 (m, 4H, H<sub>c</sub>).

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.84.

HRMS (ESI):  $m/z$  calc [(C<sub>10</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>P<sub>2</sub>)(C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>30</sub>)<sub>2</sub>-2H]<sup>2-</sup> 1138.3570; found 1138.3532.

**Pseudo-[3]rotaxane-C<sub>12</sub> (88)**

*Pseudo*-[3]RotCD of C<sub>12</sub> (**88**) was prepared at room temperature by addition of  $\alpha$ -cyclodextrin (2.1 eq.) to a solution of dodecane-diphosphate (**80**) in deuterium oxide (1.0 ml ; c = 15 mM; pH 1). Then, pH was adjusted to 10 by addition of potassium carbonate.

Experimental Section

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.04 (d,  $J = 3.3$  Hz, 12H,  $\text{H}^1$ ), 4.20 (d,  $J = 10.7$  Hz, 12H,  $\text{H}^6$ ), 4.09 – 3.99 (m, 12H,  $\text{H}^5$ ), 3.91 (t,  $J = 9.3$  Hz, 12H,  $\text{H}^3$ ), 3.86 – 3.78 (m, 4H,  $\text{H}_a$ ), 3.69 (dd,  $J = 12.5, 6.6$  Hz, 12H,  $\text{H}^6$ ), 3.59 – 3.51 (m, 24H,  $\text{H}^{2,4}$ ), 1.82 – 1.69 (m, 4H,  $\text{H}_b$ ), 1.58 – 1.49 (broad s, 4H,  $\text{H}_f$ ), 1.49 – 1.40 (broad s, 4H,  $\text{H}_e$ ), 1.39 – 1.26 (broad s, 8H,  $\text{H}_{c,d}$ ).

**$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR** (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.53.

**MS (ESI):**  $m/z$  calc  $[(\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{P}_2)(\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{30})_2-2\text{H}]^{2-}$  1152.37; found 1152.87.

---

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

---



AC	Agent de contraste
Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
ADMet	Acyclic diene metathesis
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Atomic force microscope
ALN	Alendronate
Ant	Antenne
Ar	Argon
ARN	Acide ribonucléique
ATRP	Atom-transfer radical-polymerization
BIBB	2-Bromoisobutyryl
BODIPY	Bore-dipyrométhène
calc	Calculated
CD	Cyclodextrine
CI	Conversion interne
CIS	Conversion inter-système
C <sub>q</sub>	Carbone quaternaire
CuAAC	Copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition
Cy	Cyclohexane
d	Doublet
DCM	Dichlorométhane
DIBAL-H	Diisobutylaluminium hydride
DLS	Dynamic light scattering
DMC	2-Chloro-1,3-diméthylimidazolium
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOSY	Diffusion ordered spectroscopy
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
DOX	Doxorubicine
DRX	Diffraction des rayons X
DTT	Dithiothréitol
eq	équivalent
ESI	Electrospray Ionization
ex	Excitation
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Gal	Galectin
HOESY	Heteronuclear overhauser effect spectroscopy
HRMS	High resolution mass spectrometry
HSA	Human serum albumin
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration
ICP	Inductively coupled plasma
Im	Imidazole

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ImIm	2-Imidazolyl-1,3-diméthylimidazolium
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique
Ln	Lanthanide
m	Multiplet
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MW	Microwave
NMRD	Nuclear magnetic relaxation dispersion
NOE	Nuclear overhauser effect
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NP	Nanoparticule
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Poly(éthylène glycol)
PMDETA	<i>N,N,N',N'',N''</i> -Pentamethyldiethylenetriamine
PMeCD	<i>Per</i> -methylated cyclodextrin
PPG	Poly(propylène glycol)
ppm	Partie par million
PPR	<i>Pseudopolyrotaxane</i>
PR	Polyrotaxane
q	Quadruplet
quint	Quintuplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RT	Room temperature
s	Singulet
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
t	Triplet
TBABr	Tetrabutylammonium bromide
<sup>t</sup> Bu	<i>Tert</i> -butyl
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenone
THF	Tétrahydrofurane
TMSA	Triméthylsilylacétylène
TROESY	Transverse rotating-frame overhauser enhancement spectroscopy
UV	Ultra-violet

