

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYNTHÈSE DE GLYCODENDRIMÈRES CONTENANT DES
RÉSIDUS FUCOSIDES ET GALACTOSIDES POUR TESTER LES
PROPRIÉTÉS D'ADHÉSION DES LECTINES PA-IL ET PA-IIL DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES EN CHIMIE

PAR
ISABELLE DEGUISE

Septembre 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce mémoire représente l'aboutissement de plusieurs années d'efforts et de travail acharné pour la réussite d'un but souhaité: obtenir mon diplôme de maîtrise en chimie.

Lors de ma première inscription à temps partiel à l'université, jamais je n'aurais pu imaginer effectuer un retour aux études à temps plein et terminer un programme universitaire de deuxième cycle. Au cours de ce cheminement, plusieurs personnes ont su m'influencer et m'encourager en ce sens.

Premièrement, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Pr. René Roy qui m'a incitée à poursuivre des études supérieures au sein de son groupe de recherche. Il m'a permis de découvrir l'univers de la chimie des dendrimères. Son incroyable enthousiasme face à cette chimie se résulte par l'émergence d'une quantité innombrable d'idées qui ont su me motiver tout au long de ces années. Merci pour la confiance qui m'a été accordée, les connaissances reçues et le support qui m'ont permis d'effectuer ce travail.

Je tiens à remercier aussi le Pr. Serge St-Pierre de l'Université du Québec à Montréal et le Pr. Marc Gingras de l'Université de la Méditerranée Aix-Marseille II pour la révision attentionnée de cet ouvrage.

Merci aux collaborateurs reliés à ce projet; le Pr. Anne Imberty et son équipe au CERMAV à Grenoble, pour l'aspect biologique de ce projet, le Dr. Alexandra Furtos et Mme Karine Venne, du Laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal ainsi que Madame Tara Sprules du Centre de RMN à Haut Champ du Québec et de l'Est du Canada de l'Université McGill.

Sincères remerciements au Dr. David Lagnoux pour sa précieuse collaboration apportée à ce projet. Son amitié, son écoute, ses idées, sa motivation, son support ont tous été des facteurs indispensables à la réalisation de ce travail.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire autant Français que Québécois avec qui ce fut un plaisir de travailler et de partager de bons moments: Régis Fauré, Karine Marotte, Denis Giguère, Sara Béha, Cathy Prévile, Chichi Shiao et tous ceux qui ont effectué un passage au laboratoire. Sans oublier mes amis Guillaume Thibault, Stéphanie Deslandes, Michel Alsayegh, Carole Glavicich qui ont toujours été présents.

Je remercie particulièrement mes parents et ma sœur pour leurs encouragements, leur soutien permanent et leur amour inconditionnel, sans quoi rien n'aurait été possible.

Finalement, je remercie le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG) pour le financement de ma maîtrise dans le cadre d'une bourse d'études supérieures ainsi qu'une Chaire de Recherche du Canada en Chimie Thérapeutique décernée au Pr. René Roy.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES SCHÉMAS	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xiv
CHAPITRE 1	
LES DENDRIMÈRES	1
1.1 HISTORIQUE :	1
1.2 LA FIBROSE KYSTIQUE	39
CHAPITRE 2	
SYNTHÈSE DE DENDRIMÈRES	48
2.1 STRATÉGIE DE SYNTHÈSE.....	49
2.2 SYNTHÈSE DES GLYCODENDRIMÈRES SYMÉTRIQUES.....	55
2.3 SYNTHÈSE DES GLYCODENDRIMÈRES DISSYMÉTRIQUES	68
2.4 CONCLUSION	75
CHAPITRE 3	
ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DU COMPORTEMENT DES GLYCODENDRIMÈRES EN PRÉSENCE DES LECTINES PA-IL ET PA-III DE LA BACTÉRIE PSEUDOMONAS AERUGINOSA	76
3.1 TESTS D'INHIBITIONS COMPÉTITIVES ELLA	76
3.2 ANALYSE TURBIDIMÉTRIQUE.....	81
3.3 CONCLUSION	90
CONCLUSION	91
ANNEXE	92
RÉFÉRENCES	133

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

FIGURE 1.1 : SYSTÈMES BIOLOGIQUES : A) CONIFÈRES, FEUILLUS ET LEURS RACINES, B) SPORE D'INFECTION, C) NEURONE D'INSECTE.	1
FIGURE 1.2 : DIVERSES CLASSES D'ARCHITECTURE MACROMOLÉCULAIRE.	3
FIGURE 1.3 : REPRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'UN DENDRIMÈRE.	4
FIGURE 1.4 : SCHÉMATISATION DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DIVERGENTE.	6
FIGURE 1.5 : A) PAMAM 2 ^{ÈME} GÉNÉRATION B) ARBOROL.	7
FIGURE 1.6 : SCHÉMATISATION DE LA VOIE DE SYNTHÈSE CONVERGENTE.	8
FIGURE 1.7 : SPECTRE MALDI-TOF DE DENDRIMÈRES.	9
FIGURE 1.8 : EXEMPLE D'UN DENDRIMÈRE G-3 À BASE DE DIPHOSPHINE CONTENANT 24 ATOMES DE PALLADIUM OU RUTHÉNIUM, TIRÉ DE MAJORAL ET AL.	11
FIGURE 1.9 : EXEMPLE DE DENDRIZYME SYNTHÉTISÉ PAR BRUNNER ET AL.	12
FIGURE 1.10 : EXEMPLE DE DENDRIMÈRE À BASE DE POLY(PROPYLENIMINE) ET DEUX TYPES DE GROUPEMENTS MÉSOGÈNES.	14
FIGURE 1.11 : AUTO-ASSEMBLAGE DE DENDRONS FORMANT UN DENDRIMÈRE SUPRAMOLÉCULAIRE.	15
FIGURE 1.12 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE LED CONTENANT DES DENDRIMÈRES AVEC DES CŒURS DE PENTATHIOPHÈNE (RED EMITTER) ET COUMARIN-343 (GREEN EMITTER).	16
FIGURE 1.13 : PREMIÈRE GÉNÉRATION DU DENDRIMÈRE DE MÜLLEN.	17
FIGURE 1.14 : COMPARAISON ENTRE LES DENDRIMÈRES PAMAM G = 0 À 7 ET LES SYSTÈMES BIOLOGIQUES.	18
FIGURE 1.15 : REPRÉSENTATION DE LA DEUXIÈME GÉNÉRATION DU DENDRIMÈRE A) PAMAM ET B) PPI.	20
FIGURE 1.16 : LA BOÎTE DENDRITIQUE.	25
FIGURE 1.17 : EXEMPLE DE L'ATTACHEMENT COVALENT D'UN ACTIF (DOXORUBICIN) SUR UN DENDRIMÈRE.	26
FIGURE 1.18 : RÉACTION EN CHAÎNE DE DÉGRADATION DES DENDRIMÈRES DU GROUPE DE SHABAT.	28
FIGURE 1.19 : HYDROLYSE PARTIELLE DU DENDRIMÈRE PAMAM DE GÉNÉRATION 5 PAR SOLVOLYSE.	30
FIGURE 1.20 : PROCESSUS HYPOTHÉTIQUE DE LA TRANSFECTION D'ADN ASSISTÉE D'UN DENDRIMÈRE CATIONIQUE.	31
FIGURE 1.21 : STRUCTURE DU GADOMER DENDRITIQUE UTILISÉ EN IRM.	32
FIGURE 1.22 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'INTERACTIONS PROTÉINE/SUCRE.	33

FIGURE 1.23 : REPRÉSENTATION DE L'« EFFET CLUSTER »	34
FIGURE 1.24 : REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE DIFFÉRENTES ARCHITECTURES DE GLYCODENDRIMÈRES.....	35
FIGURE 1.25 : ILLUSTRATION DE L'UTILISATION DE GLYCODENDRIMÈRES LORS D'UN PROCESSUS D'ADHÉSION BACTÉRIENNE.....	36
FIGURE 1.26 : STRUCTURE DU GLYCODENDRIMÈRE PAMAM DE 32 UNITÉS DE L'ANTIGÈNE TUMORAL.	37
FIGURE 1.27 : GLYCODENDRIMÈRE INHIBANT L'ADHÉSION DU VIRUS INFLUENZA SYNTHÉTISÉ PAR ROY ET COLL.	38
FIGURE 1.28 : PHOTOS DE POUMONS SAINS ET D'AUTRES ATTEINTS DE FIBROSE KYSTIQUE.	41
FIGURE 1.29 : PROCESSUS INFECTIEUX SUR L'ÉPITHÉLIUM PULMONAIRE DANS LE CAS DE LA FIBROSE KYSTIQUE.	42
FIGURE 1.30 : REPRÉSENTATION DES DEUX LECTINES DE PA.	46
FIGURE 1.31 : PROCESSUS D'ADHÉSION DE LA BACTÉRIE PA SUR LES CELLULES PULMONAIRES.....	47

Chapitre 2

FIGURE 2.1 : REPRÉSENTATION DE L'ARCHITECTURE DES DENDRIMÈRES ENVISAGÉS,	49
FIGURE 2.2 : COMPOSÉS DE BASE POUR LA SYNTHÈSE DES DENDRIMÈRES A) 1,3-DIAMINOPROPANE B) 3,5-BIS-(2-AZIDO-ETHOXY) BENZOATE DE MÉTHYLE.....	50
FIGURE 2.3 : RÉSIDUS SACCHARIDIQUES UTILISÉS POUR LA CONCEPTION DES GLYCODENDRIMÈRES A) PROP-2-YNYL A-0-FUCOPYRANOSIDE B) PROP-2-YNYL B-0-GALACTOPYRANOSIDE.....	51
FIGURE 2.4 : SYNTHÈSE CATALYSÉE PAR Cu(I) DE CYCLE TRIAZOLE 1,2,3-DISUBSTITUÉ EN 1,4.	52
FIGURE 2.5 : MÉCANISME PROPOSÉ POUR LA RÉACTION DE « CLICK CHEMISTRY » PAR L'ÉQUIPE DE SHARPLESS.	53
FIGURE 2.6 : RÉGIOISOMÈRES 1,5 (1) ET 1,4 (2) OBTENUS PAR CYCLOADDITION THERMIQUE DE HUISGEN.	55
FIGURE 2.7: SPECTRES RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , 25°C) MONTRANT LES SIGNAUX CARACTÉRISTIQUES DES COMPOSÉS 10, 12 ET 14.	61
FIGURE 2.8 : DIFFÉRENTES GÉNÉRATIONS DE DENDRONS FUCOSYLÉS EN SURFACE.....	65
FIGURE 2.9 : DIFFÉRENTES GÉNÉRATIONS D'HOMO-GLYCODENDRIMÈRES FUCOSYLÉS.	67
FIGURE 2.10 : SPECTRE DE MASSE DU COMPOSÉ 22	68
FIGURE 2.11 : SPECTRE RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) ET SPECTRE DE MASSE ESI-MS DU COMPOSÉ 32A (ACÉTYLÉS).	74

Chapitre 3

FIGURE 3.1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU TEST ELLA.....	77
FIGURE 3.2 : COMPOSÉS ENVOYÉS AU LABORATOIRE DE GRENOBLE.....	78
FIGURE 3.3 : RÉGIOISOMÈRE 1,5 (1) DANS LE SITE DE RECONNAISSANCE DE LA LECTINE PA-IIL; A) DENSITÉ ÉLECTRONIQUE AUTOUR DE COMPOSÉ, B) SITE DE RECONNAISSANCE, C) SURFACE DE CONNOLLY	80
FIGURE 3.4 : A) REPRÉSENTATION DU PHARMACOPHORE, B) DENSITÉ ÉLECTRONIQUE AUTOUR DU COMPOSÉ, C) SITE DE RECONNAISSANCE.....	81
FIGURE 3.5 : A) ENTHALPIE B) ENTROPIE FAVORISANT OU DÉFAVORISANT LA CHÉLATION C) RÉSEAU TRIDIMENSIONNEL FORMÉ LORS DE L'AGRÉGATION DE LECTINES ET DE COMPOSÉS DIVALENTS.....	83
FIGURE 3.6 : PRÉCIPITATION DES GLYCODENDRIMÈRES AVEC LA LECTINE PA-IIL.	84
FIGURE 3.7 : PRÉCIPITATION DES GLYCODENDRIMÈRES 23 ET 32 AVEC LA LECTINE PA-IL.....	85
FIGURE 3.8 : PRÉCIPITATION DU GLYCODENDRIMÈRES 33 AVEC LES LECTINES PA-IIL ET PA-IL.	86
FIGURE 3.9 : PRÉCIPITATION DU GLYCODENDRIMÈRE 33 AVEC PA-IL, PA-IIL ET UN MÉLANGE DES DEUX LECTINES.	88
FIGURE 3.10 : CORRÉLATION DES PRÉCIPITATIONS DU GLYCODENDRIMÈRE 33 OBSERVÉE AVEC LE MÉLANGE DE LECTINES ET CELLE OBSERVÉE AVEC CHACUNE D'ELLES SÉPARÉMENT, (RAPPORTÉ À LA MÊME CONCENTRATION).....	89

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3.1 : RÉSULTATS DES ANALYSES PAR ELLA DES TROIS COMPOSÉS 1 , 2 ET 34	78
---	----

LISTE DES SCHÉMAS

SCHÉMA 2.1 : ÉTAPES DE SYNTHÈSE DU BRAS ESPACEUR DES DENDRIMÈRES.	55
SCHÉMA 2.2 . SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 7 SUITE À UNE ÉTAPE DE PROTECTION ET DE GLYCOSIDATION DU L-(+) FUCOSE.	56
SCHÉMA 2.3 : SYNTHÈSE DES DEUX RÉGIOISOMÈRES 1 ET 2 PAR CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE DE HUISGEN ET DÉPROTECTION EN CONDITIONS DE ZEMPLÉN.....	57
SCHÉMA 2.4 : SYNTHÈSE DU MONOMÈRE 4 PAR DES RÉACTIONS D'ESTÉRIFICATION ET DE SUBSTITUTION NUCLÉOPHILE.	58
SCHÉMA 2.5 . SYNTHÈSE DU DENDRON 12 DE 1 ^{ÈRE} GÉNÉRATION PAR HYDROGÉNATION CATALYTIQUE ET COUPLAGE PEPTIDIQUE.....	58
SCHÉMA 2.6 : SYNTHÈSE DU DENDRON 13 DE 2 ^{ÈME} GÉNÉRATION PAR HYDROGÉNATION CATALYTIQUE ET COUPLAGE PEPTIDIQUE.....	60
SCHÉMA 2.7 : SYNTHÈSE DES COMPOSÉS 15 , 16 , 17 PAR COUPLAGE PEPTIDIQUE.	63
SCHÉMA 2.8 : SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 6 SUITE À UNE ÉTAPE DE PROTECTION ET DE GLYCOSIDATION DU D-(+)-GALACTOSE.....	69
SCHÉMA 2.9 : ÉTAPE DE PROTECTION DU CŒUR DENDRITIQUE.	69
SCHÉMA 2.10 : SYNTHÈSE DES COMPOSÉS 28 ET 29 SUITE AUX RÉACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE ET DE « <i>CLICK CHEMISTRY</i> ».	70
SCHÉMA 2.11 . SYNTHÈSE DES COMPOSÉS 30 ET 31 SUITE AUX RÉACTIONS DE DÉPROTECTION DU GROUPEMENT BOC ET DE COUPLAGE PEPTIDIQUE.	71
SCHÉMA 2.12 : SYNTHÈSE DES GLYCODENDRIMÈRES 32 ET 33 SUITE AUX RÉACTIONS DE « <i>CLICK CHEMISTRY</i> » ET DE ZEMPLÉN.	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α	Alpha
Ac	Acétyle
Ac ₂ O	Anhydride acétique
ACS	Grade de réactif de l'American Chemical Society
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amu	Unité de masse atomique
aq.	Aqueux
ATP	Adénosine triphosphate
β	Beta
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyloxycarbonate
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albumine sérique bovine
Bz	Benzoyle
°C	Degré Celsius
cat.	Catalytique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (anglais), régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
cm	Centimètre
DELs	diodes électroluminescentes
DIPEA	Diisopropyléthylamine

DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTPA	Acide 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-6-méthyl-diéthylène-triamine-pentaacétique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ELLA	Enzyme linked lectin assay (anglais)
éq.	Équivalent
Et	Éthyle
Et ₂ O	Oxyde de diéthyle
EtOH	Éthanol
Et ₃ N	Triéthylamine
FETs	Transistors à effet de champ
FK	Fibrose kystique
FRET	Transfert d'électron de type Förster
Fuc	Fucopyranose
g	Gramme
G	Enthalpie libre
GlcNAc	N-acétylglucosamine
Gly	Glycine
H	Enthalpie standard
HETCOR	Heteronuclear correlation spectroscopy (anglais), spectroscopie de corrélation hétéronucléaire
Hex	Hexane
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (anglais), orbitale occupée avec la plus haute en énergie
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentration requise pour 50% d'inhibition
IES	Ionisation Electrospray
IRM	Imagerie magnétique nucléaire
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier

ITC	Titration calorimétrique isothermique
K _a	Constante d'affinité
K _d	Constante de dissociation
L	Litre
LCD	Écran à cristaux liquides (anglais : liquid crystal display)
LD	Dose létale
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (anglais), orbitale inoccupée avec la plus basse en énergie
M	Molaire, concentration (mol/L)
M ⁺	Ion moléculaire
<i>m</i>	Meta
MALDI-TOF	Type de spectrométrie de masse (time-of-flight mass spectrometry)
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
mL	Millilitre
mmol	Millimole
mol	Mole
<i>m/z</i>	Rapport masse/charge (en SM)
nm	nanomètre
Noe	Nuclear Overhauser effect, anglais, effet nucléaire Overhauser
N	Normale, concentration (N)
<i>o</i>	Ortho
OLEDs	Diodes électroluminescentes organiques
OMF	Orbitale moléculaire frontière
<i>p</i>	Para
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAA	Poly[N-(2-hydroxyethyl)acrylamide]
PA-IL	Lectine I de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IIL	Lectine II de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PAMAM	dendrimère poly(amidoamine)
PCC	Pyridinium chlorochromate
PDT	Thérapie photodynamique
PEG	Polyéthylène glycol
pf	Point de fusion (°C)
Ph	Phényle
Phe	Phénylalanine
PPI	Dendrimère polypropylènimine
ppm	Partie par million
Pro	Proline
Pyr	Pyridine
R	<i>R</i> de <i>rectus</i> , latin, droit
	Symbole de configuration absolue (selon Cahn-Ingold-Prelog)
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RX	Rayon X
S	Entropie standard
Ser	Sérine
SM(IES)	Spectrométrie de masse en ionisation par <i>electrospray</i>
<i>t</i>	Tert
tBu	<i>tert</i> -butyle
^t BuOH	<i>tert</i> -butanol
TFA	acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
t.p	Température pièce
µg	microgramme
En RMN :	
δ	Déplacement chimique
b	<i>Broad</i> (anglais), large
d	Doublet

dd	Doublet de doublets
dt	Doublet de triplets
dq	Doublet de quadruplets
q	Quadruplet
J	Constante de couplage (Hz)
m	Multiplet
s	Singulet
t	Triplet
bs	<i>Broad singulet</i> (anglais), large singulet
bd	<i>Broad doublet</i> (anglais), large doublet

RÉSUMÉ

Le présent ouvrage traite d'une alternative médicale potentielle pour inhiber l'adhésion bactérienne de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière possède deux lectines, dépendantes du calcium (PA-IL et PA-IIL), ayant chacune un site de reconnaissance spécifique aux galactoses et aux fucoses, respectivement. Chez les patients atteints de la fibrose kystique, le gène *CF transmembrane regulator* (CFTR) a subi une mutation, ce qui occasionne une augmentation de la présence des résidus fucoses à la surface des cellules épithéliales pulmonaires. L'attachement de cette bactérie pathogène à la glycoprotéine CFTR est la principale cause de virulence de la maladie. Pour ce faire, il a été envisagé d'utiliser les dendrimères pour intervenir dans ce processus d'adhésion bactérienne. Les dendrimères sont une classe de macromolécules monodisperses dont l'architecture arborescente autour d'un cœur plurifonctionnel est souvent comparée à différentes organisations autour de nous. En modifiant l'extrémité de ces structures au moyen de différents groupes fonctionnels, il est possible de leur conférer certaines des propriétés recherchées. Plusieurs applications dans divers domaines ont démontré leur potentiel. Particulièrement du côté de la biologie, ces molécules sont souvent comparées à des protéines, de par leur taille et leur structure globulaire. Lors de l'incorporation de fonctions carbohydrates en périphérie, des recherches ont démontré leur potentiel d'action au niveau des interactions sucres-protéines dues à l'effet cluster (augmentation de l'affinité saccharide-ligand grâce à leur multivalence). Ainsi, pour tenter d'inhiber l'adhésion de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à la glycoprotéine CFTR, des glycodendrimères fucosylés et/ou galactosylés en surface sont développés. Basées sur des voies synthétiques appropriées, ces structures sont synthétisées à partir de produits commerciaux sur lesquels des groupements azotures et propargyliques sont installés. Ces fonctions précises permettront d'utiliser la « *click chemistry* », très régiospécifique et versatile. Par la suite, des tests préliminaires en inhibition compétitive (tests ELLA) et de turbidimétrie ont démontré que les deux lectines de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* pouvaient interagir avec les unités carbohydrates présentes sur les dendrimères et former un précipité détectable à 490nm en fonction du temps. Ainsi, l'utilisation des dendrimères pour inhiber l'adhésion bactérienne pourrait représenter une thérapie alternative ou un complémentaire aux antibiotiques pour le traitement d'infections mortelles.

Mots-Clés : Chimie thérapeutique, fibrose kystique, *Pseudomonas aeruginosa*, glycomimétiques, L-fucose, glycosidation, cycloaddition 1,3-dipolaire, métathèse croisée, dihydroxylation asymétrique

CHAPITRE 1

LES DENDRIMÈRES

1.1 HISTORIQUE :

En portant une attention à l'organisation de la nature autour de nous, des scientifiques ont remarqué un arrangement particulier auquel ils se sont intéressés. Premièrement, ils ont remarqué que l'architecture dendritique est très répandue sur la planète. Plusieurs exemples de cet arrangement structural peuvent être observés dans divers organismes, tout particulièrement dans les systèmes biologiques. Par exemple, les branches et les racines des arbres, le système vasculaire des animaux et des plantes ainsi que les neurones en sont quelques exemples à diverses échelles de grandeur.¹

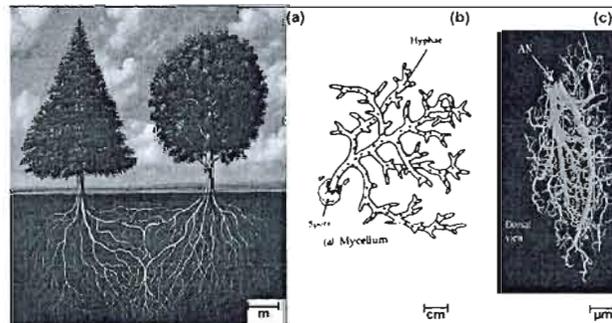


Figure 1.1 : Systèmes biologiques : a) conifères, feuillus et leurs racines, b) spore d'infection, c) neurone d'insecte.

Ainsi un intérêt particulier s'est développé pour la synthèse de molécules ayant ce type de structure. Diverses applications permettent de tirer profit de cette caractéristique particulière.

Ainsi, la conceptualisation de structures branchées par des méthodes classiques de polymérisation utilisant des monomères poly-fonctionnalisés a été développées dans les années '40 par Paul J. Flory (Prix Nobel de chimie en 1974).² Toutefois, aucun contrôle des masses moléculaires de ces structures n'était disponible à cette époque. La première architecture dendritique a été synthétisée dans les laboratoires de D.A. Tomalia vers la fin des années '70. Un concept de synthèse itérative dite « en cascade » a été développé et rapporté dans la littérature en 1978 par l'équipe de Vögtle en Allemagne,³ sans toutefois effectuer des synthèses de macromolécule. Parallèlement et indépendamment, le développement d'une voie de synthèse des premiers « Denkewalter-dendrimères » est effectué dans les laboratoires du groupe de Tomalia au cours des mêmes années. Le premier article utilisant le terme « dendrimère » et décrivant en détail la préparation du dendrimère poly(amidoamine), PAMAM, a été présenté à un congrès international en 1984.⁴ En 1985, on retrouve aussi une communication de Newkome et al. décrivant la synthèse d'arborols.⁵

Le terme « dendrimère » est issu de deux mots, soit « dendrite », évoquant des structures ramifiées et « polymère » pour la répétition d'un motif. Ainsi, le dendrimère est défini comme étant une macromolécule polyfonctionnelle monodisperse et hautement branchée constituée de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel.⁶

1.1.1 UNE NOUVELLE CLASSE MOLÉCULAIRE:

Au tout début, cette nouvelle classe de macromolécules polydendritiques n'était seulement qu'une curiosité et, comme toute nouveauté en science, les chercheurs doutaient de l'utilité et de l'efficacité de ces structures. Toutefois, grâce à l'élaboration des recherches dans divers domaines, le plein potentiel de ces macromolécules dendritiques a pu être démontré dans divers champs d'application. Non seulement le nombre de publications est en constante évolution, mais l'explosion concomitante du nombre de brevets, qui passa de 2 en 1981-85 à 51 en 1991-95, puis à 1022 de 2001-2005, reflète bien cette réalité.⁷

De nos jours, il existe quatre grandes classes de macromolécules synthétiques.

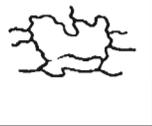
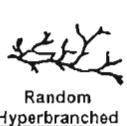
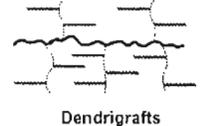
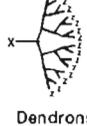
I	II	III	IV			
<i>Linear</i>	<i>Cross-Linked</i>	<i>Branched</i>	<i>Dendritic</i>			
			(a) 	(b) 	(c) 	(d) 
1930's	1940's	1960's	Random Hyperbranched	Dendrigrafts	Dendrons	Dendrimers
Plexiglass, Nylon	Rubbers, Epoxies	Low Density Polyethylene Metallocene-Based Polyolefins		Biomedical	- nano-drugs - gene expression - immuno diagnostics - controlled delivery	
				Electronics	- light harvesting - 3-D conductivity - quantum dots	
				Sensors	- chemical - biological	
				Coatings	- fast cure, low viscosities	

Figure 1.2 : Diverses classes d'architecture macromoléculaire.¹

Chacune de ces catégories démontre le degré de contrôle structural lors des synthèses. Dans les trois premiers cas, c'est-à-dire linéaire, réticulé et branché, c'est l'origine de la science traditionnelle des polymères. La topologie des ces macromolécules influence grandement les propriétés de polymères tels les thermoplastiques, les poly(oléfines), les catalyseurs de type métallocène, etc. Ces trois classes architecturales sont reconnues pour générer des produits de poids moléculaires polydispersés, ce qui est un trait caractéristique très important des polymères. Or, la quatrième classe « dendritique » offre l'opportunité de synthétiser des édifices moléculaires dont la structure est contrôlée et de poids moléculaire monodisperse, comparables à ce qu'on observe dans les systèmes biologiques.⁸

1.1.2 STRUCTURE DES DENDRIMÈRES :

Les dendrimères sont constitués principalement de trois parties, soit le cœur, la partie interne et la périphérie.

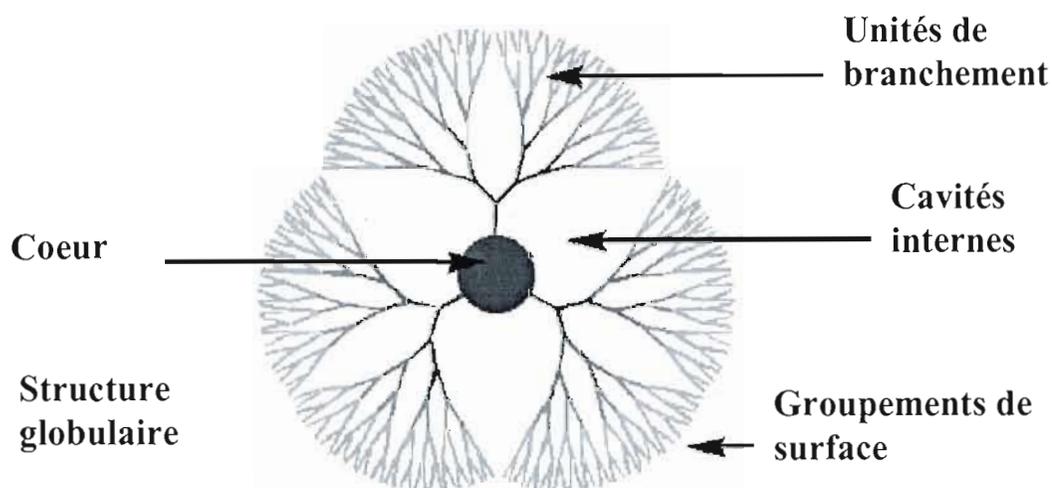


Figure 1.3 : Représentation de la structure d'un dendrimère.

Le cœur est en général une molécule multifonctionnelle qui dicte la structure, la taille et la multiplicité du dendrimère synthétisé. La partie interne du dendrimère, le corps, est une répétition du monomère. Le nombre de répétitions détermine la génération du dendrimère. La taille, la flexibilité, la multiplicité, la composition chimique et la topologie (par la présence ou non de cavité) sont influencées par le type de monomère retrouvé sur les différentes couches de jonctions. La nature et le nombre de groupements terminaux ont une importance primordiale pour les dendrimères. Augmentant exponentiellement selon les générations, ils constituent l'interface primaire du dendrimère avec son environnement. De plus, ils sont responsables des propriétés physiques et chimiques des dendrimères telles la solubilité, la réactivité chimique, la température de transition vitreuse et le volume libre.

Contrairement au polymère linéaire où leur croissance est théoriquement infinie, celle des dendrimères est mathématiquement limitée. À partir d'une certaine génération, les molécules dendritiques adoptent une conformation globulaire et, passé un certain stade, appelé l'empilement dense de Gennes,⁹ une limite stérique génère des défauts dans les structures.

En comparaison avec les polymères, la synthèse de ces architectures dendritiques possède plusieurs avantages, le plus important étant la monodispersité des structures obtenues. Il est aussi possible de contrôler le nombre ainsi que la nature des fonctions internes et en périphérie, la présence ou non de cavité, leur sensibilité à différents stimuli provenant de leur environnement, etc. Il est donc facile de moduler ces architectures de façon à obtenir des caractéristiques très précises.

La fonctionnalisation des dendrimères est possible, entre autre, par l'incorporation de groupements fonctionnels diversifiés en surface. Elle peut être aussi effectuée par l'encapsulation d'entités actives jointes, de façon covalente ou non, à l'intérieur ou à l'extrémité des structures, ainsi que par l'utilisation de divers types d'unités de branchement. Ceci permet d'obtenir une panoplie de propriétés physiques et/ou chimiques bien définies.

1.1.3 STRATÉGIE DE SYNTHÈSE DES DENDRIMÈRES

Depuis 1979, d'importantes recherches dans le domaine des dendrimères sont effectuées par plusieurs laboratoires dans le monde. Elles ont été marquées entre autre par le développement de deux stratégies de synthèse majeures. La première est la voie « divergente ». Rapportée en 1985 par Tomalia et Newkome lors de travaux indépendants,¹⁰ elle découle des recherches de Vögtle.¹¹ Ce dernier publia les premières structures dendritiques de faibles poids moléculaires. Cette synthèse s'effectue à partir de la partie centrale du dendrimère vers la périphérie. Il est possible d'obtenir des dendrimères de génération déterminée par une séquence réactionnelle itérative d'activation de fonction et de couplage.

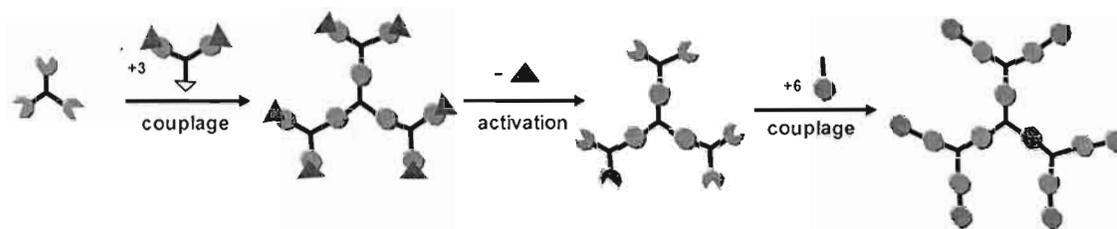


Figure 1.4 : Schématisation de la voie de synthèse divergente.

Tout débute par une étape de couplage qui joint les groupements d'un cœur plurifonctionnel à la partie réactive des monomères pour ainsi générer un dendrimère G_0 . Il s'en suit une étape d'activation des fonctions en périphérie qui s'effectue, soit par la conversion des unités fonctionnelles, soit par le départ de groupements protecteurs. Ainsi, une nouvelle couche de monomère peut être greffée, ce qui permet une croissance exponentielle des fonctions en périphérie, pour ainsi obtenir des dendrimères de générations supérieures. Cette séquence réactionnelle itérative permet donc d'obtenir rapidement des dendrimères de différentes générations. De ce fait, il est important que les fonctions terminales du monomère soient inertes vis-à-vis des groupements impliqués dans le couplage pour éviter une polymérisation hyperbranchée incontrôlable.

Avec un choix approprié de réactifs et de conditions réactionnelles à chaque étape de couplage et d'activation, l'approche divergente est idéale pour la synthèse à grande échelle de dendrimères. À chaque nouvelle génération, la quantité de produits formés a essentiellement doublé. Toutefois, les étapes de couplage impliquent aussi une augmentation exponentielle du nombre de réactions effectuées à la surface des dendrimères. Ceci nécessite un excès considérable en réactif (monomère). Cependant, les réactions incomplètes d'activation et de couplage, ainsi que les réactions de secondaires, augmentent de la même façon elles aussi. Ainsi, la purification devient complexe, car le dendrimère voulu et les produits secondaires sont de structures et de tailles semblables. Malgré les inconvénients de la synthèse divergente, plusieurs études ont démontré l'efficacité de cette méthode, dont entre autre, les travaux de Tomalia,⁸ Newkome¹² et Marjoral.¹³ Quelques structures issues de cette voie synthétique sont présentées ci-dessous.

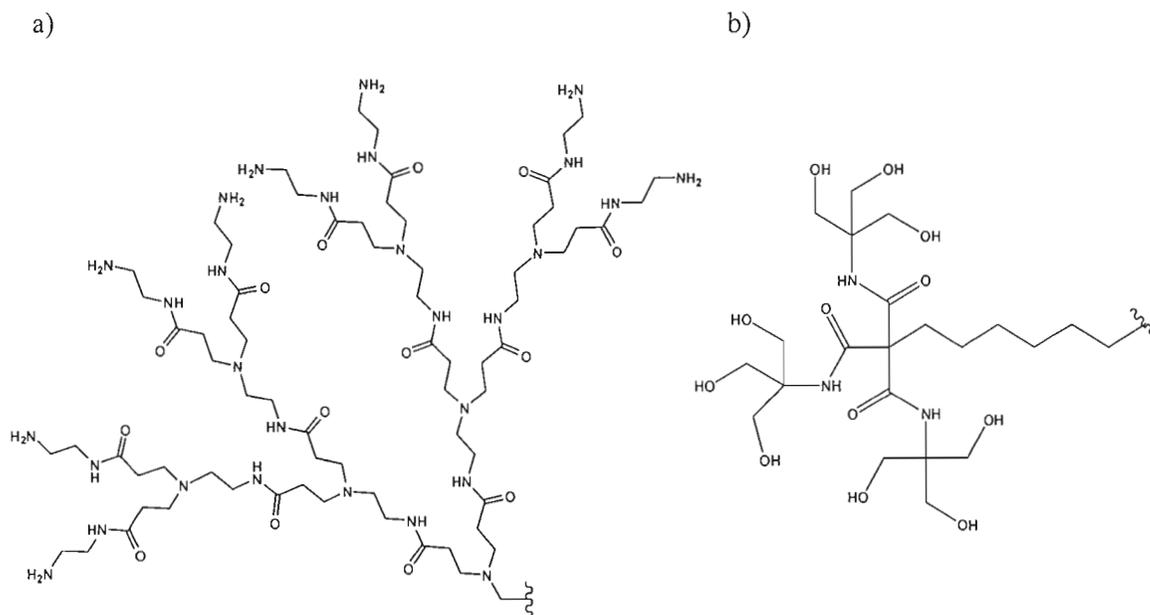


Figure 1.5 : a) PAMAM 2^{ème} génération⁸ b) Arborol¹²

Vers les années 90, une seconde méthode de synthèse a vu le jour. Rapportée dans la littérature en premier par Hawker et Fréchet,¹⁴ la « synthèse convergente » consiste à synthétiser les dendrons qui seront condensés à un cœur plurifonctionnel. Ainsi, dans un premier temps, les groupements terminaux sont greffés à chacune des branches du monomère. Ensuite, l'activation du groupement fonctionnel situé au point focal du monomère permet la condensation de ce dernier aux extrémités d'un autre monomère. Après une répétition de ces étapes, ce processus permet d'obtenir des dendrons de différentes générations qui seront joints à un cœur polyfonctionnel par leur fonction au point focal pour former un dendrimère globulaire. Les différentes étapes de la synthèse convergente sont schématisées à la figure 1.6.

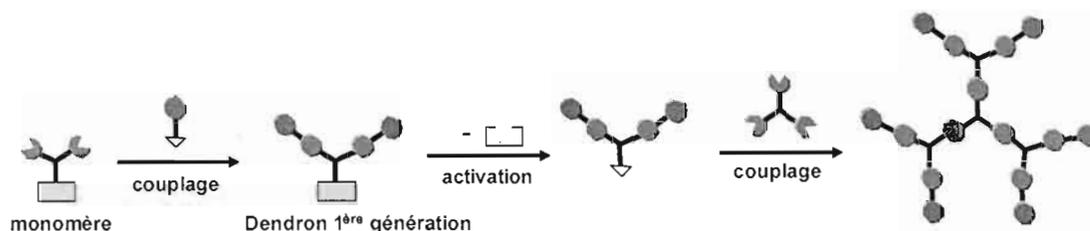


Figure 1.6 : Schématisation de la voie de synthèse convergente.

Lors du passage vers une génération supérieure, la masse moléculaire des dendrons double, ce qui a pour effet de décroître exponentiellement la contribution de la masse du monomère à celle du produit final. Ainsi, l'efficacité des étapes de couplage et de purification est affectée positivement. Par contre, le couplage des dendrons au cœur s'effectue à partir de la fonction au point focal des dendrons, ce qui limite la synthèse de dendrimères de haute génération, dû à un empêchement stérique qui affecte le rendement des synthèses.

Constituant aussi un mode de synthèse itératif, la principale différence de cette approche avec la précédente réside au niveau des étapes d'activation et de couplage. Un nombre moins important de réactions par molécule est effectué, ce qui nécessite un moins grand excès de réactif pour la synthèse de dendrimères de génération supérieure. L'étape de purification du produit est facilitée d'autant. La dissimilitude entre les molécules permet de purifier le produit efficacement par chromatographie. L'analyse suivante par spectroscopie de masse (MALDI-TOF) le démontre bien. La figure 1.7a présente le spectre d'une molécule dendritique de génération 5 obtenue selon la stratégie convergente et la figure 1.7b, un dendrimère de génération 4 obtenue selon la stratégie divergente.¹⁵

Finalement, la partie la plus fastidieuse de la synthèse de dendrimères demeure l'étape de purification. Ainsi, les chercheurs ont tenté de développer différentes méthodes qui leur permettent d'obtenir des dendrimères monodisperses de haut poids moléculaire tout en limitant le nombre d'étapes de synthèse. En combinant le principe des méthodes convergentes et divergentes, ils ont développé des méthodes dites accélérées. Dans les années '90, Fréchet et ses collaborateurs publièrent une synthèse convergente « *double-stage* » à base d'*hypercore*.¹⁶ Quelques années plus tard, ils publièrent aussi une autre approche basée sur d'*hypermonomères*, ou « *branched monomer approach* », pour synthétiser ces dendrimères plus rapidement.¹⁷ Basée sur une double croissance exponentielle du dendrimère, elle possède les avantages des synthèses convergentes et divergentes standards. D'autres méthodes ont été mises au point par l'équipe de Moore¹⁸ en 1995, suivie de l'équipe de Fréchet¹⁹ en 1998. Pour relever le défi, les chercheurs ont développé un autre type d'approche, la synthèse orthogonale. Cette stratégie convergente est basée sur l'utilisation de différents types de monomères, au lieu d'un seul, pour conceptualiser une diversité de dendrimères dissymétriques. Le premier à utiliser cette méthode fut le groupe de Fréchet en 1993.²⁰ Une série de dendrimères homogènes et hétérogènes a été produite au moyen de cette stratégie de synthèse. Toutefois, le choix des monomères doit permettre d'éviter que chacun d'eux ne réagisse avec lui-même au lieu de réagir avec l'autre monomère, ce qui rend cette méthode moins utilisée que les autres pour la synthèse de dendrimères.