---

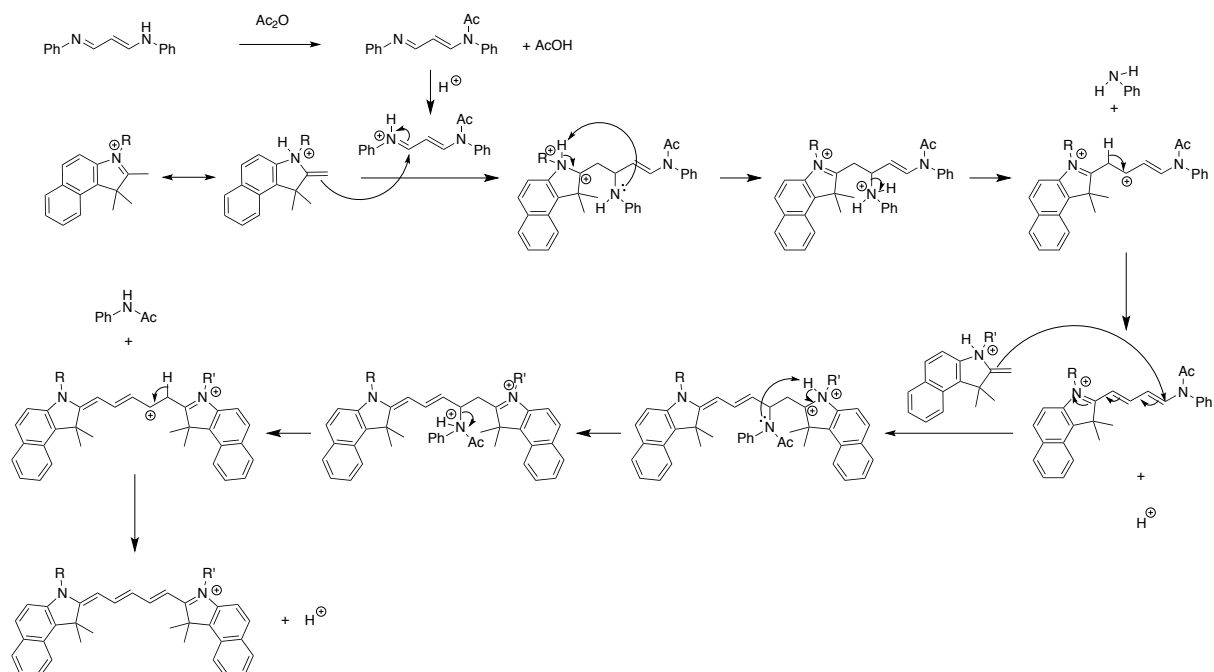
## **ANNEXES**

---



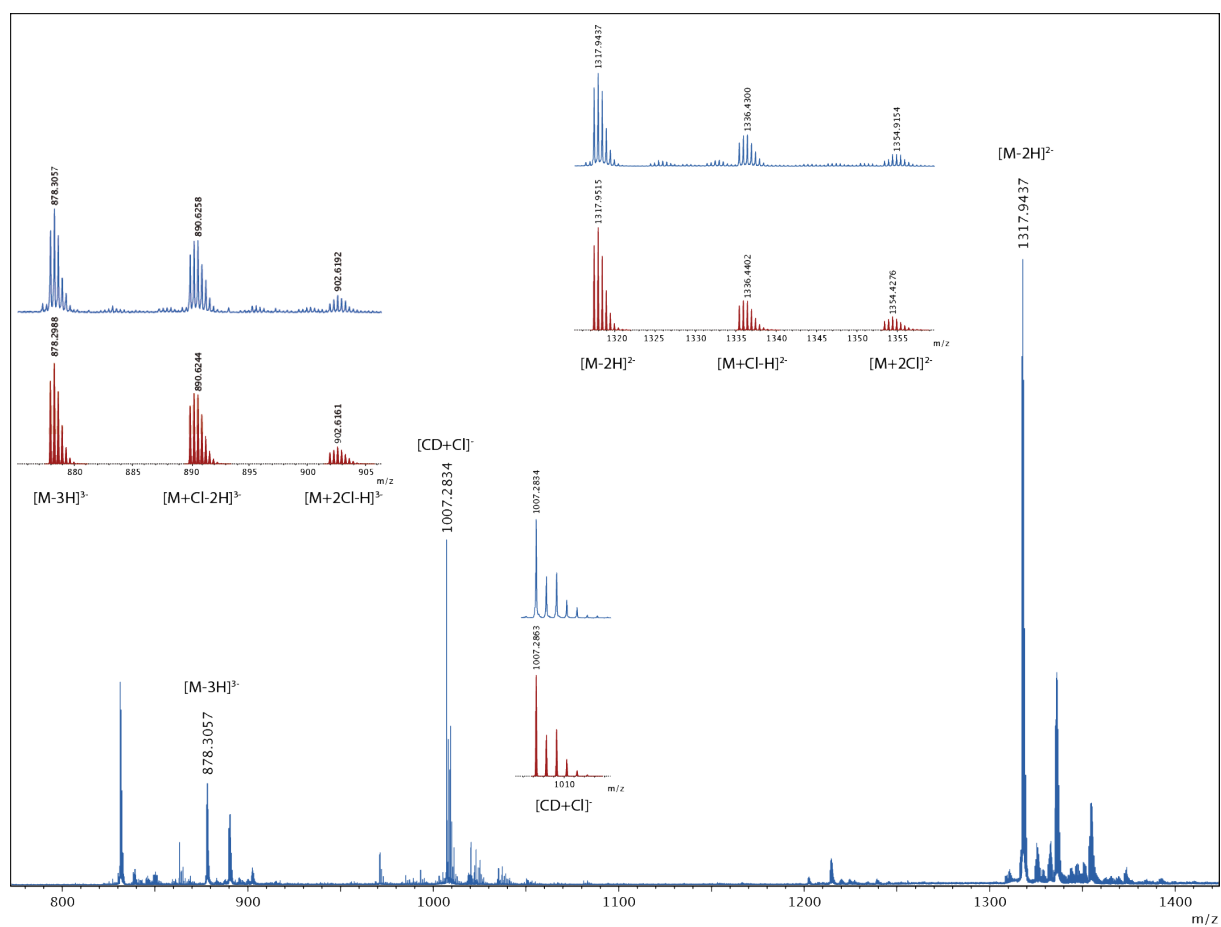


### Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse d'une cyanine 5.5

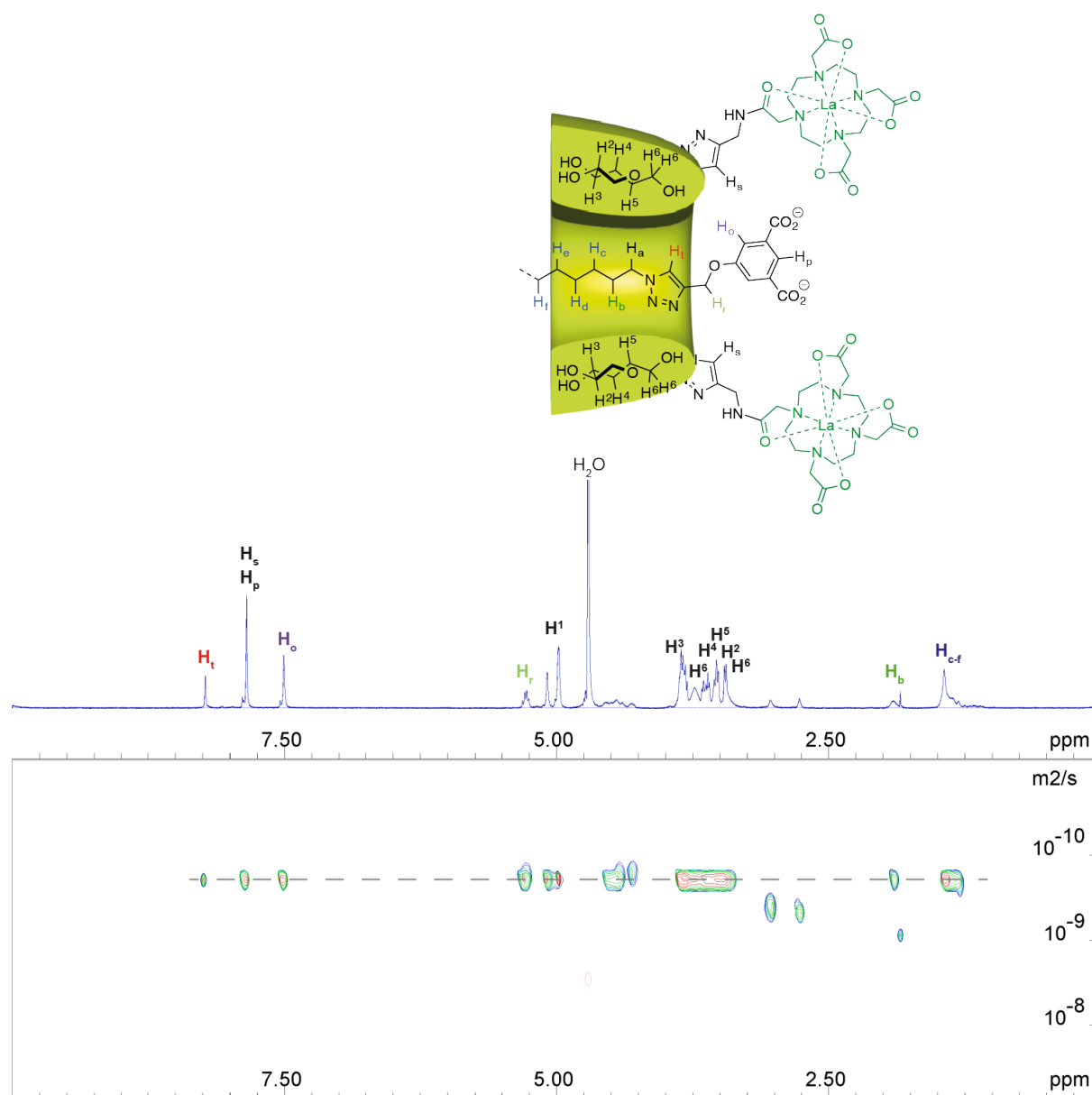


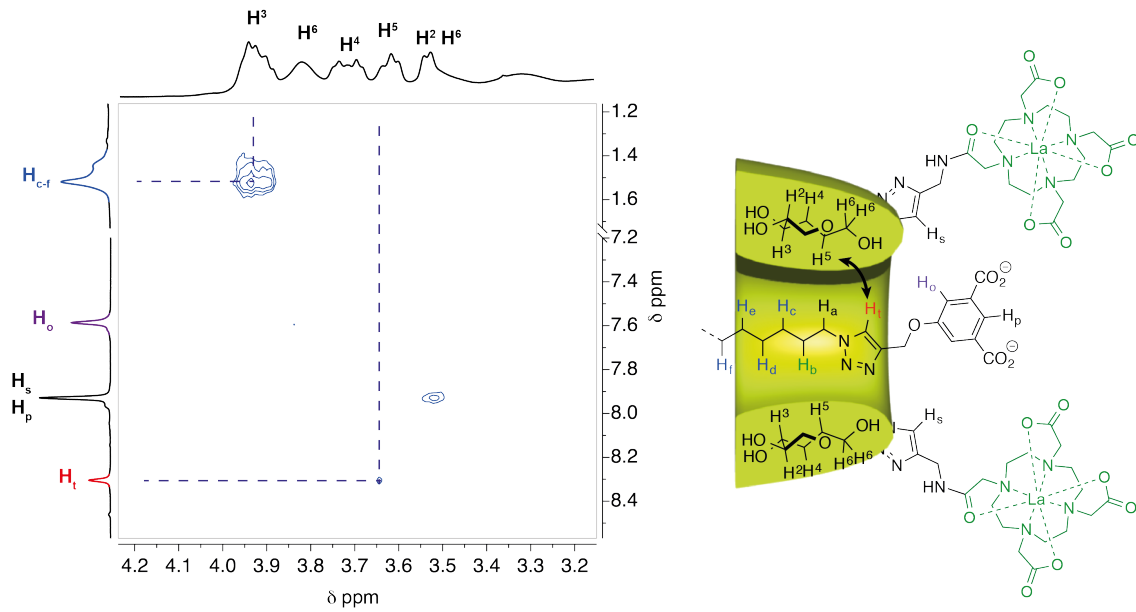
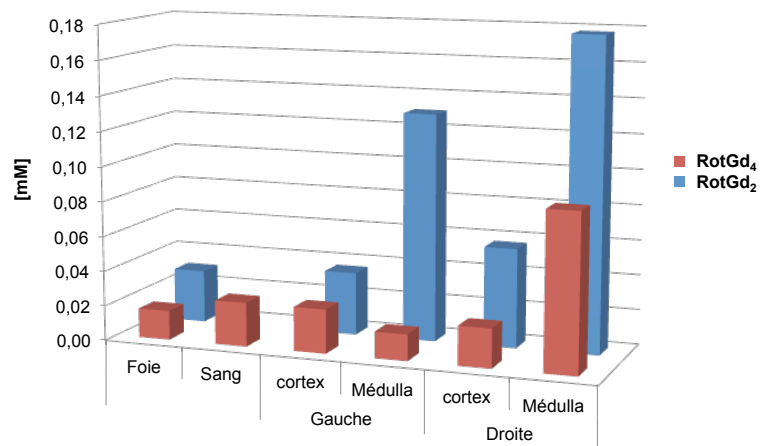
Annexe 1 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation d'une cyanine 5.5

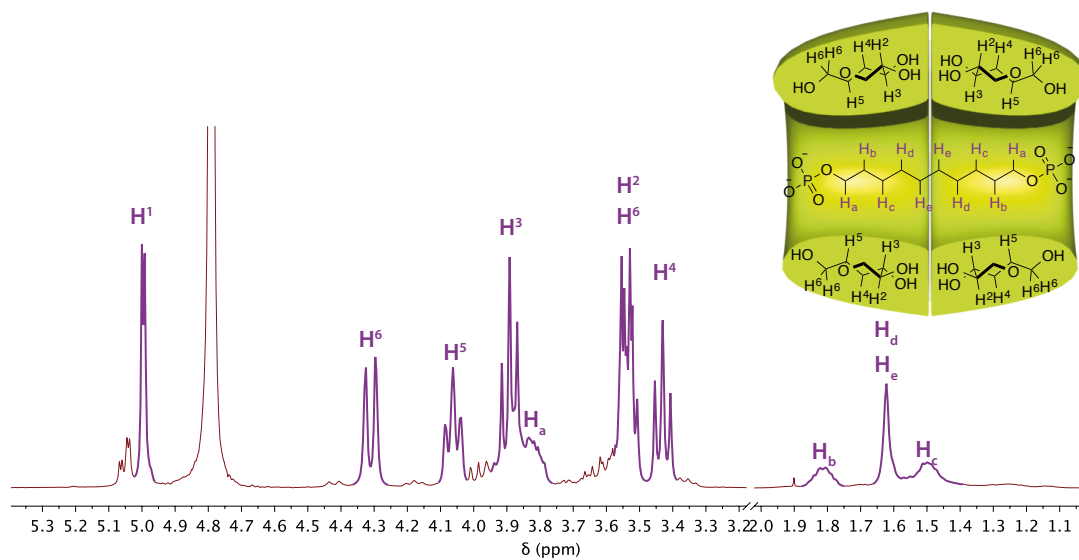
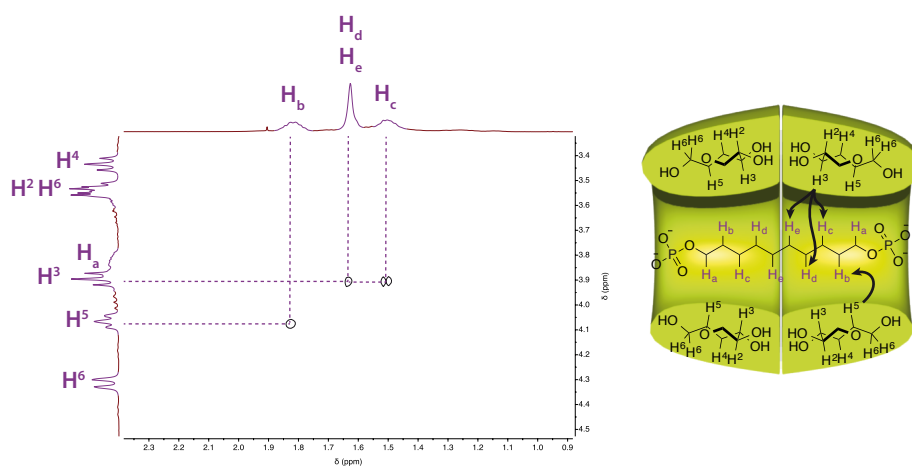
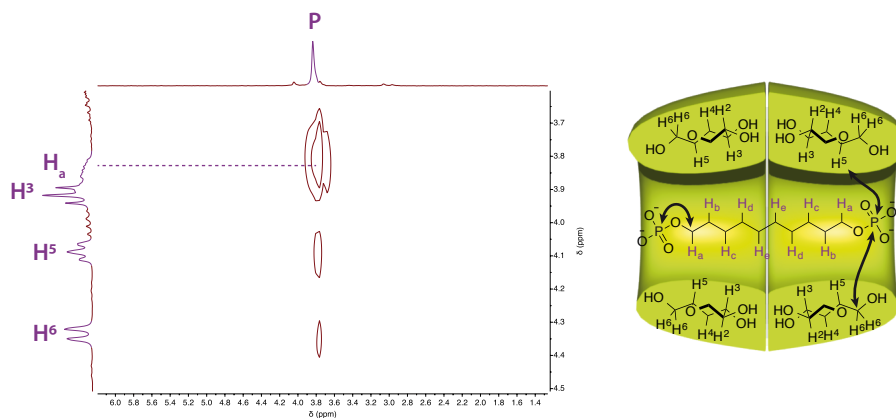
## Spectre de masse du [3]Rot-CD (68)