A l'aide de ces différentes méthodes, les scientifiques ont laissé leur imagination explorer la science des dendrimères. Une panoplie d'architectures dendritiques a été synthétisée, chacune possédant différentes propriétés structurales, chimiques et physiques. Ainsi, l'utilisation de dendrimères dans plusieurs domaines s'est révélée efficace. Différentes applications possibles seront discutées dans la prochaine partie du chapitre.

1.1.4 UTILISATION DES DENDRIMÈRES DANS LE DOMAINE DE LA CHIMIE

Les structures dendritiques ont démontré leur potentiel en chimie comme catalyseurs. À cause de leur versatilité, les dendrimères peuvent tout aussi bien s'appliquer à la catalyse homogène qu'hétérogène.²¹ Aucune frontière ne limite le design de ces molécules connues

sous le nom de métallodendrimères.²² Par exemple, on a observé que, lors de couplages carbone-carbone, un complexe dendritique de PdII avec des polyphosphines catalyse la réaction de Heck.²³ D'autre part, Alonso et Astruc ont orienté leurs recherches vers l'utilisation de dendrimères décorés en périphérie d'agrégats contenant trois métaux qui catalyseraient des réactions de transfert d'électron (*electron transfer chain*).²⁴ Aussi, les travaux de Chow ont démontré que la réaction de Diels Alder peut être catalysée en présence de Cu(II).²⁵

Un autre exemple de l'utilité des dendrimères lors de réactions courantes en chimie est illustré par les travaux de Majoral²⁶. Comme le montre la figure 1.8, l'utilisation de dendrimères contenant des ligands de diphosphine permet de catalyser les couplages de Stille, les condensations de Knoevenagel et les additions de Michael. Le catalyseur dendritique est aussi efficace, sinon plus, que les catalyseurs usuels. De plus, il est possible de le récupérer, presque en totalité à la fin de la réaction.

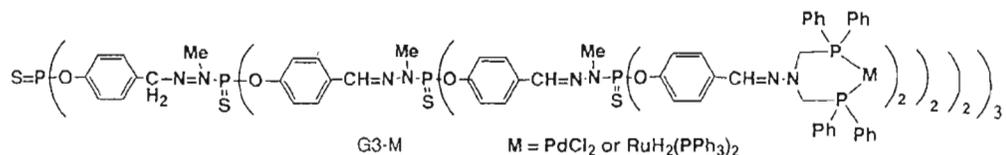


Figure 1.8 : Exemple d'un dendrimère G-3 à base de diphosphine contenant 24 atomes de palladium ou ruthénium, tiré de Majoral et al.²⁶

Pour les synthèses chirales, c'est en 1994 que les premiers travaux décrivant l'utilisation de métallodendrimères ont été publiés par le groupe de recherche de Brunner.²⁷ Ce dernier les appelle des « dendrizymes » car ils contiennent des phosphines dendritiques, ce qui leur confère une certaine ressemblance avec les enzymes. Les dendrizymes ont été utilisés lors de réactions d'hydrogénation et de cyclopropanation asymétrique.²⁸

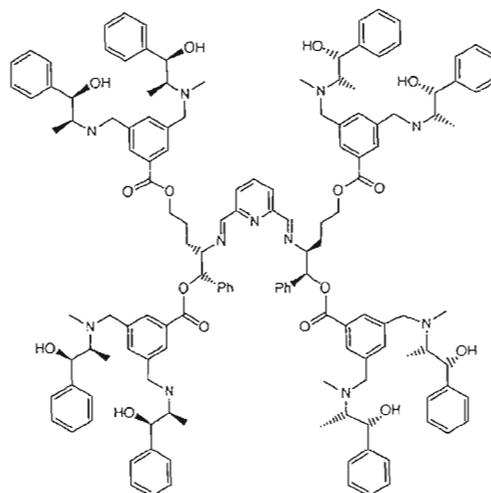


Figure 1.9 : Exemple de dendrzyme synthétisé par Brunner et al.²⁷

Ce ne sont que quelques exemples de réactions chimiques standards où les dendrimères ont montré leur utilité. On retrouve aussi dans la littérature plusieurs autres publications sur ce sujet et d'autres systèmes comparables permettant de faciliter et d'élargir les possibilités de la chimie conventionnelle sont sans cesse développés.²⁹

1.1.5 UTILISATION DES DENDRIMÈRES DANS LE DOMAINE DES TECHNOLOGIES.

Les nanotechnologies représentent un des secteurs d'évolution les plus remarquables au cours des dernières décennies, permettant de développer un large éventail de nouveaux matériaux d'origine organique. Ainsi, la recherche sur la miniaturisation de diverses composantes évolue en parallèle avec le développement de macromolécules multifonctionnelles pouvant s'auto-assembler. Des applications technologiques concrètes telles les cristaux liquides, les cellules photovoltaïques, DELs, FETs et plusieurs autres sont le fruit de ces travaux. L'application des dendrimères à ce domaine a permis d'apporter des solutions ou de contourner certains problèmes rencontrés avec les structures conventionnelles.

Les cristaux liquides ou l'état mésomorphe de la matière possèdent des propriétés intermédiaires entre les solides cristallins et les liquides. Un des grands avantages de ces

matériaux est qu'on peut facilement agir sur leur structure au moyen d'agents physiques extérieurs. Ce type de composé se retrouve souvent dans les produits comportant des afficheurs à cristaux liquides (LCD), comme les montres, les calculatrices, les téléphones mobiles, les ordinateurs portables, etc.

Les dendrimères entrant dans la composition de cristaux liquides décrits dans la littérature sont majoritairement des composés thermotropes. L'organisation de la structure (apparition de mésophase) est influencée par des changements de température. Les différents types d'auto-assemblage possible dépendent de la nature des fonctionnalités mésogènes en périphérie ainsi que de la structure du dendrimère utilisé. Ainsi, différentes mésophases peuvent être obtenues. Par exemple les travaux de Lattermann³⁰ et de Meijer³¹ présentent des dendrimères de type PPI avec des groupements mésogènes formant des mésophases lamellaires, des colonnaires rectangulaires ou hexagonales, selon la température.

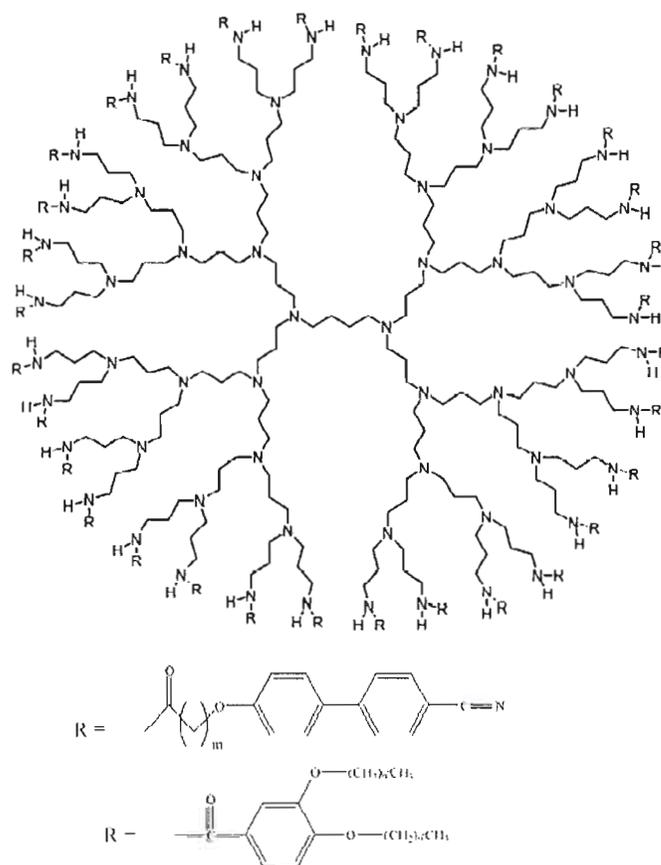


Figure 1.10 : Exemple de dendrimère à base de poly(propylenimine) et deux types de groupements mésogènes.³⁰

Les travaux de Percec³² présentent aussi un autoassemblage de dendrons sous formes cylindrique ou sphérique générant des dendrimères supramoléculaires qui forment des mésophages colonnaires hexagonales ou cubiques, selon le degré de substitution des unités répétitives.

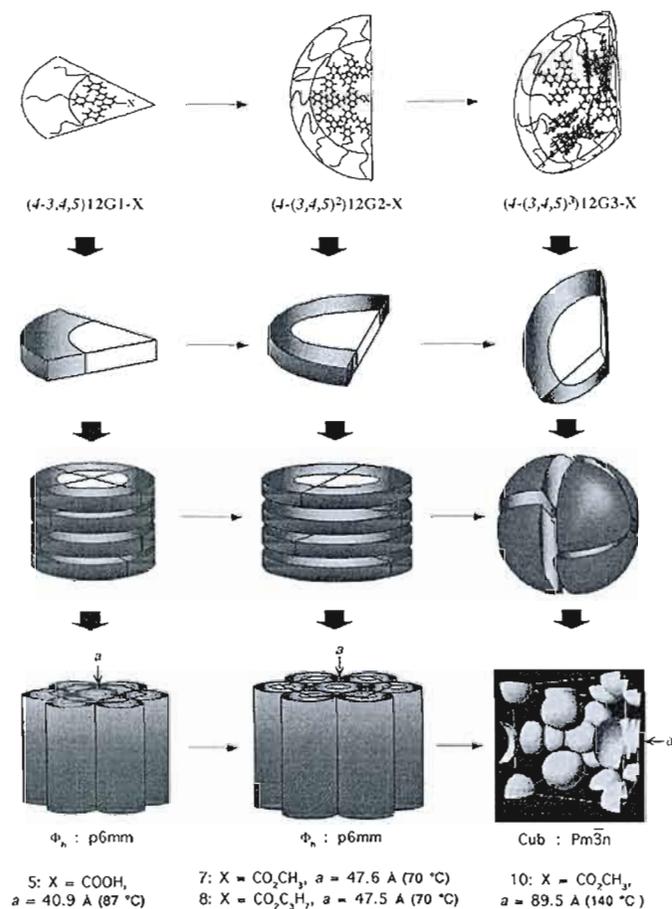


Figure 1.11 : Auto-assemblage de dendrons formant un dendrimère supramoléculaire.³²

D'autres groupes de recherche ont démontré que, selon la taille des dendrimères, différents facteurs peuvent gouverner l'organisation moléculaire. Entre autre, les travaux de Deschenaux et Nierengarten³³ ont décrit la synthèse de dendrimères mésomorphes à base de fullerène. Leurs résultats indiquent que la génération des dendrimères influence le comportement de l'autoassemblage des molécules. Pour ce qui est des dendrimères de basses générations, c'est le facteur stérique qui gouverne l'organisation, alors que pour ceux de générations supérieures, ce sont les unités mésogènes qui dominent. Ainsi, les recherches dans ce domaine visent une meilleure compréhension des comportements observés des cristaux liquides, selon les caractéristiques suivantes : la nature chimique des groupements mésogènes, ainsi que le type et la génération de dendrimères utilisés.

Les diodes électroluminescentes organiques (OLEDs) sont issues d'une technologie récente qui vise à remplacer les cristaux liquides dans les appareils d'affichage. De nos jours, plusieurs problèmes de stabilité, de durabilité et de rendement sont rencontrés avec les OLEDs à base de luminophores conjugués. Ainsi, des chercheurs tentent d'utiliser des dendrimères pour remédier à ces problèmes. Les dendrimères synthétisés sont des systèmes bichromatiques qui doivent contenir un chromophore à l'état excité et un autre à l'état neutre. Un transfert d'électron peut avoir lieu lorsque le donneur retourne à l'état neutre, simultanément avec la promotion de l'accepteur à l'état excité.³⁴ Ainsi, les dendrimères synthétisés doivent contenir deux types de chromophores émettant à différentes longueurs d'ondes.³⁵

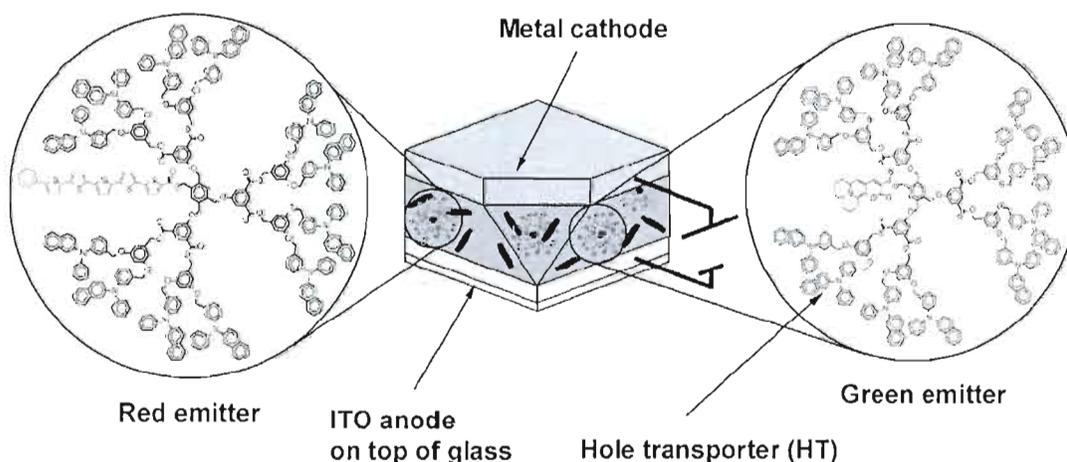


Figure 1.12 : Représentation schématique d'une LED contenant des dendrimères avec des cœurs de pentathiophène (red emitter) et coumarin-343 (green emitter).

Des études récentes³⁶ ont aussi montré l'utilité de dendrimères dans la fabrication de piles photovoltaïques. Diverses générations d'architectures dendritiques contenant une variété de groupements donneurs et accepteurs (porphyrines, fullerène, etc.) ont été synthétisées pour déterminer la meilleure combinaison présentant un potentiel maximal de transfert de charge. Par exemple, les récents travaux de Müllen³⁷ ont démontré qu'un système dendritique ayant comme donneur le pérylènediimide et, comme récepteur, le terylènediimide, espacés par

le pentaphénylbenzène, ont permis d'effectuer un transfert de deux électrons de type Förster (FRET) efficacement et indépendamment.

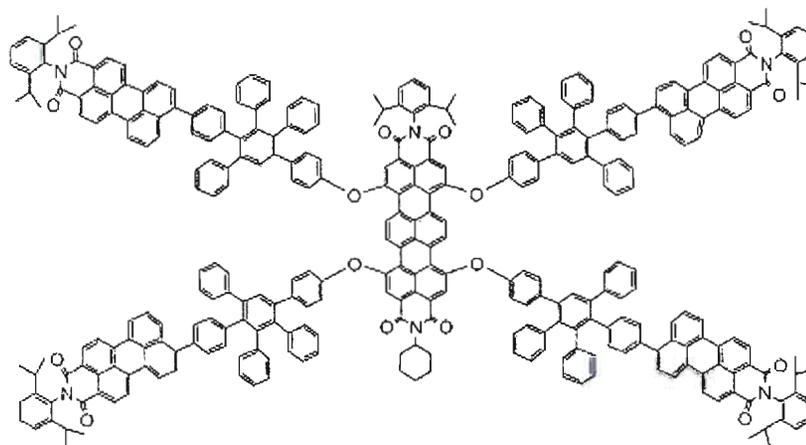


Figure 1.13 : Première génération du dendrimère de Müllen.³⁷

Ces quelques exemples démontrent que l'utilisation des dendrimères dans les sciences des matériaux est très récente et en plein développement. Par leurs avantages, les dendrimères semblent être une classe de macromolécules très prometteuses pour la découverte de nouveaux matériaux.

1.1.6 UTILISATION DES DENDRIMÈRES DANS LE DOMAINE BIOLOGIQUE.

La formation de systèmes moléculaires de grosseurs et de formes définies est très recherchée pour des applications biomédicales. Tel que mentionné précédemment dans l'introduction, l'architecture dendritique est la topologie la plus fréquemment observée dans les systèmes biologiques. C'est ainsi que les dendrimères se sont avérés efficaces comme biomimétiques. Selon leurs caractéristiques structurales, ils sont souvent comparés à des protéines artificielles. Avec le développement de ces structures qui est en croissance exponentielle, on leur trouve différentes applications médicales. En tenant compte de leur toxicité et de leur biocompatibilité, ils peuvent être utilisés, entre autre, pour la libération contrôlée de médicaments, comme agents porteurs en thérapie génique, dans le domaine de l'imagerie magnétique nucléaire et comme actifs thérapeutiques.

C'est en 1984 qu'une première famille de dendrimères nommée PAMAM a été complètement synthétisée et caractérisée; sa commercialisation par D.A. Tomalia a suivi en 1990.³⁸ Ces dendrimères monodisperses sont souvent associés à des protéines artificielles. Cette famille de dendrimères ($G = 0-7$) présente des grosseurs de molécule et des environnements chimiques comparables à de plusieurs protéines qu'on retrouve dans le corps humain. Par exemple, l'insuline (3 nm), le cytochrome C (4 nm), l'hémoglobine (5.5 nm) sont de même grosseur et de même forme que les dendrimère PAMAM de générations 3, 4 et 5 respectivement.³⁹ Les ressemblances entre les protéines et les dendrimères PAMAM de différentes générations sont illustrées à la figure 1.14.

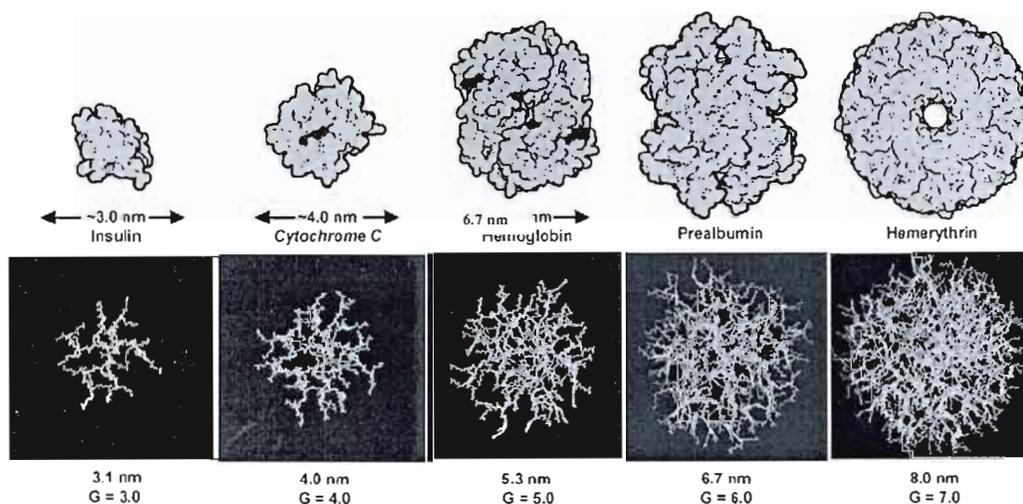


Figure 1.14 : Comparaison entre les dendrimères PAMAM $G = 0$ à 7 et les systèmes biologiques.¹

De plus, les générations 5 et 6 des PAMAM présentent un diamètre presque équivalent à la membrane lipidique d'une cellule (5.5 nm), alors que la largeur de la deuxième génération de PAMAM correspond environ à celle d'un double brin d'ADN. Ainsi, on a pu observer que des complexes stables d'ADN et de PAMAM de générations 7 à 10 pouvaient se former, tout comme le font les histones et l'ADN. Ces complexes de dendrimères formés permettraient de condenser et d'emmagasiner l'ADN avec les nucléosomes.⁴⁰

Malgré les ressemblances entre les dendrimères et les protéines globulaires, il existe tout de même des différences significatives. Par exemple, les protéines sont constituées de structures

tertiaires et quaternaires linéaires ayant subi un repliement complexe. Elles sont extrêmement fragiles, photosensibles et susceptibles d'être dénaturées si elles se retrouvent dans certaines conditions de pH et de température. Ces complexes de protéines présentent un intérieur dense et compact. De plus, des fonctionnalités hydrophobes et hydrophiles en surface sont disposées de façon hétérogène. Les complexes dendrimériques sont reconnus pour être robustes et liés de façon covalente. L'intérieur se présente comme un récepteur qui permet de recueillir des entités chimiques à l'échelle du nanomètre. Ainsi, avec un extérieur homogène et mathématiquement défini, ils forment une structure rigide de masse molaire équivalente aux protéines.

Pour être utilisables dans le développement d'agents thérapeutiques ou comme vecteurs d'actif *in vivo*, les dendrimères doivent respecter un certain nombre de critères biologiques bien précis. Ils doivent d'abord être non-toxiques, non-immunogéniques, capables de traverser des barrières biologiques (la paroi intestinale, les membranes cellulaires, etc), avoir une durée de vie adéquate dans le sang pour obtenir l'effet désiré et être spécifiques pour des cibles déterminées.

La plupart des études effectuées pour déterminer la cytotoxicité utilisent des tests *in vitro*. Pour des fins d'applications biomédicales, deux principales familles de dendrimères commercialement disponibles, les polyamidoamines (PAMAM) et les polypropylènimines (PPI), ont été testées.

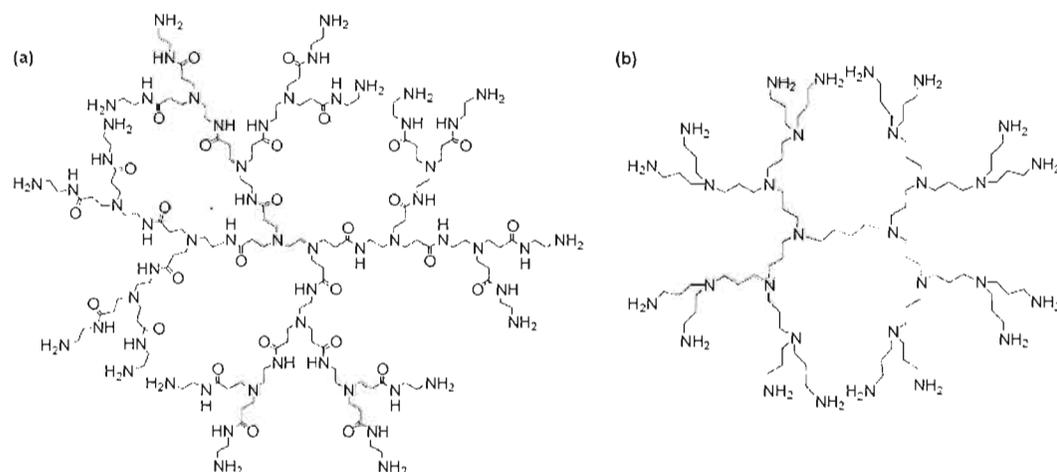


Figure 1.15 : Représentation de la deuxième génération du dendrimère a) PAMAM et b) PPI

En milieu physiologique, les structures possédant des terminaisons amines en surface se retrouvent sous forme cationique. Ainsi, toute macromolécule cationique provoque une déstabilisation des membranes cellulaires, ce qui occasionne la lyse cellulaire.⁴¹ Par exemple, des mesures d' IC_{50} effectuées avec les PAMAM aux terminaisons amines ont indiqué une cytotoxicité élevée sur les cellules intestinales humaines adénocarcinome Caco-2.⁴² La quatrième génération de PAMAM et de PPI présente un IC_{50} de 50-300 $\mu\text{g/ml}$.⁴³

De plus, il a été démontré que la cytotoxicité des composés varie selon la génération du dendrimère. En d'autres mots, plus la masse du composé testé est élevée, plus il est toxique. Ceci peut s'expliquer, entre autre, selon le degré de substitution des amines en surface. Ainsi, plus la dimension du dendrimère augmente, plus le nombre d'amine primaire en surface est considérable ce qui occasionne une barrière de charge positive en périphérie du dendrimère. Toutefois, ils demeurent moins toxiques que leurs équivalents en masse sous forme de polymères linéaires. Ceci est probablement dû à une plus faible adhérence du dendrimère globulaire à la surface des cellules.⁴⁴

Des études récentes ont démontré que les dendrimères cationiques présentaient une cytotoxicité supérieure à celle observée pour les dendrimères anioniques (terminés par des

groupements carboxylates) et ce, pour la moitié en génération.⁴⁵ Les travaux de Robert et coll.⁴⁶ précisent que les PAMAM et PPI cationiques diminuent considérablement la viabilité des cellules pulmonaires. Ces auteurs ont rapporté que l'apoptose cellulaire est présente à 90% avec 1 nM (~ 7 ng/ml) de dendrimère de 3^{ième} génération, 10 μ M (~280 μ g/ml) avec la 5^{ième} génération et 100 nM avec la 7^{ième} génération.

Toutefois, il ne faut pas tenir compte seulement des fonctions de surface pour déterminer la biocompatibilité des dendrimères. Des dendrimères anioniques dont l'architecture est basée sur un squelette de polyéther aromatique se sont avérés hémolytiques dans une solution sanguine de rat après 24H.⁴³

En dérivant leur surface avec des fonctionnalités inertes, soit des acides gras ou des PEG, ces dendrimères deviennent non toxique en présence des cellules Caco-2. Ceci s'explique par une diminution des charges positives suite à la transformation des amines primaires en amides et une encapsulation des amides tertiaires dans le corps des dendrimères. Toutefois, on obtient l'effet contraire s'il y a saturation de la surface en chaînes lipidiques ou PEG dû à la présence trop importante d'interactions hydrophobes.⁴⁵

Dans la littérature, on retrouve peu d'études *in vivo* avec des dendrimères. Il a été mentionné que l'injection à une souris d'une dose de 10 mg/kg de PAMAM, modifié ou non, de génération supérieure à G5, semble être non toxique.⁴⁷ Une autre étude a montré qu'une heure après l'injection intraveineuse de PAMAM de génération 16 et 32 sous forme amine à un rat, moins de 2% de la quantité injectée se retrouvait dans le sang. De plus, pour le PAMAM aux terminaisons carboxyles, une concentration de 10 à 20 fois supérieure est nécessaire pour observer les mêmes résultats. Ces études semblent indiquer que les dendrimères de faible génération circulent dans le sang plus longtemps, tandis que ceux de générations supérieures sont retenus dans le foie de 30 à 90%.

De plus, d'autres études ont révélé qu'un dendrimère de 4^{ième} génération, constitué d'un squelette polyéther avec des terminaisons hydroxyle ou méthoxy, ne présentait qu'une faible toxicité, aussi bien lors de tests *in vitro* que *in vivo*. À concentration élevée (40 mg/ml), ce

dendrimère inhibe la croissance cellulaire *in vitro*, mais aucune mort cellulaire n'est observée. Suite à l'injection à une souris, aucun problème de toxicité à court terme ou à long terme n'est apparu.⁴⁸ Les propriétés non toxiques de cette architecture à base de polyéther semblent indiquer qu'on pourrait l'utiliser comme agent biodégradable par les enzymes lors de la libération contrôlée de médicaments.

Des études avec les PAMAM cationiques non modifiés de générations G3 à G7 ont permis de démontrer leur faible immunogénicité.⁴⁹ Par la suite, d'autres études ont montré qu'en modifiant les dendrimères avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG), l'immunogénicité diminuait encore et une meilleure durée de vie dans le sang était observée, en comparaison aux dendrimères non modifiés. L'hydrophilicité étant augmentée grâce au PEG, la surface du dendrimère hautement hydratée fait en sorte qu'aucune variation du milieu physiologique n'est observée.⁵⁰

Dans l'éventualité d'utiliser les dendrimères comme agents thérapeutiques ou transporteurs de substances actives, la notion de bioperméabilité au niveau macroscopique doit être prise en considération. Des études *in vivo* ont révélé que des dendrimères PAMAM de générations G1 à G4 pouvaient facilement traverser la membrane des cellules rénales de chiens. L'étude n'indique aucune dépendance entre la perméabilité des cellules et la génération des dendrimères.⁵¹ Par contre, une étude du transport transépithélial des dendrimères, terminés par des groupements amines, en présence d'une monocouche de cellules Caco-2 a permis d'observer une perméabilité importante à l'endroit des petits dendrimères (G0-G2). Une cytotoxicité serait observée dans le cas de dendrimères de génération supérieure.⁵² En comparaison avec le système polymérique, des études *in vivo* ont aussi démontré que les dendrimères anioniques de PAMAM pouvaient traverser la paroi intestinale de rats très rapidement.

Dans les paragraphes qui suivent, des études relatives aux principaux champs d'applications biomédicales des dendrimères, tels la libération contrôlée de médicament, les vecteurs d'actifs pour la thérapie génique ainsi que pour l'imagerie médicale et leur utilisation comme agents thérapeutiques sont rapportées.

La libération contrôlée des médicaments est un domaine d'application d'intérêt pour les dendrimères car elle permet d'augmenter la sélectivité et la stabilité d'agents thérapeutiques. Plusieurs architectures macromoléculaires comme les liposomes et les systèmes polymériques peuvent être utilisés pour la libération de nanoparticule. Toutefois, ces composés possèdent quelques caractéristiques qui limitent leur potentiel d'utilisation (stabilité limitée, polydispersité élevée, faible reproductibilité...). Ainsi, les dendrimères représentent une alternative valable aux systèmes de libération courants. De plus, on peut moduler leur synthèse en fonction de la substance active d'intérêt.

Il existe quelques exemples de l'application de dendrimères au relargage de substances d'intérêt pharmaceutique. Ainsi, l'encapsulation du cis-platine (substance anti-cancer) dans un dendrimère PAMAM permet de libérer lentement et d'accumuler la substance dans la tumeur cancéreuse avec une toxicité moindre que le cis-platine administré sans transporteur.⁵³ Également, l'encapsulation de sel d'argent dans des dendrimères a permis d'obtenir une activité antimicrobienne accrue envers une variété de bactéries Gram-positives.⁵⁴

Le transport d'une substance active au moyen de dendrimères peut s'effectuer, soit par encapsulation (sans lien covalent) à l'intérieur des dendrimères, ou par liaison covalente à la structure dendritique (à l'intérieur ou l'extérieur). Cependant, les dendrimères, comme tout transporteur synthétique, doivent respecter certaines conditions essentielles pour être utilisables pour une application biomédicale. Entre autre, ils doivent être biocompatibles, non toxiques, hydrosolubles et capables de traverser les barrières biologiques. De plus, leur biodistribution devra permettre de libérer l'actif de façon contrôlée en fonction du temps, de façon à ce que la concentration soit adéquate et à l'endroit voulu pour éviter les effets secondaires.

L'encapsulation permet de conserver la structure des actifs et ses propriétés pharmacologiques intactes. De plus, elle permet le transport de médicaments peu soluble en milieu aqueux vers les cellules/tissus cibles. Selon le type de dendrimère et des molécules encapsulées, ce transport est basé sur diverses interactions, soit des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes, des interactions π - π , des interactions dipôle-dipôle, des interactions

électrostatiques, etc. Par exemple, selon la constitution des dendrons et la génération du dendrimère, la présence de cavité permet de créer un nano-environnement qui est protégé de l'extérieur par une surface hautement fonctionnalisée. Ces cavités de différentes tailles et de différents volumes permettent d'accueillir une panoplie de molécules de tailles variables. Un exemple de ce type de récepteur est la boîte dendritique développé par Meijer.⁵⁵ Ce dendrimère PPI de 5^{ième} génération est modifié en surface par des groupements protégés Boc-phénylalanine, créant ainsi une surface encombrée stériquement. Différents formats de molécules peuvent ainsi être encapsulées dans la structure, autant de grosses molécules comme le Rose de Bengal que de petites molécules comme le carboxylate de l'acide par-nitrobenzoïque. Suite à une acidolyse sélective des groupements Boc en surface, les molécules de plus petites tailles peuvent être libérées. Une autre réaction d'acidolyse des liens amides est nécessaire pour libérer les molécules de masse moléculaire plus élevée, ce qui permet de retrouver le dendrimère PPI non modifié.

Un fait intéressant est qu'en incorporant des liens dégradables par hydrolyse physiologique ou enzymatique à la surface du dendrimère, il est facile de perforer la surface extérieure et d'effectuer une libération contrôlée de médicament.

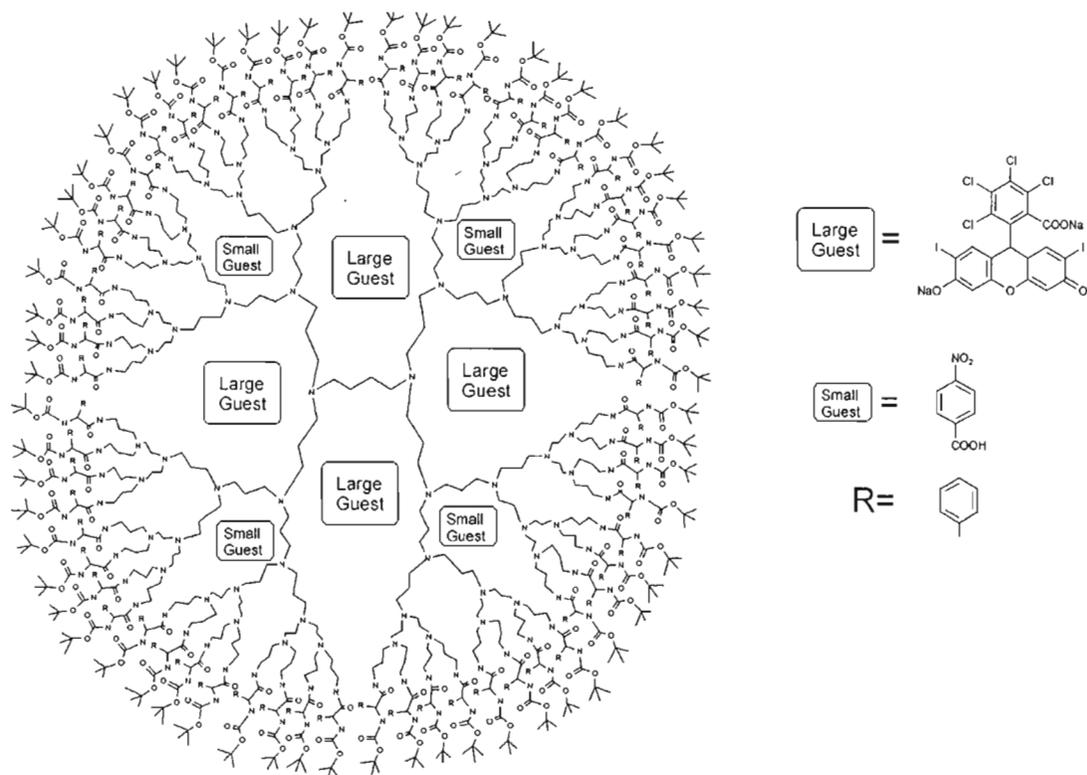


Figure 1.16 : La boîte dendritique.⁴¹

Plusieurs autres études ont été menées pour développer des architectures dendritiques permettant d'encapsuler des substances actives de manière non-covalente (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, hydrophobes).⁵⁶ Toutefois, on a dû constater que cette approche comporte plusieurs limitations, incluant la petite quantité d'ingrédient actif pouvant y être encapsulée et la fragilité des complexes ainsi formés. Ces résultats ont poussé le développement de l'approche covalente.

Cette approche est basée sur une liaison chimique des ingrédients actifs à la structure et ainsi générer un complexe dendritique de type précurseur (*prodrug*). La capacité de transport d'actif est aussi supérieure à celle obtenue par encapsulation. Il faut toutefois s'assurer de garder intact les actifs suite à leur libération. Ceci peut se faire de deux façons : par clivage spécifique de l'actif du dendrimère ou par dégradation partielle ou entière du dendrimère de façon à libérer l'actif.

Les précurseurs dont les actifs sont liés de façon covalente à l'intérieur ou à l'extérieur de la structure requièrent un clivage spécifique selon la nature de la liaison et ce, soit par voie chimique et/ou enzymatique. L'actif et le dendrimère doivent être choisis de façon à être compatibles avec le mode de synthèse; l'actif doit également contenir une fonction chimique permettant de le lier de façon covalente à la structure dendritique et permettant de le retrouver intact suite au clivage. D'autre part, le dendrimère doit être biocompatible, non toxique et hydrosoluble. De plus, le squelette dendritique ne doit pas être affecté par le processus de clivage de façon à éviter la formation de fragments de dendrimère potentiellement toxiques. Les travaux de Fréchet^{50,57} dans ce domaine citent l'exemple d'un dendrimère lié à une substance, la doxorubicine (AdriamycineTM).

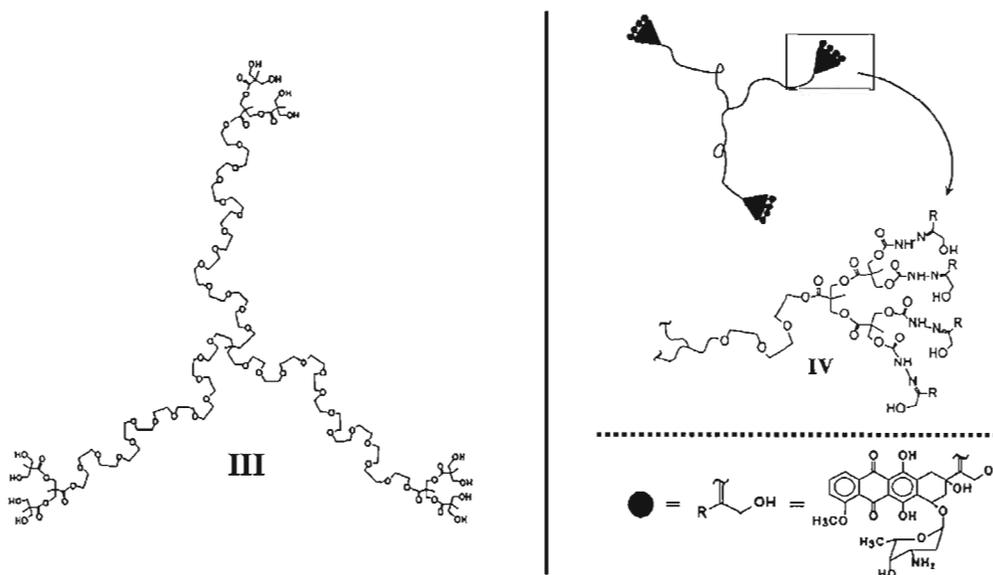


Figure 1.17 : Exemple de l'attachement covalent d'un actif (Doxorubicin) sur un dendrimère.

Des tests *in vivo* et *in vitro* ont démontré que selon la génération des dendrimères, le temps de demi-vie des complexes dans le flux sanguin est influencé. Plus sa taille est élevée, plus le dendrimère est stable, plus il demeure actif et meilleure est sa biodistribution. On a aussi observé que, dans le cas de la doxorubicine liée au dendrimère de la figure 17, la toxicité de son complexe est beaucoup plus faible que celle de sa forme libre. L'étape de clivage s'effectue à des valeurs de pH comparables à celles qu'on retrouve dans les lysosomes (pH ~ 4-6).

Une autre stratégie envisagée pour libérer le médicament lié de façon covalente au porteur dendritique est la dégradation de ce dernier. Un processus général, initié par un stimulus approprié (chimique, thermique, enzymatique, électrique ou photochimique), conduit à une dégradation en cascade de l'architecture et, ainsi, à la libération des actifs liés à la structure. Il est donc important d'avoir un système de dégradation qui agira seulement sur le dendrimère et qu'aucune interaction secondaire n'interférera avec l'actif.

C'est en 1996 que des premiers travaux sur la synthèse et la dégradation en cascade de dendrimère commençaient à être publiés par le groupe de Seebach.⁵⁸ Plusieurs études se sont développées par la suite.⁵⁹ Au cours des dernières années, le groupe de Shabat a étendu ce concept à la libération de principes actifs en nommant leurs dendrimères « *self-immolative dendrimers* ». ⁶⁰ La figure suivante démontre les étapes de la dégradation en cascade mises au point par ces auteurs.