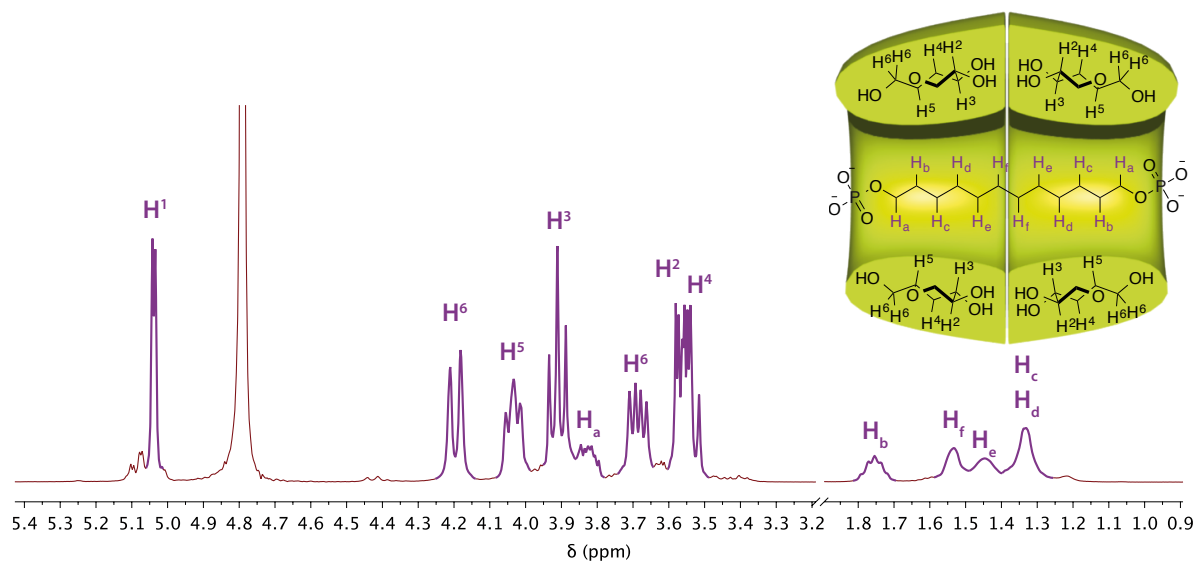
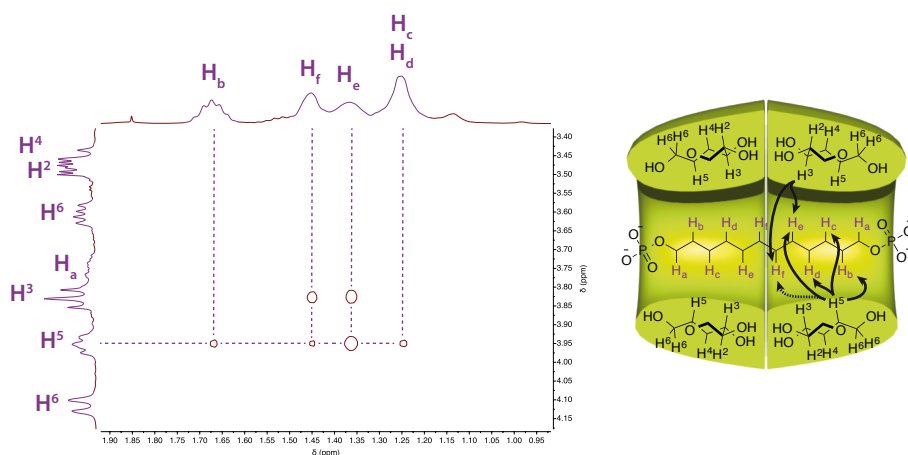
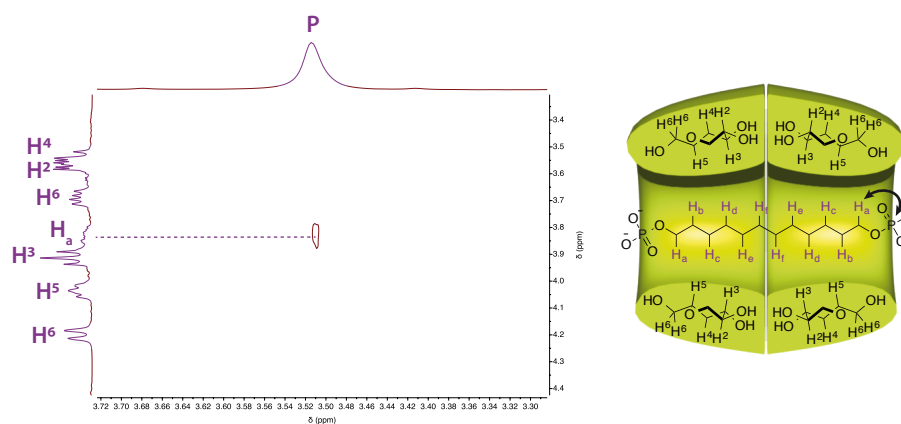


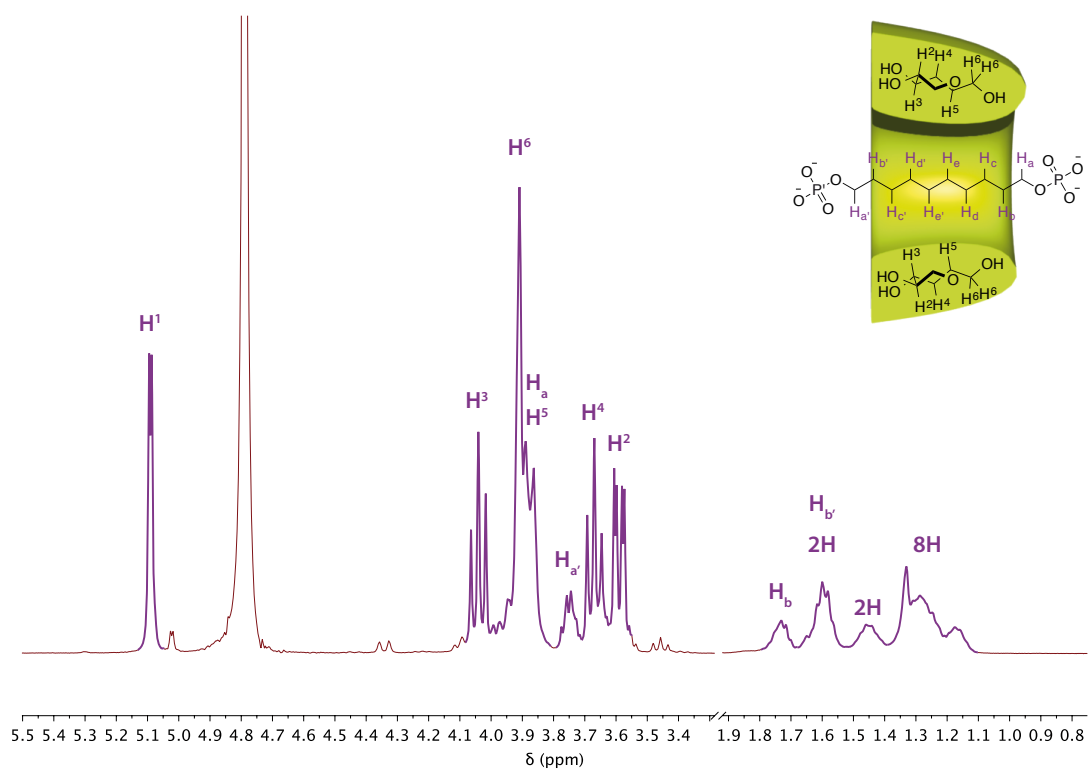
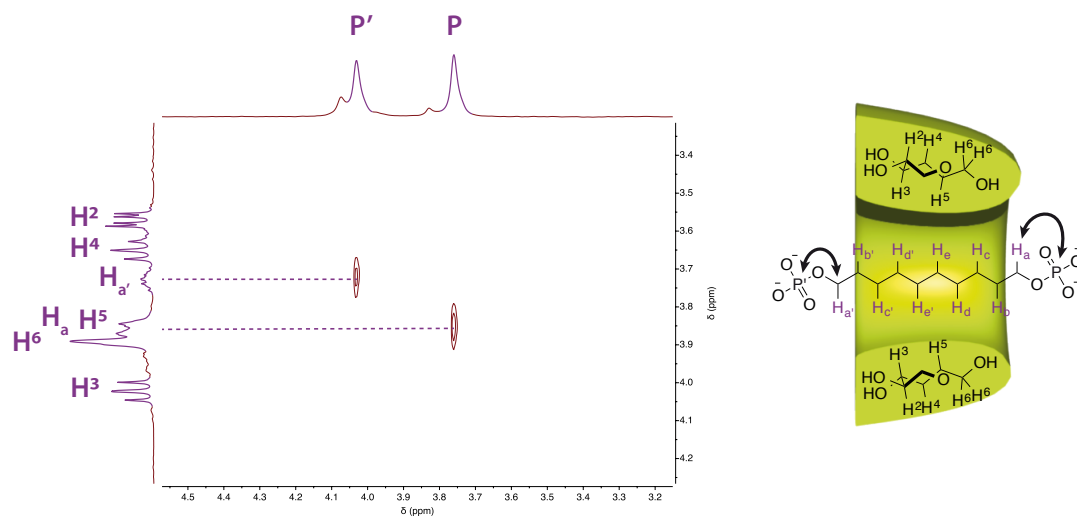
Annexe 2 : Spectre de masse haute résolution (ESI, Négatif) de [3]Rot-CD (68). Spectre observé en bleu, calculé en rouge.