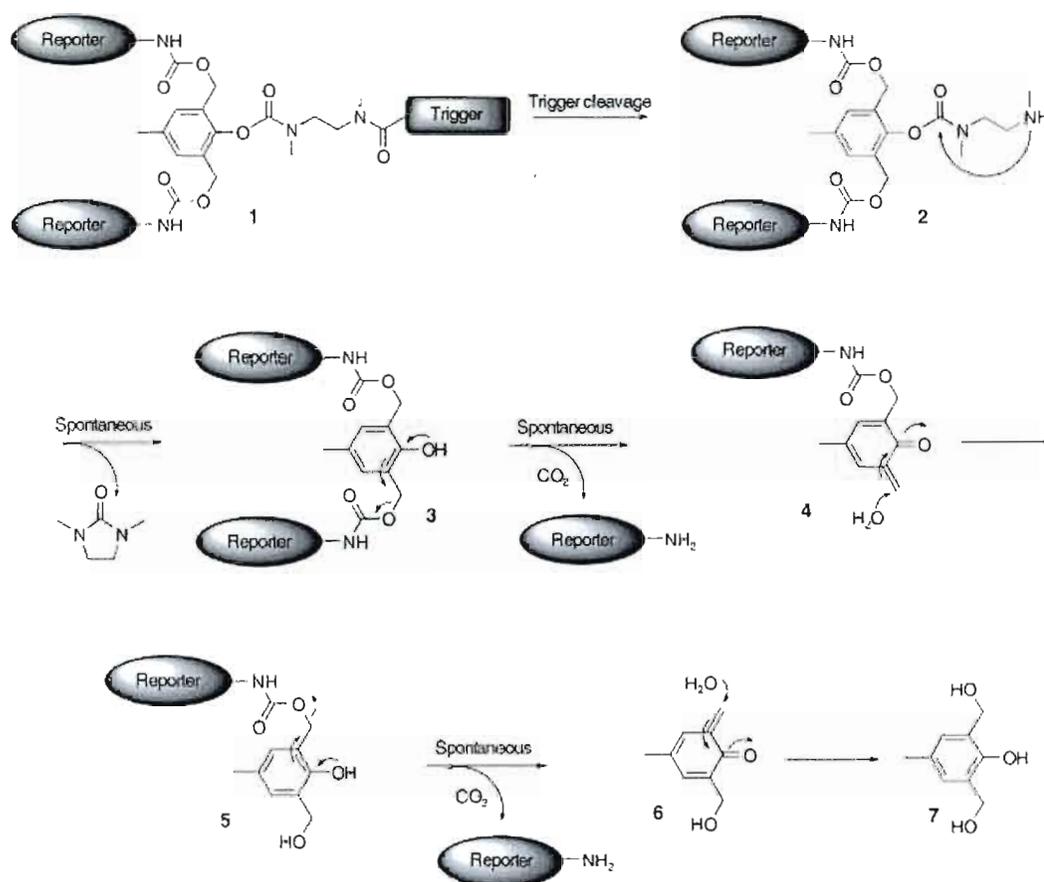


Figure 1.18: Réaction en chaîne de dégradation des dendrimères du groupe de Shabat.⁶⁰

Terminée par deux principes actifs, soit le doxorubicine et la camptothécine, l'amorce de la dégradation s'effectue par l'anticorps catalytique C32 qui clive de façon enzymatique le lien amide liant l'activateur au dendrimère. Ensuite, des réactions bien connues de rétro aldol-rétro Michael, ainsi qu'une étape de dégradation en cascade, permettront de libérer les médicaments. Les études biologiques *in vivo* ont été par la suite effectuées avec ces précurseurs; ces substances ne présentent pas une toxicité supérieure à celle des principes actifs libres.

Pour cibler encore plus efficacement les tissus et les cellules malades, les chercheurs tentent maintenant de développer des systèmes de transport combinant les deux approches précédentes, soit non covalente et covalente. Toutefois ces travaux demeurent très préliminaires.

C'est dans le domaine de la thérapie génique que les recherches effectuées sur les dendrimères comme agents porteurs sont les plus avancées. La thérapie génique est basée sur la libération de brins d'ADN dans les noyaux cellulaires dans le but de modifier le patrimoine génétique de cellules pathogènes. Les vecteurs viraux présentant certains problèmes, telle une réponse immunitaire et une sélectivité limitées, la recherche s'est plutôt orientée du côté des vecteurs synthétiques. Plusieurs travaux ont été rapportés en vue d'explorer l'utilisation de dendrimères PAMAM ou PPI aux terminaisons amines non modifiées comme vecteurs de transfert non-viral.⁶¹ Ces vecteurs se doivent donc d'être non immunogènes, effectuer la fixation de l'ADN, de le protéger lors du transport et de lui permettre de franchir les différentes barrières biologiques (muqueuse, membrane cellulaire, membrane nucléaire, etc.) La structure du complexe dendrimère-ADN n'est pas complètement définie. Il semblerait toutefois qu'elle soit basée sur des interactions acide-base entre les unités phosphates de l'ADN et les amines tertiaires et primaires du dendrimère, qui sont chargées positivement en milieu physiologique. De plus, il a été observé qu'un dendrimère partiellement dégradé (fragmenté), par clivage hydrolytique des liens amides, serait plus efficace pour le transport de gènes par endocytose.⁶² Ceci est dû à une plus grande flexibilité du dendrimère et à un complexe plus compact avec l'ADN.

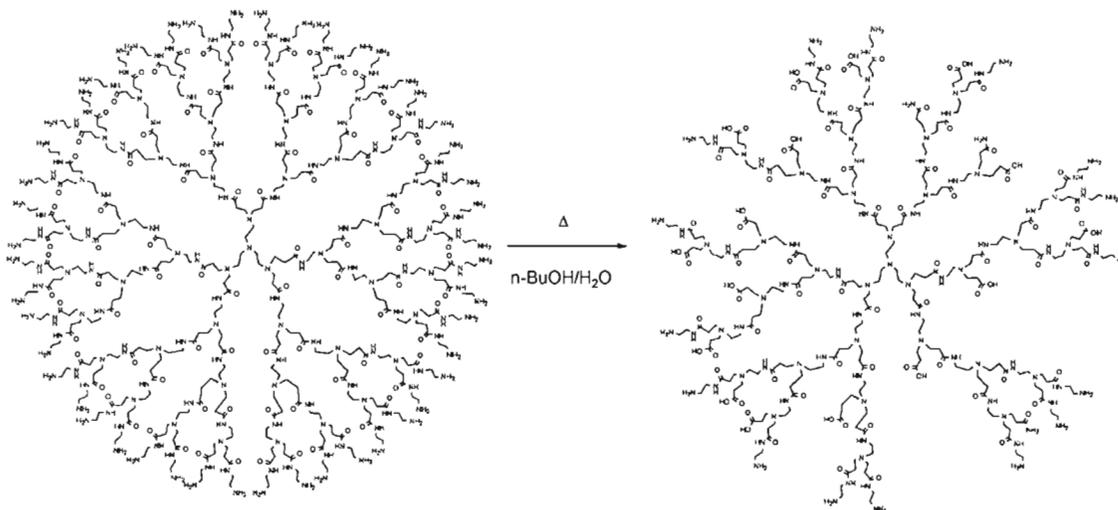


Figure 1.19 : Hydrolyse partielle du dendrimère PAMAM de génération 5 par solvolyse.⁴¹

De plus, on a observé que l'efficacité du processus peut être augmentée en utilisant un excès de groupes d'amine primaire sur le dendrimère par rapport au groupement phosphate présent sur l'ADN, ce qui génère une charge positive nette sur le complexe. Il existe donc un rapport (R+/-) optimal pour lequel l'efficacité du complexe formé est maximale.⁶³

La vectorisation de l'ADN au moyen de dendrimères (terminés par des fonctions amines) aurait pour effet de perturber la membrane cellulaire, permettant ainsi d'atteindre le noyau. Sans le dendrimère, l'ADN seule occasionne des répulsions électrostatiques entre les charges négatives de ces groupements phosphates et les charges négatives des membranes cellulaires. Le schéma suivant illustre le processus hypothétique de la transfection de l'ADN assistée d'un dendrimère cationique.

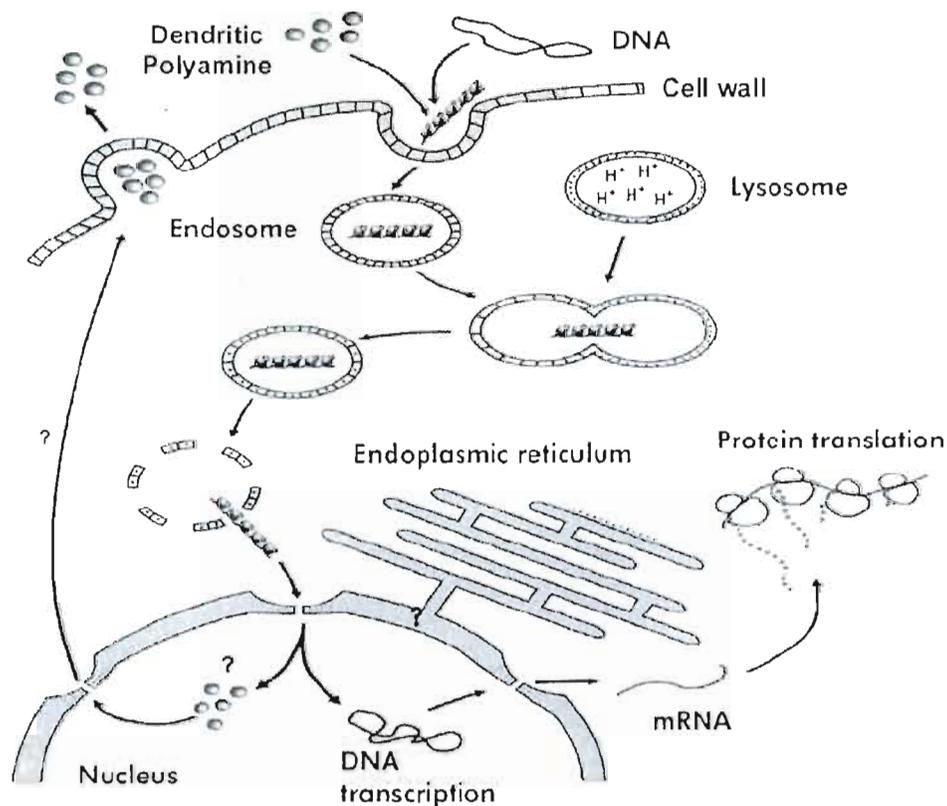


Figure 1.20: Processus hypothétique de la transfection d'ADN assistée d'un dendrimère cationique.⁶⁴

Le complexe doit entrer dans la cellule au travers la membrane cellulaire, échapper à la dégradation dans les parties endosomiales/lysosomiales, traverser le cytoplasme et entrer dans le noyau. Ainsi, les caractéristiques physico-chimiques telles la taille, la charge, l'hydrophobicité et l'effet tampon du complexe jouent un rôle majeur dans l'efficacité du transport et de l'activité biologique des vecteurs de gène.

Un autre domaine où l'on peut retrouver l'utilisation de dendrimères est l'imagerie magnétique nucléaire (IRM). Ceci est une technique de diagnostic médical en radiologie. Elle permet d'obtenir des images tridimensionnelles ou en coupe des différentes parties de l'anatomie. C'est grâce à la présence d'eau dans l'organisme qu'il est possible d'effectuer ce type d'analyse. Les molécules d'eau réagissant à un champ magnétique permettent de

détecter la différence de concentration en eau dans les différents tissus; c'est le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN). Ainsi, il sera possible de distinguer les tissus sains des tissus malades. Toutefois, le signal peut être faible et ne donner aucune réponse significative. C'est pourquoi des agents de contraste à base d'ions gadolinium (III) sont utilisés en IRM. Ainsi, le contraste entre deux zones sera augmenté pour permettre d'obtenir un diagnostic valable. Néanmoins, il faut demeurer prudent face à ces produits car leur toxicité peut être très élevée si l'ion gadolinium n'est pas complexé. Présentement, des agents de contraste sont disponibles commercialement, mais ils sont plus ou moins efficaces dû à leur faible poids moléculaire. Ainsi, ces composés sont rapidement éliminés du flux sanguin, ce qui occasionne une mauvaise discrimination entre les tissus. C'est à ce niveau que l'utilisation des dendrimères devient pertinente. Les travaux de Wiener⁶⁵ ont montré que des dendrimères PAMAM de générations 2 et 6, fonctionnalisés avec l'acide 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-6-méthyl-diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) pouvaient être efficaces.

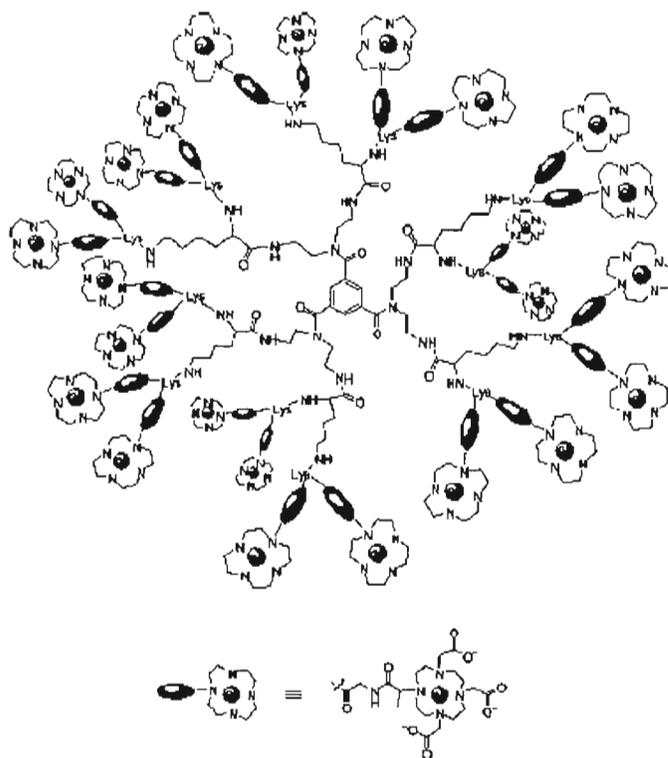


Figure 1.21 : Structure du gadomer dendritique utilisé en IRM.⁶⁵

Ce ligand permet de chélater le gadolinium (III). Des analyses *in vivo* effectuées chez le lapin ont permis d'améliorer les images en IRM et d'obtenir un temps de demi-vie prolongé dans la circulation sanguine (> 100 min.).

Bien que les dendrimères soient présent dans diverses applications biologiques, la littérature démontre que l'utilisation la plus importante de ces derniers s'avère comme agent thérapeutique basés sur des interactions protéine-carbohydate.

Les interactions multivalentes sont omniprésentes dans notre environnement, tout particulièrement dans le monde de la biologie. Leur complexité peut varier du simple attachement divalent d'un anticorps aux millions d'interactions exercées entre la patte d'un gecko et la surface où elle adhère.

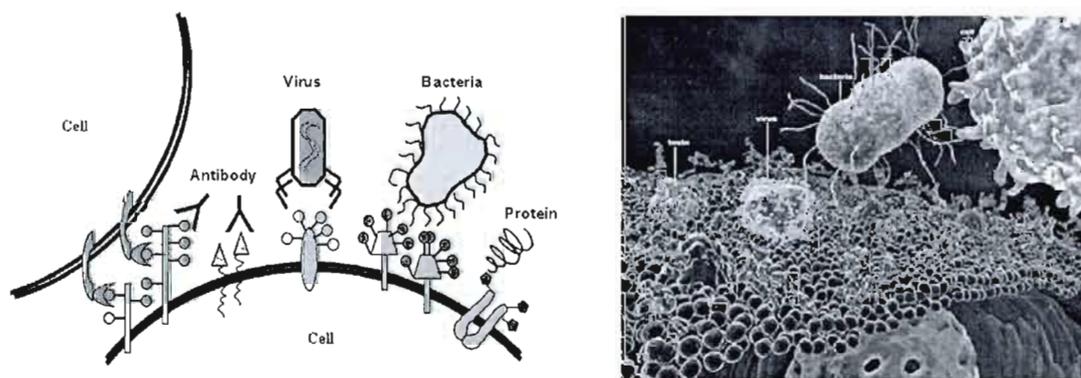


Figure 1.22 : Représentation schématique d'interactions protéine/sucre.⁹⁵

Plus particulièrement, plusieurs processus biologiques dans l'organisme humain font intervenir une panoplie de glycoconjugués présents sur les cellules et des récepteurs spécifiques. Ainsi, ces interactions protéines-sucre servent de transducteur du signal entre l'intérieur et l'extérieur cellulaire et se retrouvent à la base de la régulation des fonctions physiologiques, des infections virales et bactériennes, du système immunitaire, etc.

Certaines de ces interactions, comme les interactions entre les cellules-virus et/ou certains types de bactéries, peuvent donc être néfastes à l'organisme humain. C'est pourquoi plusieurs études ont tenté d'inhiber ces interactions au moyen de petites molécules sélectives. Toutefois, il a été montré qu'individuellement chacune de ces molécules ne manifestait qu'une faible constante d'affinité, de l'ordre de 10^3 - 10^6 M^{-1} , et une faible sélectivité envers son ligand respectif.⁶⁶ Or, l'activité biologique se manifeste par des affinités et des sélectivités élevées entre le ligand et le récepteur. C'est ce qui a inspiré la recherche de dendrimères permettant d'effectuer des interactions multivalentes. Ainsi, en augmentant le nombre d'interactions, l'effet synergique de chacune d'elles résulte en une meilleure adhésion entre le ligand et le récepteur, ce qui se manifeste par l'« effet cluster ».⁶⁷

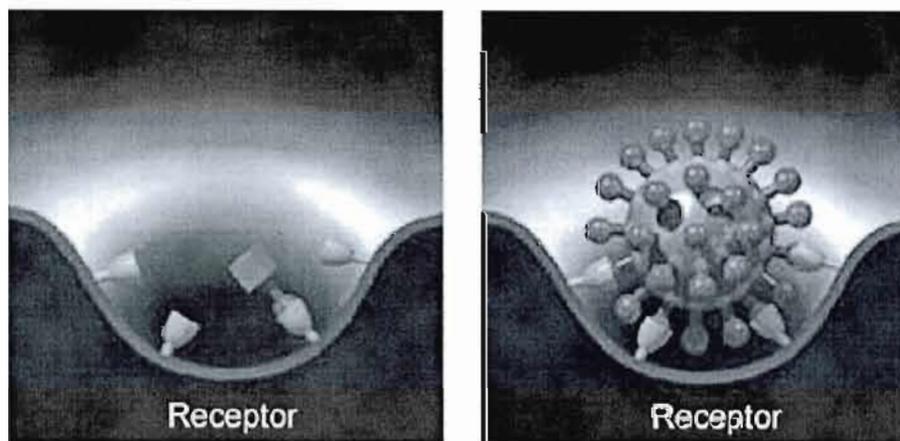


Figure 1.23: Représentation de l'« effet cluster »⁶⁴

Les glycodendrimères possèdent une architecture permettant d'étudier les multiples interactions protéines-sucres impliquées dans divers processus de reconnaissance biologique. Le terme glycodendrimère est utilisé pour décrire des dendrimères auxquels des unités carbohydrates sont incorporées à leur structure. Différentes architectures de glycodendrimères (Figure 1.24) peuvent être synthétisées selon l'approche convergente et divergente décrites précédemment.⁶⁸

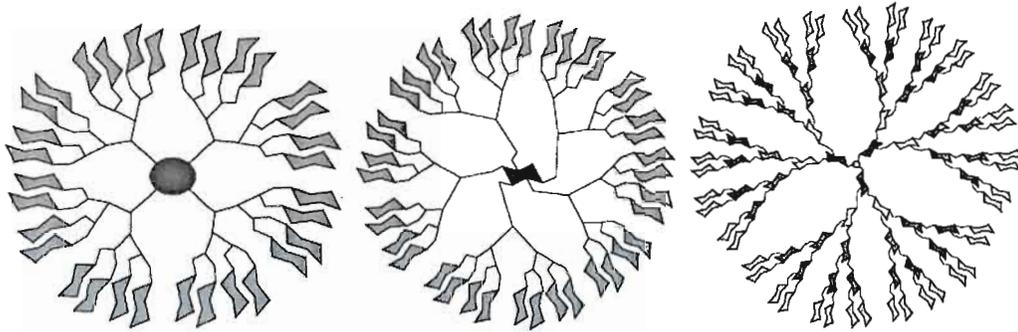


Figure 1.24 : Représentation schématique de différentes architectures de glycodendrimères.⁶⁸

Ces glycodendrimères sont utilisés dans une variété d'applications biologiques; en particulier, un glycodendrimère dont la surface est recouverte d'unités saccharidiques permet d'étudier les interactions protéines-sucres. Ainsi, on tente d'intervenir à un stade précoce du processus. La figure 1.25 démontre le processus d'adhésion de bactéries et/ou de virus à des cellules épithéliales recouvertes de glycoconjugués. Dans un processus normal, la bactérie qui possède des protéines spécifiques aux résidus saccharidiques présents à la surface des cellules adhère à la paroi cellulaire et l'infection débute. En présence de glycodendrimères, deux possibilités s'offrent à la bactérie : l'adhésion aux résidus saccharidiques recouvrant le glycodendrimère ou ceux qui se trouvent sur la membrane cellulaire. L'effet de compétition résulte donc en une diminution de l'infection.

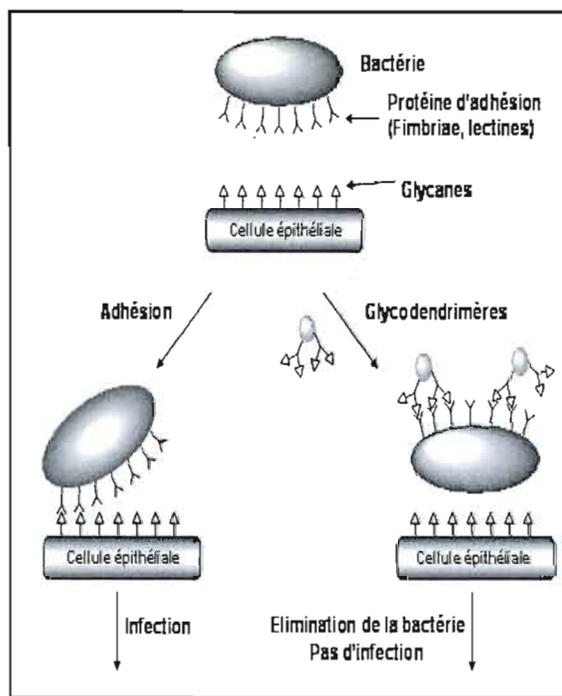


Figure 1.25 : Illustration de l'utilisation de glycodendrimères lors d'un processus d'adhésion bactérienne.

L'utilisation de glycodendrimères comme inhibiteurs d'adhésion bactérienne a largement été décrite dans la littérature.⁴¹ Des analyses d'inhibition d'héماغlutination ont été effectuées avec la lectine végétale concanavaline A et différentes générations de dendrimères PAMAM terminés par des résidus mannosides. Ainsi, la sixième génération du dendrimer PAMAM avec 170 unités mannose présente le double de l'activité par unité mannose, comparativement à celle de la quatrième génération comprenant 55 unités mannose. De plus, ces deux générations de dendrimères mannosylés présentent une meilleure activité double par rapport au mannose monomérique.⁶⁹

Les travaux de Roy et coll.^{72, 73} ont illustré le potentiel d'inhibition que peuvent manifester des dendrimères envers certains virus et bactéries. Entre autre, des dendrimères PAMAM couplés à 32 unités disaccharidiques de l'antigène tumoral associé au cancer (β Gal-(1-3)- α GalNAc) ont été testés avec la lectine d'arachide et un anticorps monoclonal de souris spécifique aux résidus mannose (Fig.1.26). Les analyses turbidimétriques et les tests ELISA

ont indiqué que le dendrimère était 20 fois plus efficace que l'antigène seul.⁷⁰ Ces composés pourraient ainsi permettre de détecter les tumeurs malignes possédant le récepteur d'antigène tumoral et, éventuellement, servir comme transporteurs pour des substances antitumorales (par exemple, en thérapie du cancer du sein).⁷¹

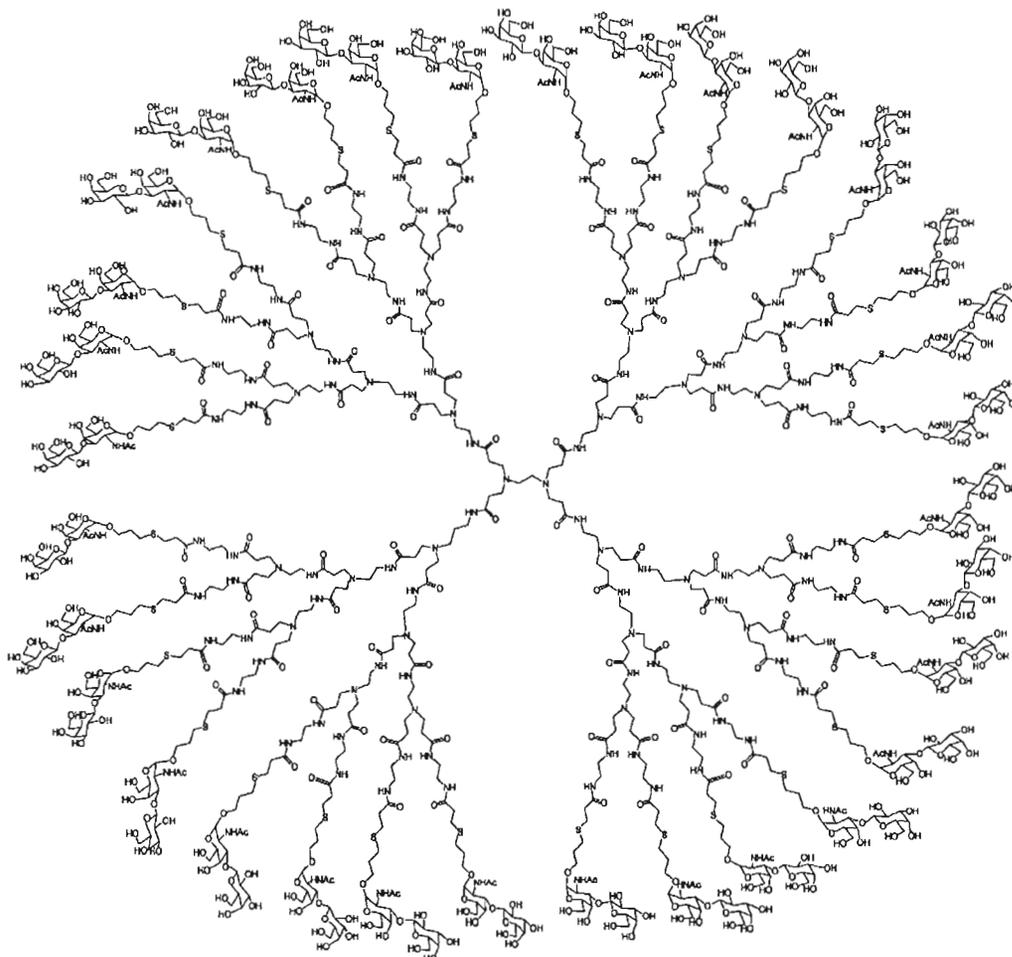


Figure 1.26 : Structure du glycodendrimer PAMAM de 32 unités de l'antigène tumoral.⁷⁰

L'inconvénient majeur de ces structures de génération supérieure est l'encombrement stérique qui rend difficilement accessible les unités saccharidiques en surface. Ainsi, les avantages obtenus au moyen de l'effet « cluster » décroissent proportionnellement chez les molécules de grande taille. Pour contourner ce problème, des chercheurs ont synthétisé des

dendrimères contenant des groupements inertes et solubles intercalés parmi les unités saccharidiques. Ainsi, l'accessibilité des unités sacchariques étant augmentée, l'interaction globale sera d'autant plus efficace grâce à l'effet cluster.⁷² Une autre façon pour résoudre ce problème d'encombrement stérique est l'utilisation de dendrons fonctionnalisés au lieu de dendrimères. Étant des composés intermédiaires utilisés pour synthétiser des macromolécules plus complexes, ces dendrons ne possèdent pas une forme globulaire hermétique rendant plus accessible les fonctions en périphérie. Dans cet ordre d'idée, l'équipe du professeur Roy a développé deux dendrimères à base de polylysine facilement synthétisés en phase solide. Ces derniers ont démontré un pouvoir d'inhibition de l'adhésion du pathogène. Dans un premier temps, différentes générations de glycodendrimères possédant 2, 4, 8 et 16 unités d'acide sialique en surface ont été synthétisées. Un exemple de l'architecture des ces composé est présenté à la figure 1.27.

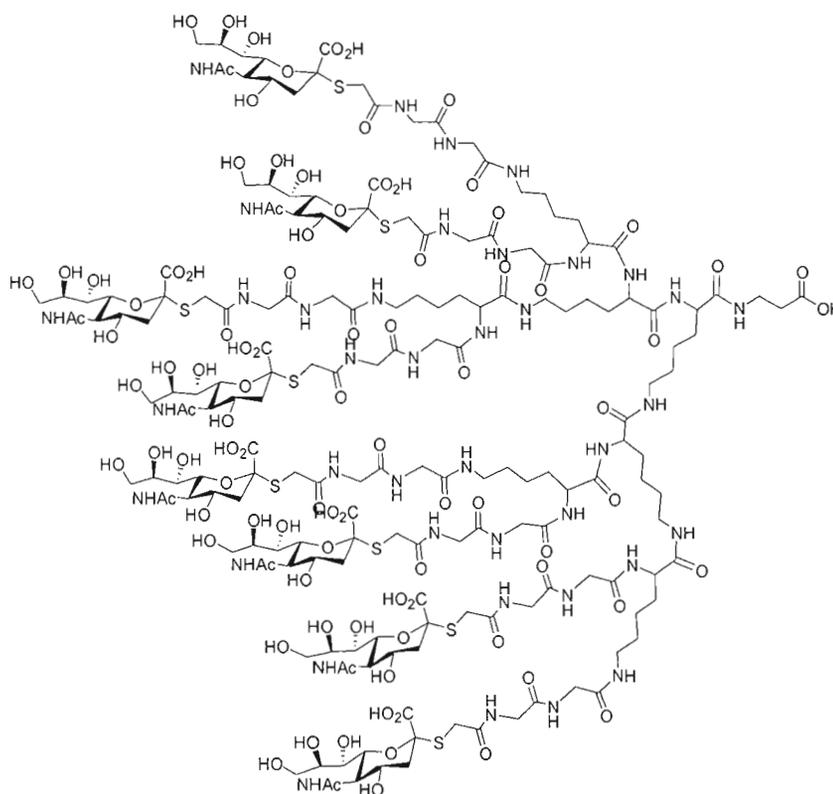


Figure 1.27 : Glycodendrimère inhibant l'adhésion du virus influenza synthétisé par Roy et coll.⁷³

Des analyses d'inhibition de l'héماغlutination du virus de l'influenza A ont été effectuées en présence des glycodendrimères et la valeur de IC_{50} diminue exponentiellement avec l'augmentation du nombre de résidus d'acide sialique. Ainsi, le dendrimère contenant 16 unités d'acide sialique présente un IC_{50} de 19 μ M.⁷³ Une seconde structure à base de polylysine fonctionnalisée par des résidus de mannose a permis d'inhiber l'adhésion de *E. coli* à des cellules sanguines de cheval et ce, dans l'ordre du nM par unité saccharidique.⁷⁴

D'autre part, Zimmerman et coll.⁷⁵ a utilisé des glycodendrimères combinés à une nouvelle technique pour le traitement du cancer au moyen de B⁷⁶, où il les présente comme récepteurs artificiels spécifiques pour des molécules imprimées dans leur architecture dendritique. Des glycodendrimères ont également été utilisés comme substances antitumorales en thérapie photodynamique (PDT)⁷⁷, de même que pour la préparation de vaccins⁴¹ et en ophtalmologie.⁷⁸

Dans le cadre de ce projet, nous utilisons les glycodendrimères pour inhiber l'adhésion de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* aux cellules épithéliales pulmonaires des patients souffrant de fibrose kystique.

1.2 LA FIBROSE KYSTIQUE

La fibrose kystique (FK) est une maladie génétique héréditaire qui atteint principalement la population caucasienne et qui est causée par un mauvais fonctionnement des glandes muqueuses. Elle affecte donc principalement les poumons et le système digestif. On évalue à 3000 le nombre de personnes atteintes au Canada. Malgré l'important effort de recherche déployé pour enrayer la fibrose kystique, aucune thérapie n'a encore été mise au point.

Chez les sujets normaux, un mucus fluide recouvre les poumons et les voies aériennes, ce qui permet entre autre l'élimination des microbes et des particules de poussière. Toutefois, chez les personnes atteintes de fibrose kystique, il vient obstruer les bronchioles, dû à sa consistance épaisse et collante. L'air demeure ainsi emprisonné dans les poumons bloqués par ce mucus, ce qui rend donc la respiration difficile. Ce milieu devient alors un environnement propice à l'accumulation et la multiplication des bactéries dans les bronchioles, causant ainsi des infections.

Au niveau du système digestif, ce même mucus obstrue les fins conduits du pancréas, inhibant la libération d'enzymes digestives. Ces dernières ne pouvant plus atteindre l'intestin grêle, les aliments ingérés ne sont que partiellement digérés, perdant ainsi une partie de leur valeur nutritive.

Les personnes atteintes de cette maladie souffrent d'infections endobronchiques, de sinusites, de malabsorption due à une insuffisance pancréatique, d'une perte accrue de sels par la transpiration, de maladies hépatobiliaires obstructives et de perte de fécondité.⁷⁹

Un traitement fréquent par antibiotiques pourra devenir nécessaire chez les personnes atteintes de la fibrose kystique afin de maîtriser l'infection pulmonaire. La plupart de ces patients ont quotidiennement besoin d'enzymes pour améliorer l'absorption de la nourriture et profiter de son apport calorifique.

1.2.1 GÉNÉTIQUE

Cette maladie génétique se transmet selon un mode autosomique récessif, ce qui implique que seulement les personnes héritant de deux gènes déficients sont atteintes de la fibrose kystique. C'est en 1989 que des chercheurs identifièrent le gène défectueux responsable de la fibrose kystique, franchissant une étape importante dans la compréhension de la maladie. Ce gène muté est responsable de réguler la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR). Cette protéine agit entre autre comme canal à ions chlorure⁸⁰ et est située sur les membranes des cellules épithéliales des voies respiratoires, intestinales, reproductrices ainsi que sur les glandes de sécrétion externe.⁸¹

Principalement, ce dysfonctionnement occasionne une augmentation du mucus recouvrant les voies respiratoires. Les infections bactériennes deviennent plus fréquentes, provoquant ainsi une réaction inflammatoire et une destruction des parois bronchiques. De plus, une carence au niveau du transport d'ions chlorures a pour effet d'inactiver les peptides cationiques antibactériens du système immunitaire.⁸² L'image suivante illustre l'état des poumons d'un individu sain en comparaison avec un autre souffrant de fibrose kystique. La perte de fonctions pulmonaires est à la base de 90% des mortalités.



Figure 1.28 : Photos de poumons sains et d'autres atteints de fibrose kystique.

1.2.2 INFECTION BACTÉRIENNE PULMONAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE LA FIBROSE KYSTIQUE.

Un des principaux effets de la fibrose kystique est un dérèglement à la surface pulmonaire. Les personnes atteintes de cette maladie sont vulnérables aux infections bactériennes au niveau des poumons. Chez les individus sains, un processus normal de défense permettant le dégagement et l'activité antimicrobienne à la surface des voies pulmonaires a lieu. Ainsi, grâce à un mucus présent à la surface des cellules épithéliales, les particules et les micro-organismes peuvent être captés. Ensuite, ils sont expectorés grâce à un flux du mucus créé par le battement de cils sur l'épithélium pulmonaire.

Dans le cas de patients atteints de fibrose kystique, le mucus devient épais et visqueux, ce qui empêche le battement des cils, provoquant ainsi un milieu propice à l'infection bactérienne.⁸³ Un processus de colonisation bactérienne, suivi de la formation d'un biofilm, permet de protéger ensuite ces bactéries contre le système immunitaire et les médicaments.

La figure suivante illustre le processus infectieux de la fibrose kystique.

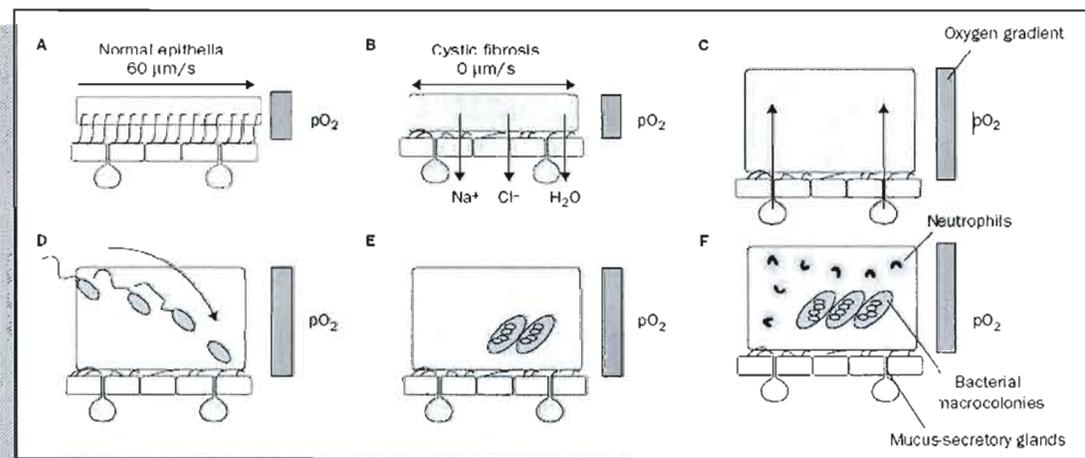


Figure 1.29 : Processus infectieux sur l'épithélium pulmonaire dans le cas de la fibrose kystique.⁸⁴

1.2.3 INFECTION PAR LA BACTÉRIE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Un trait important de la maladie pulmonaire de la fibrose kystique est l'infection endobronchique par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA), qui est le principal vecteur infectieux des voies respiratoires chez les patients atteints de fibrose kystique.⁸⁵ PA est une bactérie Gram-négative ubiquitaire, opportuniste et versatile, qui vit dans les milieux humides comme les sols, les tissus végétaux et le système digestif de certains animaux. Ce pathogène, inoffensif pour les personnes en bonne santé, devient particulièrement dangereux pour celles dont le système immunitaire est affaibli. Chez les patients atteints de fibrose kystique, elle est la principale cause de décès.⁸⁶

PA s'adapte facilement aux différents environnements hostiles où elle se trouve. Au cours des dernières années, les chercheurs ont élucidé complètement la séquence de son génome.⁸⁷ Cependant, PA possède un fort pouvoir de mutation, ce qui lui confère sa grande pathogénicité.⁸⁸ De plus, elle sécrète des toxines et des enzymes pathogènes directement dans le cytoplasme des cellules-hôtes, ce qui lui confère une toxicité élevée.⁸⁹ Ces sécrétions sont impliquées dans un système de communication entre bactéries dépendant de la densité de population bactérienne, le « *quorum sensing* ».⁹⁰ Ainsi, la bactérie peut facilement s'adapter à son environnement en formant un biofilm, qui lui permet de proliférer et de former des

microcolonies, tout en obstruant davantage les voies respiratoires. Cette architecture visqueuse protège PA des antibiotiques, entrave le système immunitaire en résistant aux anticorps et à l'attachement de cellules immunitaires.⁹¹ Cette couche protectrice est signe d'une installation durable de la bactérie sur l'organe contaminé.

1.2.4 PHÉNOMÈNE DE L'ADHÉSION BACTÉRIENNE

L'adhésion bactérienne est possible à cause de la présence d'une panoplie de glycoconjugués à divers endroits dans l'organisme humain. Ces glycoconjugués sont inclus dans les membranes cellulaires et confèrent sa spécificité et son identité à la cellule.

Les voies respiratoires sont recouvertes de mucus, permettant le dégagement mucociliaire. Le mucus est composé de mucines et de glycoprotéines linéaires qui présentent plusieurs points de glycosylation.⁹² Les mucines humaines contiennent principalement les monosaccharides fucose, galactose, N-acetylglucosamine, N-acétylgalactosamine et acide sialique. Ces mucines peuvent interagir avec différentes substances biologiques, telles les protéines, les peptides et les lipides; elles sont à l'origine des propriétés visco-élastiques du mucus.

Le défaut génétique provoqué par la fibrose kystique occasionne une augmentation de la quantité de résidus fucose au niveau des cellules épithéliales et des mucines pulmonaires. Ceci se traduit par une augmentation de la concentration d'oligosaccharides fucosylés de type Lewis x, ainsi que par une modification au niveau de la sialylation de ces résidus.⁹³ Or, ces sucres à la surface des cellules pulmonaires deviennent des cibles de choix pour les protéines spécifiques qui reconnaissent ces structures, les lectines bactériennes. Bien que ne possédant aucune activité enzymatique propre, elles sont d'origine virale, animale, végétale ou bactérienne et reconnaissent spécifiquement des oligosaccharides.⁹⁴

La reconnaissance de ces lectines pour leur ligand spécifique au niveau des tissus est souvent la première étape d'une infection. Ainsi, la colonisation de la bactérie PA au niveau des poumons de patients atteints de la fibrose kystique s'effectue plus facilement à cause de la présence accrue de résidus fucosides. Une fois adhérente à la surface des cellules pulmonaires,

la bactérie pénètre dans le mucus en adoptant un métabolisme anaérobique. C'est ce qui forme le biofilm retrouvé à la surface des poumons.⁹⁵

1.2.5 LES LECTINES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

La bactérie PA adhère à la surface cellulaire via deux lectines solubles. La première, PA-IL, spécifique au D-galactose, possède une constante d'association (K_a) de $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.⁹⁶ De plus, elle est cytotoxique pour les cellules épithéliales, tout en inhibant leur croissance. Cette lectine semblerait jouer un rôle lors de la colonisation de la bactérie grâce aux lipopolysaccharides constituant les membranes externes des bactéries Gram négatives⁹⁷, provoquant aussi l'agglutination des bactéries.⁹⁸ Elle jouerait aussi un rôle dans la formation et la stabilisation du biofilm.

PA-IL se présente sous la forme d'un arrangement tétramérique (Figure 1.30) autour d'un pseudo axe de symétrie C222, avec un résidu galactose dans chaque monomère. Ces derniers adoptent un repliement de brin antiparallèle de type β -sandwich.⁹⁹ Dans le site de reconnaissance, la présence d'un ion calcium permet la coordination avec deux hydroxyles du D-galactose. De plus, la majorité des hydroxyles interagissent directement ou via une molécule d'eau avec la protéine.¹⁰⁰

La deuxième lectine de la bactérie est PA-IIL. Spécifique au L-fucose, elle nécessite la présence de deux ions calcium pour permettre la coordination des groupements hydroxyles du fucose. Ce mode de liaison inhabituel lui confère une constante d'affinité pour le fucose très supérieure ($K_a = 1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)¹⁰¹ à celle observée habituellement pour ce genre d'interactions protéine-saccharide, de l'ordre de 10^3 M^{-1} . Ainsi, la présence de deux ions calcium permet à la lectine PA-IIL, d'avoir une faible spécificité et une grande affinité. Une stéréochimie particulière des hydroxyles, soit deux groupes équatoriaux vicinaux et un axial sont nécessaires pour effectuer des liens avec les ions calciums, ce qui explique que différents types de sucre puissent se lier à la PA-IIL.¹⁰²

Des études ont démontré qu'elle se localisait sur la paroi extracellulaire de la bactérie en s'associant aux glycoconjugués présents sur celle-ci.¹⁰³ Elle est donc à la base de la reconnaissance et de l'adhésion bactérie-hôte, bactérie-bactérie et bactérie-biofilm. Cette lectine a aussi la capacité d'inhiber les battements ciliaires à la surface des cellules pulmonaires.¹⁰⁴

La lectine PA-IIL montre aussi un arrangement tétramérique autour d'un pseudo axe de symétrie C₂₂₂, avec un résidu fucose dans chaque monomère. Le même repliement de type β -sandwich que chez PA-IL est aussi observé, mais PA-IIL possède plutôt une forme sphérique plus compacte. Trois groupements hydroxyles du fucose participent à une coordination avec les deux ions calcium, un pont hydrogène indirect via une molécule d'eau et un réseau de sept ponts hydrogène directs stabilise le ligand dans le site de reconnaissance de la lectine.

Des résultats issus de tests d'inhibition de l'héماغlutination ont démontré que certains saccharides pouvaient inhiber l'adhésion des lectines de la bactérie. Par exemple, pour la lectine PA-IL, son adhésion a pu être fortement réduite en présence de composés à base d'acide sialique, de glucosamine, de galactosamine, du fucose, du mannose et du galactose¹⁰⁵. Pour la lectine PA-IIL, les meilleurs inhibiteurs sont, en ordre décroissant, L-fucose > L-galactose > D-arabinose > D-fructose et D-mannose, tandis que D-galactose ne manifestait aucune activité d'inhibition.¹⁰¹

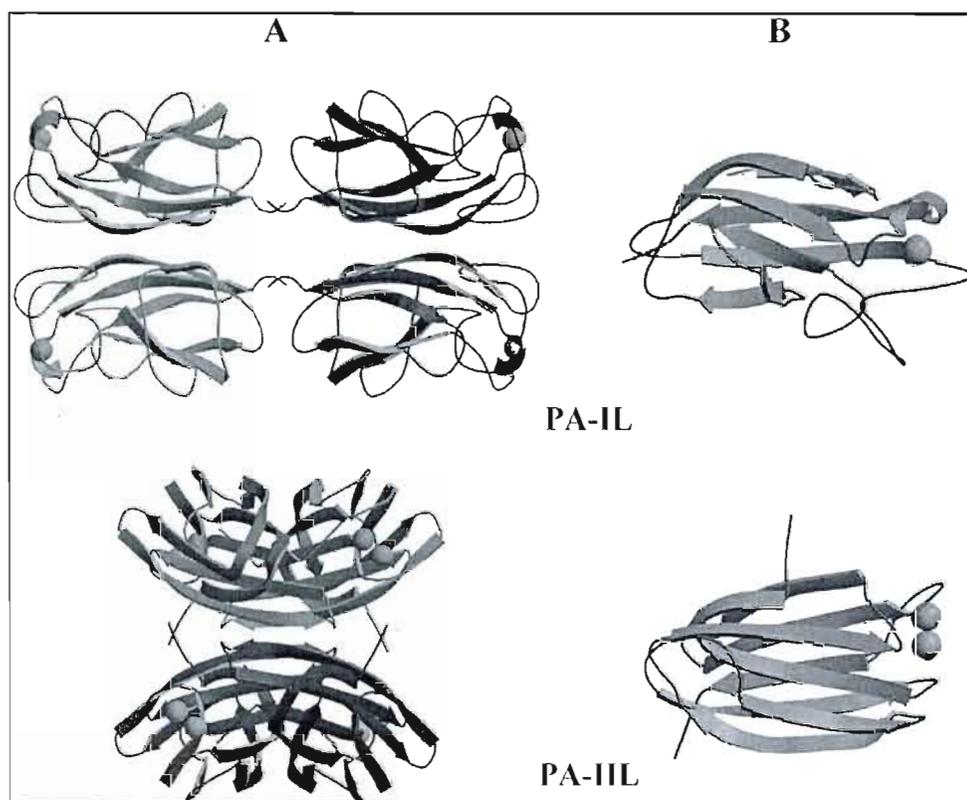


Figure 1.30 : Représentation des deux lectines de PA.⁹⁵

Chez les patients atteints de la FK et dont le diagnostic est bien établi, l'antibiothérapie parvient rarement à éradiquer la bactérie. Seulement des traitements de dégagement des voies respiratoires sont disponibles,¹⁰⁶ d'où l'importance d'agir à un stade précoce de l'infection. La figure suivante illustre le processus d'infection par *Pseudomonas aeruginosa*.

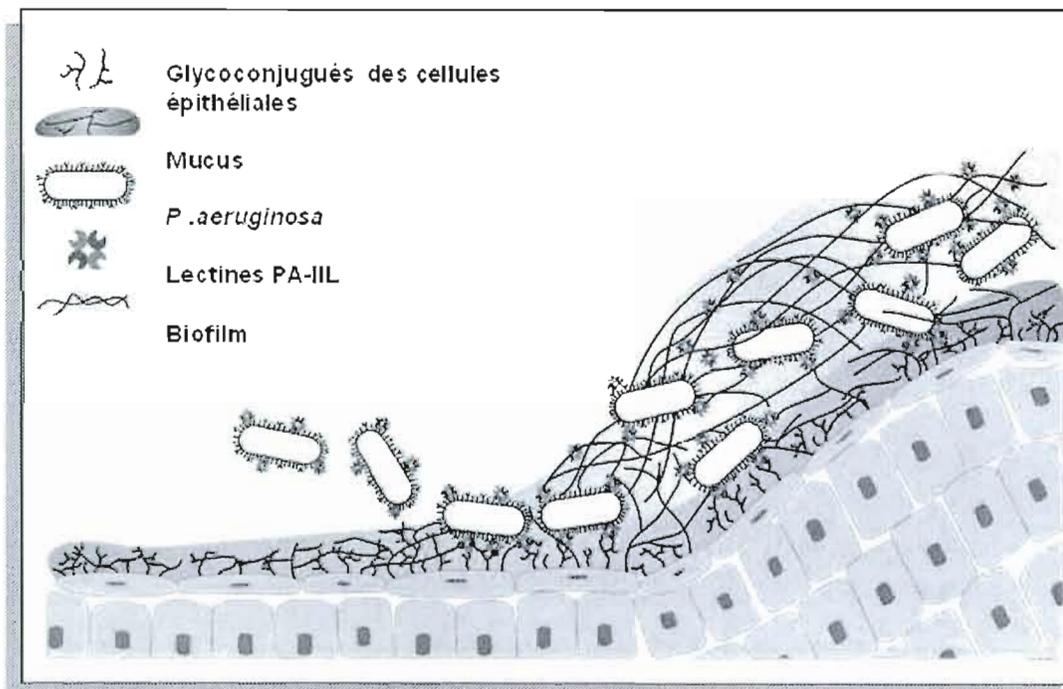


Figure 1.31 : Processus d'adhésion de la bactérie PA sur les cellules pulmonaires.⁹⁵

Dans cet ordre d'idée, nous utiliserons pour ce projet des glycodendrimères afin d'inhiber l'adhésion de la bactérie sur les cellules épithéliales pulmonaires. Le principe avait été illustré précédemment à la figure 1.25.

CHAPITRE 2

SYNTHÈSE DE DENDRIMÈRES

L'objectif de ce projet était de synthétiser une série de glycodendrimères de différentes générations et de les utiliser dans une stratégie antibactérienne appliquée à la fibrose kystique. Différentes architectures dendritiques ont été synthétisées et une étude préliminaire voulant démontrer l'affinité des lectines de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) pour ces glycodendrimères a été effectuée.

Principalement, deux séries d'architectures dendritiques ont été ainsi envisagées : des glycodendrimères homogènes, contenant des unités saccharidiques de types L-fucosides en surface et des glycodendrimères hétérogènes, contenant différents types d'unités saccharidiques en surface: le L-fucose et le D-galactose. La disposition de ces différentes unités a été contrôlée et a permis de tirer certaines observations sur le comportement des deux lectines lors de l'adhésion de la bactérie PA.

Ce chapitre est divisé en deux parties. La première partie décrit principalement la stratégie de synthèse utilisée pour obtenir les glycodendrimères homogènes (contenant un type de sucre à la périphérie) et suivies de la synthèse des glycodendrimères hétérogènes (contenant deux types de sucres différents à la périphérie).

2.1 STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

La stratégie de synthèse utilisée pour l'obtention de ces macromolécules repose sur une approche pseudo-convergente permettant une modulation et un contrôle précis de l'agencement des éléments structuraux. Dans un premier temps, pour les glycodendrimères homogènes, elle consiste à préparer des dendrons de différentes générations qui seront couplés au cœur dendritique. Ultérieurement, les unités saccharidiques seront installées en périphérie de la structure.

Pour les glycodendrimères hétérogènes, une approche par étape sera utilisée. On peut la définir comme une approche orthogonale utilisant des groupements protecteurs. Ceci permettra donc d'obtenir des glycodendrimères qui possèdent, en surface, des unités D-galactosides d'un côté et de l'autre des unités L-fucosides de façon contrôlée.

Un exemple de l'architecture des macromolécules finales est présenté dans le schéma suivant:

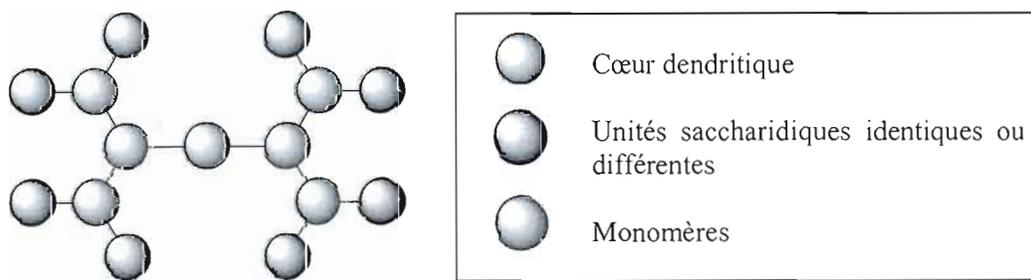


Figure 2.1 : Représentation de l'architecture des dendrimères envisagés.

Les deux composés suivants ont été choisis pour la conception des dendrimères :

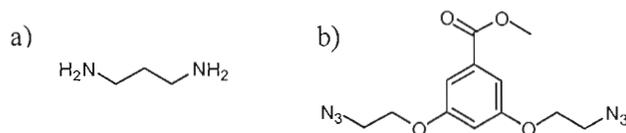


Figure 2.2: Composés de base pour la synthèse des dendrimères a) 1,3-Diaminopropane b) 3,5-bis(2-azidoethoxy)benzoate de méthyle

Le rôle principal du cœur dendritique est d'assurer un greffage multiple de dendrons, via des réactions efficaces et compatibles avec les fonctions présentes sur ces derniers. Notre choix s'était arrêté sur le 1,3-diaminopropane. Disponible commercialement, il offre l'avantage d'être assez flexible et stable dans plusieurs conditions réactionnelles. Toutefois, il possède une toxicité élevée ($LD_{50} = 350 \text{ mg/kg}$) chez le rat. Il sera possible éventuellement de le remplacer par des composés moins cytotoxiques comme le polyéthylène glycol (PEG)¹⁰⁷ ayant des propriétés de biodégradabilité et de toxicité réduites.

Pour le choix du monomère, l'unité répétitive qui constitue les dendrons, nous nous sommes inspirés des travaux effectués par l'équipe de Linskamp.¹⁰⁸ Le composé 3,5-Bis-(2-azidoethoxy) benzoate de méthyle servira d'unité de base, retrouvé dans la partie interne des dendrimères, permettant ainsi de synthétiser les dendrons de différentes générations. Toutefois, la voie synthétique utilisée qui permet d'obtenir des fonctions azotures en surface est légèrement différente de celle qui est décrite dans la littérature. Ce composé est obtenu à partir de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque. Ce dernier est utilisé couramment comme agent de conservation de la nourriture, ou encore dans le domaine pharmaceutique et cosmétique, sous forme de sel ou d'ester. Les dendrimères basés sur cette structure aromatique vont donc avoir une architecture semi-rigide et aucun repliement des fonctions externes vers l'intérieur ne devrait être possible.

L'attachement des dendrons au cœur dendritique s'effectuera au moyen de couplages peptidiques qui permettront de former des liens amides entre les différentes générations. La stabilité de ce type de liaisons au clivage étant reconnue¹⁰⁹, elles devraient donc résister aux conditions réactionnelles subséquentes.

Pour obtenir les glycodendrimères, deux saccharides ont été utilisés, soit le L(-)-fucose et le D-(+)-galactose. Une chaîne alkyle terminée par une fonction alcyne est installée en position anomérique dans le but d'utiliser la « *click chemistry* » pour joindre les différentes unités saccharidiques en périphérie du dendrimère. Les deux structures de base sont présentées à la figure suivante.

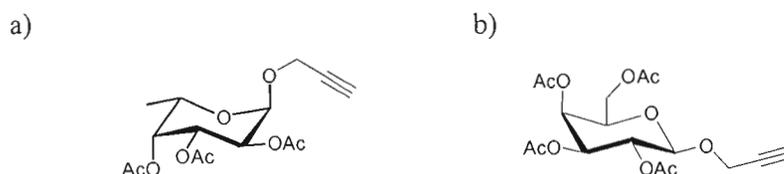


Figure 2.3 : Résidus saccharidiques utilisés pour la conception des glycodendrimères a) prop-2-ynyl α -O-fucopyranoside b) prop-2-ynyl β -O-galactopyranoside.

La « *click chemistry* » est la version moderne non concertée de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen¹¹⁰. Cette réaction entre un alcyne et un azoture est catalysée par le Cu(I) et forme un hétérocycle 1,2,3-triazole disubstitué en position 1,4. La beauté de cette réaction est sa régiospécificité, qui permet d'obtenir un seul régioisomère. Toutefois, il est possible d'obtenir les deux régioisomères 1,4 et 1,5 selon un processus thermique (concerté) en proportion 1:1.

L'équipe de Sharpless a démontré les avantages de la réaction catalysée par le cuivre¹¹¹ et, rapidement, on la retrouve dans divers domaines, comme en chimie, en biologie ainsi qu'en physique, lorsque l'on pense aux matériaux.¹¹² Cette réaction est versatile puisqu'elle permet d'utiliser une variété de conditions réactionnelles. Elle peut très bien s'effectuer dans divers systèmes de solvants (soit de l'eau pure, un mélange eau/alcool ou un solvant comme le DMSO, THF, DMF, acétone et acétonitrile, en utilisant toujours l'eau comme co-solvant). De

plus, elle s'effectue avec une multitude d'alcynes et d'azotures, sans avoir à protéger les divers groupes fonctionnels présents ailleurs sur les molécules. Elle peut s'effectuer aussi bien sur une vaste gamme de pH (4 à 12) que de températures (0 à 160°C). De plus, pour certains produits, aucune purification n'est nécessaire suite à une filtration ou extraction pour obtenir un composé pur.

L'équipe de Sharpless a étudié en détail les conditions réactionnelles optimales de cette réaction et deux procédures se sont démarquées par leur commodité et les avantages d'utilisation de cette réaction catalytique.

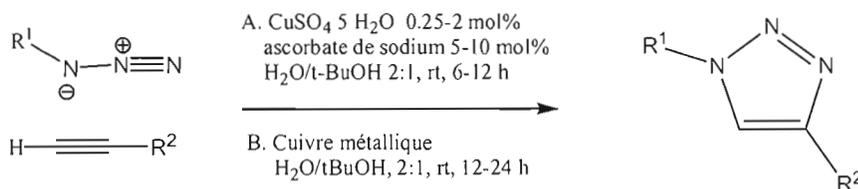


Figure 2.4 : Synthèse catalysée par Cu(I) de cycle triazole 1,2,3-disubstitué en 1,4.

Ces deux réactions sont effectuées en milieu aqueux, à température ambiante et ne requièrent aucune précaution particulière. L'espèce réactive du cuivre est le Cu(I). La procédure A fait intervenir le sel de cuivre(II) qui subit une réduction *in situ* par l'ascorbate de sodium. Lors de la procédure B, le catalyseur est introduit sous forme de Cu(0) où l'espèce active est formée suite à une comproportionation du couple Cu(II)/Cu(0). Cette procédure est utile lorsque des composés sont plus ou moins tolérants à l'ascorbate de sodium. Le mécanisme de la réaction proposé par l'équipe de Sharpless¹¹² est le suivant :

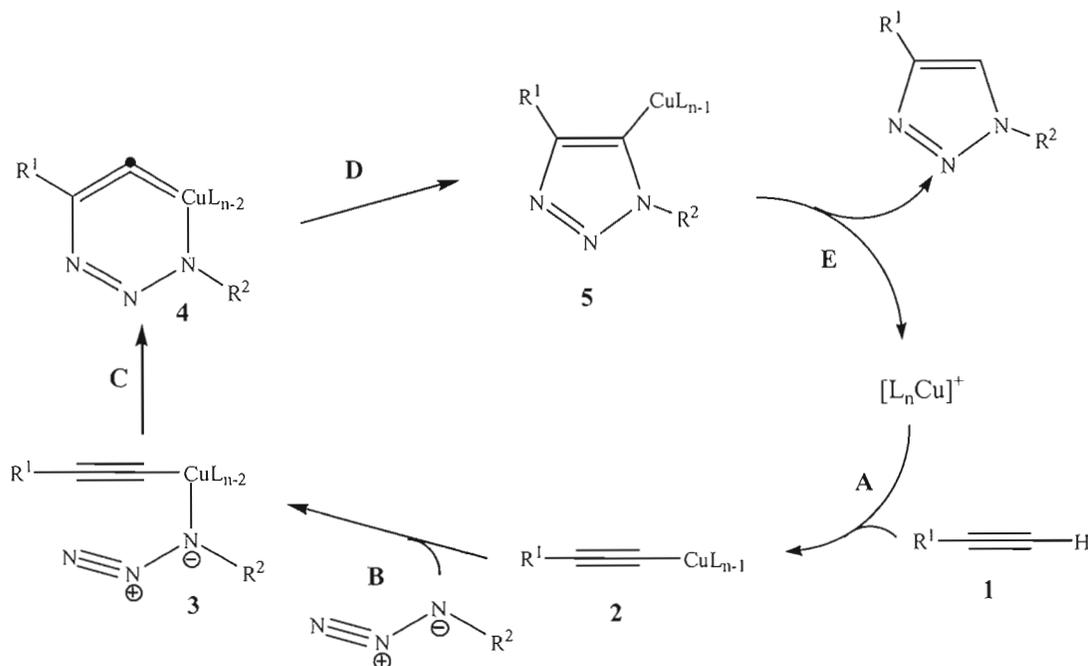


Figure 2.5 : Mécanisme proposé pour la réaction de « *click chemistry* » par l'équipe de Sharpless.

Ce mécanisme comporte certains intermédiaires réactionnels intéressants. Tout d'abord, la séquence débute par la coordination de l'alcène sur le Cu(I), pour ensuite former l'acétylure de cuivre **2**. Ce complexe est bien connu comme intermédiaire lors de la formation de liens C-C. Ensuite, l'azoture vient se coordiner au cuivre par l'atome d'azote le plus riche en électrons, pour former l'intermédiaire **3**. Par la suite, l'azote terminal de l'azoture va attaquer le carbone C-2 de l'acétylure pour former un métallacycle de Cu(III) à six membres non usuel, l'intermédiaire **4**. Ce dernier est possible grâce à la présence d'orbitales d vides du cuivre. L'étape C est endothermique, mais la barrière d'énergie est toujours plus basse que celle observée lors d'une cycloaddition thermique, ce qui a pour effet d'augmenter considérablement la vitesse de la réaction catalysée par le cuivre. Ensuite, la contraction de cycle favorable permettra d'obtenir un dérivé cuivré **5**. Le cycle catalytique est terminé par la formation du cycle triazole suite à une protéolyse du composé **5**.

Au cours de cette réaction catalysée par le cuivre, il est possible d'isoler des intermédiaires clés ayant des barrières d'énergie beaucoup plus basses, comparativement à la cycloaddition concertée où l'on retrouve seulement des états de transition hauts en énergie. L'avantage est l'augmentation de la vitesse de réaction et, surtout, d'offrir une régiosélectivité exclusive. L'utilisation de ce type de chimie a été mise à profit lors des différentes synthèses de macromolécules à cause de sa facilité réactionnelle et de la formation régiosélective d'un cycle triazole. En milieu biologique, ces hétérocycles peuvent former un complexe de transfert de charge avec des résidus d'acides aminés aromatiques présents dans le site de reconnaissance des lectines. Ceci a pour effet d'augmenter leur affinité avec les lectines.¹¹³ Aussi considérés comme accepteurs d'hydrogène, ils montrent une très grande stabilité face à diverses transformations métaboliques possibles. Des tests biologiques effectués démontrent l'affinité des lectines pour les composés possédant des cycles triazoles au sein de leur structure. Ces résultats seront présentés dans le chapitre 3.

La partie suivante de ce chapitre décrit les voies de synthèse utilisées pour obtenir différentes générations de glycodendrimères homogènes et hétérogènes.

2.2 SYNTHÈSE DES GLYCODENDRIMÈRES SYMÉTRIQUES

Dans un premier temps, pour valider l'utilisation de la « *click chemistry* », la synthèse de résidus fucosides, ayant comme aglycone seulement le cycle triazole, a été effectuée. Ceci permet de démontrer l'affinité supérieure de la lectine PA-IIL pour le régioisomère 1,4, comparativement au régioisomère 1,5.

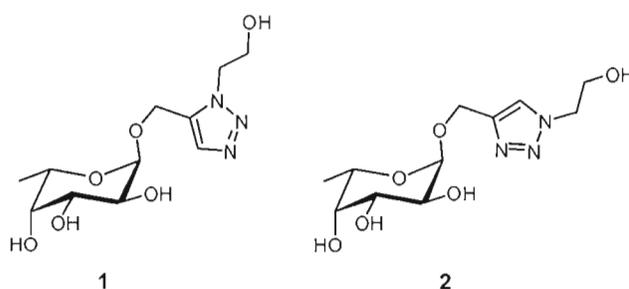


Figure 2.6 : Régioisomères 1,5 (1) et 1,4 (2) obtenus par cycloaddition thermique de Huisgen.

Afin d'obtenir les deux régioisomères et, particulièrement, le régioisomère 1,5, une cycloaddition 1,3-dipolaire thermique de Huisgen a été effectuée à l'aide de l'azidoéthanol et du L-(+)-fucose peracétylés. L'azidoéthanol est obtenu à partir d'un produit disponible commercialement, le bromoéthanol. Les réactions suivantes illustrent les deux étapes effectuées.

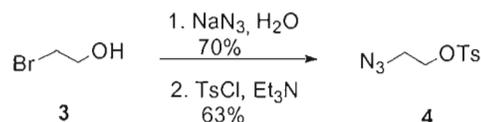


Schéma 2.1 : Étapes de synthèse du bras espaceur des dendrimères.

La première étape consiste à substituer le bromure par l'azoture. Pour ce faire, la réaction s'effectue à reflux en milieu aqueux en présence de l'azoture de sodium. Lorsque la réaction est terminée, l'extraction du produit peut s'effectuer à l'aide d'un solvant organique, comme le dichlorométhane ou l'éther. Toutefois, une attention particulière doit être apportée lors de l'évaporation de la phase organique sous pression réduite, car l'azidoéthanol obtenue est

assez volatile. C'est ce qui occasionne une variation de rendement lorsque la réaction est répétée à plusieurs reprises. La seconde étape est l'activation du groupement alcool sous forme de tosylate. Ceci s'effectue à l'aide du chlorure de *p*-toluènesulfonyle, en présence de la base triéthylamine pour neutraliser l'acide ainsi formé. La réaction s'effectue à froid, avec un rendement total de 63%.

Ensuite, une réaction de glycosidation est effectuée sur le L-(+)-fucose peracétylé avec le composé synthétisé précédemment, dans le but de fixer un aglycone alcynique en position anomérique. Pour le besoin des réactions à venir, une protection des fonctions hydroxyles du L-(+)-fucose s'avère nécessaire. La protection sous forme d'acétate est effectuée par acétylation en présence d'anhydride acétique et de pyridine. L'anomère α est isolé par cristallisation dans l'éthanol. Ceci permet d'obtenir de meilleurs rendements pour les prochaines étapes. La glycosidation est effectuée en présence d'alcool propargylique et d'une quantité catalytique de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans le dichlorométhane.¹¹⁴ L'anomère α , composé **7**, est purifié au moyen d'une colonne chromatographique contenant du gel de silice. Une analyse par RMN confirme la configuration anomérique du composé, avec un déplacement chimique de H_1 à $\delta = 5.23$ ppm et une constante de couplage ($J_{1,2}$) de 3.6 Hz.

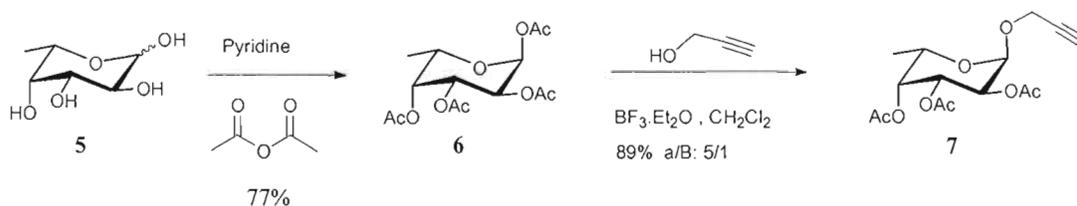


Schéma 2.2 : Synthèse du composé 7 suite à une étape de protection et de glycosidation du L-(+) fucose.

La synthèse des deux régioisomères 1,4 et 1,5 est ensuite effectuée, suite à une réaction entre le composé **7** et l'intermédiaire 2-azidoéthanol obtenu lors de la réaction précédente.

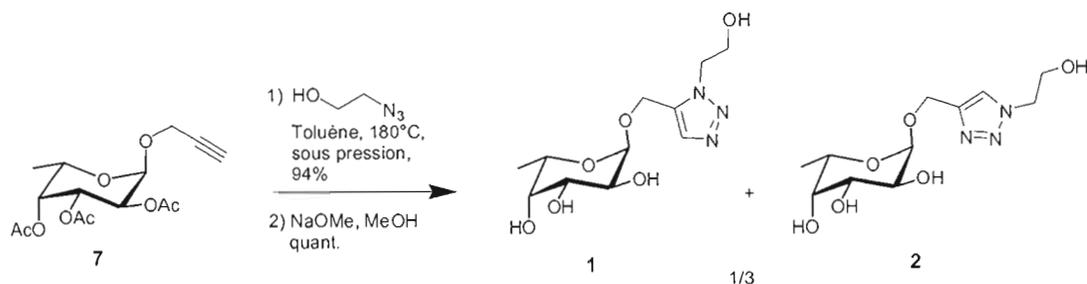


Schéma 2.3 : Synthèse des deux régioisomères 1 et 2 par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen et déprotection en conditions de Zemplén

Les deux régioisomères sont séparés au moyen d'une colonne chromatographique contenant du gel de silice et caractérisés par RMN. Par la suite, une déprotection des groupements hydroxyyles est effectuée selon les conditions de Zemplén (NaOMe, MeOH) et ces deux régioisomères ont été envoyés à Grenoble, au laboratoire du Dr. Anne Imberty au Cermav, où des tests d'inhibition compétitive ont été effectués avec PA-IIL. Les résultats d'affinité relative sont discutés au chapitre 3.

2.2.1 SYNTHÈSES DU MONOMÈRE

Tel que mentionné précédemment, le principe de la synthèse convergente a été utilisé pour obtenir des macromolécules dendritiques. Dans un premier temps, le monomère utilisé s'inspire des travaux de Linskamp.¹⁰⁸ Toutefois, la synthèse de ce dernier diffère. À l'aide de deux produits disponibles commercialement, l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque et le bromoéthanol, le composé **9** a été obtenu (Schéma 2.4). La première étape consiste à estérifier la fonction acide. Cette réaction, qui s'effectue en milieu acide dans le méthanol, a été complétée avec un très bon rendement, soit 94%. Par la suite, la réaction de deux équivalents d'azoture **2** (synthétisé précédemment) avec les fonctions hydroxyyles du cycle s'est effectuée au moyen d'une substitution nucléophile en présence de carbonate de césium dans le DMF.

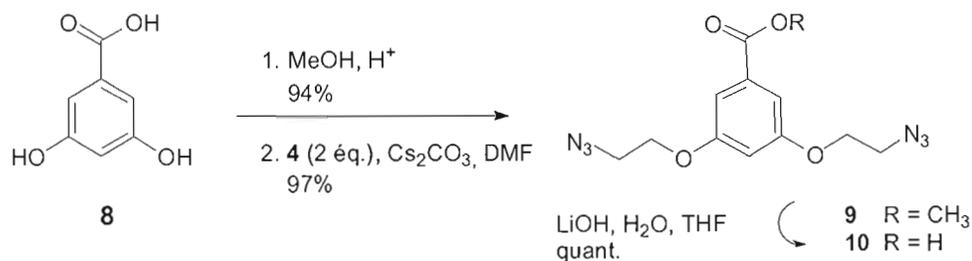


Schéma 2.4 : Synthèse du monomère **4** par des réactions d'estérification et de substitution nucléophile.

Ceci permet d'obtenir uniquement le composé disubstitué. La présence des fonctions azotures a été confirmée par IR où on observe une bande intense à 2100 cm⁻¹. L'analyse par RMN confirme la symétrie dans la structure. Pour le besoin des réactions subséquentes, la fonction méthyle ester est déprotégée dans le THF en présence de LiOH préalablement dissout dans un peu d'H₂O. Ceci permet de synthétiser les dendrons et les dendrimères de générations supérieures.

2.2.2 SYNTHÈSE DU DENDRON DE PREMIÈRE GÉNÉRATION

Le dendron de première génération est obtenu à partir du monomère **9** et de deux unités de la forme acide du monomère, le composé **10**. Les détails des réactions sont décrits dans le schéma suivant :

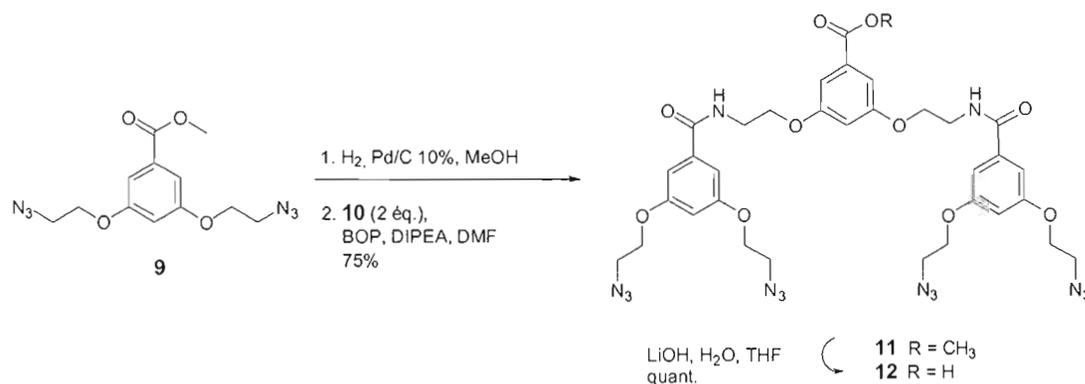


Schéma 2.5 : Synthèse du dendron **12** de 1^{ère} génération par hydrogénation catalytique et couplage peptidique.

L'hydrogénation catalytique permet de transformer les deux fonctions azotures du composé **9** en amine. Ceci s'effectue en présence d'une quantité catalytique de Pd/C 10%, sous atmosphère d'hydrogène dans le MeOH. La transformation complète des azotures en amides est confirmée par la disparition du signal caractéristique de la fonction N_3 à 2100 cm^{-1} en IR. La réaction terminée, une filtration est effectuée pour enlever le Pd/C et le diamine ainsi formé est utilisé directement sans purification à l'étape suivante.

L'étape de couplage entre le diamine et le composé **10** est effectuée dans le DMF, en présence d'un agent de couplage, le BOP et d'une base, le DIPEA. Suite à la disparition de la diamine de départ observé par chromatographie sur couche mince (CCM), une série de lavages est effectuée dans le but d'enlever le HMPA, composé secondaire formé lors du couplage peptidique. Ce dernier étant difficile à éliminer par chromatographie sur colonne, d'autres agents de couplage ont été évalués pour former l'amide; toutefois, ces derniers ont donné lieu à des temps de couplage plus longs et à des réactions moins complètes, tel que montré par ccm. Ainsi, le dendron de première génération **11** a été obtenu sous forme d'un solide blanc, avec un rendement de 75% après purification sur colonne chromatographique. Pour les fins des réactions subséquentes, la saponification de l'ester a été effectuée en milieu alcalin, avec LiOH, H_2O dans le THF. Le composé **12** a été obtenu et identifié par RMN, où on constate la disparition du signal caractéristique à la fonction ester à $\delta = 3.90$ ppm. De plus, les signaux des hydrogènes voisins des fonctions amides se distinguent de ceux qui sont adjacents aux fonctions azotures, soit $\delta = 3.86$ et 3.60 ppm respectivement. Aussi, l'analyse par spectrométrie de masse confirme la présence du composé.

Une répétition des réactions de saponification, hydrogénation catalytique et couplage peptidique permet d'obtenir les dendrons de générations supérieures.

2.2.3 SYNTHÈSE DU DENDRON DE SECONDE GÉNÉRATION

Toujours selon une stratégie convergente, la génération supérieure du dendron (composé **13**) a été obtenue en deux étapes. La première étape consistait à procéder à une hydrogénation catalytique du composé **9**, qui a permis de transformer les fonctions azotures en amines. Cette

réaction s'effectue en présence de Pd/C 10% dans le MeOH. Le composé formé a aussitôt été utilisé pour la seconde étape, suite à une filtration sur du charbon activé (Pd/C).

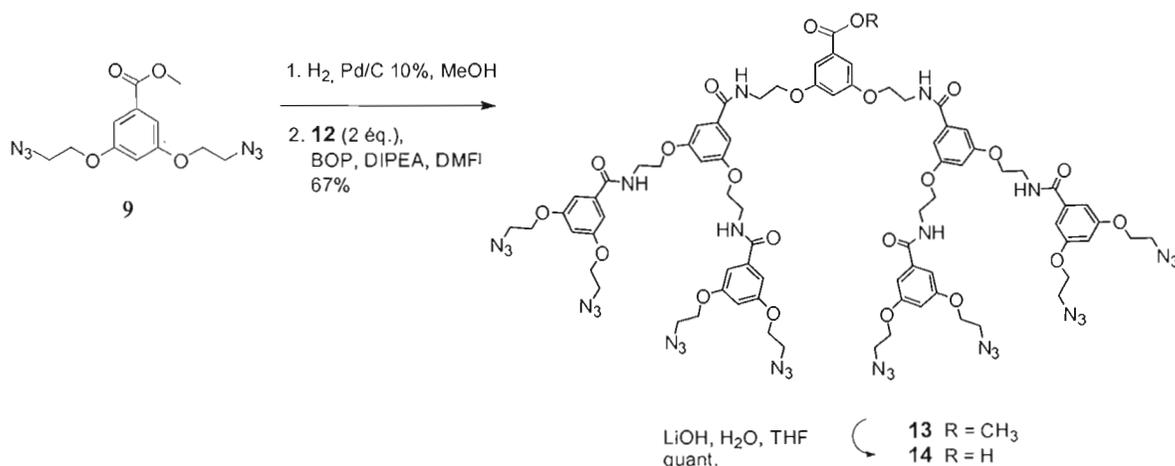


Schéma 2.6 : Synthèse du dendron 13 de 2^{ème} génération par hydrogénation catalytique et couplage peptidique.

L'amide a été formé au moyen de l'agent de couplage BOP, avec la base DIPEA et dans le DMF comme solvant. La seconde génération de dendron (composé **13**) est obtenue avec un rendement de 67%.

Ces molécules ont été caractérisées au moyen d'analyses spectroscopiques RMN-¹H, RMN-¹³C et ESI-MS. Tout particulièrement, la RMN-¹H a permis de suivre facilement l'évolution des générations grâce aux signaux caractéristiques des protons adjacents aux azotures ($\delta = 3.6$ ppm) par rapport à ceux près des cycles benzéniques ($\delta = 4.2$ ppm). De plus, on peut se fier aussi aux signaux caractéristiques des protons aromatiques ($\delta = 7.3$ et 6.8 ppm) dont les rapports varient entre eux.

Protons adjacents aux azotures et ceux près de cycles benzéniques :

Composés : 10

12

14



Protons des aromatiques :

Composés : 10

12

14

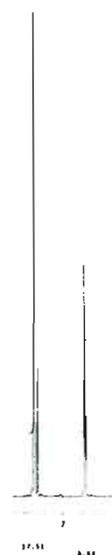


Figure 2.7: Spectres RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 25°C) montrant les signaux caractéristiques des composés 10, 12 et 14.

Dans la suite de ce chapitre, le monomère et les dendrons de génération 1 et 2 sont utilisés pour la conception de macromolécules homogènes.

2.2.4 SYNTHÈSE DES MACROMOLÉCULES

Une fois les dendrons de génération 0, 1 et 2 synthétisés, ils ont été couplés à un cœur dendritique présentant deux fonctions amines, le diaminopropane. Ceci a permis d'obtenir diverses générations de dendrimères. Les fonctions amines du cœur ont ensuite été liées aux fonctions acides des dendrons par liaison peptidique.

Trois dendrimères ont été synthétisés à partir de deux équivalents de chacun des composés **10**, **12**, **14** et d'un équivalent du 1,3-propanediamine pour chaque réaction. Ces réactions ont été effectuées en présence de l'agent de couplage BOP et de la base DIPEA dans le DMF. Le schéma suivant présente la synthèse des trois dendrimères, portant 4, 8 et 16 fonctions azotures en périphérie.

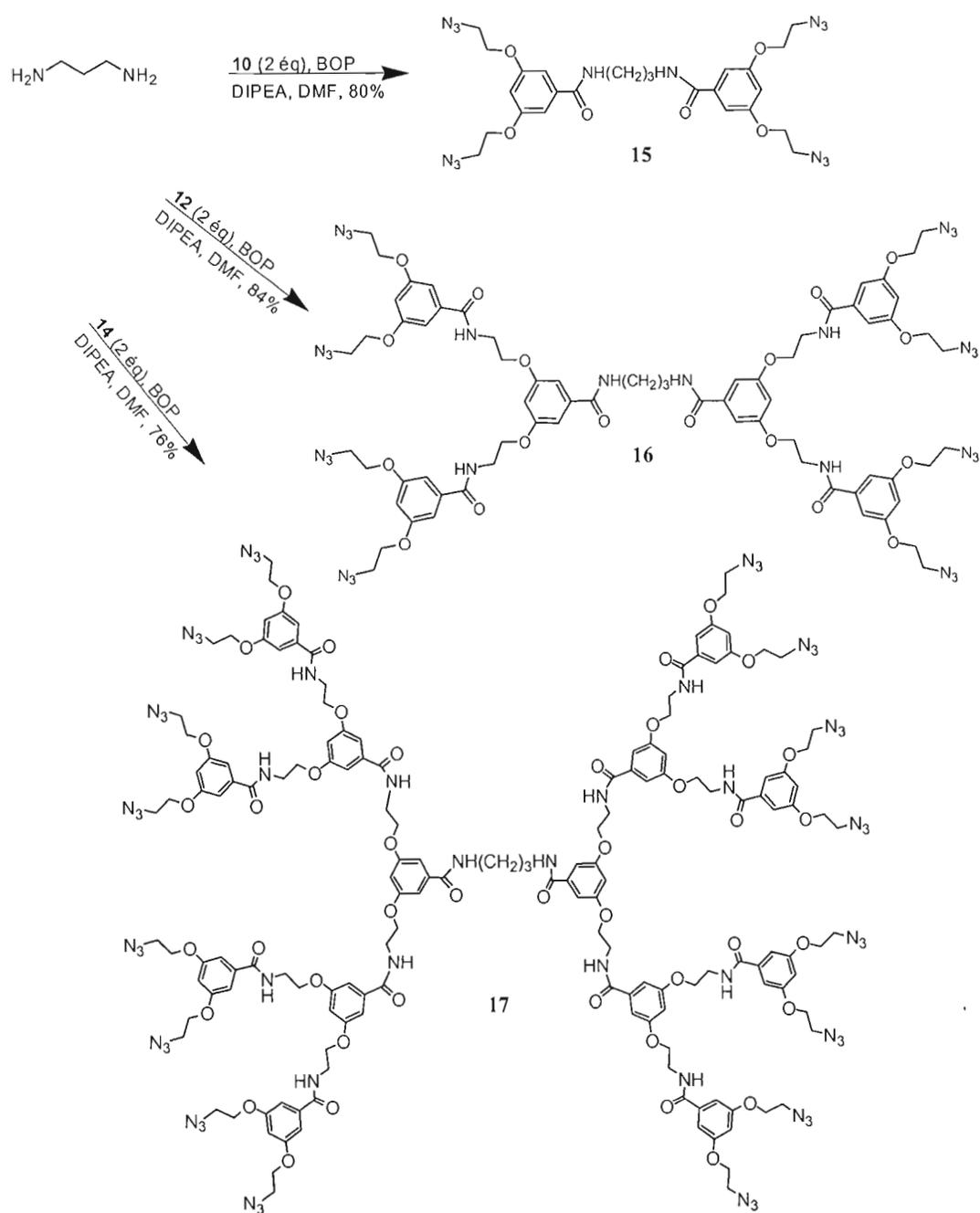


Schéma 2.7 : Synthèse des composés 15, 16, 17 par couplage peptidique.