Spectre RMN DOSY  $^1\text{H}$  de RotLa<sub>4</sub> (71)Annexe 3 : Spectre RMN DOSY  $^1\text{H}$  (600 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K) de RotLa<sub>4</sub> (71)

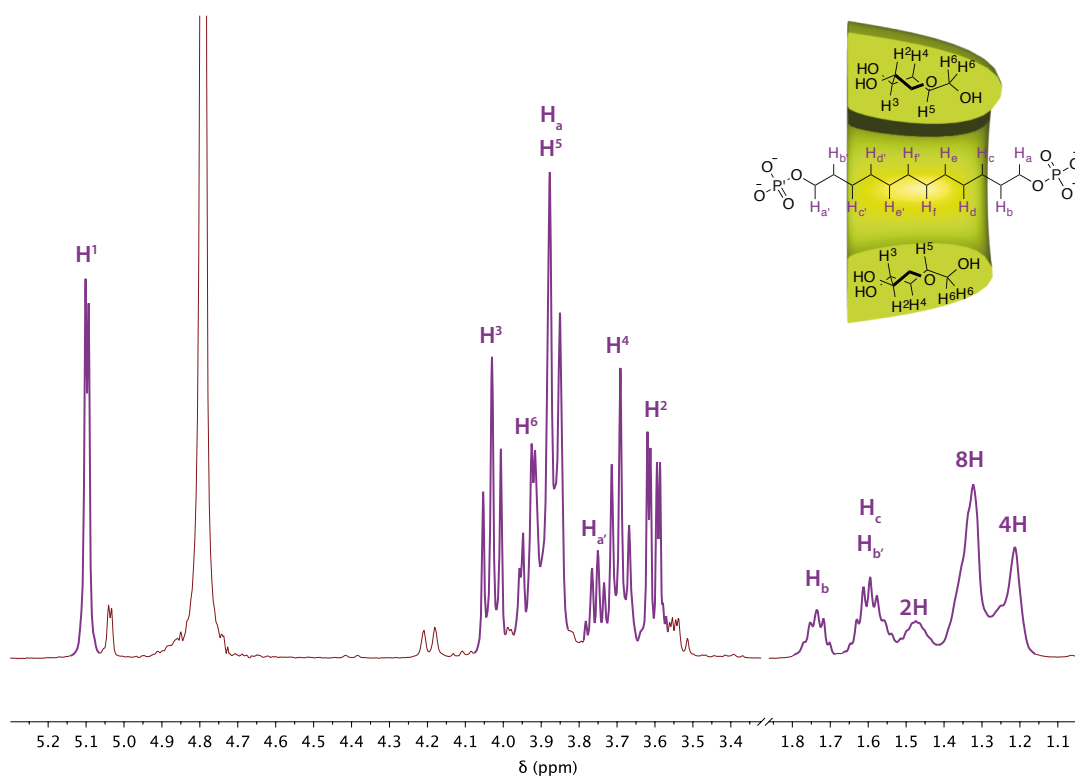
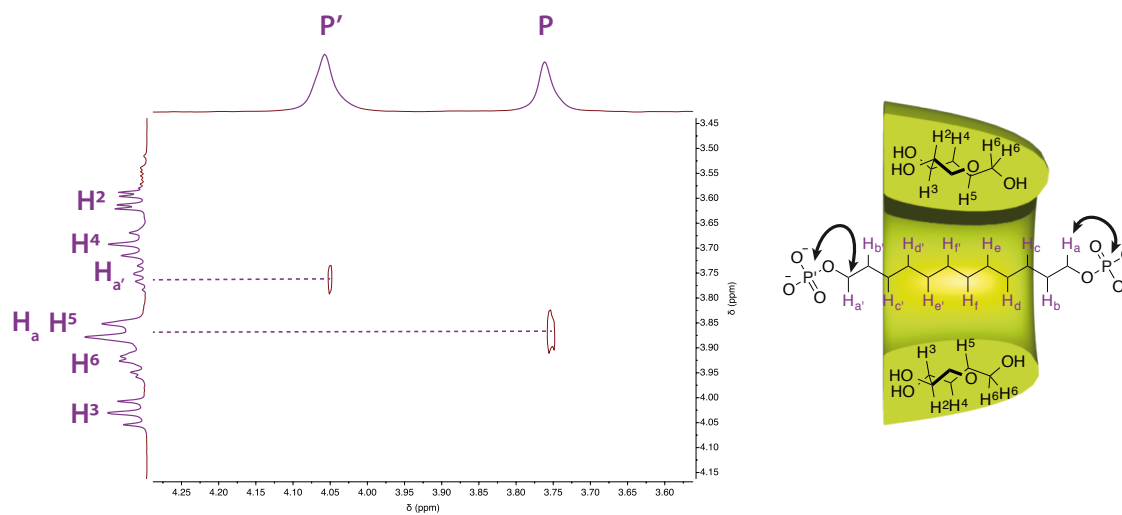
Spectre RMN TROESY  $^1\text{H}$  de RotLa<sub>4</sub> (71)Annexe 4 : Spectre RMN TROESY  $^1\text{H}$  (600 MHz, D<sub>2</sub>O) de RotLa<sub>4</sub> (71)Concentration résiduelle en gadolinium 40 après l'injection de RotGd<sub>2</sub> et RotGd<sub>4</sub>Annexe 5 : Concentration (mM) en Gd(III) dans différents organes 40 minutes après l'injection de RotGd<sub>2</sub> ou RotGd<sub>4</sub>

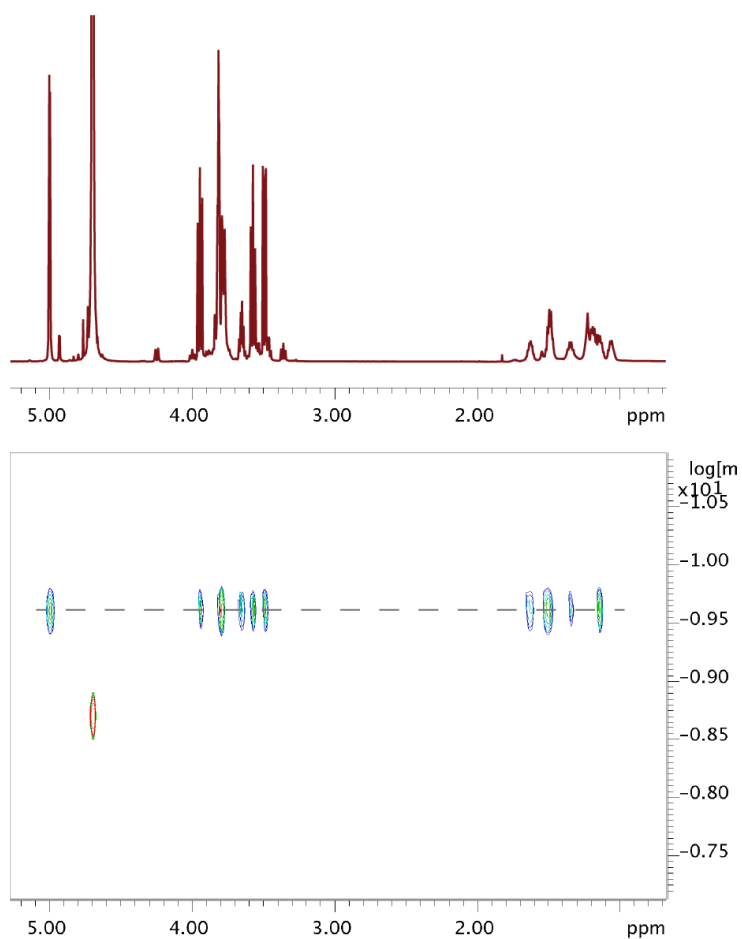
Spectres RMN du *pseudo*-[3]rotaxane **86** (C<sub>10</sub>)Annexe 6 : Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[3]rotaxane **86** (C<sub>10</sub>)Annexe 7 : Spectre RMN TROESY <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[3]rotaxane **86** (C<sub>10</sub>)Annexe 8 : Spectre RMN HOESY (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}/<sup>1</sup>H) (400 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[3]rotaxane **86** (C<sub>10</sub>)

Spectres RMN du *pseudo*-[3]rotaxane **88** (C<sub>12</sub>)Annexe 9 : Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[3]rotaxane **88** (C<sub>12</sub>)Annexe 10 : Spectre RMN TROESY <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[3]rotaxane **88** (C<sub>12</sub>)Annexe 11 : Spectre RMN HOESY (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}/<sup>1</sup>H) (400 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[3]rotaxane **88** (C<sub>12</sub>)