Le rendement moyen de ces trois couplages peptidiques est d'environ 80%. Ces dendrimères ont été caractérisés par RMN et ESI-MS. À l'aide de la RMN ^1H , la présence de signaux caractéristiques du cœur dendritique, vers $\delta = 3.3$ et 1.8 ppm appartenant au protons du diamino propane, a permis de confirmer le couplage. Toutefois, il demeure difficile de caractériser les dendrimères de génération plus élevée car le cœur dendritique étant moins flexible que les fonctions aux extrémités, les protons et les carbones du cœur sont moins détectés en RMN à 300 MHz. Les spectres de masse ont confirmé toutefois la présence des composés attendus.

2.2.5 SYNTHÈSE DES DENDRONS FUCOSYLÉS ET DE GLYCLODENDRIMÈRES FUCOSYLÉS

Jusqu'à présent, la synthèse de dendrons et de dendrimères de différentes générations a été décrite. Ces composés présentent tous un nombre différent de fonctions azotures en surface qui permettent de coupler des résidus saccharidiques. Afin d'effectuer cette union, la réaction de « *click chemistry* » a été envisagée. Tel que mentionné précédemment, cette réaction s'effectue entre un alcyne terminal et une fonction azoture.

Le composé **7** a été couplé en périphérie de chacun des dendrons et dendrimères synthétisés précédemment. La réaction de « *click chemistry* » s'est effectuée en présence d'une quantité catalytique de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et d'ascorbate de sodium dans le THF/ H_2O ou le $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$. Pour certains dendrimères de masse moléculaire élevée, l'utilisation du THF/ H_2O et un chauffage modéré du mélange réactionnel a été nécessaire afin de dissoudre plus facilement les réactifs et de diminuer le temps de réaction. Ensuite, les fonctions hydroxyles des saccharides ont été déprotégées selon les conditions standards de Zemplén (NaOMe/MeOH). Une série de glycodendrimères a ainsi été obtenue.

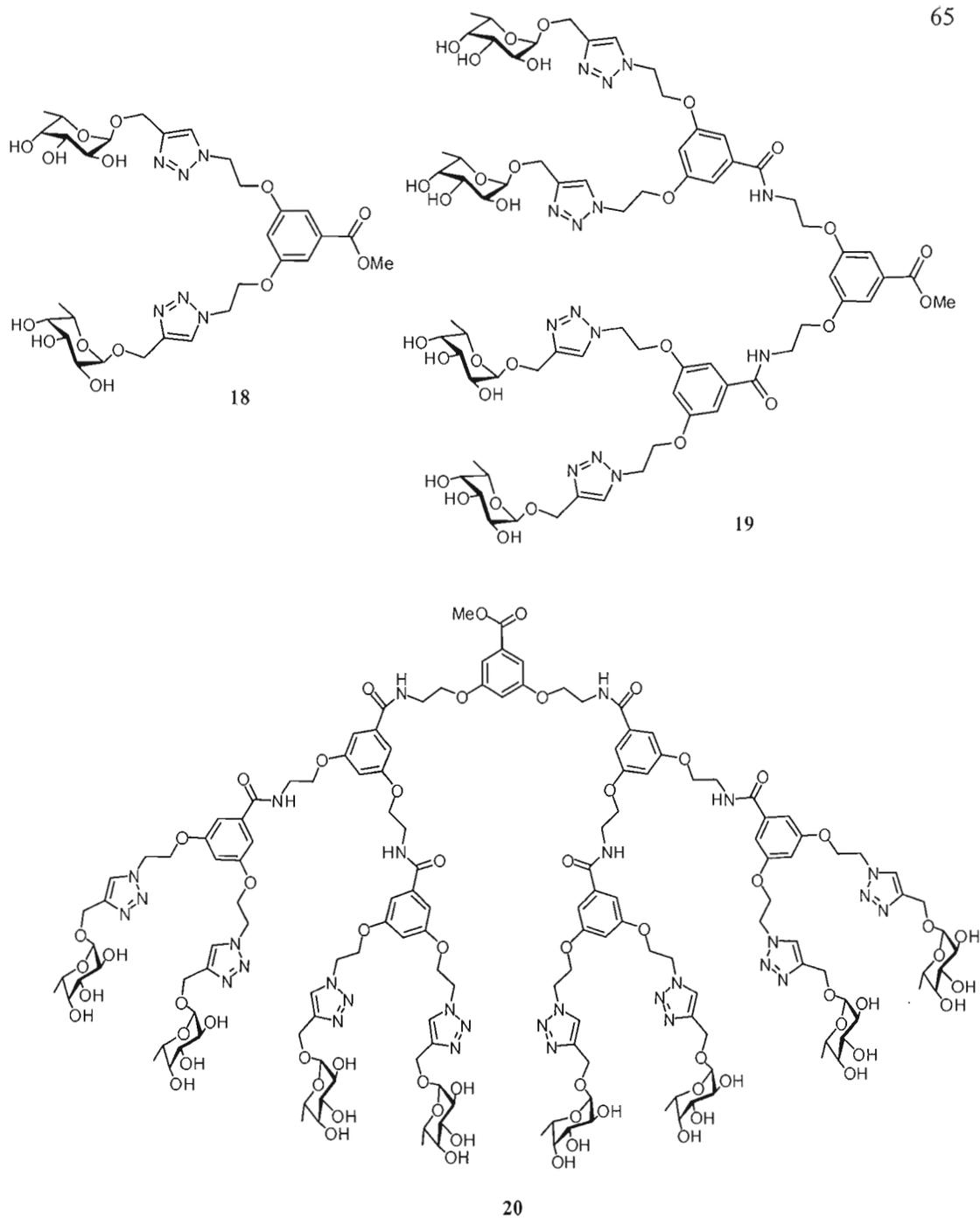
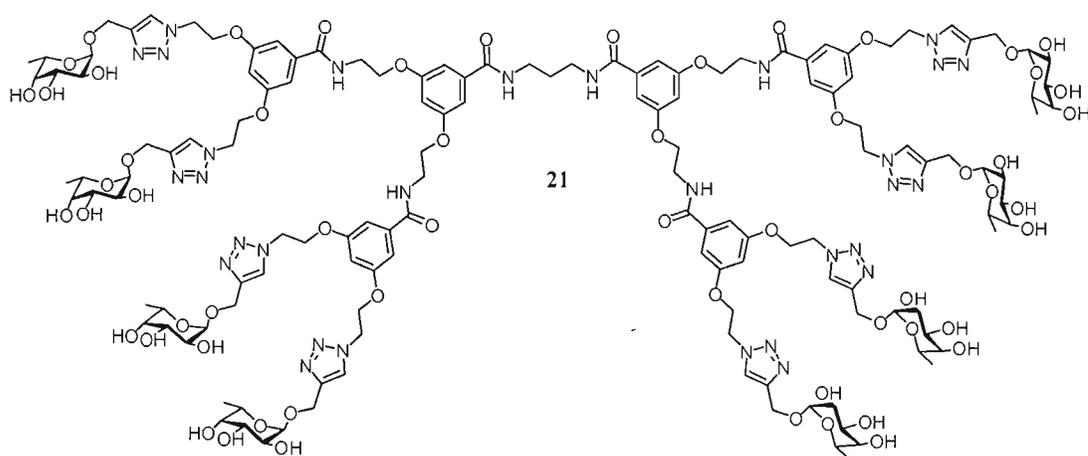
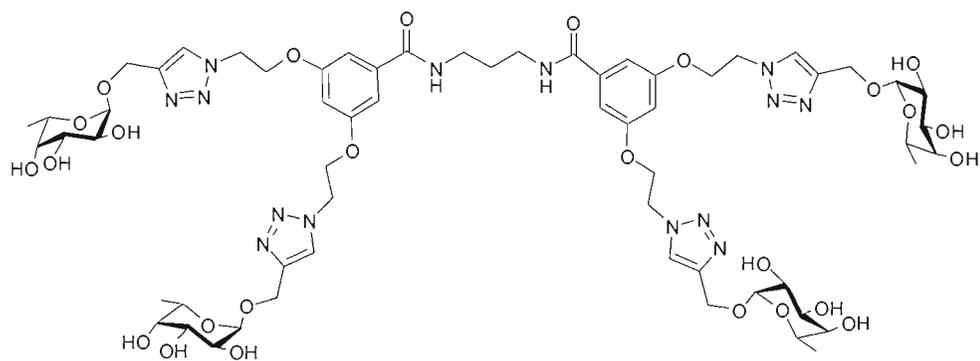


Figure 2.8 : Différentes générations de dendrons fucosylés en surface.



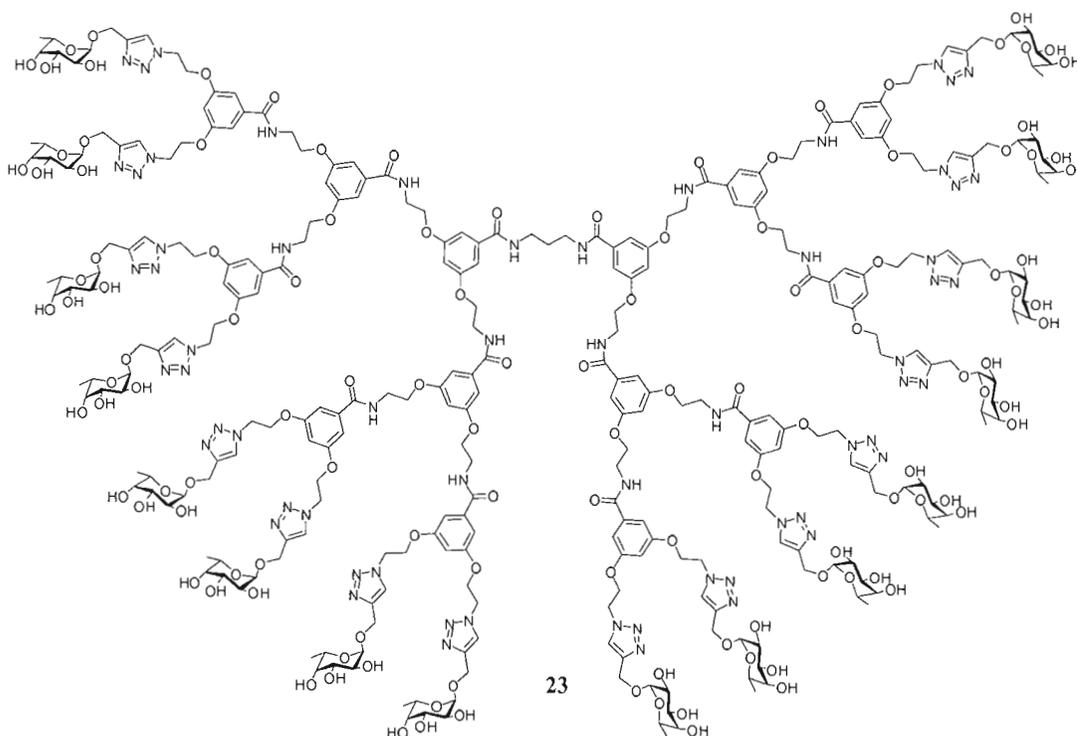


Figure 2.9 : Différentes générations d'homo-glycodendrimères fucosylés.

Les réactions de « *click chemistry* » ont été complétées avec des rendements variant entre 77 et 96% après chromatographie sur une colonne de gel de silice. À cette étape, la disparition du signal caractéristique de l'azoture à 2000 cm^{-1} du spectre infrarouge a permis de confirmer que toutes les fonctions azotures avaient réagi. De plus, les spectres RMN ^1H et ^{13}C permettent d'observer le déplacement des signaux caractéristiques aux protons adjacents des fonctions azotures vers les champs plus élevés, dû à la présence des cycles triazoles qui ont pour effet de délocaliser les électrons de façon plus importante que la fonction azoture. Par exemple, pour le composé **16** vs la version acétylée du composé **22**, un déplacement des signaux des hydrogènes adjacents à la fonction azoture ou au cycle triazole à $\delta = 3,64\text{ ppm}$ vers $4,28\text{ ppm}$ est observé, respectivement. L'analyse par ESI-MS a confirmé que la structure attendue était bien présente, à cause de la présence de fragments attribués à $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

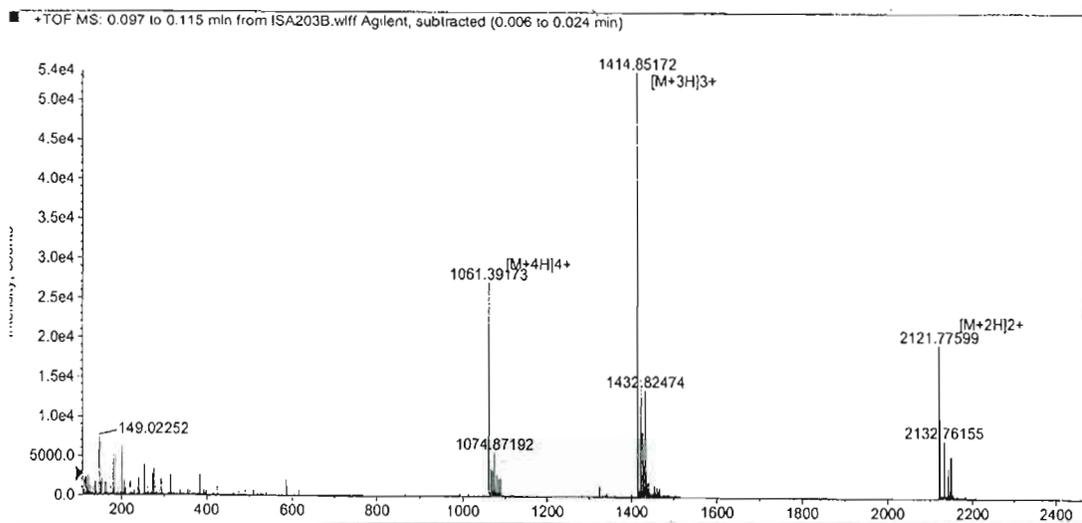


Figure 2.10 : Spectre de masse du composé 22

Dans une deuxième étape, diverses générations d'hétéro-glycodendrimères contenant des résidus galactosides et fucosides ont été synthétisées. Suivant une stratégie légèrement différente de la précédente, les mêmes types de réactions ont permis de contrôler la disposition des unités saccharidiques autour des dendrimères.

2.3 SYNTHÈSE DES GLYCODENDRIMÈRES DISSYMMÉTRIQUES

Le but premier de cette synthèse d'hétéroglycodendrimère était d'installer des résidus galactosides sur les glycodendrimères pour évaluer leur affinité avec la lectine PA-IL de la bactérie. Le même type d'architecture que les homoglycodendrimères a été envisagé dans le but d'une comparaison éventuelle de leur pouvoir d'affinité avec les différentes lectines. L'approche synthétique utilisée est une série de protection-déprotection de groupements réactionnels. Les dendrons et le cœur dendritique décrits précédemment ont aussi été utilisés pour préparer ces macromolécules dissymétriques.

En premier lieu, une protection des hydroxyles du D-(+)-galactose sous forme d'acétate a été effectuée, suivie d'une glycosidation en position anomérique de l'alcool propargylique.¹¹⁵ Les mêmes conditions réactionnelles pour la protection et la glycosidation du L-(+)-fucose décrites précédemment ont été utilisées (schéma 2.2).

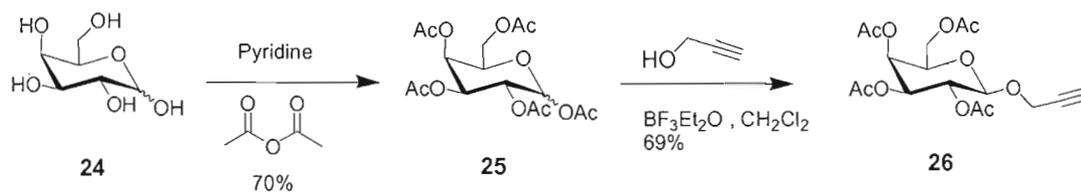


Schéma 2.8 : Synthèse du composé 6 suite à une étape de protection et de glycosidation du D-(+)-galactose.

Les résidus galactosides ont d'abord été installés, préférablement aux résidus fucosides, pour éviter la perte de produit advenant l'échec d'une réaction. Le fucose étant beaucoup plus spéndieux que le galactose, cette voie de synthèse semblait plus avantageuse et sécuritaire.

Tout d'abord, une des deux extrémités du cœur dendritique a été protégée par un groupement Boc pour former le tert-butyle 3-aminopropylcarbamate **27**. Cette réaction s'est effectuée à partir de dicarbonate de di-tert-butyle dans le chloroforme à 0°C, avec un rendement de 96%.

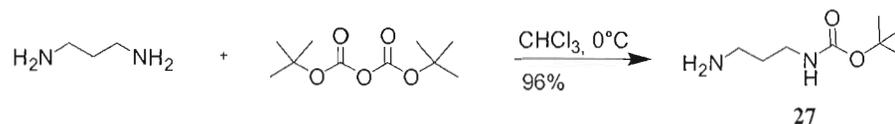
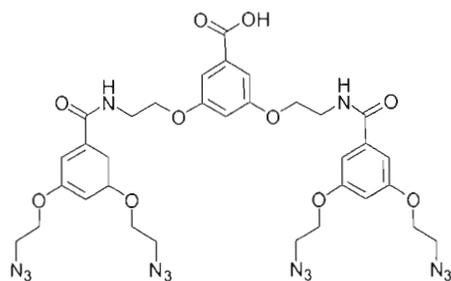


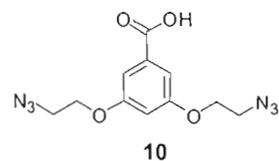
Schéma 2.9 : Étape de protection du cœur dendritique.

La première étape de la synthèse des hétérodendrimères consistait à unir, par un lien peptidique, les différentes générations de dendrons synthétisés précédemment. Dans ce cas-ci, seuls le monomère et les dendrons de première génération ont été utilisés pour préparer des dendrimères hétérogènes, par manque de produit et de temps. Le couplage peptidique s'est effectué en présence de l'agent de couplage BOP et de la base DIPEA dans le DMF. Ensuite, des résidus galactosides ont été installés au moyen de la réaction de « *click chemistry* » pour joindre les fonctions alcynes des sucres aux azotures des dendrimères par la formation régiospécifique de cycles triazoles 1,4. Le schéma suivant montre les premières étapes de la formation des hétéroglycodendrimères.



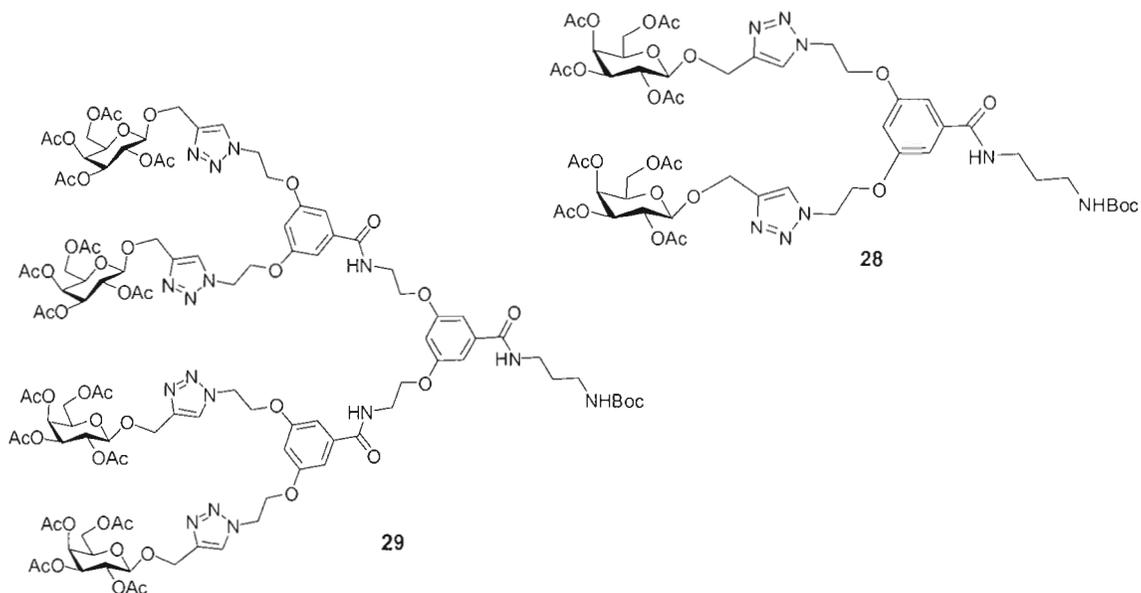
12

- 1) 27, BOP, DIPEA, DMF, 85%
- 2) 26, CuSO₄·5H₂O, ascorbate de sodium, ^tBuOH/H₂O 77%



10

- 1) 27, BOP, DIPEA, DMF, 85%
- 2) 26, CuSO₄·5H₂O, ascorbate de sodium, ^tBuOH/H₂O 92%



29

28

Schéma 2.10 : Synthèse des composés 28 et 29 suite aux réactions de couplage peptidique et de «click chemistry».

Les composés **28** et **29** ont été caractérisés par RMN et ESI-MS. Les spectres RMN confirment les structures anticipées, en montrant les signaux caractéristiques des protons ($\delta = 1.41$ ppm) et des carbones ($\delta = 79.5$ et 28.4 ppm) constituant le groupement *tert*-butyle, ainsi que ceux des triazoles, apparaissant à $\delta = 7.79$ ppm et 123.8 ppm, respectivement. Les spectres de masse ont confirmé ces structures avec la présence du fragment $[M+H]^+$ à $m/z = 1221.47$ amu pour le composé **28** et $m/z = 2489.89$ amu pour le composé **29**.

La déprotection de l'amine du cœur dendritique au moyen de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane pendant 3 heures à 25°C a suivi. Après purification chromatographique des produits sous forme amine sur une colonne de gel de silice, la RMN a permis d'observer la disparition des signaux caractéristiques du groupement protecteur Boc à $\delta = 1.43$ ppm. Ensuite, un couplage peptidique a permis de joindre une autre unité du monomère ou du dendron de première génération à la structure. Les composés suivants ont été synthétisés :

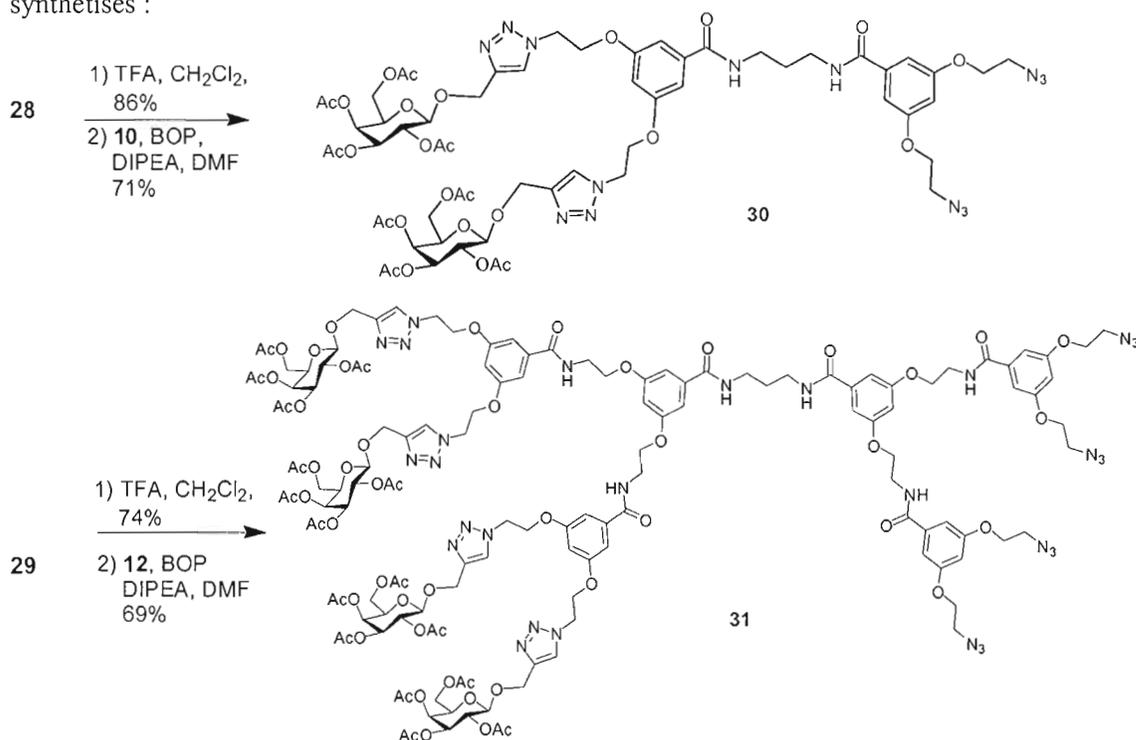


Schéma 2.11 : Synthèse des composés **30** et **31** suite aux réactions de déprotection du groupement Boc et de couplage peptidique.

Les deux dendrimères **30** et **31** contenant 2 et 4 fonctions azotures et résidus galactosides ont été obtenus et caractérisés par RMN et ESI-MS. Sur les spectres RMN ^1H , les signaux des cycles benzéniques couplés à des unités saccharidiques ($\delta = 7.05$ et 6.62 ppm) se distinguaient de ceux qui ne l'étaient pas ($\delta = 7.02$ et 6.53 ppm). De plus, la présence des signaux des protons adjacents aux azotures et ceux adjacents aux cycles triazoles ont confirmé une fois de plus que le couplage s'était effectué ($\delta = 3.60$ vs 4.40 ppm).

Finalement, l'étape suivante était d'installer le résidu fucoside **7** à l'autre extrémité de ces dendrimères en utilisant la « *click chemistry* ». Les réactions ont été effectuées en présence de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et d'ascorbate de sodium dans le THF. Ce solvant est préféré au $t\text{-BuOH}$ à cause du problème de solubilité des produits de départ. Par la suite, une désacétylation des hydroxyles des sucres a permis d'obtenir deux hétérodendrimères, dont un contenant deux résidus fucosides et deux résidus galactosides et l'autre, 4 résidus fucosides et 4 résidus galactosides. Ces deux composés pourront être testés avec la lectine PA-II et PA-III de la bactérie PA.

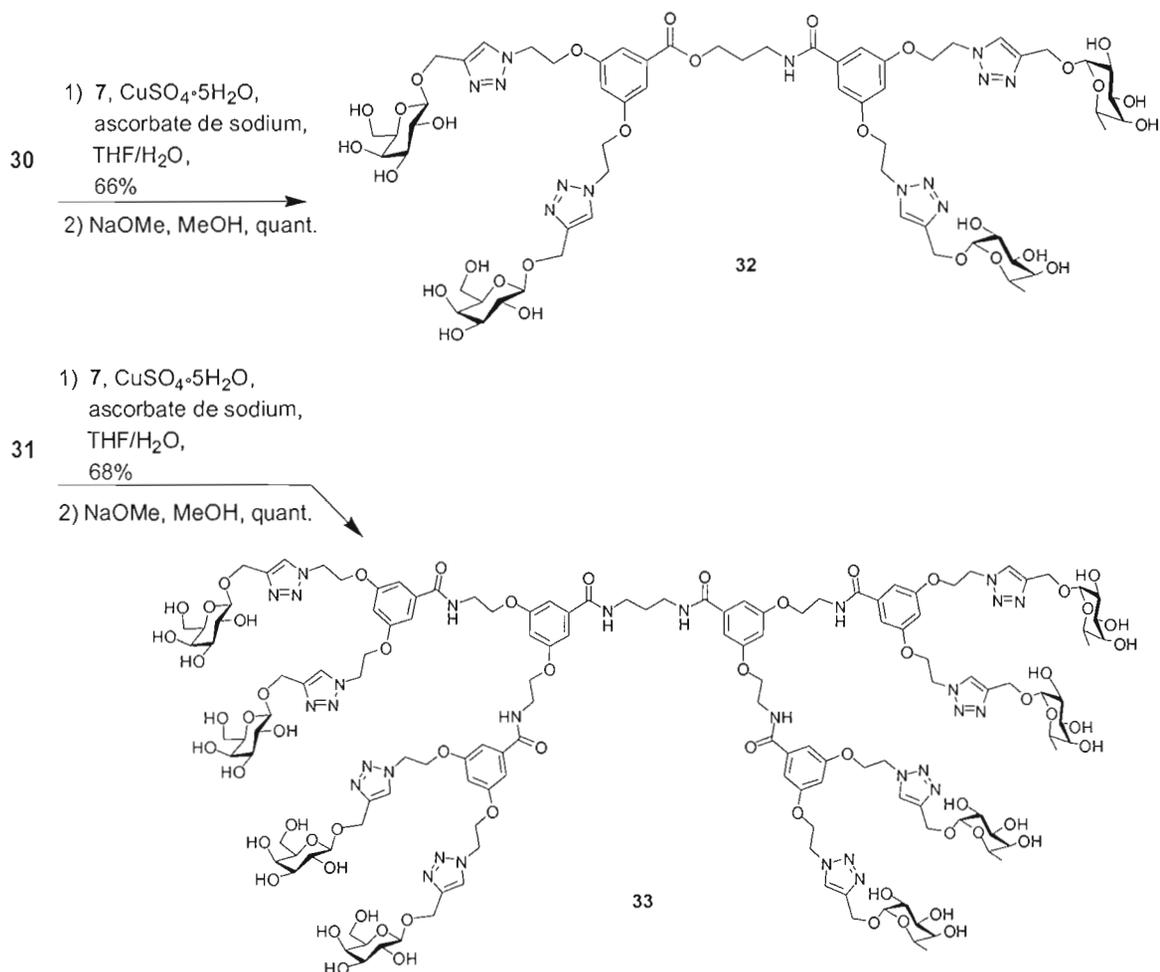


Schéma 2.12 : Synthèse des glycodendrimères 32 et 33 suite aux réactions de « *click chemistry* » et de Zemplén.

Ces glycodendrimères acétylés ont été caractérisés par RMN et ESI-MS. Sur le ^1H -RMN, l'ajout des résidus fucoses a été confirmé avec la présence du signal à $\delta = 0.89$ ppm pour les protons en H_6 du sucre, celle du signal du proton en position anomérique H_1 des résidus galactosides à $\delta = 4.35$ ppm et, enfin, des signaux du proton des triazoles qui se distinguent autour de $\delta = 8.0$ ppm.

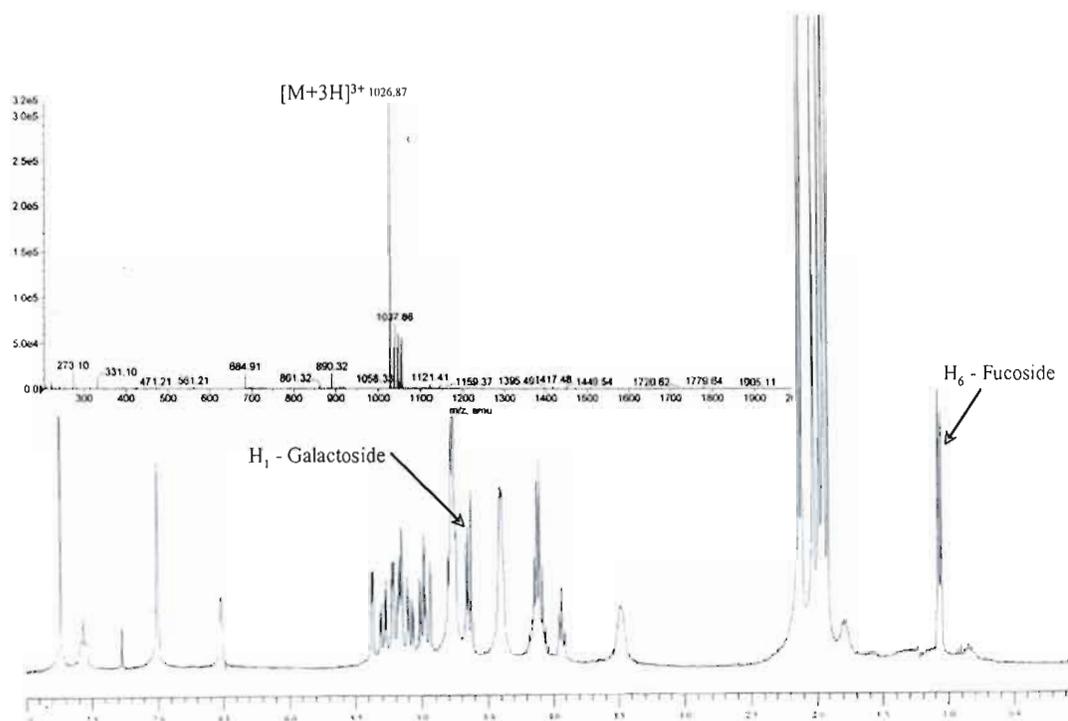


Figure 2.11 : Spectre RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3$) et spectre de masse ESI-MS du composé 32a (acétylés).

Une fois les groupements hydroxyles des unités saccharidiques déprotégés, les composés dendritiques désacétylés ont été analysés par RMN et ESI-MS. Pour obtenir de bonnes analyses par spectroscopie RMN, la caractérisation des composés finaux ont dû être produite dans le DMSO, leur solubilité étant trop faible dans les solvants deutérés courants pour obtenir les concentrations nécessaires pour la prise des spectres à température ambiante et dans un intervalle de temps acceptable. De plus, l'analyse du glycodendrimère de masse moléculaire élevée, le composé **23**, a dû se faire à concentration élevée dans l'eau et à une température interne de la sonde à $80^\circ C \pm 5^\circ C$.

2.4 CONCLUSION

Une bibliothèque de macromolécules dendritiques monodisperses et caractérisées a pu être produite au moyen d'une stratégie de synthèse directe et systématique. Notre approche, versatile et flexible, a permis d'utiliser des conditions réactionnelles simples, relativement douces et compatibles, avec une large gamme de fonctions chimiques. Une panoplie de composés dendritiques présentant différentes variables (le nombre et le type d'unité saccharique, ainsi que leur disposition dans l'espace) a été synthétisée. Deux principales séries se distinguent. D'abord, on retrouve les six homoglycodendrimères, dont un dendron avec deux résidus fucosides, un dendron et un dendrimère avec quatre et huit résidus fucosides, et un dendrimère avec seize résidus fucosides. Ensuite, il y a la série d'hétérodendrimères, dont un dendrimère avec deux résidus fucosides et deux résidus galactosides et, finalement, un dendrimère avec quatre résidus fucosides et quatre galactosides. Toutes ces macromolécules ont été évaluées en présence des différentes lectines de la bactérie PA pour tenter d'associer leur pouvoir d'agglutination à leurs caractéristiques structurales.

Ces résultats ont été présentés dans une publication parue dans le *New Journal of Chemistry*. (Deguise, I.; Lagnoux, D.; Roy, R. *New J. Chem.* **2007**, 31, 1321).¹¹⁶

CHAPITRE 3

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DU COMPORTEMENT DES GLYCODENDRIMÈRES EN PRÉSENCE DES LECTINES PA-IL ET PA-IIL DE LA BACTÉRIE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Ayant en main une série de molécules dendritiques comportant des résidus fucosides et galactosides en périphérie, des études de leur comportement en présence des lectines PA-IL et PA-IIL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ont été effectuées. D'abord, notre collaboratrice Anne Imberty, chercheuse au CERMAV de Grenoble, France, a effectué des tests ELLA impliquant la lectine PA-IIL et certains composés dont la synthèse a été décrite précédemment. La description du test et des résultats de ces analyses est présentée et discutée dans la première partie de ce chapitre. Ensuite, des tests préliminaires de turbidimétrie ont été effectués dans nos laboratoires, avec tous les autres composés dendritiques synthétisés et les deux lectines de la bactérie. Certaines conclusions peuvent être tirées en regard des structures moléculaires nécessaires permettant une réticulation efficace entre les glycodendrimères et les lectines tel que discuté dans la deuxième partie de ce chapitre.

3.1 TESTS D'INHIBITIONS COMPÉTITIVES ELLA

Une des méthodes les plus répandues permettant d'analyser les interactions lectine-sucre est le test ELLA (*Enzyme Linked Lectin Assay*). Ce test, dit test « *sandwich* », consiste à évaluer le potentiel de molécules données à inhiber l'adhésion de protéines à un ligand de référence. Ici, les macromolécules dendritiques fucosylés ont été mises en présence de la lectine PA-IIL et du méthyle α -L-fucose comme référence. Le schéma suivant représente les différentes étapes de ce test.

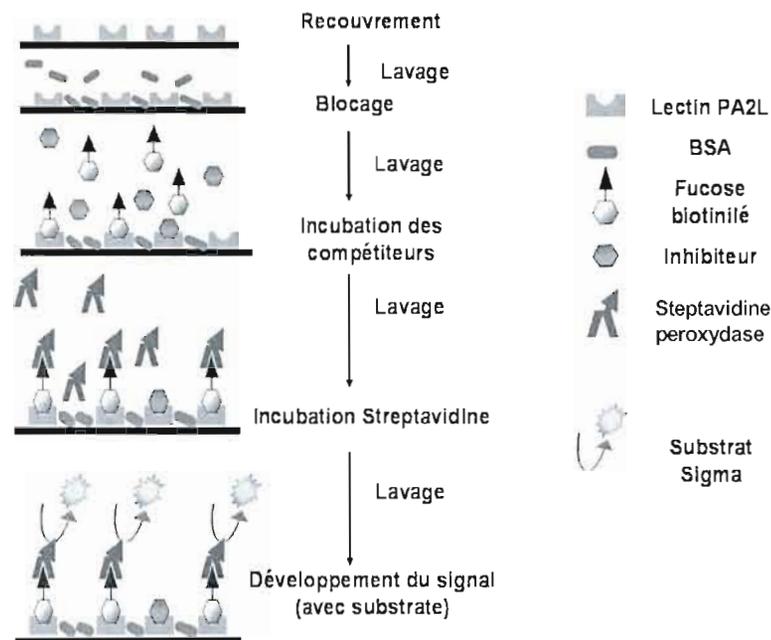


Figure 3.1 : Représentation schématique du test ELLA.

Ces analyses ont été effectuées sur une plaque *microtitre* de 96 puits. Tout d'abord, chacun des puits doit être recouvert de lectine PA-IIL, liée de façon non-covalente par des interactions de type hydrophobe. Entre les différentes étapes, plusieurs lavages doivent être effectués pour enlever l'excédent des composés déposés dans les puits. Ensuite, une protéine inactive, BSA (albumine sérique bovine) est ajoutée afin d'occuper tous les sites non-occupés par PA-IIL, évitant ainsi les adhésions non-spécifiques. La plaque est incubée en présence de l'inhibiteur et du L-fucose biotinylié, puis de la steptavidine peroxydase est ajoutée. Cette protéine tétramérique, couplée à une enzyme peroxydase, se lie à la biotine présente sur les fucoses durant l'étape d'incubation. La dernière étape consiste à ajouter un substrat métabolisable par la peroxydase qui est lié à un chromophore. Un signal est alors émis et il est proportionnel à la quantité des complexes fucose-biotine-steptavidine liés à PA-IIL. Ainsi, il est possible de mesurer le potentiel d'inhibition relatif de chacune des différentes structures fucosylées analysées.

Au tout début du projet, les deux régioisomères **1** et **2**, issus d'une cycloaddition 1,3-dipolaire thermique et le monomère **34**, présentant deux résidus fucosides, ont été envoyés au laboratoire de Grenoble. Des tests d'inhibitions compétitives ELLA avec la lectine PA-III ont été effectués.

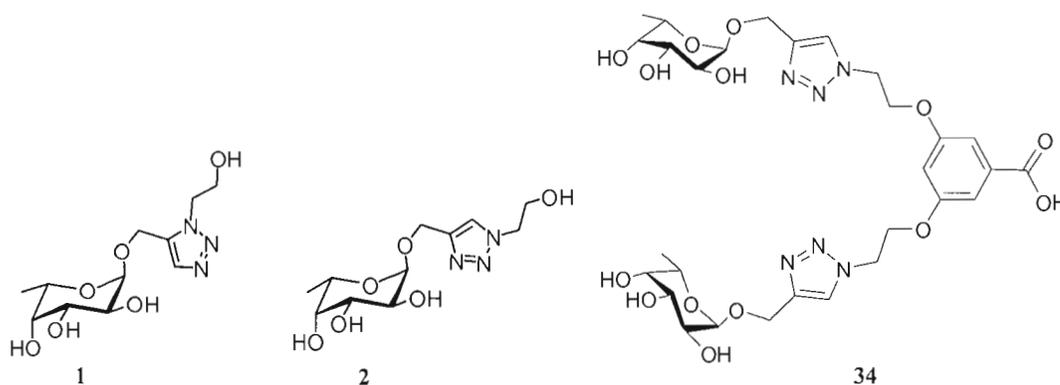


Figure 3.2 : Composés envoyés au laboratoire de Grenoble.

En comparant les résultats obtenus de ces trois composés, il est possible de déterminer quel régioisomère est le mieux reconnu par la lectine et d'observer l'influence d'un nombre plus élevé d'unités saccharidiques sur la structure. Leur affinité relative est déterminée par rapport au méthyl α -L-fucopyranoside utilisé comme référence et rapportée dans le tableau suivant.

Tableau 1.1 : Résultats des analyses par ELLA des trois composés 1, 2 et 34.

COMPOSÉ	AFFINITÉ RELATIVE	ÉCART TYPE
Régioisomère 1,5 (1)	1,4	0,12
Monomère fucosylé (34)	3,0	0,67
Régioisomère 1,4 (2)	2,7	0,1
Méthyl α -L-fucopyranoside	1,0	0

Premièrement, ces résultats démontrent que la lectine présente une meilleure affinité pour les composés comprenant un cycle triazole, comparativement au méthyl α -L-fucopyranoside seul. De plus, l'affinité de 1,4 du régioisomère 1,5 (**1**) est inférieure à celle de 2,7 observée pour le régioisomère 1,4 (**2**). Cette observation justifie l'utilisation de la « *click chemistry* » pour préparer des composés comprenant des cycles triazoles 1,2,3-disubstitués en 1,4.

Cependant, contrairement à ce qui aurait été attendu, l'affinité relative du monomère **34** présentant deux unités fucosides est seulement de 3.0. La présence de ces deux unités saccharidiques nous aurait permis de s'attendre à observer environ le double de l'affinité relative obtenue avec le régioisomère 1,4. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette observation. D'abord, l'utilisation du réactif de Zemplén contenant une quantité appréciable d'eau peut avoir causé la déprotection partielle de la fonction ester lors de la déprotection des hydroxyles. La présence de la fonction acide libre ainsi générée peut avoir occasionné des interactions avec des résidus d'acides aminés voisins du site d'affinité. Ceci limiterait le déploiement de l'autre unité saccharidique et empêcherait la reconnaissance d'une autre lectine ou, tout simplement rapprocherait trop fortement deux unités saccharidiques, induisant cette faible affinité. Des analyses avec des structures de plus haute génération permettraient éventuellement d'expliquer cette observation.

Il est intéressant aussi d'observer la structure tridimensionnelle obtenue par diffraction de rayons-X par l'équipe de Grenoble, du complexe formé par co-cristallisation de la lectine PA-IIL avec le régioisomère 1,5 (**1**) dans le site de liaison.

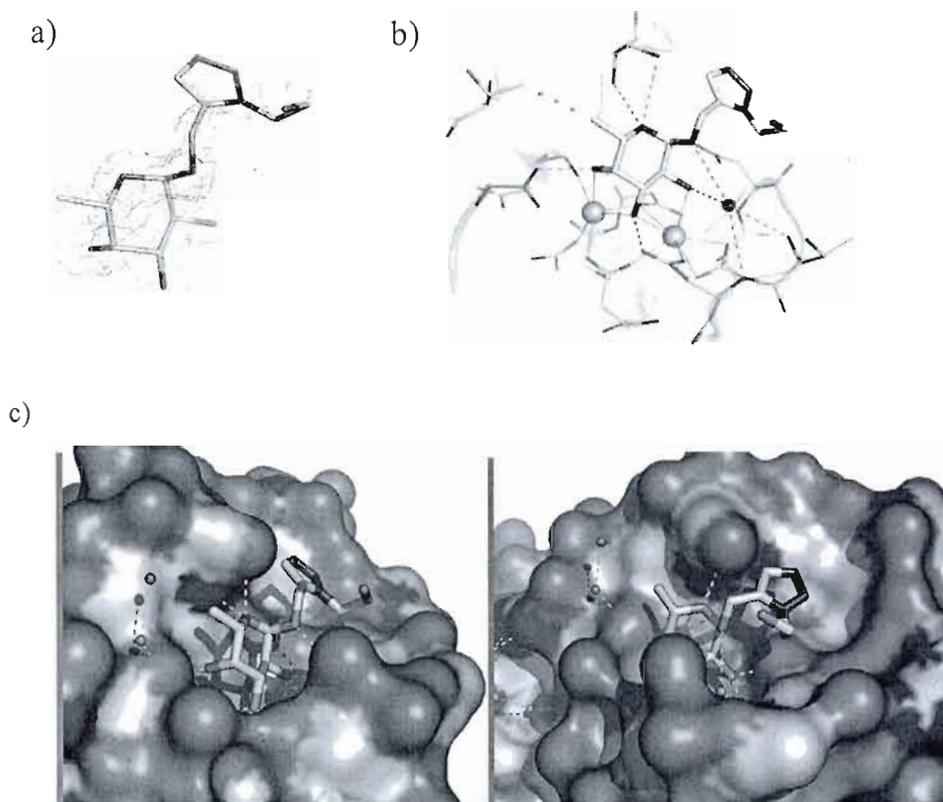


Figure 3.3 : Régioisomère 1,5 (1) dans le site de reconnaissance de la lectine PA-IIL; a) densité électronique autour de composé, b) site de reconnaissance, c) surface de Connolly

Cette structure indique que l'hétérocycle vient se positionner dans une zone hydrophobe de la protéine. De plus, on observe qu'aucune interaction n'est effectuée avec les acides aminés environnants. Malheureusement, la cristallisation du régioisomère 1,4 n'ayant pas été effectuée, il n'a pas été possible d'observer les différences du positionnement du triazole dans les deux cas. Toutefois, une de nos collègues de travail a synthétisé le même type de composé comprenant un hétérocycle comme pharmacophore. Il s'agit d'un isoxazole qui est aussi substitué en 1,4. Une cristallisation de ce composé avec PA-IIL a été effectuée, ce qui a permis d'observer la présence de nouveaux ponts hydrogène avec la protéine. L'interaction la plus importante ainsi observée provient de l'existence de liaison hydrogène entre l'azote de l'hétérocycle et l'oxygène de Asp 96.

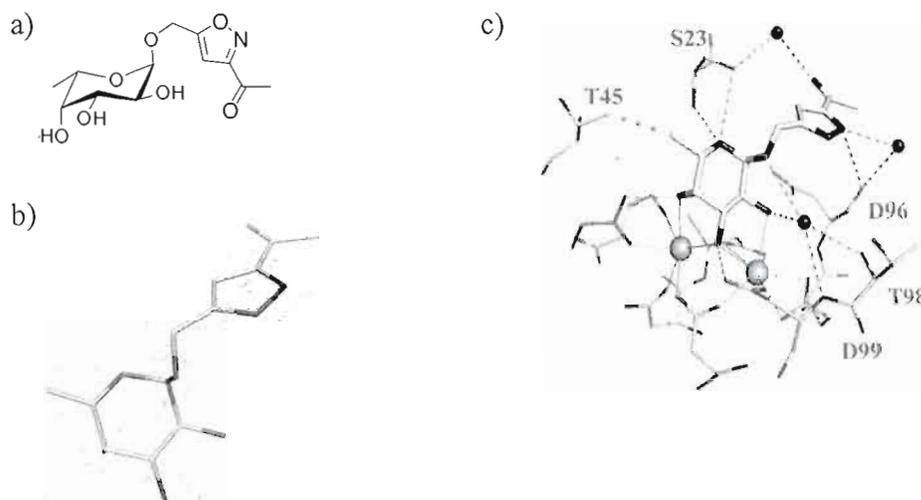


Figure 3.4 : a) Représentation du pharmacophore, b) densité électronique autour du composé, c) site de reconnaissance.

Ainsi, la configuration spatiale de l'hétérocycle est importante pour obtenir une bonne affinité des unités saccharidiques dans les sites de reconnaissance. Ceci justifie l'utilisation de la « *click chemistry* », qui permet de générer des composés avec des triazoles substitués en 1,4 exclusivement qui semblent manifester une plus grande affinité que le régioisomère 1,5 (1).

3.2 ANALYSE TURBIDIMÉTRIQUE

Tel que mentionné précédemment, les systèmes saccharidiques multivalents permettent d'observer une plus grande affinité pour les lectines que les monosaccharides. Des analyses de turbidimétrie, effectuées dans nos laboratoires, supportent l'existence de ce phénomène avec les macromolécules synthétisées. Ces analyses ont été rendues possibles par la générosité du Professeur Imberty, qui a fourni quelques milligrammes de PA-IIL d'origine bactérienne, isolé et purifié dans leur laboratoire. Ces analyses nous ont permis d'atteindre les objectifs de ce projet, soit de démontrer l'affinité des lectines PA-IL et PA-IIL pour les dendrons et les dendrimères contenant des résidus galactosides et fucosides en surface, respectivement.

Lorsque les glycodendrimères sont mis en présence des lectines spécifiques, deux phénomènes peuvent être engendrés. Selon la constitution des dendrimères glycosylés, le composé multivalent peut créer une réticulation intramoléculaire (au sein d'une même entité) ou intermoléculaire (entre deux ou plusieurs entités différentes).

La réticulation intramoléculaire consiste en une chélation entre deux sites de reconnaissance d'une même lectine. Cet évènement est toutefois moins favorable, à cause d'une enthalpie d'interaction élevée, qui ne stabiliserait que légèrement le complexe ligand-récepteur formé. Pour que le deuxième contact soit efficace, le bras espaceur devrait être de longueur adéquate, ce qui est difficile à concevoir. De plus, aucune interaction de ce dernier avec la surface de la lectine ne doit exister, car ceci aurait pour effet d'augmenter l'enthalpie de la seconde interaction. De plus, l'entropie, synonyme de désordre, vient aussi limiter le phénomène de chélation. Tout bras espaceur pourrait changer de conformation suite à une rotation, une translation, à l'hydratation, augmentant ainsi le nombre de degrés de liberté, donc le désordre. Ainsi, des conditions exceptionnelles (longueur et flexibilité des bras espaceur) doivent être réunies pour qu'on puisse observer la réticulation intramoléculaire.

Le deuxième phénomène de réticulation intermoléculaire est donc plus favorisé car les protéines présentent souvent une architecture multimérique dont les sites de reconnaissance sont éloignés les uns des autres. Un complexe ligand-récepteur tridimensionnel et insoluble se forme et précipite dans le milieu.¹¹⁷ La figure 3.5 illustre les systèmes d'interaction avec des composés divalents; toutefois, les mêmes phénomènes se produisent également chez les structures plus complexes.

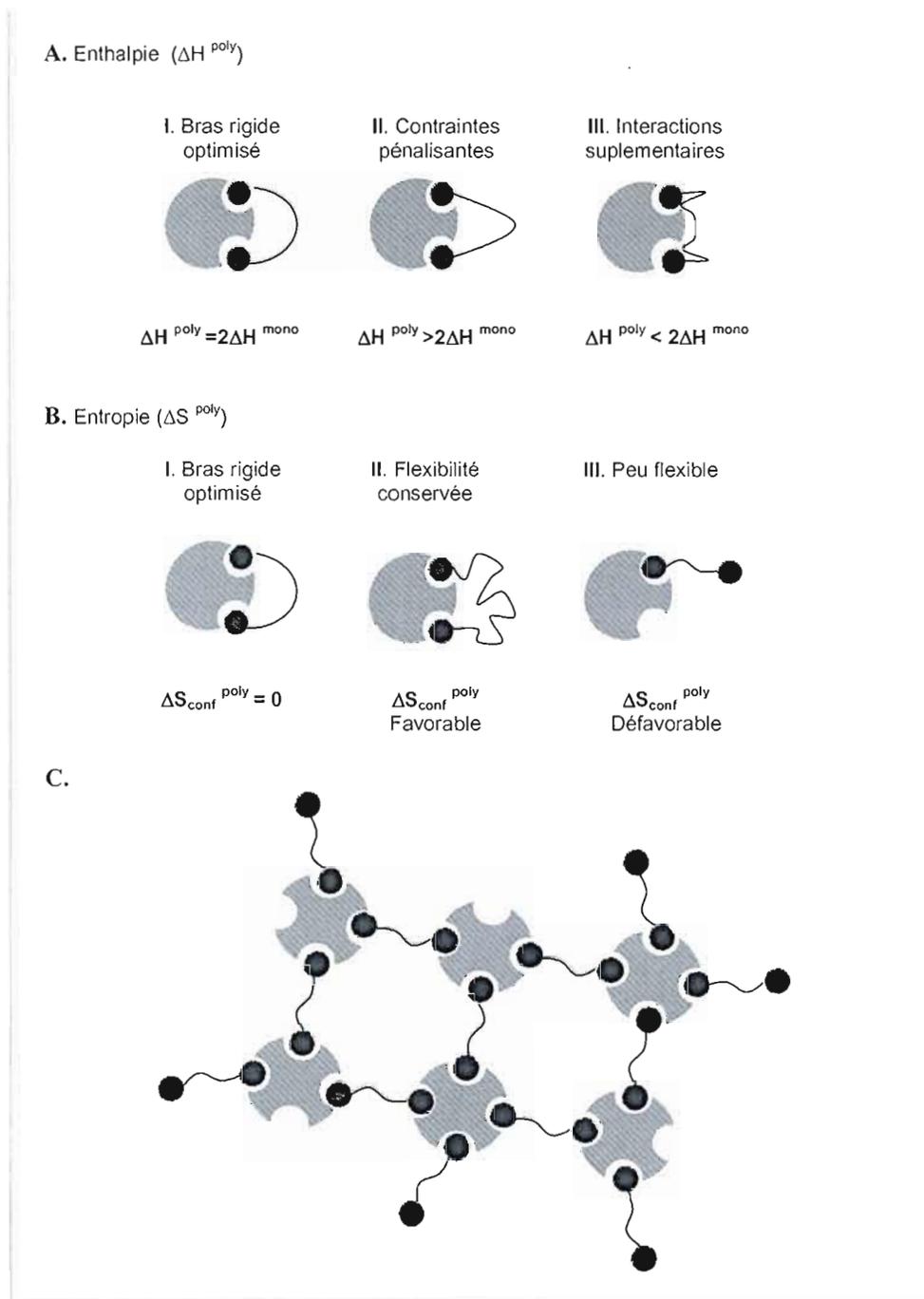


Figure 3.5 : a) Enthalpie b) Entropie favorisant ou défavorisant la chélation c) réseau tridimensionnel formé lors de l'agrégation de lectines et de composés divalents.

Ainsi, ces complexes hautement réticulés deviennent insolubles et visibles à l'œil nu. En fonction du temps, une mesure spectroscopique à 490 nm (région du visible) peut être prise pour observer la progression de la précipitation du complexe. Le graphique suivant représente l'opacité des précipités formés en fonction du temps, lorsque les différentes structures dendritiques (concentration de 1mg/ml) sont mises en présence de la lectine PA-IIL (concentration de 1mg/ml). Ces lectures représentent la moyenne de trois essais effectués.

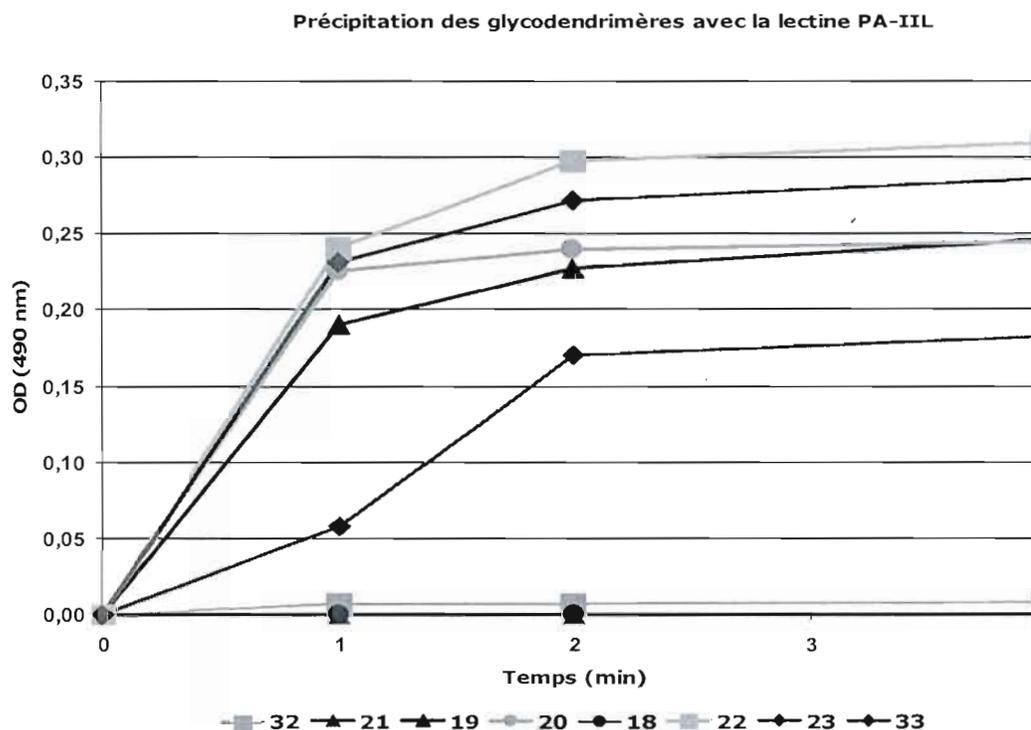


Figure 3.6 : Précipitation des glycodendrimères avec la lectine PA-IIL.

En regard de ces résultats préliminaires, certaines conclusions pertinentes peuvent être tirées. Par exemple, les précipités formés dans le cas des dendrimère 19, 20, 22, 23 et 33 permettent d'avancer qu'un minimum de quatre résidus fucosides d'un même côté du dendrimère est nécessaire pour entraîner la précipitation du complexe. De plus, les générations supérieures des glycodendrimères n'occasionnent aucune précipitation plus avantageuse en fonction du temps que dans le cas de glycodendrimères de plus petites tailles. On peut observer ceci notamment en comparant les courbes de densité optique obtenues pour les composés 19, 20 et

22, 23. Ce phénomène peut être causé par un encombrement stérique entre les sucres et les résidus d'acides aminés constituant les lectines. Occasionnant une diminution de la réticulation intermoléculaire entre plusieurs lectines, on observe un précipité moins intense qu'attendu, si l'on considère le nombre de résidus saccharidiques en surface. Un processus semblable se produit lorsque les glycodendrimères 18, 21 et 32 sont mis en présence de la lectine. Cette dernière se lie aux résidus fucosides sur les glycodendrimères, sans toutefois provoquer l'élaboration d'une architecture assez réticulée pour qu'elle devienne insoluble dans le milieu. Ainsi, le complexe pourrait être soluble dans l'eau et aucune valeur de densité optique ne serait perçue.¹¹⁸

Ensuite, le même type d'analyse a été effectué avec les hétérodendrimères et la lectine PA-IL. Les glycodendrimères 32 et 33 (concentration de 1mg/ml) ont chacun été mis en présence de la lectine PA-IL (concentration de 1mg/ml) et une lecture de la densité optique à 490 nm en fonction du temps été prise. Le graphique suivant montre les résultats recueillis.

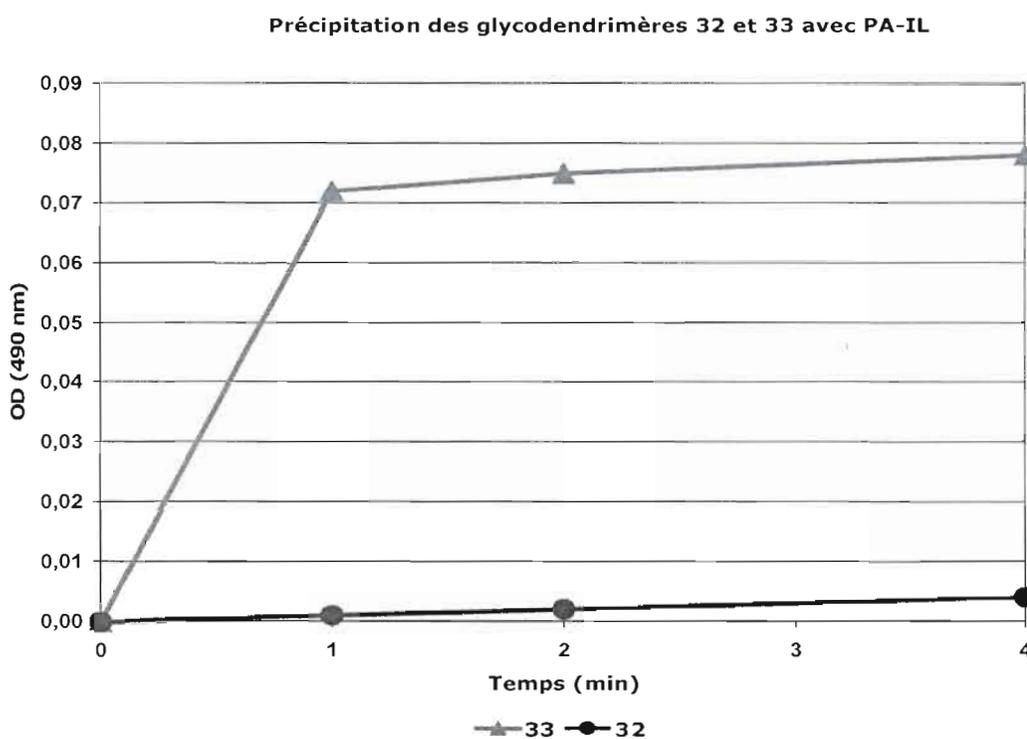


Figure 3.7 : Précipitation des glycodendrimères 23 et 32 avec la lectine PA-IL.

Ces résultats indiquent que le glycodendrimère **32** peut agglutiner la lectine et ainsi former un complexe hautement réticulé insoluble. Par la précipitation de la matrice, ces résultats confirment qu'un minimum d'unités saccharidiques en surface du dendrimère est nécessaire pour effectuer une agglutination adéquate. Le glycodendrimères **33**, présentant quatre unités galactosides à une extrémité du dendrimère, possède un pouvoir d'agglutination plus élevé que le glycodendrimère **32**, qui ne présente que deux unités galactosides. Ainsi, aucune précipitation n'est observée pour ce dernier dendrimère.

L'analyse suivante a été effectuée pour démontrer la différence d'affinité du glycodendrimère **33** pour PA-IL et PA-IIL. Le graphique suivant illustre les courbes de densité optique du composé **33** mis en présence de chacune des lectines séparément.

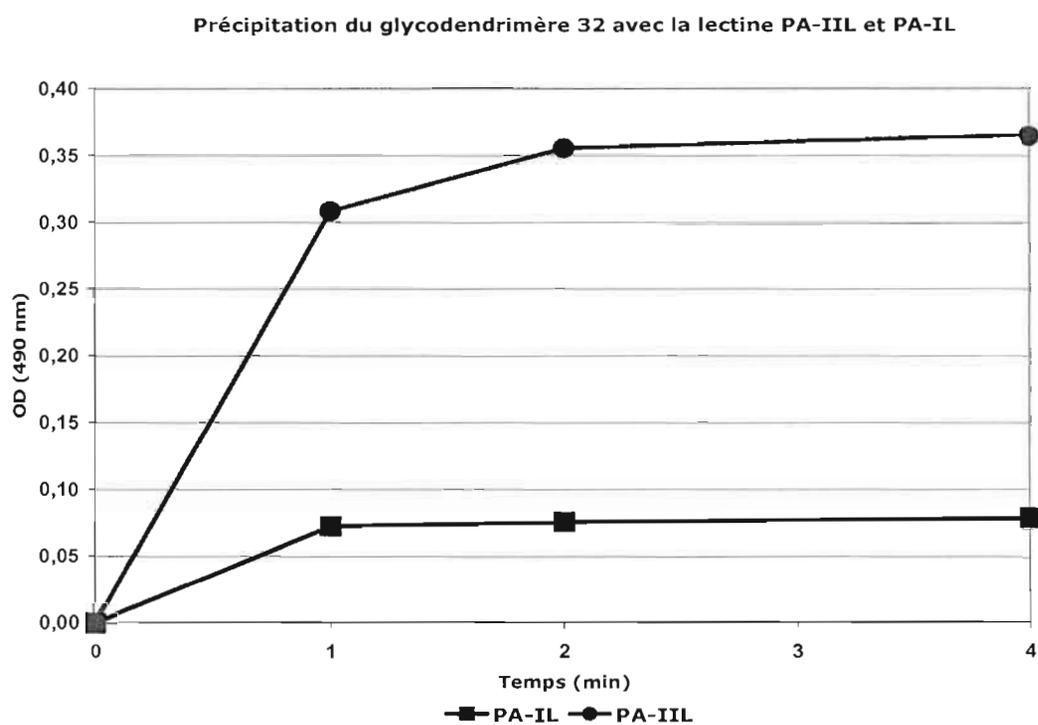


Figure 3.8 : Précipitation du glycodendrimères 33 avec les lectines PA-IIL et PA-IL.

Ainsi, on peut observer que le complexe formé avec la lectine PA-IL est moins opaque, comparativement à celui qui est formé en présence de PA-IIL, et ce au même temps donné. Ces observations concordent si l'on considère les constantes d'affinité des lectines pour leurs ligands naturels. La constante d'affinité de la lectine PA-IIL pour le résidu fucoside ($K_a = 1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) est considérablement plus élevée que celle de la lectine PA-IL pour le résidu galactoside ($K_a = 3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Dû à cette grande affinité, un complexe insoluble lectine-sucrose se forme plus rapidement et précipite dans le milieu.

Il faut toutefois considérer la provenance des lectines utilisées. La source des deux lectines n'étant pas la même, une ayant été isolée dans un laboratoire académique et l'autre disponible commercialement, une différence de pureté des produits peut avoir un effet sur les résultats. Ainsi, une variation entre les concentrations des différents composés mis en présence l'un de l'autre peut influencer la formation des complexes.

Un troisième type d'analyse a été effectué. Cette fois, les deux lectines ont été mises en contact avec le glycodendrimère **33** dans un même puits. En voulant maintenir le volume total dans le puits identique à celui des analyses précédentes, une même quantité de dendrimères a été utilisée, mais la quantité de chacune des lectines a été réduite de moitié. Ainsi, 100 μl d'une solution de concentration 1mg/ml du glycodendrimère et 50 μl de chacune des solutions de lectines à 1mg/ml ont été déposés dans les puits. Avec un total de 100 μl de lectines, le volume final dans les puits demeure de 200 μl . Le tableau suivant rapporte la progression des formations de précipités. On y retrouve celle du précipité observée lorsque le glycodendrimère est mis en présence des deux lectines simultanément, ainsi que celle qui avait été obtenue lors des analyses précédentes, c'est-à-dire en présence des deux lectines séparément.

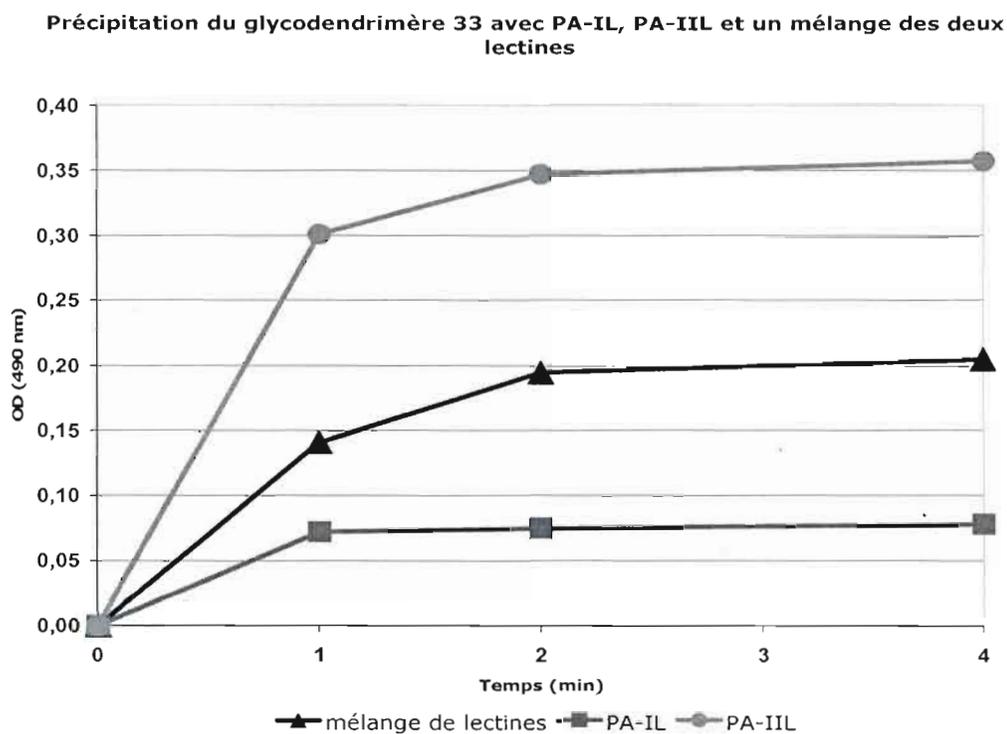


Figure 3.9 : Précipitation du glycodendrimère 33 avec PA-IL, PA-IIL et un mélange des deux lectines.

À première vue, le précipité formé en présence des deux lectines simultanément indique une précipitation intermédiaire entre celui obtenu avec la lectine PA-IIL et PA-IL séparément. En tenant compte que la concentration de chacune des lectines est diminuée de moitié, ce résultat est le plus probable. Le graphique suivant permet de mieux illustrer ce constat.

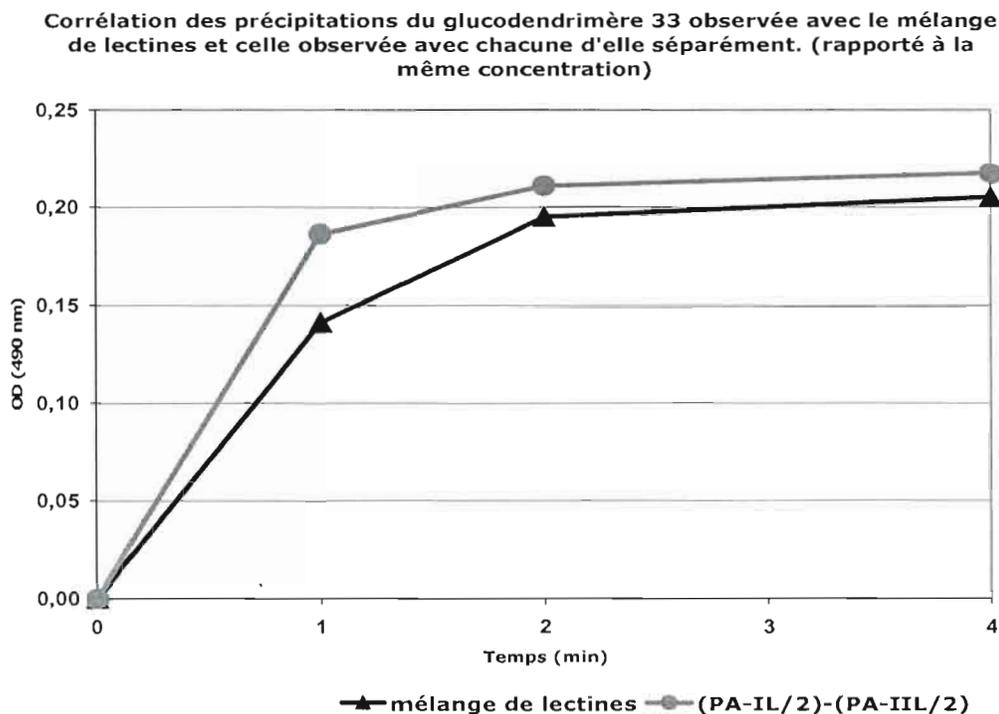


Figure 3.10 : Corrélation des précipitations du glycodendrimère 33 observée avec le mélange de lectines et celle observée avec chacune d'elles séparément. (Rapporté à la même concentration).

Pour chacune des lectines, chaque intensité de densités optiques obtenue des analyses en présence de lectine seule est divisée par deux et additionnée entre elles. Ces nouvelles valeurs sont ensuite rapportées en fonction du temps. On retrouve donc la courbe observée lors de l'analyse avec les lectines présentes simultanément et celle calculée à partir des courbes précédentes. Cette corrélation démontre que les deux courbes se confondent. On peut ainsi supposer que le dendrimères **33** effectue une complexation entre les deux types de lectine. Or, la partie du glycodendrimère recouverte par les résidus fucosides complexe avec la lectine PA-IIL et la partie recouverte de résidus galactosides avec la lectines PA-IL pour former un complexe hautement réticulé.

Une analyse plus élaborée en vue d'identifier les lectines pourrait confirmer cette observation. Par exemple, en utilisant des lectines marquées de chromophores différents, une lecture spectroscopique à différentes longueurs d'onde permettrait de valider ou non la conclusion précédente.

3.3 CONCLUSION

Ces analyses préliminaires ont permis d'observer que les lectines de *Pseudomonas aeruginosa* reconnaissent efficacement et sélectivement les unités saccharidiques disposées sur des dendrimères. Selon une disposition et une génération déterminée, leur multivalence permet de former un agrégat insoluble et de former un précipité. D'autres analyses devront être effectuées afin de valider et de renforcer les conclusions tirées des observations précédentes.

CONCLUSION

Pour conclure, l'objectif du projet a été atteint suite à la synthèse de glycodendrimères. Plusieurs dendrons, homoglycodendrimères et hétéroglycodendrimères de 1^{ère} et 2^{ème} générations comportant jusqu'à 16 résidus saccharidiques ont été obtenus. Des séquences réactionnelles itératives ont permis de moduler de façon efficace la position des résidus saccharidiques à leur surface. Des réactions de protection, de déprotection, des couplages peptidiques et des réactions de type "*click chemistry*" ont permis de produire différentes générations de glycodendrimères. L'étape clé dans ces synthèses est la possibilité d'incorporer des résidus saccharidiques de types fucosides et/ou galactosides régiosélectivement. Catalysée par du cuivre(I) généré *in situ* à partir de sulfate de cuivre et d'acide ascorbique, cette réaction est très efficace et versatile tout en induisant la formation régiosélective d'un cycle triazole.

Ainsi, les glycodendrimères ont permis d'effectuer des tests de reconnaissance sur les lectines PA-IIL et PA-IIIL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière, lorsqu'impliquée dans la pathologie de la fibrose kystique, provoque des complications pouvant mener jusqu'à la mort. Son type d'adhésion, dépendante au calcium, est à la base de la virulence de la bactérie. Ainsi, ce projet démontre que la multivalence des glycodendrimères leur permet d'interférer dans l'adhésion de la bactérie sur les tissus humains. À la base de plusieurs études éventuelles pour optimiser l'architecture, la toxicité des dendrimères, plusieurs autres tests demeurent à effectuer pour comprendre plus à fond le type d'action et le processus d'adhésion bactérienne.

ANNEXE

Partie expérimentale

Généralités

Un appareil Varian-Gemini 300BB a été utilisé pour enregistrer les spectres de résonance magnétique nucléaire ^1H RMN et ^{13}C RMN. Les spectres des protons ont été effectués à une fréquence de 300 MHz et ceux des carbones, à 75 MHz. Plusieurs standards de référence ont été utilisés pour la calibration des déplacements chimiques. La calibration des protons et des carbones se réfère, soit au chloroforme deutéré (^1H , δ 7.27 ppm; ^{13}C , δ 77.0 ppm), au méthanol deutéré (^1H , δ 3.31 ppm; ^{13}C , δ 49.0 ppm), à l'acétone deutérée (^1H , δ 2.05 ppm; ^{13}C , δ 29.9 ppm), au dioxyde de deutérium (^1H , δ 4.79 ppm) ou au sulfoxyde de diméthyle deutéré (^1H , δ 2.50 ppm; ^{13}C , δ 39.5 ppm), selon le cas.

Les spectres de masse en ionisation par electrospray ont été mesurés par le Dr. Alexandra Furtos et Mme Karine Venne, du Laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal.

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) ont été enregistrés au moyen d'un appareil Bomem MB-Series.

Les lyophilisations ont été effectuées à l'aide d'un appareil Freeze Mobile 24 (Virtis).

Les chromatographies sur couche mince effectuées durant les synthèses ont utilisé des plaques commerciales en aluminium recouvertes de gel de silice 60 F254, Merck KGaA. Les plaques ont été révélées, soit sous lumière ultraviolette à 254 nm, ou par immersion dans une solution de molybdate (2.5 g de molybdate d'ammonium, 1.0 g de sulfate cérique dissous

dans 100 ml d'une solution aqueuse contenant 10% d'acide sulfurique concentré) ou encore dans une solution d'anisaldéhyde (10 mL de *p*-anisaldéhyde, 10 mL d'acide sulfurique concentré et 180 mL d'éthanol 95%) et séchées au moyen d'un séchoir à air chaud.

Les produits ont été purifiées par chromatographie au moyen de colonnes de verre contenant du gel de silice (Silice-P Flash Silica Gel, Silicycle), avec des solvants de qualité ACS tels qu'obtenus du fournisseur.

L'évaporation des solvants durant les synthèses s'est effectuée sur un évaporateur rotatif (Laborota-4000-efficient Heidolph) sous pression réduite (relié à une trompe à eau).

La lectine PA-IL de *Pseudomonas aeruginosa* a été achetée chez Sigma-Aldrich (L9895). PA-IIL a été extraite de la bactérie dans le laboratoire du Dr. Anne Imbert, CERMAV, Grenoble (France) et fournie gracieusement à notre laboratoire.

Les analyses turbidimétriques ont été effectuées sur un lecteur de microplaque de type Thermo Max.

Procédures Générales

Procédure A : Couplage peptidique

Un mélange de 3,5-bis(2-azidoethoxy)benzoate de méthyle **1** et de Pd/C 10% dans MeOH sont agités sous hydrogène environ 6 heures. Le Pd/C est ensuite enlevé par filtration et le filtrat qui contient le composé **4** est évaporé sous pression réduite et repris avec du DMF. À cette solution, l'acide carboxylique X (2.1 éq), BOP (2,2 éq) et DIPEA (12 éq) sont ajoutés. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures. Ensuite, il est extrait avec EtOAc qui est ensuite nettoyé par extraction avec une solution saturée de NaHCO₃, KHSO₄ et une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. La purification du produit a été faite par colonne chromatographique sur gel de silice.

Procédure B: Saponification

L'ester X est dissous dans du THF et LiOH (2.2 éq/acide) dissous préalablement dans l'eau est ajouté. La solution est agitée pendant 4 heures et par la suite, acidifiée avec HCl (5 N). L'extraction du composé acide est effectuée avec EtOAc et HCl 1N. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. La purification du produit final est effectuée sur colonne chromatographique sur gel de silice.

Procédure C: Couplage peptidique au cœur dendritique

Le composé ayant les amines libres Y (1 éq), BOP (1.2 éq ou 2.2 éq) et DIPEA (6 ou 12 éq) sont ajoutés à une solution de DMF contenant l'acide carboxylique X (1.2 éq or 2.2 éq). Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures et ensuite extrait avec EtOAc. La phase organique est nettoyée par extraction avec une solution saturée de NaHCO₃, KHSO₄ et une solution saturée en NaCl et ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. La purification du produit se fait par colonne chromatographique sur gel de silice.

Procédure D: Synthèse des composés contenant le cycle triazole

Le dendrimère X est dissous dans t BuOH ou THF; ensuite, le composé saccharidique Y (1.1 éq/fonction azoture) est ajouté, ainsi que $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.4 éq/fonction azoture), l'ascorbate de sodium (0.7 éq/fonction azoture) et H_2O . La solution est agitée à température ambiante ou chauffée à 50°C pendant une période de 12H. Ensuite, l'extraction est effectuée avec EtOAc et lavée avec une solution aqueuse saturée en NH_4Cl et une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite. La purification du produit se fait par colonne chromatographique sur gel de silice.

Procédure E: Déprotection des unités saccharidiques.

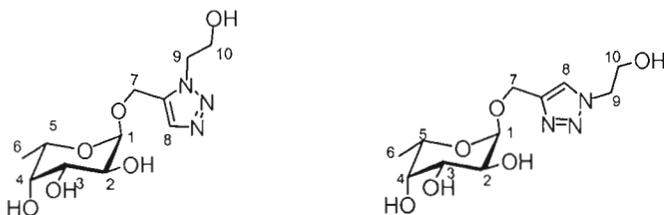
Le glycodendrimère X est dissous dans le MeOH sec et MeONa est ajouté jusqu'à pH 9. La réaction est agitée jusqu'à disparition complète du produit de départ. Ensuite, le milieu est neutralisé à l'aide de résine Amberlite (H^+) et filtré. Le filtrat est évaporé, séché sous pression réduite et lyophilisé.

Procédure F: Déprotection des groupements Boc

Le composé X est dissous dans CH_2Cl_2 et TFA (65 éq) est ajouté à la solution. Le mélange est agité à température de la pièce pendant 4 heures. Ensuite, le solvant est évaporé sous pression réduite. La purification du produit se fait par colonne chromatographique sur gel de silice.

Caractérisations

Synthèse des composés 1 et 2 :



$C_{11}H_{19}N_3O_6$
Mol. Wt.: 289,29

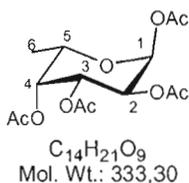
Le composé **7** est mis en présence d'azidoéthanol dans du toluène sous pression à 180°C pour former le mélange de régioisomères **1** et **2** dans une proportion de 1/3, respectivement.