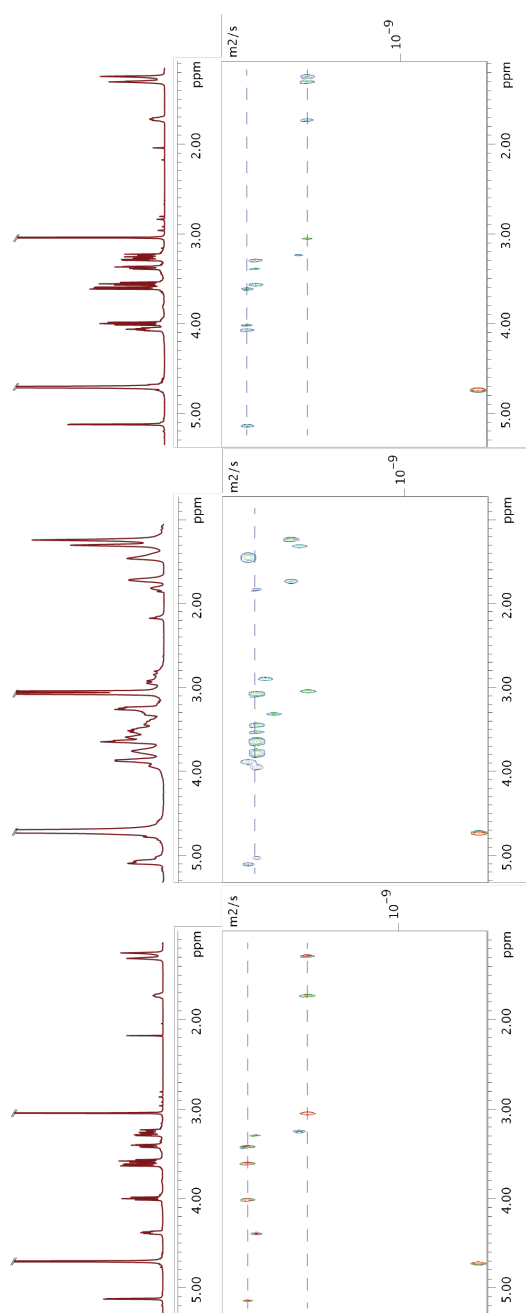
Spectres RMN du *pseudo*-[2]rotaxane **85** (C<sub>10</sub>)Annexe 12 : Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[2]rotaxane **85** (C<sub>10</sub>)Annexe 13 : Spectre RMN HOESY (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}/<sup>1</sup>H) (400 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[2]rotaxane **85** (C<sub>10</sub>)



Spectres RMN du *pseudo*-[2]rotaxane **87** (C<sub>12</sub>)Annexe 14 : Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[2]rotaxane **87** (C<sub>12</sub>)Annexe 15 : Spectre RMN HOESY (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}/<sup>1</sup>H) (400 MHz, D<sub>2</sub>O) du *pseudo*-[2]rotaxane **87** (C<sub>12</sub>)

**Spectre RMN DOSY  $^1\text{H}$  du *pseudo*-[2]rotaxane **85** ( $\text{C}_{10}$ )**

Annexe 16 : Spectre RMN DOSY  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) du *pseudo*-[2]rotaxane **85** ( $\text{C}_{10}$ ) ( $c = 15$  mM, pH 10,  $25^\circ\text{C}$ )

**Suivi de l'enfilage et du désenfilage de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  (105) sur le 1,12-diammonium dodécane *per*-méthylé (24) par RMN DOSY  $^1\text{H}$** 

Annexe 17 : Spectres RMN DOSY  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) d'une solution de monomère modèle (24) et de  $\text{CD}(\text{NH}_2)_6$  (105) en mélange 1:1 à 10 mM dans  $\text{D}_2\text{O}$  conditionnée à pH 1 par ajout de TFA (a), après enfilage à pH 10 ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (b), après désenfilage à pH 1 (TFA) (c)

---

## **BIBLIOGRAPHIE**

---



1. (a) Wasserman, E., *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4433-4434; (b) Harrison, I. T.; Harrison, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5723-5724; (c) Dietrich - Buchecker, C. O.; Sauvage, J. P., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 189-192.
2. Steed, J. W.; Atwood, J. L., Concepts. In *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd: 2009; pp 1-48.
3. Steed, J. W.; Atwood, J. L., Molecular Guests in Solution. In *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd: 2009; pp 307-384.
4. Frisch, H.; Martin, I.; Mark, H., *Monatsh. Chem.* **1953**, *84*, 250-256.
5. Patat, F.; Derst, P., *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 105-110.
6. Zheng, B.; Wang, F.; Dong, S.; Huang, F., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1621-1636.
7. (a) Nepogodiev, S. A.; Stoddart, J. F., *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1959-1976; (b) Wenz, G.; Han, B.-H.; Müller, A., *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782-817.
8. (a) Ciao, R.; Talotta, C.; Gaeta, C.; Margarucci, L.; Casapullo, A.; Neri, P., *Org Lett* **2013**, *15*, 5694-5697; (b) Arduini, A.; Bussolati, R.; Credi, A.; Secchi, A.; Silvi, S.; Semeraro, M.; Venturi, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9924-9930; (c) Zanichelli, V.; Ragazzon, G.; Arduini, A.; Credi, A.; Franchi, P.; Orlandini, G.; Venturi, M.; Lucarini, M.; Secchi, A.; Silvi, S., *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1033-1042.
9. Kim, K., *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 96-107.
10. (a) Trinh, T. M. N.; Nierengarten, I.; Holler, M.; Gallani, J. L.; Nierengarten, J. F., *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8019-8022; (b) Xiong, S.; Zhang, X.; Meng, L.-B.; Jiang, J.; Lin, C.; Wang, L., *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6504-6507.
11. (a) Ikeda, T.; Higuchi, M., *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3046-3052; (b) Sue, C.-H.; Basu, S.; Fahrenbach, A. C.; Shveyd, A. K.; Dey, S. K.; Botros, Y. Y.; Stoddart, J. F., *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 119-125.
12. Ogino, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1303-1304.
13. Stoddart, J. F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11102-11104.
14. Wang, L. Y.; Ko, J. L.; Lai, C. C.; Liu, Y. H.; Peng, S. M.; Chiu, S. H., *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8850-8860.
15. Gibson, H. W.; Wang, H.; Niu, Z.; Slebodnick, C.; Zhakharov, L. N.; Rheingold, A. L., *Macromolecules* **2012**, *45*, 1270-1280.
16. (a) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M., *Nature* **1992**, *356*, 325-327; (b) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M., *Nature* **1993**, *364*, 516-518; (c) Harada, A.; Li, J.; Nakamitsu, T.; Kamachi, M., *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7524-7528; (d) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M., *Nature* **1994**, *370*, 126-128; (e) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3192-3196.
17. (a) Wenz, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 803-822; (b) Herrmann, W.; Keller, B.; Wenz, G., *Macromolecules* **1997**, *30*, 4966-4972; (c) Herrmann, W.; Schneider, M.; Wenz, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2511-2514; (d) Weickenmeier, M.; Wenz, G., *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 1109-1115.
18. (a) Harada, A.; Kamachi, M., *Macromolecules* **1990**, *23*, 2821-2823; (b) Harada, A.; Kamachi, M., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1322-1323.
19. Harada, A.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H., *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 875-882.
20. Wenz, G.; Keller, B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 197-199.
21. (a) Loethen, S.; Kim, J.-M.; Thompson, D. H., *Polym. Rev.* **2007**, *47*, 383-418; (b) Wenz, G., Recognition of Monomers and Polymers by Cyclodextrins. In *Inclusion Polymers*, Wenz, G., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2009; pp 204-254; (c) Araki, J.; Ito, K., *Soft Matter* **2007**, *3*, 1456-1473.
22. (a) Gu, Z.; Zhang, L.; Su, T.; He, B., *Nano-Micro Lett.* **2014**, *6*; (b) Jung, S.; Swamy, B. Y.; Moon, J.-B.; Kim, D.-H.; Chung, I., *J. Polym. Sci. A* **2012**, *50*, 4895-4901; (c) Tardy, B. L.; Dam, H. H.; Kamphuis, M. M.; Richardson, J. J.; Caruso, F., *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 53-59.
23. Liu, R.; Lai, Y.; He, B.; Li, Y.; Wang, G.; Chang, S.; Gu, Z., *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5249-5258.
24. Hosseini, F.; Panahifar, A.; Adeli, M.; Amiri, H.; Lascialfari, A.; Orsini, F.; Doschak, M. R.; Mahmoudi, M., *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *103*, 652-657.
25. Adeli, M.; Sarabi, R. S.; Yadollahi Farsi, R.; Mahmoudi, M.; Kalantari, M., *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 18686.