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 25% MeOH/DCM.

RMN 1H (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 8.04 (s, 1H, H8), 4.88 (m, 1H, H1), 4.71 (dd, 2H, J = 12.36, 42.58 Hz, H7), 3.94 (m, 3H, H2 et H9), 3.74 (m, 2H, H3 et H4), 3.65 (m, 1H, H5), 1,19 (d, 3H, J = 6.59 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 142.7, 109.6, 162.9, 121.2, 84.3, 77.9, 104.3, 131.8, 113.6, 35.6;

Synthèse du composé 6: 1,2,3,4-tétra-O-acétyl- α -L-fucopyranose¹¹⁴



Le L-fucose (5.00 g, 30.5 mmol) a été ajouté par petites doses à un mélange d'anhydride acétique (40 mL) et de pyridine (200 mL) refroidi à 0 °C. Le mélange réactionnel a été mis sous agitation et graduellement réchauffé à température pièce. La réaction est demeurée sous agitation durant toute une nuit et suivie par CCM (hexane/acétate d'éthyle 1:1) jusqu'à disparition du matériel de départ. Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel a été dilué avec du dichlorométhane, puis lavé plusieurs fois avec HCl 10%. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium (Na_2SO_4) puis concentrée sous pression réduite.

Purification: Le produit brut obtenu sous forme d'huile a été solidifié sous vide puis recristallisé avec de l'éthanol absolu pour obtenir des cristaux blancs correspondant à l'anomère pur α .

Produit: 8.43 g, 25.3 mmol

Rendement: 77%

p.f. 93-94 °C

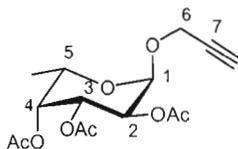
$[\alpha_D]^{20}$ (c = 1.0, $CHCl_3$): -118.1

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 6.34 (d, 1H, J = 2.3 Hz, H1); 5.32-5.39 (m, 3H, H2, H3 et H4); 4.28 (1H, m, H5); 2.18 (s, 3H, HAC), 2.15 (s, 3H, HAC), 2.02 (s, 3H, HAC), 2.01 (s, 3H, HAC); 1.16 (3H, d, J = 6.6 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 170.5, 170.2, 169.9, 169.1, 89.9, 70.5, 67.8, 67.2, 66.4, 20.9, 20.7, 20.6, 20.6, 15.9;

SM (IES): m/z calculé pour $C_{14}H_{20}O_9$: 332.3; trouvé: 355.3 [$M + Na^+$].

Synthèse du composé 7 : 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -L-fucopyranoside de prop-2-ynyle¹¹⁴



$C_{15}H_{20}O_8$
Mol. Wt.: 328,31

Le 1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl- α -L-fucopyranose 6 (332 mg, 1.0 mmol) a été dissous dans 4.0 mL de dichlorométhane séché sur tamis moléculaire 4 puis mis sous agitation à température pièce sous atmosphère d'azote avant l'ajout de l'alcool propargylique (2.0 mmol). La solution a été refroidie à 0 °C puis l'acide de Lewis trifluorure de bore diéthylétérate (BF₃Et₂O) (315 μ L, 2.5 mmol) a été ajouté goutte à goutte. Le mélange a ensuite été agité à reflux et sous atmosphère d'azote pendant cinq heures et la réaction suivie par CCM (hexane/acétate d'éthyle 1:1) jusqu'à la disparition du matériel de départ. Le mélange réactionnel a par la suite été lavé deux fois avec 3.0 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium (Na₂SO₄) puis concentrée sous pression réduite pour former une huile jaunâtre.

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, hexane/acétate d'éthyle (70:30)

Produit: (α : β ; 5:1) 292 mg, 0.89 mmol

Rendement: 89%

p.f.: 58-59 °C;

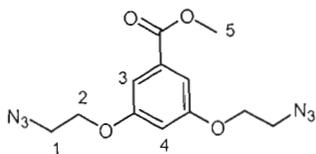
$[\alpha_D]^{22}$ (c = 1.0, CHCl₃): -143.5;

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.34 (dd, 1H, J = 3.3, 10.7 Hz, H3), 5.28 (dd, 1H, J = 1.1, 3.3 Hz, H4), 5.23 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H1), 5.14 (dd, 1H, J = 3.6, 10.7 Hz, H2), 4.24 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H9), 4.18 (dq, 1H, J = 1.1, 6.6 Hz, H5), 2.43 (t, 2H, J = 2.5 Hz, H7), 2.15 (s, 3H, HAc), 2.07 (s, 3H, HAc), 1.97 (s, 3H, HAc), 1.13 (d, 3H, J = 6.6 Hz, H6);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.2, 170.4, 169.8, 94.9, 78.5, 74.8, 70.9, 67.7, 67.6, 64.8, 55.1, 20.6, 20.5, 20.5, 15.6;

SM (IES): m/z calculé pour C₁₅H₂₀O₈: 328.31; trouvé: 351.3 [M + Na⁺].

Synthèse du composé 9 : 3,5-bis(2-azidoethoxy)benzoate de méthyle



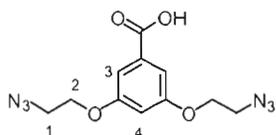
$C_{12}H_{14}N_6O_4$
Mol. Wt.: 306,28

L'acide 3,5-dihydroxybenzoïque (10g, 64 mmol) est dissous dans le MeOH (400 ml) et une quantité catalytique d'acide sulfurique est ajoutée (0.6 ml). Après que la réaction ait été laissée à reflux durant une nuit, le milieu réactionnel est refroidi à température pièce et neutralisé avec NaOH 2 N. Après concentration, le résidu est dissous dans l'acétate d'éthyle et nettoyé avec de la saumure, Na_2SO_4 sec et la phase organique est évaporée sous pression réduite pour obtenir le 3,5-dihydroxybenzoate de méthyle (11.38g, 94%).¹⁰⁸ Ce dernier (10g, 59 mmol) est dissous par la suite dans DMF sec (100 ml) avec Cs_2CO_3 (2.2 éq) et l'azidoéthanol activée, le composé 4 (2éq). La réaction est laissée sous agitation pour la nuit à 40°C. Le solvant est partiellement évaporé sous pression réduite et dissous dans l'acétate d'éthyle. Plusieurs lavages à l'eau et à la saumure sont effectués. Ensuite, la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Le composé 9 (17,4g 97%) est obtenu.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.30 (d, 2H, J = 2.20 Hz, H3), 6.77 (t, 1H, J = 2.34 Hz, H4), 4.20 (t, 4H, J = 4.94 Hz, H2), 4.13 (s, 3H, H5), 3.64 (t, 4H, J = 4.95 Hz, H1);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 165.8, 159.5, 133.8, 107.9, 106.5, 77.0, 67.8, 51.2.

Synthèse du composé 10 : acide 3,5-bis(2-azidoéthoxy)benzoïque



$C_{11}H_{12}N_6O_4$
Mol. Wt.: 292,25

Procédure B :

X = 9 (310 mg, 1.01 mmol)

LiOH (93 mg, 2.22 mmol),

THF (5 mL),

H₂O (5 mL).

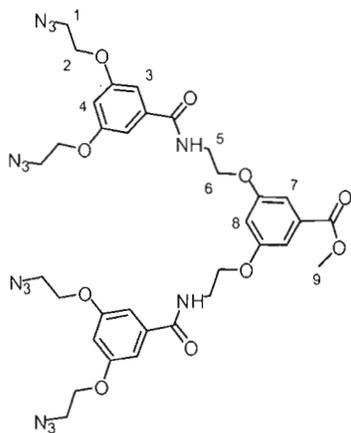
Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 5% MeOH/DCM

Produit: 283.6 mg, 0.36 mmol

Rendement: 96%

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.30 (d, 2H, J = 2.20 Hz, H3), 6.77 (t, 1H, J = 2.34 Hz, H4), 4.20 (t, 4H, J = 4.94 Hz, H2), 3.64 (t, 4H, J = 4.95 Hz, H1);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 165.8, 159.5, 133.8, 107.9, 106.5, 67.8, 51.2.

Synthèse du composé 11 :

$C_{34}H_{38}N_{14}O_{10}$
Mol. Wt.: 802,75

Procédure A :

X = **10** (2.03 g, 6.94 mmol),

9 (840 mg, 3.30 mmol),

BOP (3.21 g, 7.27 mmol),

DIPEA (6.6 mL, 39.6 mmol)

DMF (30 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 1% MeOH/DCM

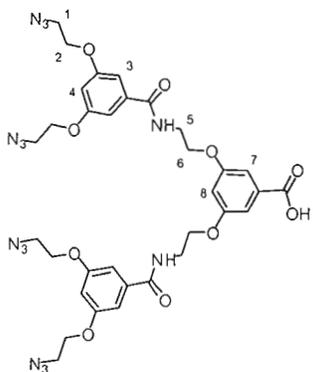
Produit: 2.0 g, 2.49 mmol,

Rendement: 75%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.17 (d, 2H, J = 2.20 Hz, H7), 6.96 (d, 4H, J = 2.20 Hz, H3), 6.71 (br t, 2H, NH), 6.64 (t, 1H, J = 2.20 Hz, H4), 6.61 (t, 2H, J = 2.20 Hz, H8), 4.15 (br t, 12H, H6 et H2), 3.90 (s, 3H, H9), 3.87-3.84 (m, 4H, H5), 3.60 (t, 8H, J = 4.94 Hz, H1);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.1, 166.4, 159.5, 136.6, 132.2, 108.2, 106.3, 106.1, 104.8, 67.2, 66.9, 52.3, 50.0, 39.5;

SM(IES): m/z calc. $C_{34}H_{38}N_{14}O_{10}$: 802.29; trouvé: 803.30 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 12:

$C_{33}H_{36}N_{14}O_{10}$
Mol. Wt.: 788,73

Procédure B:

X = 11 (300 mg, 0.37 mmol),

LiOH (34 mg, 0.82 mmol),

THF (2 mL),

H₂O (2 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 5% MeOH/DCM

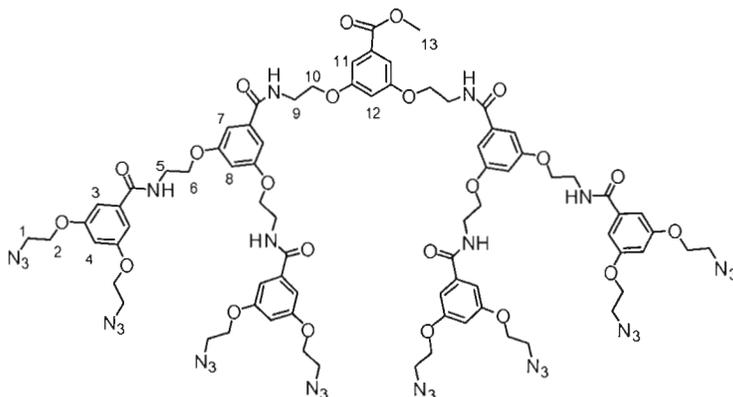
Produit: 283.6 mg, 0.36 mmol,

Rendement: 96%

RMN ¹H (300 MHz, MeOH): δ = 7.15 (d, 2H, J = 2.47 Hz, H7), 7.02 (d, 4H, J = 2.20 Hz, H3), 6.68-6.64 (m, 3H, H8 et H4), 4.18-4.15 (m, 12H, H6 et H2), 3.73 (br t, 4H, H5), 3.59 (t, 8H, J = 4.94 Hz, H1);

RMN ¹³C (75 MHz, MeOH): δ = 168.0, 165.9, 160.5, 137.2, 133.2, 107.7, 106.1, 105.8, 104.6, 66.2, 66.0, 51.9, 39.5;

SM(IES): m/z calc. $C_{33}H_{36}N_{14}O_{10}$: 788.27; trouvé: 789.28 [M + H]⁺.

Synthèse du composé 13:

$C_{78}H_{86}N_{30}O_{22}$
Mol. Wt.: 1795,71

Procédure A:

X = 12 (362 mg, 0.46 mmol),

9 (55.6 mg, 0.22 mmol),

BOP (213 mg, 0.48 mmol),

DIPEA (0.46 mL, 2.62 mmol)

DMF (4 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 4% MeOH/DCM

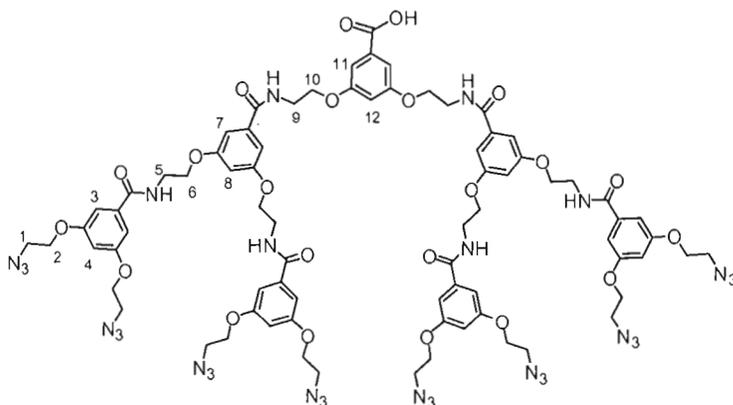
Produit: 264 mg, 0.15 mmol,

Rendement: 67%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.56 (br t, 4H, NH), 7.42 (br t, 2H, NH), 7.02 (d, 10H, J = 2.20 Hz, H11 et H3), 6.76 (br s, 4H, H7), 6.56 (br s, 5H, H12 et H4), 6.26 (br s, 2H, H8), 4.05 (t, 20H, J = 4.67 Hz, H10 et H2), 3.88 (br s, 8H, H6), 3.82 (s, 3H, H13), 3.68 (br s, 12H, H9 et H5), 3.51 (t, 16H, J = 4.67 Hz, H1);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.6, 167.4, 166.6, 159.5, 159.4, 159.3, 136.4, 136.2, 131.9, 108.1, 106.2, 105.7, 105.0, 104.1, 67.1, 66.7, 66.4, 52.3, 50.0, 39.5;

SM(IES): m/z calc. $C_{78}H_{86}N_{30}O_{22}$: 1794.65; trouvé: 1795.66 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 14:

$C_{77}H_{84}N_{30}O_{22}$
Mol. Wt.: 1781,68

Procédure B:

X = 13 (242.8 mg, 0.14 mmol),

LiOH (12 mg, 0.30 mmol),

THF (1 mL),

H₂O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 2% MeOH/DCM

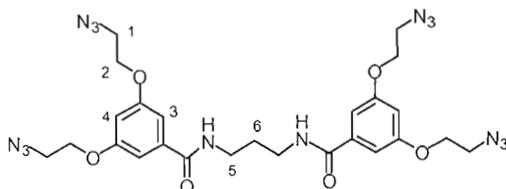
Produit: 202 mg, 0.11 mmol,

Rendement: 84%

RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 8.08 (br s, 4H, NH), 7.97 (br s, 2H, NH), 7.03 (s, 10H, H11 et H3), 6.92 (s, 4H, H7), 6.54 (s, 5H, H12 et H4), 6.41 (s, 2H, H8), 4.06 (t, 20H, J = 4.53 Hz, H10 et H2), 4.00 (br s, 8H, H6), 3.67 (br s, 12H, H9 et H5), 3.50 (t, 16H, J = 4.53 Hz, H1);

RMN ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 167.1, 166.9, 159.4, 159.2, 136.4, 105.9, 105.7, 104.5, 66.9, 66.1, 49.7, 39.1;

SM(IES): m/z calc. C₇₇H₈₄N₃₀O₂₂: 1780.64; trouvé: 1781.64 [M + H]⁺.

Synthèse du composé 15:

$C_{25}H_{30}N_{14}O_6$
Mol. Wt.: 622,60

Procédure C:

X = 10 (173.2 mg, 0.59 mmol, 2.1 éq),

Y = 1,3-diaminopropane (24 μ L, 0.28 mmol),

BOP (275 mg, 0.62 mmol, 2.2 éq),

DIPEA (0.59 mL 3.39 mmol, 12 éq),

DMF (6 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 2% MeOH/DCM

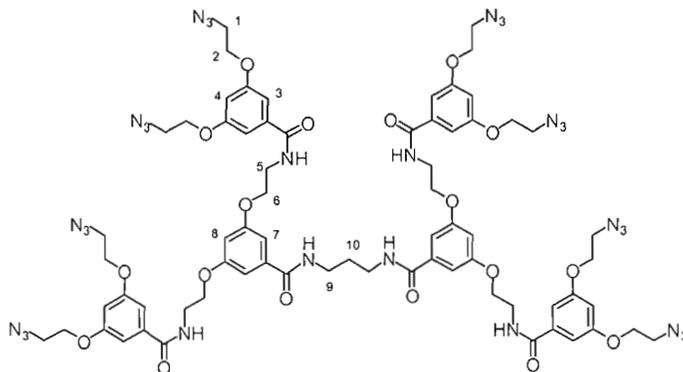
Produit: 140 mg, 0.22 mmol,

Rendement: 80%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.14 (br t, 2H, NH), 7.05 (d, 4H, J = 1.65 Hz H3), 6.64 (s, 2H, H4), 4.20 (t, J = 4.67 Hz, 8H, H2), 3.62 (t, 8H, J = 4.81 Hz, H1), 3.55 (br d, 4H, H5), 1.84 (br s, 2H, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.5, 159.5, 136.7, 106.0, 105.0, 67.3, 50.1, 36.3, 29.7;

SM(IES): m/z calc. $C_{25}H_{30}N_{14}O_6$: 622.25; trouvé: 623.25 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 16 :

$C_{69}H_{78}N_{30}O_{18}$
Mol. Wt.: 1615,55

Procédure C:

X = **12** (153.3 mg, 0.19 mmol, 2.1 éq),

Y = 1,3-diaminopropane (9 μ L, 0.07 mmol),

BOP (90 mg, 0.20 mmol, 2.2 éq),

DIPEA (0.19 mL, 1.11 mmol, 12 éq)

DMF (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 2% MeOH/DCM

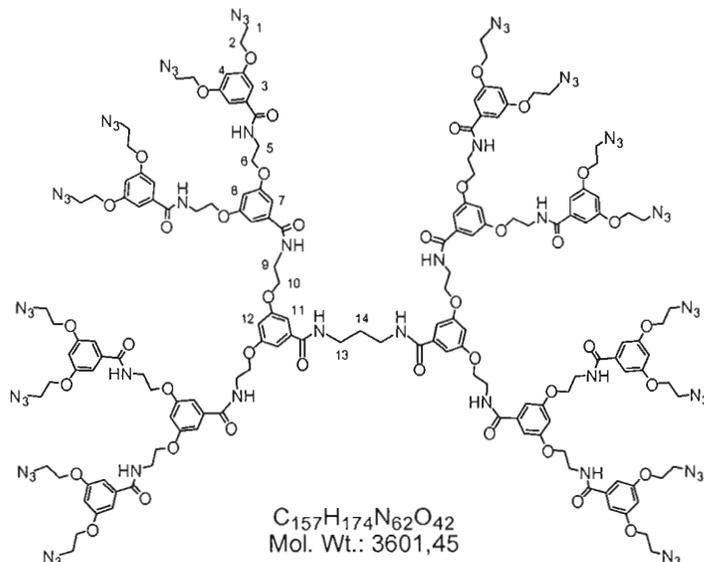
Produit: 264 mg, 0.16 mmol,

Rendement: 84%

RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ = 8.70 (br t, 4H, NH), 8.46 (br t, 2H, NH), 7.06 (d, 8H, J = 2.20 Hz, H3), 7.02 (d, 4H, J = 1.92 Hz, H7), 6.68 (d, 6H, J = 1.92 Hz, H8 et H4), 4.19 (t, 16H, J = 4.65 Hz, H2), 4.13 (t, 8H, J = 5.63 Hz, H6), 3.64 (t, 24H, J = 4.67 Hz, H5 et H1), 3.27-3.25 (m, 4H, H9), 1.70-1.75 (m, 2H, H10);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.7, 167.6, 159.5, 159.4, 136.4, 136.2, 106.2, 105.5, 105.1, 104.2, 67.2, 66.5, 50.0, 39.7, 36.8, 29.2;

SM(IES): m/z calc. $C_{69}H_{78}N_{30}O_{18}$: 1614.61; trouvé: 1615.62 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 17:**Procédure C:**

X = 14 (90 mg, 0.05 mmol, 2.1 éq),

Y = 1,3-diaminopropane (2 μ L, 0.02 mmol),

BOP (23.4 mg, 0.05 mmol, 2.2 éq),

DIPEA (50 mL, 0.29 mmol, 12 éq)

DMF (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 4% MeOH/DCM

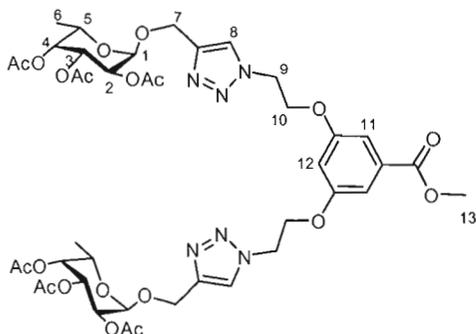
Produit: 66 mg, 0.02 mmol,

Rendement: 76%

RMN 1H (300 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 8.40-8.18 (m, 14H, NH), 7.13 (d, 16H, J = 2.20 Hz, H3), 7.01 (br s, 12H, H11 et H7), 6.64 (br s, 8H, H4), 6.50-6.43 (m, 6H, H12 et H8), 4.14 (t, 32H, J = 4.67 Hz, H2), 4.06 (br s, 24H, H10 et H6), 3.69 (br s, 24H, H9 et H5), 3.58 (t, 16H, J = 4.67 Hz, H1), 3.43 (br s, 4H, H13), 1.79 (br s, 2H, H14);

RMN ^{13}C (75 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 167.6, 167.2, 160.2, 160.0, 137.3, 136.9, 106.6, 106.4, 104.9, 67.7, 66.8, 50.4, 39.7, 31.5;

SM(IES): m/z calc. $C_{158}H_{175}N_{61}O_{42}$: 3598.34; trouvé: 1801.17 $[M + 2H]^{2+}$.

Synthèse du composé 18a:

$C_{42}H_{54}N_6O_{20}$
Mol. Wt.: 962,91

Procédure D:

X = **9** (51 mg, 0.17 mmol),
Y = **7** (120 mg, 0.37 mmol),
CuSO₄·5H₂O (33 mg, 0.13 mmol),
Ascorbate de sodium (46 mg, 0.23 mmol),
tBuOH (1 mL) and H₂O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 25% EtOAc/Hexane

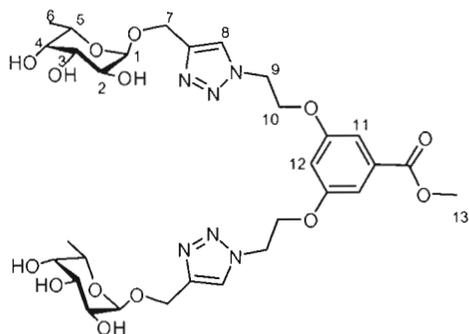
Produit: 153 mg, 0.16 mmol,

Rendement: 96%

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.72 (s, 2H, H8), 7.18 (d, 2H, *J* = 2.20 Hz, H11), 6.61 (t, 1H, *J* = 2.34 Hz, H12), 5.34 (dd, 2H, *J* = 3.30, 10.71 Hz, H3), 5.27 (dd, 2H, *J* = 1.10, 3.57 Hz, H4), 5.19 (d, 2H, *J* = 3.85 Hz, H1), 5.12 (dd, 2H, *J* = 3.57, 10.71 Hz, H2) 4.83 (d, 2H, *J* = 12.64 Hz, H7a), 4.78 (t, 4H, *J* = 4.95 Hz, H9), 4.67 (d, 2H, *J* = 12.64 Hz, H7b), 4.40 (t, 4H, *J* = 4.67 Hz, H10), 4.18 (br q, 2H, H5), 3.90 (s, 6H, H13), 2.16 (s, 6H, HAC), 2.01 (s, 6H, HAC), 1.97 (s, 6H, HAC), 1.10 (d, 6H, *J* = 6.59 Hz, H6);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.5, 170.2, 169.9, 166.0, 158.7, 144.0, 132.3, 123.6, 108.3, 106.4, 95.6, 70.9, 67.8, 67.7, 66.5, 64.6, 61.1, 52.3, 49.5, 20.6, 20.5, 20.5, 15.7;

SM(IES): *m/z* calc. C₄₂H₅₄N₆O₂₀: 962.34; trouvé: 963.35 [M + H]⁺.

Synthèse du composé 18 :

$C_{29}H_{40}N_6O_{14}$
Mol. Wt.: 696,66

Procédure F:

X = **18a** (38 mg, 0.04 mmol),

MeOH (1 mL).

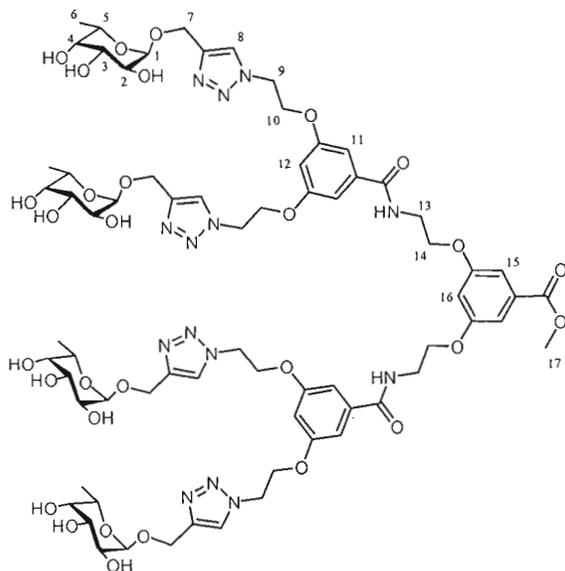
Produit: 26 mg, 0.04 mmol,

Rendement: 96%

RMN 1H (300 MHz, D_2O): δ = 7.99 (s, 2H, H8), 6.83 (d, 2H, J = 2.20 Hz, H11), 6.23 (br t, 1H, H12), 4.83-4.65 (m, 4H, H3 et H2), 4.57 (dd, 4H, J = 13.05, 25.41 Hz, H7), 4.29-4.20 (m, 4H, H10), 3.59-3.41 (m, 10H, J = 1.37, 2.47 Hz, H9, H5, H4 et H1), 0.73 (d, 6H, J = 6.59 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 175.2, 160.1, 146.0, 140.8, 127.1, 109.9, 105.8, 100.5, 73.2, 71.0, 69.5, 68.2, 62.6, 51.5, 16.6;

SM(IES): m/z calc. $C_{29}H_{40}N_6O_{14}$: 696.26; trouvé: 697.27 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 19:

$C_{70}H_{94}N_{14}O_{30}$
Mol. Wt.: 1611,57

Procédure E:

X = **19a** (150 mg, 0.07 mmol),

MeOH (1 mL).

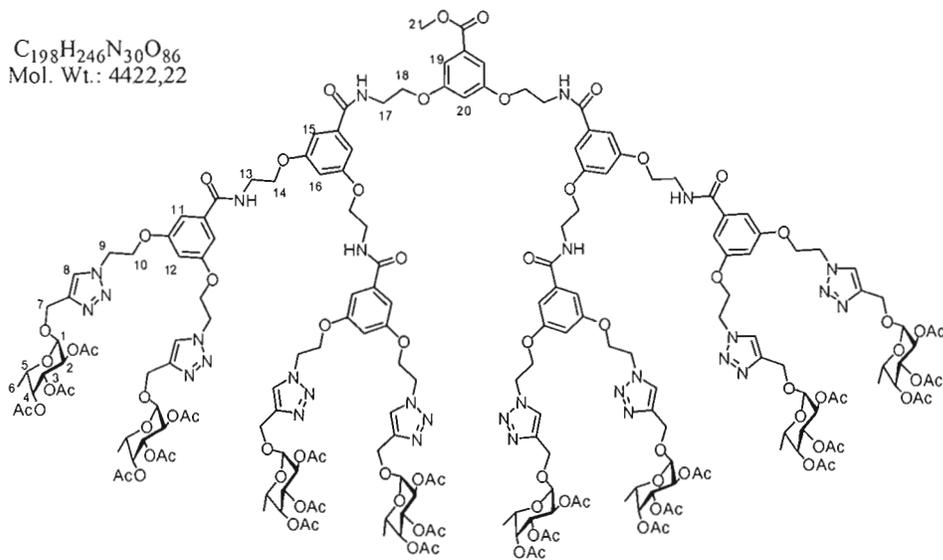
Produit: 112 mg, 0.07 mmol

Rendement: Quantitatif

RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ = 8.66 (br t, 2H, NH), 8.18 (s, 4H, H8), 7.07 (br s, 2H, H15), 7.02 (s, 4H, H11), 6.82 (s, 1H, H16), 6.66 (s, 2H, H12), 4.75-4.73 (m, 12H, H10 et H1), 4.63 (d, 4H, J = 12.37 Hz, H7a), 4.51-4.42 (m, 26H, H9, H7b et H4), 4.12 (br t, 4H, H14), 3.81-3.75 (m, 7H, H17 et H5), 3.59-3.46 (m, 12H, H13, H3 et H2), 1.05 (d, 12H, J = 6.32 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 165.8, 159.6, 158.9, 144.1, 136.3, 131.6, 124.4, 107.6, 106.4, 104.1, 98.6, 71.6, 69.6, 68.0, 66.4, 66.1, 60.1, 52.3, 48.9, 16.4;

SM(IES): m/z calc. $C_{70}H_{94}N_{14}O_{30}$: 1610.63; trouvé: 1611.63 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 20a:**Procédure D:**

X = 13 (20.2 mg, 0.01 mmol),

Y = 7 (32.5 mg, 0.09 mmol, 8.8 eq.),

CuSO₄·5H₂O (9 mg, 0.04 mmol),

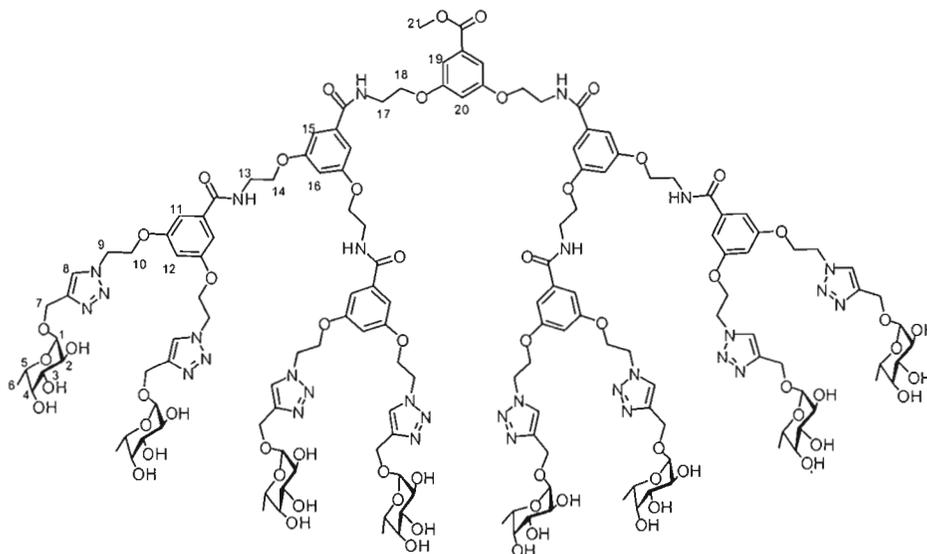
Ascorbate de sodium (12 mg, 0.06 mmol),

THF (1 mL),

H₂O (1 mL).**Purification:** Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 3% MeOH/DCM**Produit:** 40 mg, 0.009 mmol,**Rendement:** 77%

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (s, 8H, H8), 7.54 (br t, 4H, NH), 7.36 (br s, 2H, NH), 7.10 (br s, 2H, H19), 6.92 (br s, 8H, H11), 6.82 (br s, 4H, H15), 6.70 (br s, 1H, H20) 6.42 (br s, 4H, H12), 6.37 (br s, 2H, H16), 5.30 (dd, 8H, J = 3.42, 10.74 Hz, H3), 5.23 (d, 8H, J = 2.93 Hz, H4), 5.17 (d, 8H, J = 3.42 Hz, H1), 5.11 (dd, 8H, J = 3.42, 10.74 Hz, H2), 4.79 (d, 8H, J = 12.70 Hz, H7a), 4.72 (s, 16H, H9), 4.64 (d, 8H, J = 12.70 Hz, H7b), 4.29 (br s, 16H, H10), 4.16-4.12 (m, 12H, H18 et H5), 3.97 (br s, 8H, H14), 3.85 (s, 3H, H21), 3.73-3.70 (m, 12H, H17 et H13), 2.15 (s, 24H, HAC), 1.98 (s, 24H, HAC), 1.96 (s, 24H, HAC), 1.08 (d, 24H, J = 6.34 Hz, H6);

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 170.6, 170.4, 170.1, 167.1, 158.6, 158.9, 144.1, 136.7, 136.4, 123.9, 106.2, 104.9, 95.7, 71.0, 68.0, 67.9, 66.5, 64.7, 61.1, 54.8, 49.6, 39.5, 20.7, 20.6, 15.8.

Synthèse du composé 20:

$C_{150}H_{198}N_{30}O_{62}$
Mol. Wt.: 3413,34

Procédure E:

X = **20a** (10.8 mg, 0.002 mmol),

MeOH (1 mL).

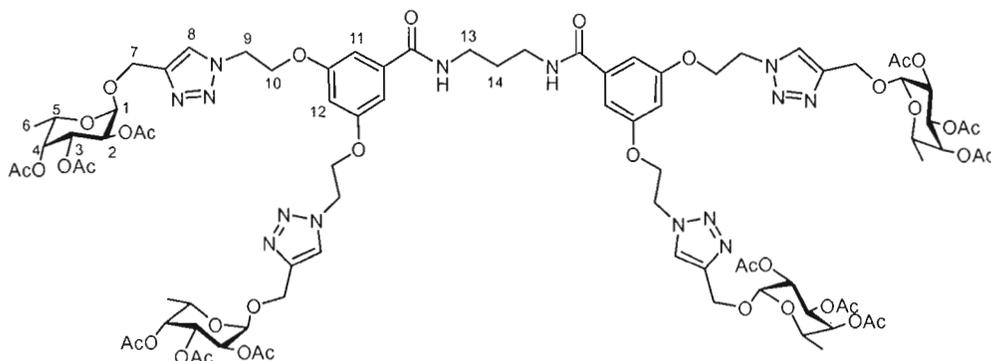
Produit: 8 mg, 0.002 mmol,

Rendement: Quantitatif

RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ = 8.69 (s, 6H, NH), 8.17 (s, 8H, H8), 7.03 (s, 14H, H19, H15 et H11). 6.65 (s, 7H, H20, H16 et H12), 4.74-4.43 (m, 64H, H10, H9, H7, H4 et H1), 4.11 (s, 8H, H14), 3.78 (s, 8H, H5), 3.76-3.28 (m 35H, H21, H18, H17, H13, H3 et H2), 1.03 (d, 24H, J = 6.32 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 165.9, 165.7, 159.7, 159.4, 158.9, 158.8, 144.1, 144.0, 136.4, 136.1, 124.4, 124.2, 106.4, 105.8, 98.6, 98.5, 71.6, 69.6, 68.0, 66.4, 66.1, 63.1, 60.1, 31.3, 16.4;

SM(IES): m/z calc. $C_{150}H_{198}N_{30}O_{62}$: 3411.33; trouvé: 1706.67 $[M + 2H]^{2+}$.

Synthèse du composé 21a :

$C_{85}H_{110}N_{14}O_{38}$
Mol. Wt.: 1935,85

Procédure D:

X = **15** (50 mg, 0.08 mmol),

Y = **7** (16 mg, 0.35 mmol),

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (32 mg, 0.13 mmol),

Ascorbate de sodium (45 mg 0.23 mmol),

'BuOH (1 mL)

H_2O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 4% MeOH/DCM

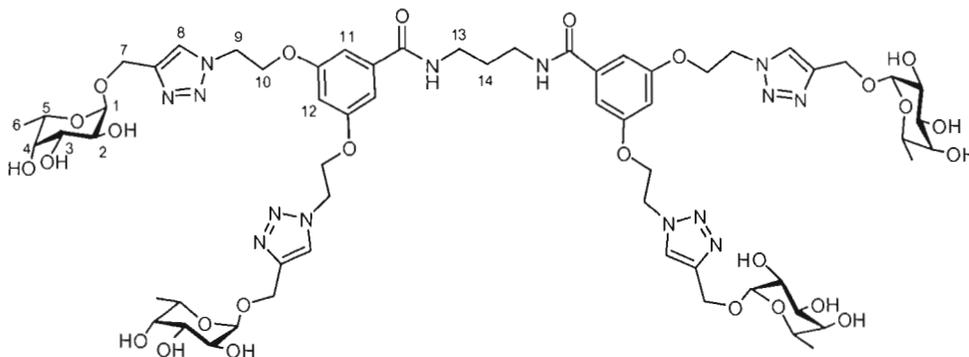
Produit: 124 mg, 0.06 mmol,

Rendement: 80%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.76 (s, 4H, H8), 7.54 (br s, 2H, NH), 7.00 (br s, 4H, H11), 6.52 (br s, 2H, H12), 5.30 (dd, 4H, J = 3.30, 10.71 Hz, H3), 5.23 (d, 4H, J = 2.75 Hz, H4), 5.17 (d, 4H, J = 3.57 Hz, H1) 5.10 (dd, 4H, J = 3.57, 10.99 Hz, H2), 4.82-4.64 (m, 64H, H9 et H7), 4.42 (br s, 8H, H10), 4.12 (br q, 4H, H5), 3.51 (br s, 4H, H13), 2.14 (s, 12H, HAC), 1.99 (s, 12H, HAC), 1.95 (s, 12H, HAC), 1.82 (br s, 2H, H14), 1.08 (d, J = 6.32 Hz, 12H, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.6, 170.4, 170.1, 167.0, 159.0, 144.1, 136.8, 123.9, 106.0, 105.1, 95.7, 71.0, 67.9, 67.8, 66.6, 64.6, 61.1, 49.7, 36.1, 29.1, 20.7, 20.6, 20.6, 15.7;

SM(IES): m/z calc. $C_{85}H_{110}N_{14}O_{38}$: 1934.71; trouvé: 1935.71 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 21 :

$C_{61}H_{86}N_{14}O_{26}$
Mol. Wt.: 1431,41

Procédure E:

X = **21a** (36 mg, 0.02 mmol),

MeOH (1 mL).