26. (a) Adeli, M.; Hakimpoor, F.; Parsamanesh, M.; Kalantari, M.; Sobhani, Z.; Attyabi, F., *Polymer* **2011**, *52*, 2401-2413; (b) Adeli, M.; Kalantari, M.; Parsamanesh, M.; Sadeghi, E.; Mahmoudi, M., *Nanomedicine* **2011**, *7*, 806-817.
27. Huang, H.; Cao, D.; Qin, L.; Tian, S.; Liang, Y.; Pan, S.; Feng, M., *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 2323-2333.
28. Mamad-Hemouch, H.; Ramoul, H.; Abou Taha, M.; Bacri, L.; Huin, C.; Przybylski, C.; Oukhaled, A.; Thiebot, B.; Patriarche, G.; Jarroux, N.; Pelta, J., *Nano Lett* **2015**, *15*, 7748-7754.
29. (a) Shimomura, T.; Akai, T.; Abe, T.; Ito, K., *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 1753; (b) Frampton, M. J.; Anderson, H. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1028-1064.
30. (a) Terao, J.; Tsuda, S.; Tanaka, Y.; Okoshi, K.; Fujihara, T.; Tsuji, Y.; Kambe, N., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16004-16005; (b) Tsuda, S.; Terao, J.; Tanaka, Y.; Maekawa, T.; Kambe, N., *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1146-1150; (c) Terao, J.; Tsuda, S.; Tsurui, K.; Kambe, N., *Macromol. Symp.* **2010**, *297*, 54-60; (d) Terao, J., *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 2444; (e) Terao, J.; Ikai, K.; Kambe, N.; Seki, S.; Saeki, A.; Ohkoshi, K.; Fujihara, T.; Tsuji, Y., *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6816-6818; (f) Terao, J.; Homma, K.; Konoshima, Y.; Imoto, R.; Masai, H.; Matsuda, W.; Seki, S.; Fujihara, T.; Tsuji, Y., *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 658-660; (g) Masai, H.; Terao, J.; Seki, S.; Nakashima, S.; Kiguchi, M.; Okoshi, K.; Fujihara, T.; Tsuji, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1742-1745.
31. Ito, K.; Kato, K.; Mayumi, K., Mechanical Properties of Slide-ring Materials. In *Polyrotaxane and Slide-Ring Materials*, RSC: 2016; pp 44-77.
32. (a) Kato, K.; Inoue, K.; Kidowaki, M.; Ito, K., *Macromolecules* **2009**, *42*, 7129-7136; (b) Kato, K.; Yasuda, T.; Ito, K., *Macromolecules* **2013**, *46*, 310-316.
33. Sugihara, N.; Tominaga, Y.; Shimomura, T.; Ito, K., *Electrochim. Acta* **2015**, *169*, 433-439.
34. Takashima, Y.; Yuting, Y.; Otsubo, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A., *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1594-1600.
35. Inutsuka, M.; Inoue, K.; Hayashi, Y.; Inomata, A.; Sakai, Y.; Yokoyama, H.; Ito, K., *Polymer* **2015**, *59*, 10-15.
36. Bin Imran, A.; Esaki, K.; Gotoh, H.; Seki, T.; Ito, K.; Sakai, Y.; Takeoka, Y., *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5124.
37. Zhou, L.; Li, J.; Luo, Q.; Zhu, J.; Zou, H.; Gao, Y.; Wang, L.; Xu, J.; Dong, Z.; Liu, J., *Soft Matter* **2013**, *9*, 4635.
38. Li, J. J.; Zhao, F.; Li, J., Supramolecular Polymers Based on Cyclodextrins for Drug and Gene Delivery. In *Biofunctionalization of Polymers and their Applications*, Nyanhongo, S. G.; Steiner, W.; Gübitz, G., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2011; pp 207-249.
39. (a) Yui, N.; Ooya, T., *J. Artif. Organs* **2004**, *7*, 62-68; (b) Vyas, A.; Saraf, S.; Saraf, S., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *62*, 23-42; (c) Li, J. J.; Zhao, F.; Li, J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 427-443; (d) Higashi, T.; Motoyama, K.; Arima, H., *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2013**, *23*, 523-529.
40. (a) Nyanhongo, G. S.; Steiner, W.; Gübitz, G. M., *Biofunctionalization of polymers and their applications*. Springer Berlin Heidelberg: 2011; (b) Yui, N.; Katoono, R.; Yamashita, A., Functional Cyclodextrin Polyrotaxanes for Drug Delivery. In *Inclusion Polymers*, Wenz, G., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2009; pp 115-173; (c) Li, J., Cyclodextrin Inclusion Polymers Forming Hydrogels. In *Inclusion Polymers*, Wenz, G., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2009; pp 175-203.
41. (a) Watanabe, J.; Ooya, T.; Nitta, K.-H.; Park, K. D.; Kim, Y. H.; Yui, N., *Biomaterials* **2002**, *23*, 4041-4048; (b) Tachaboonyakiat, W.; Furubayashi, T.; Katoh, M.; Ooya, T.; Yui, N., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2004**, *15*, 1389-1404; (c) Fujimoto, M.; Isobe, M.; Yamaguchi, S.; Amagasa, T.; Watanabe, A.; Ooya, T.; Yui, N., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2005**, *16*, 1611-1621; (d) Ooya, T.; Ichi, T.; Furubayashi, T.; Katoh, M.; Yui, N., *React. Funct. Polym.* **2007**, *67*, 1408-1417.
42. Ooya, T.; Mori, H.; Terano, M.; Yui, N., *Macromol. Rapid Commun.* **1995**, *16*, 259-263.
43. Watanabe, J.; Ooya, T.; Yui, N., *J. Artif. Organs* **2000**, *3*, 136-142.
44. Lee, W. K.; Ichi, T.; Ooya, T.; Yamamoto, T.; Katoh, M.; Yui, N., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *67A*, 1087-1092.
45. Liu, S.; Xie, R.; Cai, J.; Wang, L.; Shi, X.; Ren, L.; Wang, Y., *RSC Adv.* **2015**, *5*, 46088-46094.
46. Li, J.; Ni, X.; Leong, K. W., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *65A*, 196-202.
47. He, B.; Zeng, J.; Nie, Y.; Ji, L.; Wang, R.; Li, Y.; Wu, Y.; Li, L.; Wang, G.; Luo, X.; Zhang, Z.; Gu, Z., *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 1169-1175.

48. Born, M.; Koch, T.; Ritter, H., *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196*, 1761-1767.
49. Ooya, T.; Ito, A.; Yui, N., *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 379-383.
50. Nishida, K.; Tamura, A.; Yui, N., *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 4040-4047.
51. (a) Ooya, T.; Choi, H. S.; Yamashita, A.; Yui, N.; Sugaya, Y.; Kano, A.; Maruyama, A.; Akita, H.; Ito, R.; Kogure, K.; Harashima, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3852-3853; (b) Yamashita, A.; Yui, N.; Ooya, T.; Kano, A.; Maruyama, A.; Akita, H.; Kogure, K.; Harashima, H., *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2861-2869; (c) Yamashita, A.; Kanda, D.; Katoono, R.; Yui, N.; Ooya, T.; Maruyama, A.; Akita, H.; Kogure, K.; Harashima, H., *J. Control. Release* **2008**, *131*, 137-144.
52. (a) Park, H. D.; Lee, W. K.; Ooya, T.; Park, K. D.; Kim, Y. H.; Yui, N., *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 186-190; (b) Joung, Y. K.; Sengoku, Y.; Ooya, T.; Park, K. D.; Yui, N., *Sci. Tech. Adv. Mater* **2016**, *6*, 484-490.
53. (a) Tamura, A.; Yui, N., *Biomaterials* **2013**, *34*, 2480-2491; (b) Badwaik, V. D.; Aicart, E.; Mondjinou, Y. A.; Johnson, M. A.; Bowman, V. D.; Thompson, D. H., *Biomaterials* **2016**, *84*, 86-98; (c) Wen, C.; Hu, Y.; Xu, C.; Xu, F. J., *Acta Biomater.* **2016**, *32*, 110-119; (d) Badwaik, V.; Mondjinou, Y.; Kulkarni, A.; Liu, L.; Demoret, A.; Thompson, D. H., *Macromol. Biosci.* **2016**, *16*, 63-73; (e) Tamura, A.; Yui, N., *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3535.
54. Yui, N.; Ooya, T.; Kawashima, T.; Saito, Y.; Tamai, I.; Sai, Y.; Tsuji, A., *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 582-587.
55. (a) Moon, C.; Kwon, Y. M.; Lee, W. K.; Park, Y. J.; Yang, V. C., *J. Control. Release* **2007**, *124*, 43-50; (b) Moon, C.; Kwon, Y. M.; Lee, W. K.; Park, Y. J.; Chang, L. C.; Yang, V. C., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *84*, 238-246; (c) Yu, S.; Zhang, Y.; Wang, X.; Zhen, X.; Zhang, Z.; Wu, W.; Jiang, X., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7272-7277; (d) Jiang, L.; Gao, Z.-m.; Ye, L.; Zhang, A.-y.; Feng, Z.-g., *Periodica Polytech., Chem. Eng.* **2014**, *58*, 55; (e) Yu, S.; Yuan, J.; Shi, J.; Ruan, X.; Wang, Y.; Gao, S.; Du, Y., *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 5277-5283.
56. (a) Collins, C. J.; McCauliff, L. A.; Hyun, S. H.; Zhang, Z.; Paul, L. N.; Kulkarni, A.; Zick, K.; Wirth, M.; Storch, J.; Thompson, D. H., *Biochemistry* **2013**, *52*, 3242-3253; (b) Mondjinou, Y. A.; McCauliff, L. A.; Kulkarni, A.; Paul, L.; Hyun, S. H.; Zhang, Z.; Wu, Z.; Wirth, M.; Storch, J.; Thompson, D. H., *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4189-4197; (c) Tamura, A.; Yui, N., *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4356; (d) Tamura, A.; Yui, N., *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 9442-9454; (e) Mondjinou, Y. A.; Hyun, S. H.; Xiong, M.; Collins, C. J.; Thong, P. L.; Thompson, D. H., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 23831-23836.
57. Gong, X. S.; Jiang, R. J.; Liao, X. L.; Xie, H. D.; Ma, X.; Gao, C. Z.; Yang, B.; Zhao, Y. L., *Carbohydr. Res.* **2015**, *412*, 7-14.
58. Jiang, R. J.; Yang, B.; Liu, Z. K.; Zhao, Y. L.; Liao, X. L.; Yang, J.; Gao, C. Z.; Wang, F.; Han, B., *Carbohydr. Res.* **2013**, *380*, 149-155.
59. Zhang, X.; Zhu, X.; Ke, F.; Ye, L.; Chen, E.-q.; Zhang, A.-y.; Feng, Z.-g., *Polymer* **2009**, *50*, 4343-4351.
60. Liu, B., *Clin. Lipidol.* **2012**, *7*, 289-301.
61. Irie, T.; Uekama, K., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 101-123.
62. Lederberg, J.; Tatum, E., *Science* **1966**, *153*, 442-449.
63. Wu, G. Y.; Wu, C. H., *Biotherapy* **1991**, *3*, 87-95.
64. Zhou, Y.; Wang, H.; Wang, C.; Li, Y.; Lu, W.; Chen, S.; Luo, J.; Jiang, Y.; Chen, J., *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1067-1076.
65. (a) Yang, C.; Wang, X.; Li, H.; Goh, S. H.; Li, J., *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3365-3374; (b) Yang, C.; Wang, X.; Li, H.; Ling Ding, J.; Yun Wang, D.; Li, J., *Polymer* **2009**, *50*, 1378-1388; (c) Yang, C.; Wang, X.; Li, H.; Tan, E.; Lim, C. T.; Li, J., *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7903-7911; (d) Yang, C.; Li, H.; Wang, X.; Li, J., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *89*, 13-23.
66. (a) Kulkarni, A.; DeFrees, K.; Schuldt, R. A.; Hyun, S. H.; Wright, K. J.; Yerneni, C. K.; VerHeul, R.; Thompson, D. H., *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 1299-1305; (b) Kulkarni, A.; DeFrees, K.; Schuldt, R. A.; Vlahu, A.; VerHeul, R.; Hyun, S. H.; Deng, W.; Thompson, D. H., *Integr. Biol.* **2013**, *5*, 115-121.
67. (a) Dandekar, P.; Jain, R.; Keil, M.; Loretz, B.; Muijs, L.; Schneider, M.; Auerbach, D.; Jung, G.; Lehr, C. M.; Wenz, G., *J. Control. Release* **2012**, *164*, 387-393; (b) Albuzat, T.; Keil, M.; Ellis, J.; Alexander, C.; Wenz, G., *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8558; (c) Dandekar, P.; Jain, R.; Keil, M.; Loretz, B.; Koch, M.; Wenz, G.; Lehr, C. M., *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 2590-2598.



68. (a) Utsunomiya, H.; Katoono, R.; Yui, N.; Sugiura, T.; Kubo, Y.; Kato, Y.; Tsuji, A., *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 665-669; (b) Yui, N., *Macromol. Symp.* **2009**, *279*, 158-162.
69. Yui, N.; Ooya, T., *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6730-6737.
70. (a) Ooya, T.; Utsunomiya, H.; Eguchi, M.; Yui, N., *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 62-69; (b) Ooya, T.; Kawashima, T.; Yui, N., *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 293-300.
71. Ooya, T.; Yui, N., *J. Control. Release* **2002**, *80*, 219-228.
72. Nelson, A.; Belitsky, J. M.; Vidal, S.; Joiner, C. S.; Baum, L. G.; Stoddart, J. F., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11914-11922.
73. Yokoyama, N.; Seo, J. H.; Tamura, A.; Sasaki, Y.; Yui, N., *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 359-368.
74. Hein, C. D.; Liu, X. M.; Chen, F.; Cullen, D. M.; Wang, D., *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 1544-1556.
75. Zhou, Z.; Mondjinou, Y.; Hyun, S. H.; Kulkarni, A.; Lu, Z. R.; Thompson, D. H., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 22272-22276.
76. Yan, K.; Li, P.; Zhu, H.; Zhou, Y.; Ding, J.; Shen, J.; Li, Z.; Xu, Z.; Chu, P. K., *RSC Adv.* **2013**, *3*, 10598.
77. Weissleder, R.; Pittet, M. J., *Nature* **2008**, *452*, 580-589.
78. Hüber, M. M.; Staubli, A. B.; Kustedjo, K.; Gray, M. H. B.; Shih, J.; Fraser, S. E.; Jacobs, R. E.; Meade, T. J., *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 242-249.
79. Louie, A., *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3146-3195.
80. Fredy, J. W.; Scelle, J.; Guenet, A.; Morel, E.; de Beaumais, S. A.; Menand, M.; Marvaud, V.; Bonnet, C. S.; Toth, E.; Sollogoub, M.; Vives, G.; Hasenknopf, B., *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 10915-10920.
81. Weissleder, R., *Nat. Biotech.* **2001**, *19*, 316-317.
82. Cassidy, P. J.; Radda, G. K., *J. R. Soc. Interface* **2005**, *2*, 133-144.
83. (a) Tóth, É.; Helm, L.; Merbach, A. E., Relaxivity of MRI Contrast Agents. In *Contrast Agents I: Magnetic Resonance Imaging*, Krause, W., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2002; pp 61-101; (b) Jacques, V.; Dumas, S.; Sun, W. C.; Troughton, J. S.; Greenfield, M. T.; Caravan, P., *Invest. Radiol.* **2010**, *45*, 613-624.
84. Gupta, A. K.; Gupta, M., *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021.
85. Hermann, P.; Kotek, J.; Kubicek, V.; Lukes, I., *Dalton Trans.* **2008**, 3027-3047.
86. Caravan, P., *Chem Soc Rev* **2006**, *35*, 512-523.
87. Valeur, B., Characteristics of Fluorescence Emission. In *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH: 2001; pp 34-71.
88. Lavis, L. D.; Raines, R. T., *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.
89. Guo, Z.; Park, S.; Yoon, J.; Shin, I., *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 16-29.
90. Hirayama, T.; Van de Bittner, G. C.; Gray, L. W.; Lutsenko, S.; Chang, C. J., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 2228-2233.
91. Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y., *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620-2640.
92. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
93. (a) Melton, L. D.; Slessor, K. N., *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 29-37; (b) Tang, W.; Ng, S. C., *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 691-697; (c) Quan, C.-Y.; Chen, J.-X.; Wang, H.-Y.; Li, C.; Chang, C.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X., *ACS Nano* **2010**, *4*, 4211-4219.
94. Lecourt, T.; Hérault, A.; Pearce, A. J.; Sollogoub, M.; Sinay, P., *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2960-2971.
95. Sato, T.; Nakamura, H.; Ohno, Y.; Endo, T., *Carbohydr. Res.* **1990**, *199*, 31-35.
96. Guieu, S.; Sollogoub, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7060-7063.
97. Guitet, M.; Marcelo, F.; de Beaumais, S. A.; Zhang, Y.; Jiménez-Barbero, J.; Tilloy, S.; Monflier, E.; Ménand, M.; Sollogoub, M., *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3691-3699.
98. Hanessian, S.; Benalil, A.; Laferriere, C., *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4786-4797.
99. Raghunand, N.; Guntle, G. P.; Gokhale, V.; Nichol, G. S.; Mash, E. A.; Jagadish, B., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6747-6757.
100. (a) Viguier, R. F. H.; Hulme, A. N., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11370-11371; (b) Martinage, O.; Le Clainche, L.; Czarny, B.; Dugave, C., *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6484-6490.
101. Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., *Angew. Chem.* **2009**, *48*, 9879-9883.

102. Meneul, S.; Azaroual, N.; Landy, D.; Six, N.; Hapiot, F.; Monflier, E., *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3949-3955.
103. Lyon, A. P.; Banton, N. J.; Macartney, D. H., *Can. J. Chem.* **1998**, *76*, 843-850.
104. (a) Markova, L. I.; Fedyunyayeva, I. A.; Povrozin, Y. A.; Semenova, O. M.; Khabuseva, S. U.; Terpetschnig, E. A.; Patsenker, L. D., *Dyes Pigments* **2013**, *96*, 535-546; (b) Kuznetsova, V. E.; Vasiliskov, V. A.; Zasedatelev, A. S.; Chudinov, A. V., *Mendeleev Commun.* **2008**, *18*, 138-140.
105. Langhals, H.; Varja, A.; Laubichler, P.; Kernt, M.; Eibl, K.; Haritoglou, C., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3903-3925.
106. Gerowska, M.; Hall, L.; Richardson, J.; Shelbourne, M.; Brown, T., *Tetrahedron* **2012**, *68*, 857-864.
107. (a) Benzi, C.; Bertolino, C. A.; Miletto, I.; Ponzio, P.; Barolo, C.; Viscardi, G.; Coluccia, S.; Caputo, G., *Dyes Pigments* **2009**, *83*, 111-120; (b) Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S., *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 356-362; (c) Jiang, L.-L.; Dou, L.-F.; Li, B.-L., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5825-5829; (d) Pham, W.; Medarova, Z.; Moore, A., *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 735-740; (e) Park, J. W.; Kim, Y.; Lee, K. J.; Kim, D. J., *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 350-362.
108. Mustrup, H.; Reiner, K.; Mistol, J.; Ernst, S.; Keil, D.; Hennig, L., *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 835-840.
109. (a) Akae, Y.; Okamura, H.; Koyama, Y.; Arai, T.; Takata, T., *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2226-2229; (b) Akae, Y.; Koyama, Y.; Kuwata, S.; Takata, T., *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 17132-17136; (c) Akae, Y.; Koyama, Y.; Sogawa, H.; Hayashi, Y.; Kawauchi, S.; Kuwata, S.; Takata, T., *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5335-5341.
110. Zhao, Y.-L.; Dichtel, W. R.; Trabolsi, A.; Saha, S.; Aprahamian, I.; Stoddart, J. F., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11294-11296.
111. Chwalek, M.; Auzely, R.; Fort, S., *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1680-1688.
112. Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., *Nanomed.* **2008**, *3*, 703-717.
113. Wenz, G.; Gruber, C.; Keller, B.; Schilli, C.; Albuzat, T.; Müller, A., *Macromolecules* **2006**, *39*, 8021-8026.
114. Ai, H.; Pink, J. J.; Shuai, X.; Boothman, D. A.; Gao, J., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *73*, 303-312.
115. Miura, T.; Kida, T.; Akashi, M., *Macromolecules* **2011**, *44*, 3723-3729.
116. Tamura, A.; Tokunaga, M.; Iwasaki, Y.; Yui, N., *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 648-653.
117. Lu, Q.; Ubillas, R. P.; Zhou, Y.; Dubenko, L. G.; Dener, J. M.; Litvak, J.; Phuan, P.-W.; Flores, M.; Ye, Z.; Gerber, R. E.; Truong, T.; Bierer, D. E., *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 824-828.
118. Thordarson, P., *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.
119. Quiroga, M.; Parajo, M.; Rodriguez-Dafonte, P.; Garcia-Rio, L., *Langmuir* **2016**, *32*, 6367-6375.
120. (a) Pretula, J.; Penczek, S., *Makromol. Chem., Rapid Commun* **1988**, *9*, 731-737; (b) Pretula, J.; Penczek, S., *Makromol. Chem.* **1990**, *191*, 671-680; (c) Penczek, S.; Pretula, J., *Macromolecules* **1993**, *26*, 2228-2233; (d) Pretula, J.; Kaluzynski, K.; Szymanski, R.; Penczek, S., *Macromolecules* **1997**, *30*, 8172-8176; (e) Pretula, J.; Kaluzynski, K.; Szymanski, R.; Penczek, S., *Macromol. Symp.* **1997**, *122*, 269-274; (f) Pretula, J.; Kaluzynski, K.; Szymanski, R.; Penczek, S., *J. Polym. Sci. A* **1999**, *37*, 1365-1381; (g) Penczek, S.; Pretula, J.; Kaluzynski, K., *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 547-551; (h) Penczek, S.; Pretula, J.; Kaluzynski, K., *J. Polym. Sci. A* **2005**, *43*, 650-657; (i) Pretula, J.; Kaluzynski, K.; Wisniewski, B.; Szymanski, R.; Loontjens, T.; Penczek, S., *J. Polym. Sci. A* **2008**, *46*, 830-843.
121. (a) Vo, H. T.; Kim, Y. J.; Jeon, E. H.; Kim, C. S.; Kim, H. S.; Lee, H., *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 9019-9023; (b) Kuroda, K.; Ohno, H., *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10551-10553.
122. Troev, K.; Naruoka, A.; Terada, H.; Kikuchi, A.; Makino, K., *Macromolecules* **2012**, *45*, 5698-5703.
123. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288-6308.
124. (a) Abuchowski, A.; van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F., *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578-3581; (b) Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; van Es, T.; Davis, F. F., *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582-3586.
125. (a) Blume, G.; Cevc, G., *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1029*, 91-97; (b) Klibanov, A. L.; Maruyama, K.; Torchilin, V. P.; Huang, L., *FEBS Lett.* **1990**, *268*, 235-237.

126. Pasut, G.; Veronese, F. M., *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 933-961.
127. (a) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28-51; (b) Liu, J.; Yu, M.; Ning, X.; Zhou, C.; Yang, S.; Zheng, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12572-12576.
128. Jarroux, N.; Guégan, P.; Cheradame, H.; Auvray, L., *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23816-23822.
129. Ooya, T.; Eguchi, M.; Ozaki, A.; Yui, N., *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 47-54.
130. Hyun, H.; Yui, N., *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 326-331.
131. Chmurski, K.; Defaye, J., *Supramol. Chem.* **2000**, *12*, 221-224.
132. Gorin, B. I.; Riopelle, R. J.; Thatcher, G. R. J., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4647-4650.
133. Wenz, G.; Kräuter, I.; Sackmann, E., *J. Polym. Sci. A* **2009**, *47*, 6223-6230.
134. Erbas-Cakmak, S.; Leigh, D. A.; McTernan, C. T.; Nussbaumer, A. L., *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10081-10206.
135. (a) Lee, S. C.; Choi, H. S.; Ooya, T.; Yui, N., *Macromolecules* **2004**, *37*, 7464-7468; (b) Sun, G.; Wu, D.; Liu, Y.; He, C.; Chung, T. S.; Goh, S. H., *Polymer* **2005**, *46*, 3355-3362.
136. Karaky, K.; Brochon, C.; Schlatter, G.; Hadziioannou, G., *Soft Matter* **2008**, *4*, 1165-1168.
137. (a) Fujita, H.; Ooya, T.; Yui, N., *Macromolecules* **1999**, *32*, 2534-2541; (b) Ikeda, T.; Watabe, N.; Ooya, T.; Yui, N., *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 1338-1344; (c) Karino, T.; Okumura, Y.; Zhao, C.; Kidowaki, M.; Kataoka, T.; Ito, K.; Shibayama, M., *Macromolecules* **2006**, *39*, 9435-9440.
138. (a) Li, S.; Taura, D.; Hashidzume, A.; Harada, A., *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 2281-2289; (b) Iwaso, K.; Takashima, Y.; Harada, A., *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 625-632.
139. Qu, D.-H.; Wang, Q.-C.; Ren, J.; Tian, H., *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2085-2088.
140. Cheetham, A. G.; Hutchings, M. G.; Claridge, T. D.; Anderson, H. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1596-1599.
141. (a) Baer, A. J.; Macartney, D. H., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1448-1452; (b) Oshikiri, T.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12186-12187; (c) Casati, C.; Franchi, P.; Pievo, R.; Mezzina, E.; Lucarini, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19108-19117.
142. Ragazzon, G.; Baroncini, M.; Silvi, S.; Venturi, M.; Credi, A., *Nature Nanotech.* **2015**, *10*, 70-75.
143. Altieri, A.; Aucagne, V.; Carrillo, R.; Clarkson, G. J.; D'Souza, D. M.; Dunnett, J. A.; Leigh, D. A.; Mullen, K. M., *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1922.
144. (a) Maciejewski, M., *J. Macromol. Sci. Chem.* **1979**, *13*, 77-85; (b) Maciejewski, M., *J. Macromol. Sci. Chem.* **1979**, *13*, 1175-1202; (c) Ogata, N.; Sanui, K.; Wada, J., *J. Polym. Sci.* **1976**, *14*, 459-462.
145. (a) van den Boogaard, M.; Bonnet, G.; van't Hof, P.; Wang, Y.; Brochon, C.; van Hutten, P.; Lapp, A.; Hadziioannou, G., *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4383-4385; (b) Grigoras, M.; Conduruta, D. G., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, *54*, 101-107; (c) Shinohara, K.-i.; Suzuki, T.; Kitami, T.; Yamaguchi, S., *J. Polym. Sci. A* **2006**, *44*, 801-809; (d) Farcas, A.; Jarroux, N.; Ghosh, I.; Guégan, P.; Nau, W. M.; Harabagiu, V., *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 1440-1449.
146. (a) Steinbrunn, M. B.; Wenz, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2139-2141; (b) Kali, G.; Eisenbarth, H.; Wenz, G., *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, *37*, 67-72.
147. Taylor, P. N.; O'Connell, M. J.; McNeill, L. A.; Hall, M. J.; Aplin, R. T.; Anderson, H. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3456-3460.
148. Takashima, Y.; Sakamoto, K.; Oizumi, Y.; Yamaguchi, H.; Kamitori, S.; Harada, A., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, *56*, 45-53.
149. Momcilovic, N.; Clark, P. G.; Boydston, A. J.; Grubbs, R. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19087-19089.
150. Gułajski, Ł.; Ślędz, P.; Lupa, A.; Grela, K., *Green Chem.* **2008**, *10*, 271.
151. (a) Jordan, J. P.; Grubbs, R. H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5152-5155; (b) Matsuo, T.; Yoshida, T.; Fujii, A.; Kawahara, K.; Hirota, S., *Organometallics* **2013**, *32*, 5313-5319; (c) Brendgen, T.; Fahlbusch, T.; Frank, M.; Schühle, D. T.; Seßler, M.; Schatz, J., *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 303-307; (d) Binder, J. B.; Blank, J. J.; Raines, R. T., *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4885-4888; (e) Tomasek, J.; Schatz, J., *Green Chem.* **2013**, *15*, 2317.
152. Lee, S.; Chen, C. H.; Flood, A. H., *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 704-710.
153. (a) Wagner, G. K.; Pesnot, T.; Field, R. A., *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1172-1194; (b) Xu, Z., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3777-3783.

154. Tanaka, H.; Yoshimura, Y.; Jorgensen, M. R.; Cuesta-Seijo, J. A.; Hindsgaul, O., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11531-11534.
155. Kuzmič, P., *Anal. Chem.* **1996**, *237*, 260-273.
156. Antoni, P.; Malkoch, M.; Vamvounis, G.; Nystrom, D.; Nystrom, A.; Lindgren, M.; Hult, A., *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 2545-2554.
157. Godoy, J.; Vives, G.; Tour, J. M., *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1464-1467.
158. Hu, B.; Su, Q.; Lu, P.; Wang, Y., *Sens. and Actuators* **2012**, *168*, 310-317.
159. Ziesel, R.; Ulrich, G.; Olivier, J. H.; Bura, T.; Sutter, A., *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7978-7980.
160. Barbero, N.; Magistris, C.; Park, J.; Saccone, D.; Quagliotto, P.; Buscaino, R.; Medana, C.; Barolo, C.; Viscardi, G., *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3306-3309.
161. Neto, V.; Granet, R.; Krausz, P., *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4633-4646.
162. Ji, F.-Y.; Zhu, L.-L.; Ma, X.; Wang, Q.-C.; Tian, H., *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 597-600.
163. Zhang, L.; Robertson, C. R.; Green, B. R.; Pruess, T. H.; White, H. S.; Bulaj, G., *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1310-1316.

## POLYROTAXANES DE CYCLODEXTRINES POUR DES APPLICATIONS BIOMÉDICALES

Ce projet de thèse s'inscrit dans une dynamique de développement des polyrotaxanes de cyclodextrines pour des applications biomédicales. L'objectif est d'obtenir, par une approche modulaire et convergente, des polyrotaxanes fonctionnalisés pour l'imagerie par microscopie optique dans le proche infrarouge et l'IRM. Une bibliothèque de cyclodextrines fonctionnalisées a été générée par CuAAC entre des fluorophores (BODIPY, Cyanine) ou un agent de contraste (monoamide-DO3A-Gd) et des  $\alpha$ -cyclodextrines mono- ou bis-azotures. Leurs propriétés d'auto-assemblage ont été étudiées sur un axe court et ont permis le développement de [3]rotaxanes fonctionnalisés pour l'IRM dont les expérimentations *in vivo* ont démontré l'apport bénéfique de la structure supramoléculaire pour les propriétés d'agent de contraste. L'extension de l'architecture aux polyrotaxanes multimodaux a été réalisée par l'utilisation d'un axe polyammonium. Une nouvelle classe d'axes anioniques a été développée avec l'étude cinétique et thermodynamique de l'enfilage sélectif d'une ou deux cyclodextrines sur des monomères diphosphates et montre l'intérêt des *pseudo*-bouchons phosphates pour le contrôle de la barrière d'activation par le pH. L'extension à une structure *pseudopolyrotaxane* est obtenue par la synthèse d'un poly(hexylène phosphate) et permet de valider l'utilisation du polymère pour la synthèse de composés fonctionnalisés. En perspective de ces développements, des voies de *post*-fonctionnalisation des polyrotaxanes, une nouvelle voie de synthèse par polymérisation de *pseudo*-rotaxanes et l'obtention d'une cyclodextrine pour le relargage contrôlé par stimuli acido-basiques sont abordés.

**Mots clés :** cyclodextrine, polyrotaxane, poly(alkylène phosphate), polyammonium, cyanine, microscopie de fluorescence, agent de contraste IRM.

## CYCLODEXTRIN-BASED POLYROTAXANES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

This PhD project is focused on the development of cyclodextrin-based polyrotaxanes for biomedical applications. The objective is to use a modular building-block approach to synthesize functionalized polyrotaxanes for NIR fluorescence and magnetic resonance imaging. A library of functionalized cyclodextrins was obtained by a versatile 'click' reaction between fluorescent probes (BODIPY, Cyanine) or contrast agent (GdDO3A-monoamide) and mono- or bis-azido  $\alpha$ -cyclodextrins. Their self-assembly properties were first studied on short axles and allowed the development of functionalized [3]rotaxanes for MRI. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated the advantages of the supramolecular approach for the design of contrast agent with an enhancement of the relaxivities and better retention times in kidneys. The strategy was extended to obtain multimodal polyrotaxane architectures based on a poly(alkyl)ammonium thread. A new family of anionic threads based on alkylphosphate moieties was also developed. Thorough kinetic and thermodynamic studies revealed the ability of phosphates to act as pH-responsive stoppers enabling a selective threading of one or two cyclodextrins on small alkanediphosphate threads. *Pseudopolyrotaxanes* of  $\alpha$ -CD were then obtained with poly(hexylene phosphate) and pave the way for the synthesis of functionalized ones. Finally, significant investigations in the *post*-functionalization of polyrotaxanes, polymerization of *pseudo*-rotaxanes as new synthetic pathway and pH-switchable rotaxane for controlled release were realized.

**Keywords:** cyclodextrin, polyrotaxane, poly(alkylene phosphate), poly(alkyl)ammonium, cyanine, fluorescence microscopy, MRI contrast agent.