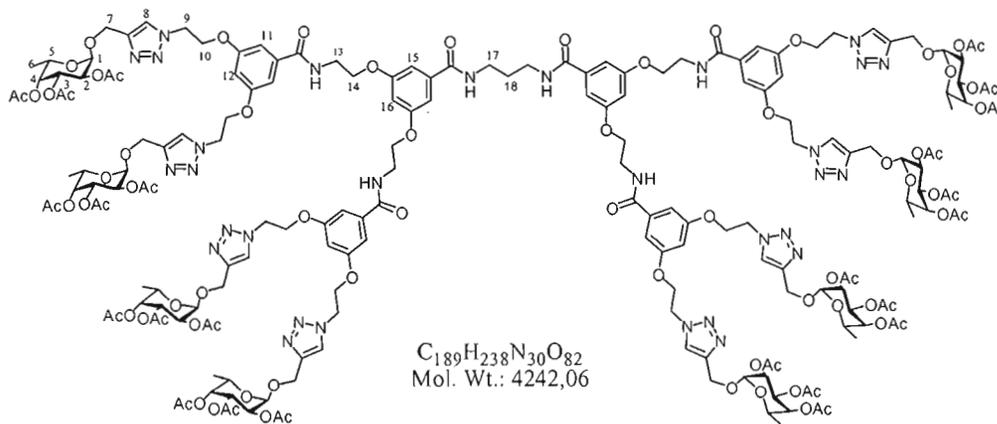
Produit: 26 mg, 0.02 mmol,

Rendement: 98%

RMN 1H (300 MHz, D_2O): δ = 7.93 (s, 4H, H8), 6.47 (s, 4H, H11), 6.11 (s, 2H, H12), 4.81 (s, 4H, H1), 4.59-4.53 (m, 12H, H7 et H4), 4.04 (br s, 8H, H10), 3.63-3.21 (m, 24H, H13, H9, H5, H3 et H2), 1.74 (br s, 2H, H14), 0.82 (d, 12H, J = 5.49 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O + $(CD_3)_2CO$): δ = 168.0, 158.2, 143.9, 135.2, 124.9, 105.6, 104.2, 98.3, 71.3, 69.1, 67.5, 66.2, 66.0, 60.3, 49.3, 37.8, 27.1, 14.7;

SM(IES): m/z calc. $C_{61}H_{86}N_{14}O_{28}$: 1430.58; trouvé: 1431.59 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 22a :**Procédure D:**

X = 16 (49.7 mg, 0.03 mmol),

Y = 7 (89 mg, 0.27 mmol),

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (25 mg, 0.10 mmol),

Ascorbate de sodium (34 mg, 0.17 mmol),

t-BuOH (1 mL)

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 6% MeOH/DCM

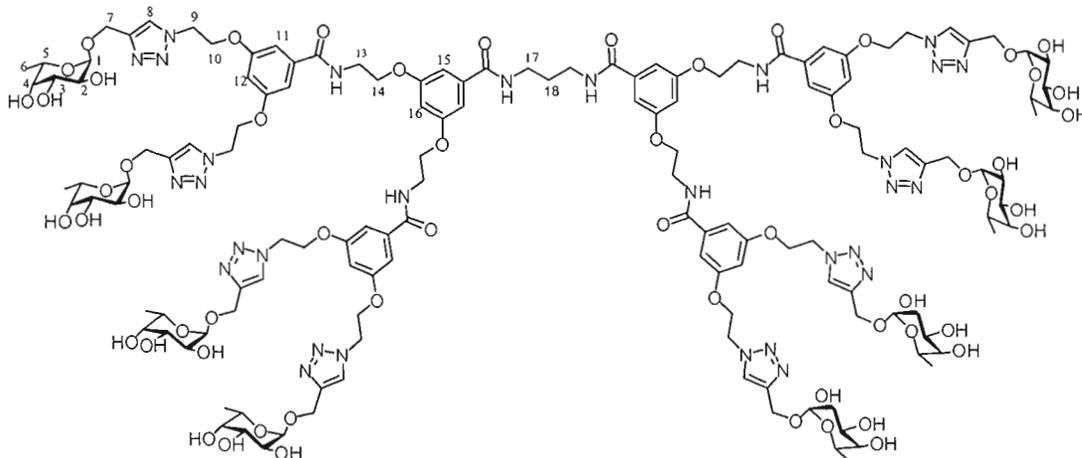
Produit: 107 mg, 0.03 mmol,

Rendement: 82%

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.78 (s, 8H, H8), 7.76-7.60 (m, 6H, NH), 6.92 (s, 12H, H15 et H11), 6.41-6.38 (m, 6H, H16 et H12), 5.29 (dd, 8H, J = 3.30, 10.86 Hz, H3), 5.22 (d, 8H, J = 2.93 Hz, H4), 5.17 (d, 8H, J = 3.66 Hz, H1), 5.09 (dd, 8H, J = 3.66, 10.75 Hz, H2), 4.79 (d, 8H, J = 12.46 Hz, H7a), 4.71 (s, 16H, H10), 4.63 (d, 8H, J = 12.46 Hz, H7b), 4.28 (s, 16H, H9), 4.13 (q, 8H, J = 6.11 Hz, H5), 4.02 (br s, 8H, H14), 3.70 (br s, 8H, H13), 3.52-3.42 (m, 4H, H17), 2.14 (s, 24H, HAC), 1.97 (s, 24H, HAC), 1.95 (s, 24H, HAC), 1.89-1.77 (m, 2H, H18), 1.06 (d, 24H, J = 6.35 Hz, H6);

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.6, 170.4, 170.1, 167.4, 167.2, 159.5, 158.9, 144.0, 136.7, 136.3, 124.0, 106.1, 105.8, 104.9, 104.8, 95.7, 71.0, 68.0, 67.8, 66.4, 64.7, 61.0, 49.6, 39.4, 37.1, 29.6, 20.7, 20.6, 20.5 15.7;

SM(IES): m/z calc. $C_{189}H_{238}N_{30}O_{82}$: 4241.54; trouvé: 2121.78 $[M + 2H]^{2+}$

Synthèse du composé 22:

$C_{141}H_{190}N_{30}O_{58}$
Mol. Wt.: 3233,18

Procédure E:

X = **22a** (48.3 mg, 0.01 mmol),

MeOH (1 mL).

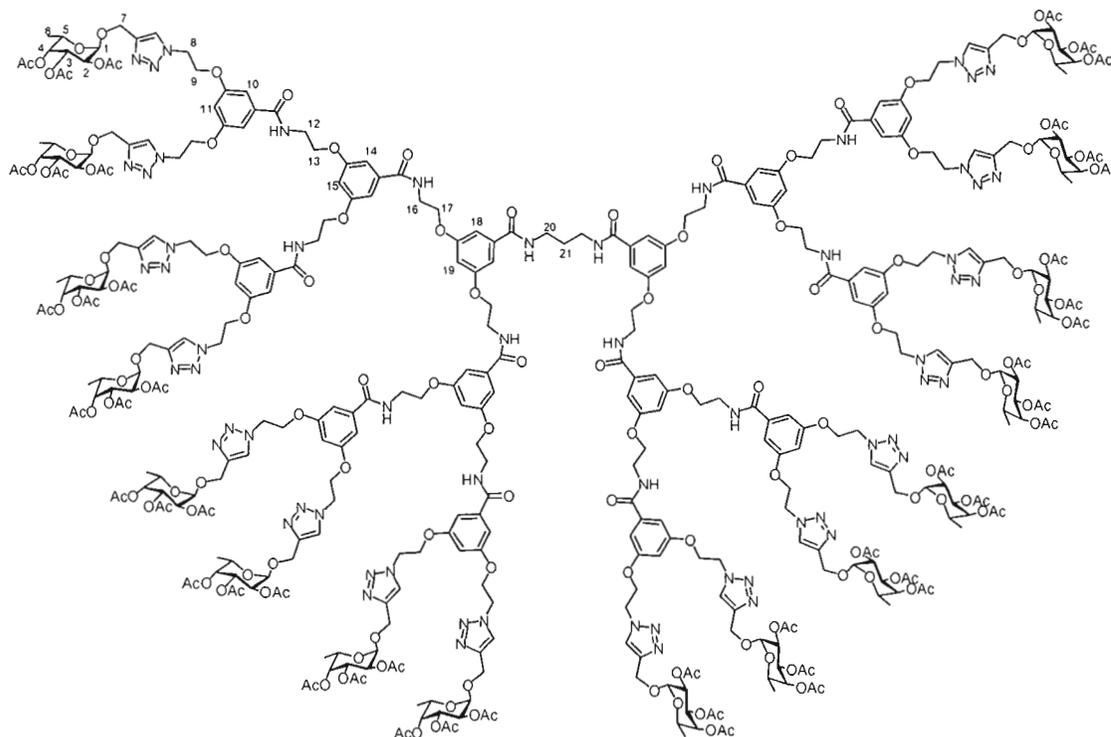
Produit: 30 mg, 0.009 mmol,

Rendement: 82%

RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ = 8.69 (br t, 4H, NH), 8.17 (s, 8H, H8), 7.02 (br s, 12H, H15 et H11), 6.65 (br s, 6H, H16 et H12), 4.74-4.42 (m, 64H, H10, H9, H7, H4 et H1), 4.11 (br s, 8H, H14), 3.78 (br q, 8H, H5), 3.58-3.14 (m, 28H, H17, H13, H3, et H2), 1.74 (br s, 2H, H18), 1.04 (d, 24H, J = 6.04 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 165.7, 165.5, 159.4, 158.8, 144.1, 136.6, 136.3, 124.4, 106.3, 105.9, 104.1, 98.6, 71.6, 69.6, 68.0, 66.4, 66.1, 60.1, 48.9, 37.2, 29.2, 16.4;

SM(IES): m/z calc. $C_{61}H_{86}N_{14}O_{28}$: 3231.28; trouvé: 1078.11 $[M + 3H]^{3+}$

Synthèse du composé 23a :

$C_{397}H_{494}N_{62}O_{170}$
Mol. Wt.: 8854,48

Procédure D:

X = **17** (66 mg, 0.02 mmol),

Y = **7** (106 mg, 0.32 mmol, 17.6 eq),

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (29 mg, 0.12 mmol),

Ascorbate de sodium (41 mg, 0.2 mmol),

t BuOH (1 mL)

H_2O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 7% MeOH/DCM

Produit: 78.7 mg, 0.009 mmol

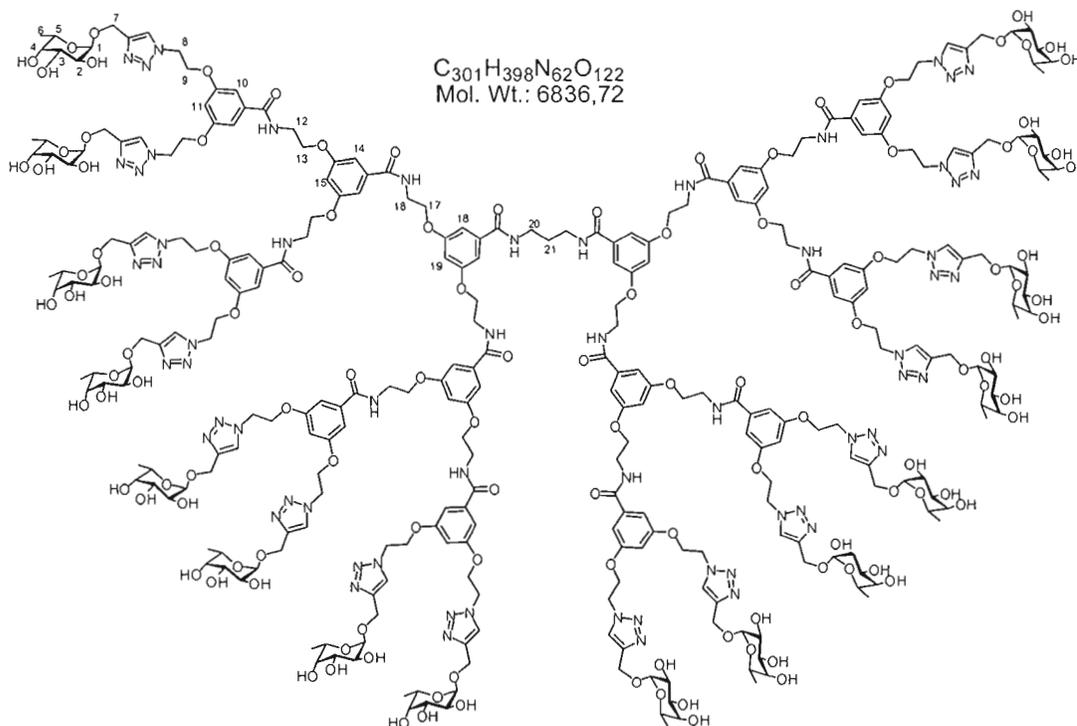
Rendement: 49%

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.81 (br s, 12H, NH), 7.77 (s, 16H, H8), 6.97 (br s, 16H, H11), 6.85 (br s, 4H, H19), 6.76 (br s, 8H, H15), 6.42 (br s, 8H, H10), 6.26 (br s, 6H, H20 et H16), 5.28 (dd, 16H, J = 3.42, 10.74 Hz, H3), 5.21 (d, 16H, J = 2.93 Hz, H4), 5.16 (d, 16H, J = 3.91 Hz, H1), 5.09 (dd, 16H, J = 3.91, 10.74 Hz, H2), 4.77 (d, 16H, J = 12.70 Hz, H7a), 4.69 (br s, 32H, H9), 4.61 (d, 16H, J = 12.70 Hz, H7b), 4.26 (br s, 32H, H10), 4.12 (br q, 16H, H5), 3.93 (br s, 24H, H18 et H14), 3.64 (br s, 24H, H17 et H13), 3.49 (br s, 4H, H21), 2.50 (br s, 2H, H22), 2.13 (s, 48H, HAC), 1.96 (s, 48H, HAC), 1.94 (s, 48H, HAC), 1.05 (d, 48H, J = 6.35 Hz, H6);

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ = 170.6, 170.4, 170.1, 167.1, 159.5, 159.4, 158.9, 144.0, 136.6, 136.2, 124.0, 106.1, 105.0, 95.6, 71.0, 67.9, 67.8, 66.4, 64.6, 61.0, 49.5, 39.5, 29.6, 20.7, 20.6, 20.5, 15.7;

SM(IES): m/z calc. $\text{C}_{397}\text{H}_{494}\text{N}_{62}\text{O}_{170}$: 8854.48; trouvé: 1771.81 $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$;

IR (cm^{-1}): ν = 1751.

Synthèse du composé 23:**Prodédure E:**

X = **23a** (77 mg, 0.009 mmol),

MeOH (1 mL).

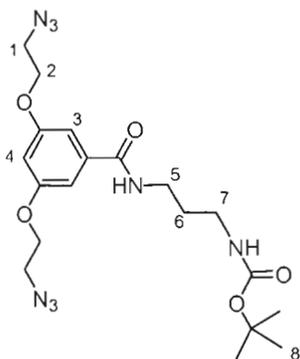
Produit: 57 mg, 0.008 mmol

Rendement: 97%

RMN 1H (300 MHz, D_2O , 80°C): δ = 8.32 (s, 16H, H8), 7.13' (br s, 28H, H19, H15 et H11), 6.77 (br d, 14H, H20, H16 et H12), 5.28 (d, 16H, J = 3.22 Hz, H4), 4.99 (br s, 64H, H9, H7a et H1), 4.63 (br s, 32H, H10 et H7b), 4.31-3.92 (m, 112H, H18, H17, H14, H13, H5, H3 et H2), 3.65 (br s, 4H, H21), 2.07 (br s, 2H, H22), 1.35 (d, 48H, J = 6.45 Hz, H6);

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO, 80°C): δ = 169.0, 160.2, 159.7, 145.2, 136.8, 125.8, 107.5, 107.3, 106.0, 99.5, 72.6, 70.7, 69.0, 67.4, 61.6, 50.4, 40.2, 16.0;

SM(IES): m/z calc. $C_{301}H_{398}N_{62}O_{122}$: 6832.69; trouvé: 1709.17 $[M + 4H]^{4+}$.

Synthèse du composé 28a:

$C_{19}H_{28}N_8O_5$
Mol. Wt.: 448,48

Procédure C :

X = 10 (51.2 mg, 0.18 mmol, 1.2 éq.)

Y = 27 (25.4 mg, 0.15 mmol),

BOP (77 mg, 0.18 mmol, 1.2 éq),

DIPEA (0.15 mL, 0.88 mmol, 6 éq),

DMF (3 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 2% MeOH/DCM

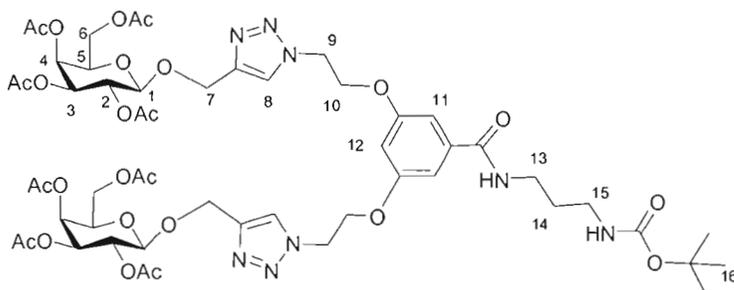
Produit: 60 mg, 0.13 mmol

Rendement: 85%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.54 (br t, 1H, NH), 7.07 (d, 2H, J = 1.65 Hz, H3), 6.61 (t, 1H, J = 2.20 Hz, H4), 5.03 (br t, 1H, NH), 4.16 (t, 4H, J = 4.95 Hz, H2), 3.58 (t, 4H, J = 4.95 Hz, H1), 3.47 (q, 2H, J = 6.32, 12.22 Hz, H5), 3.23 (q, 2H, J = 6.14, 12.09 Hz, H7), 1.72-1.64 (m, 2H, H6), 1.43 (s, 9H, H9);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 166.7, 159.3, 157.0, 136.8, 105.8, 105.2, 79.5, 67.1, 50.0, 36.9, 35.9, 29.9, 28.3;

SM(IES): m/z calc. $C_{19}H_{28}N_8O_5$: 448.22; trouvé: 471.21 $[M + Na]^+$.

Synthèse du composé 28:

$C_{53}H_{72}N_8O_{25}$
Mol. Wt.: 1221,18

Procédure D:

X = **28a** (54.9 mg, 0.12 mmol),

Y = **26** (104 mg, 0.27 mmol, 2.2 eq.),

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (24.5 mg, 0.10 mmol),

Ascorbate de sodium (34 mg, 0.17 mmol),

t BuOH (1 mL) and H_2O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 3% MeOH/DCM

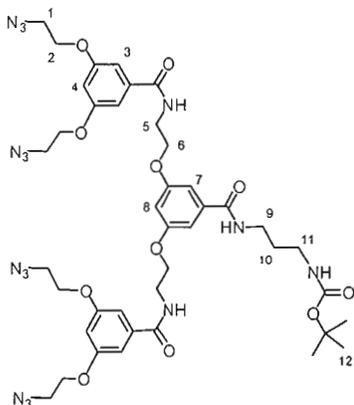
Produit: 137 mg, 0.11 mmol,

Rendement: 92%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.71 (s, 2H, H8), 7.51 (br t, 1H, NH), 7.04 (br s, 2H, H11), 6.53 (t, 1H, J = 2.20, 4.12 Hz, H12), 5.38 (d, 2H, J = 3.30 Hz, H4), 5.20 (dd, 2H, J = 7.97, 10.44 Hz, H2), 5.02-4.95 (m, 5H, H7a, H3 et NH), 4.81-4.70 (m, 6H, H10 et H7b), 4.64 (d, 2H, J = 7.69 Hz, H1), 4.39 (t, 4H, J = 4.67 Hz, H9), 4.20-4.07 (m, 4H, H6a et H5), 3.94 (t, 2H, J = 6.59 Hz, H6b), 3.46 (br q, 2H, H13), 3.22 (br q, 2H, H15), 2.13 (s, 6H, HAC), 2.04 (s, 6H, HAC), 1.97 (s, 6H, HAC), 1.93 (s, 6H, HAC), 1.71-1.67 (m, 2H, H14), 1.43 (s, 9H, H16);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.4, 170.1, 170.0, 169.6, 168.1, 158.9, 144.3, 137.1, 123.7, 106.2, 104.8, 100.4, 79.5, 70.8, 70.7, 68.8, 67.0, 66.5, 62.9, 61.2, 49.6, 36.9, 35.9, 28.3, 20.6, 20.5;

SM(IES): m/z calc. $C_{53}H_{72}N_8O_{25}$: 1220.46; trouvé: 1221.47 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 29a:

$C_{41}H_{52}N_{16}O_{11}$
Mol. Wt.: 944,95

Procédure C:

X = **12** (93.5 mg, 0.12 mmol, 1.2 éq.),

Y = **27** (17.2 mg, 0.10 mmol),

BOP (52.4 mg, 0.12 mmol, 1.2 éq),

DIPEA (103 mg, 0.59 mmol, 6 éq),

DMF (2 mL).

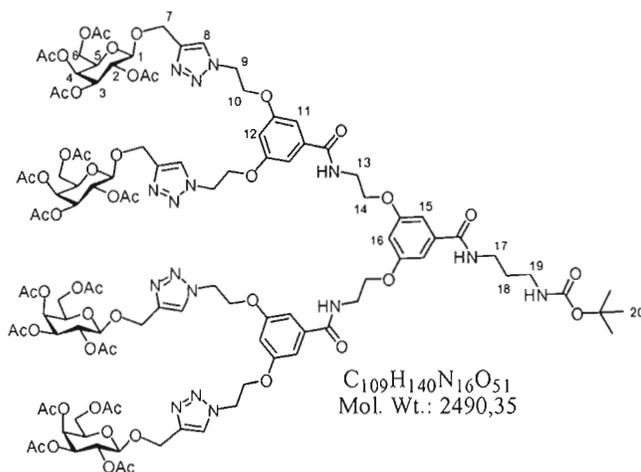
Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 3% MeOH/DCM

Produit: 79 mg, 0.08 mmol,

Rendement: 85%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.40-7.60 (m, 3H, NH), 7.06 (d, 4H, J = 2.20, H3), 6.79 (br s, 2H, H4), 6.60 (t, 2H, J = 2.28 Hz, H7), 6.26 (br s, 1H, H8), 5.15 (br t, 1H, NH), 4.11 (t, 8H, J = 4.81 Hz, H2), 3.94 (br s, 4H, H6), 3.72 (br d, 4H, H5), 3.55 (t, 8H, J = 4.95 Hz, H1), 3.49-3.43 (m, 2H, H9), 3.21-3.19 (m, 2H, H11), 1.60-1.80 (m, 2H, H10), 1.41 (s, 9H, H12);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.4, 159.4, 156.8, 136.5, 106.2, 105.5, 105.1, 104.0, 79.5, 67.1, 66.5, 50.0, 39.6, 37.2, 36.3, 29.6, 28.3.

Synthèse du composé 29:**Procédure D:**

X = **29a** (69 mg, 0.07 mmol),

Y = **26** (124 mg, 0.32 mmol, 4.4 eq.),

Ascorbate de sodium (41 mg, 0.20 mmol),

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (29 mg, 0.12 mmol),

t BuOH (1 mL)

H_2O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 4% MeOH/DCM

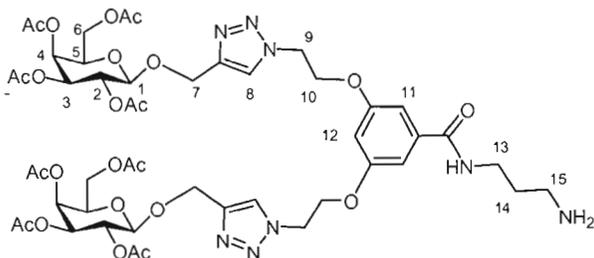
Produit: 139.5 mg, 0.06 mmol,

Rendement: 77%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.72 (s, 4H, H8), 7.28 (br t, 2H, NH), 7.00 (br s, 2H, H15), 6.93 (d, 4H, J = 1.10 Hz, H11), 6.52 (br t, 1H, H16), 6.49 (t, 2H, J = 2.20 Hz, H12), 5.38 (d, 4H, J = 2.75 Hz, H4), 5.22-5.16 (m, 5H, H2 et NH), 5.12-4.94 (m, 8H, H7a et H3), 4.79-4.72 (m, 12H, H10 et H7b), 4.65 (d, 4H, J = 7.69 Hz, H1), 4.35 (t, 8H, J = 4.95 Hz, H9), 4.03-4.08 (m, 12H, H14, H6a et H5), 3.94 (br t, 4H, H6b), 3.79-3.73 (m, 4H, H13), 3.46-3.44 (m, 2H, H17), 3.20-3.18 (m, 2H, H19), 2.12 (s, 12H, HAC), 2.04 (s, 12H, HAC), 1.95 (s, 12H, HAC), 1.92 (s, 12H, HAC), 1.71-1.67 (m, 2H, H18), 1.41 (s, 9H, H20);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.4, 170.2, 170.1, 169.8, 166.8, 159.6, 159.0, 144.3, 137.0, 136.8, 123.8, 106.5, 105.7, 104.8, 104.6, 100.4, 79.5, 70.8, 70.7, 68.8, 67.0, 66.5, 63.0, 61.2, 49.6, 39.4, 37.1, 36.0, 29.7, 28.4, 20.7, 20.6, 20.4, 20.5;

SM(IES): m/z calc. $C_{109}H_{140}N_{16}O_{51}$: 2488.89; trouvé: 2489.89 $[M + H]^+$;

Synthèse du composé 30a:

$C_{48}H_{64}N_8O_{23}$
Mol. Wt.: 1121,06

Procédure F:

X = **28** (67 mg, 0.05 mmol),

TFA (0.26 mL, 3.57 mmol),

CH_2Cl_2 (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 7% MeOH/DCM

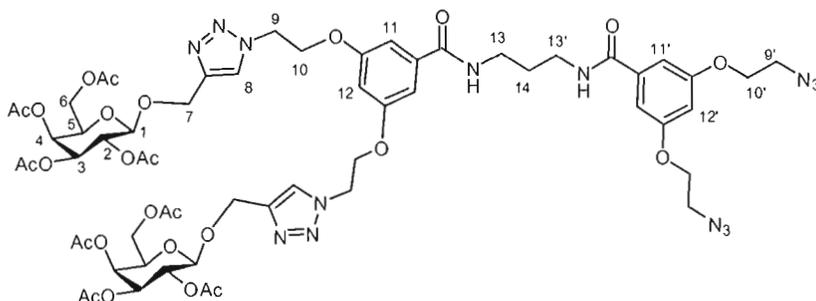
Produit: 53 mg, 0.05 mmol,

Rendement: 86%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.07- 7.90 (m, 3H, NH), 7.77 (s, 2H, H8), 6.89 (br s, 2H, H11), 6.40 (br s, 1H, H12), 5.39 (d, 2H, J = 3.30 Hz, H4), 5.21-5.11 (m, 2H, H2), 5.02 (dd, 2H, J = 3.28, 10.44 Hz, H3), 4.95 (d, 2H, J = 12.35 Hz, H7a), 4.82-4.62 (m, 8H, H10, H7b et H1), 4.30 (br s, 4H, H9), 4.21-4.05 (m, 4H, H6a et H5), 3.96 (t, 2H, J = 6.32 Hz, H6b), 3.47 (br s, 2H, H13), 3.22 (br s, 2H, H15), 3.01 (br s, 2H, H14), 2.13 (s, 6H, HAC), 2.03 (s, 6H, HAC), 1.99 (s, 6H, HAC), 1.92 (s, 6H, HAC);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.5, 170.1, 170.0, 169.8, 168.3, 159.2, 144.3, 136.1, 124.1, 106.6, 105.6, 100.6, 71.0, 70.9, 69.1, 67.3, 66.7, 62.8, 61.3, 49.7, 37.1, 36.3, 27.2, 20.5, 20.4, 20.4;

SM(IES): m/z calc. $C_{48}H_{64}N_8O_{23}$: 1120.41; trouvé: 1121.42 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 30:

$C_{59}H_{74}N_{14}O_{26}$
Mol. Wt.: 1395,30

Procédure C:

X = **10** (17 mg, 0.05 mmol, 1.2 eq.),

Y = **30a** (54.3 mg, 0.05 mmol),

BOP (26 mg, 0.06 mmol, 1.2 eq),

DIPEA (51 μ l, 0.29 mmol, 6 eq),

DMF (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 6% MeOH/DCM

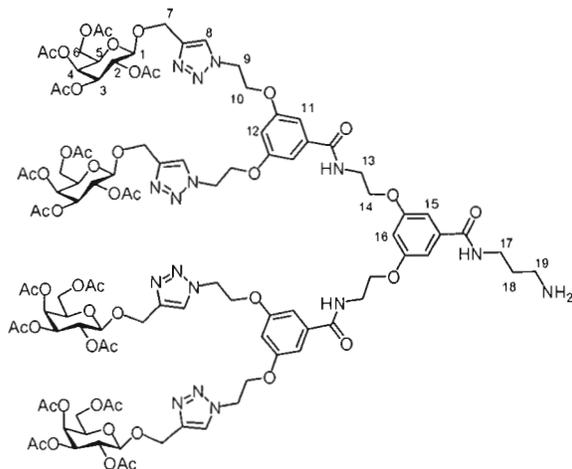
Produit: 48.1 mg, 0.03 mmol,

Rendement: 71%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.72 (s, 2H, H8), 7.52 (br t, 1H, NH), 7.40 (br t, 1H, NH), 7.05 (d, 2H, J = 2.20 Hz, H11), 7.02 (d, 2H, J = 2.20 Hz, H11'), 6.62 (t, 1H, J = 2.20 Hz, H12), 6.53 (br t, 1H, H12'), 5.39 (d, 2H, J = 2.47 Hz, H4), 5.19 (dd, 2H, J = 7.97, 10.43 Hz, H2), 4.94-5.04 (m, 4H, H7a et H3), 4.73-4.83 (m, 6H, H10 et H7b), 4.64 (d, 2H, J = 7.97 Hz, H1), 4.40 (br t, 4H, H9), 4.06-4.22 (m, 8H, H10', H6a et H5), 3.93 (br t, 2H, H6b), 3.60 (t, 4H, J = 4.67 Hz, H9'), 3.50 (br q, 2H, H13' et H13), 2.13 (s, 6H, HAC), 2.04 (s, 6H, HAC), 1.97 (s, 6H, HAC), 1.94 (s, 6H, HAC), 1.84 (br s, 2H, H14);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.4, 170.1, 170.0, 169.7, 167.3, 167.0, 159.5, 159.0, 144.3, 136.9, 136.7, 123.8, 106.4, 106.0, 104.8, 104.7, 100.4, 70.8, 70.7, 68.8, 67.2, 67.0, 66.5, 62.9, 61.2, 50.0, 49.6, 36.3, 29.4, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5;

SM(IES): m/z calc. $C_{59}H_{74}N_{14}O_{26}$: 1394.49; trouvé: 1395.50 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 31a :

$C_{104}H_{132}N_{16}O_{49}$
Mol. Wt.: 2390,24

Procédure F:

X = **29** (45 mg, 0.02 mmol),

TFA (87 μ l, 1.17 mmol), CH₂Cl₂ (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 8% MeOH/DCM

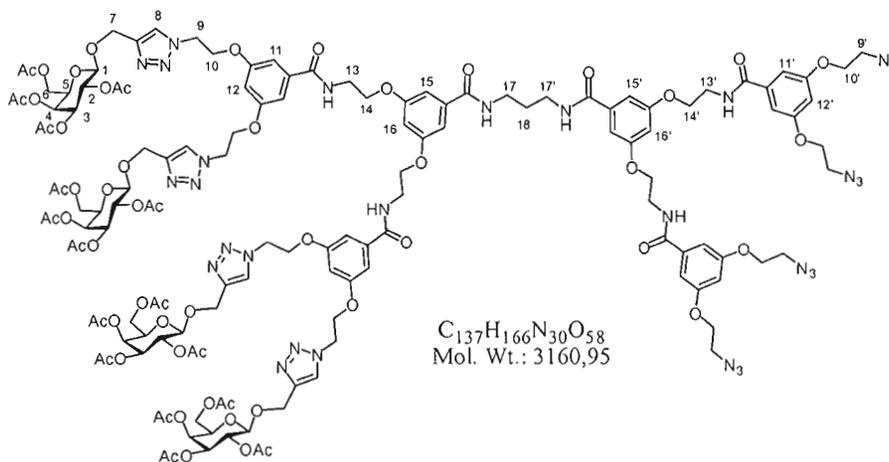
Produit: 31.9 mg, 0.01 mmol,

Rendement: 74%

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.18-8.11 (m, 3H, NH), 7.86 (br s, 1H, NH), 7.74 (s, 4H, H8), 7.69 (br s, 4H, H11), 6.96 (br s, 2H, H15), 6.45 (br s, 2H, H12), 6.36 (br s, 1H, H16), 5.38 (d, 4H, J = 3.30 Hz, H4), 5.17 (dd, 4H, J = 7.97, 10.44 Hz, H2), 5.02 (dd, 4H, J = 3.30, 10.44 Hz H3), 4.93 (d, 4H, J = 12.64 Hz, H7a), 4.77-4.64 (m, 16H, H10, H7b et H1), 4.30 (br s, 8H, H9), 4.19-4.06 (m, 12H, H14, H6a et H5), 3.98-3.93 (m, 4H, H6b), 3.67 (br s, 4H, H13), 3.46 (br s, 2H, H17), 2.95-2.87 (m, 4H, H19 et H18), 2.11 (s, 12H, HAC), 2.02 (s, 12H, HAC), 1.95 (s, 12H, HAC), 1.92 (s, 12H, HAC);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.5, 170.2, 170.1, 169.8, 167.3, 159.5, 158.9, 144.1, 136.5, 135.4, 124.1, 106.3, 105.7, 105.1, 100.4, 70.8, 70.7, 68.8, 67.0, 66.4, 62.7, 61.2, 49.6, 39.4, 37.1, 36.0, 29.7, 20.6, 20.5, 20.4;

SM(IES): m/z calc. $C_{104}H_{132}N_{16}O_{49}$: 2388.83; trouvé: 2389.84 [M + H]⁺.

Synthèse du composé 31:**Procédure C:**

X = **12** (13.6 mg, 0.02 mmol, 1.2 eq.),

Y = **31a** (34 mg, 0.01 mmol),

BOP (7.6 mg, 0.02 mmol, 1.2 eq),

DIPEA (15 μ l, 0.09 mmol, 6 eq),

DMF (2 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 6% MeOH/DCM

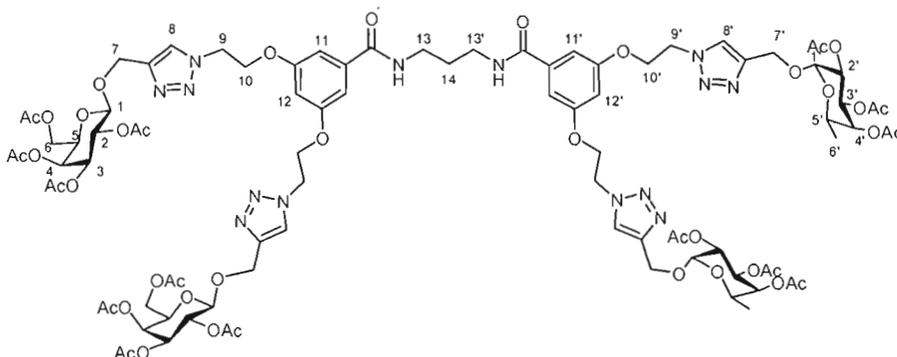
Produit: 31.0 mg, 0.10 mmol,

Rendement: 69%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.72 (s, 8H, H8), 7.65 (br t, 4H, NH), 7.06 (d, 4H, J = 2.20 Hz, H11'), 6.97 (br t, 1H, NH), 6.93 (br d, 6H, H15 et H11), 6.76 (br s, 2H, H15'), 6.58 (t, 2H, J = 2.20 Hz, H12'), 6.44 (br s, 3H, H16 et H12), 6.27 (br s, 1H, H16'), 5.38 (d, 4H, J = 3.30 Hz, H4), 5.18 (dd, J = 7.97, 10.44 Hz, 4H, H2), 5.01 (dd, J = 3.30, 10.44 Hz 4H, H3), 4.95 (d, 4H, J = 12.36 Hz, H7a), 4.75 (d, 4H, J = 12.36 Hz, H7b), 4.69-4.63 (m, 12H, H10 et H1), 4.28 (br t, 8H, H9), 4.19-4.07 (m, 20H, H14, H10', H6a et H5), 3.96-3.92 (m, 8H, H14' et H6b), 3.73 (br s, 8H, H13 et H13'), 3.56-3.48 (m, 12H, H17, H17' et H9'), 2.12 (s, 12H, HAC), 2.03 (s, 12H, HAC), 1.95 (s, 12H, HAC), 1.92 (s, 12H, HAC), 1.80-1.82 (br qt, 2H, H18);

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.9, 170.6, 170.5, 170.1, 167.8, 167.6, 160.0, 159.9, 159.8, 159.3, 144.6, 137.1, 136.9, 136.8, 136.5, 124.4, 106.7, 106.2, 105.4, 105.2, 100.9, 71.2, 71.1, 69.2, 67.6, 67.4, 66.8, 63.3, 61.6, 50.4, 50.0, 39.9, 37.5, 36.5, 21.7, 21.0, 20.9;

SM(IES): m/z calc. $C_{137}H_{166}N_{30}O_{58}$: 3159.10; trouvé: 1580.55 $[M + 2H]^{2+}$.

Synthèse du composé 32a:

$C_{89}H_{114}N_{14}O_{42}$
Mol. Wt.: 2051,93

Procédure D:

X = 30 (38 mg, 0.03 mmol),

Y = 7 (20 mg, 0.06 mmol, 2.2 éq.),

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (6 mg, 0.02 mmol),

Ascorbate de sodium (8 mg, 0.04 mmol),

t BuOH (1 mL)

H_2O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 2% MeOH/DCM

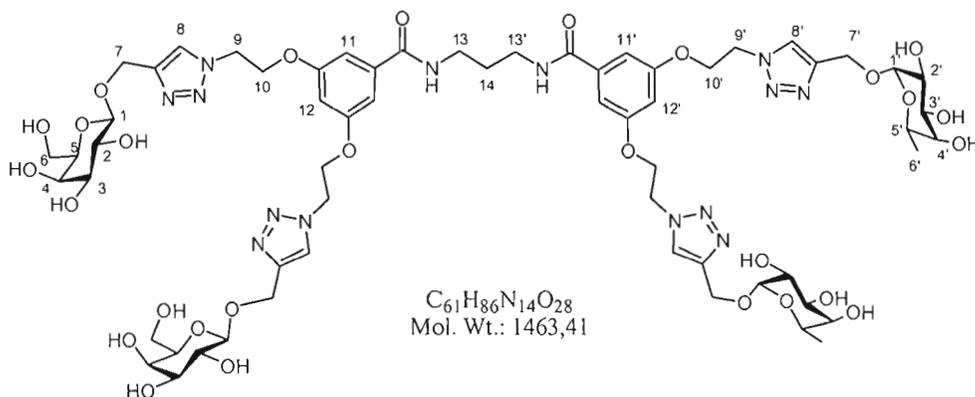
Produit: 37 mg, 0.02 mmol,

Rendement: 66%

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.74 (s, 4H, H8 et H8'), 7.56 (br t, 2H, NH), 7.01 (s, 4H, H11 et H11'), 6.51 (s, 2H, H12 et H12'), 5.37 (d, 2H, J = 3.30 Hz, H4), 5.29 (dd, 2H, J = 3.43, 10.85 Hz, H3'), 5.21 (d, 2H, J = 3.85 Hz, H4'), 5.18-5.15 (m, 4H, H2 et H1'), 5.08 (dd, 2H, J = 3.57, 10.99 Hz, H2'), 5.01-4.94 (m, 4H, H7a et H3), 4.80-4.74 (m, 12H, H10, H9, H7a' et H7b), 4.66-4.62 (m, 4H, H7b' et H1), 4.39 (br d, 8H, H10' et H9), 4.16-4.05 (m, 6H, H6a, H5 et H5'), 3.93 (br t, 2H, H6b), 3.48 (br q, 4H, H13 et H13'), 2.13 (s, 6H, HAC), 2.11 (s, 6H, HAC), 2.02 (s, 6H, HAC), 1.98 (s, 6H, HAC), 1.95 (s, 6H, HAC), 1.94 (s, 6H, HAC), 1.91 (s, 6H, HAC), 1.80-1.78 (br m, 2H, H14), 1.06 (d, 6H, J = 6.59 Hz, H6');

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.5, 170.3, 170.3, 170.1, 170.0, 169.9, 169.6, 167.0, 166.8, 159.0, 158.9, 144.2, 144.1, 136.8, 136.7, 123.8, 106.2, 106.0, 105.0, 104.8, 100.3, 95.6, 70.9, 70.7, 70.6, 68.7, 67.9, 67.8, 66.9, 66.6, 64.6, 62.9, 61.1, 49.6, 36.1, 29.1, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4, 15.7;

SM(IES): m/z calc. $C_{89}H_{114}N_{14}O_{42}$: 2050.72; trouvé: 2051.73 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 32:

Procédure E: X = **32a** (34.2 mg, 0.02 mmol),
 MeOH (1 mL).

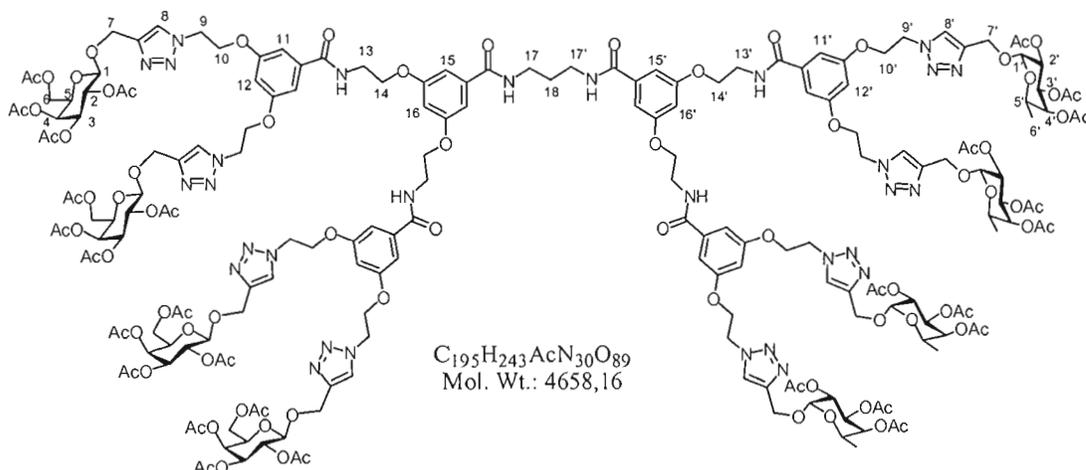
Produit: 24 mg, 0.02 mmol,

Rendement: quantitatif

RMN 1H (500 MHz, $D_2O + (CD_3)_2CO$): $\delta = 8.04$ (s, 2H, H8), 8.01 (s, 2H, H8'), 6.60 (s, 2H, H11), 6.57 (s, 2H, H11'), 6.31 (s, 1H, H12), 6.25 (s, 1H, H12'), 4.90-4.61 (m, 20H, H9, H7, H9', H7', H4' et H1'), 4.35 (d, 2H, $J = 7.63$ Hz, H1), 4.15-4.13 (m, 8H, H10 et H10'), 3.82 (br d, 2H, H3), 3.72-3.45 (m, 16H, H6, H5, H4, H2, H5', H3' et H2'), 3.37 (br t, 4H, H13), 1.39 (br s, 2H, H14), 0.89 (d, 6H, $J = 6.72$ Hz, H6');

RMN ^{13}C (125 MHz, $D_2O + (CD_3)_2CO$): $\delta = 168.1, 158.3, 143.8, 143.3, 135.3, 125.4, 125.0, 105.7, 104.5, 104.3, 101.5, 98.3, 74.8, 72.4, 71.3, 70.2, 69.1, 68.1, 67.5, 66.2, 66.0, 61.2, 60.5, 60.3, 49.3, 38.0, 26.9, 14.7$;

SM(IES): m/z calc. $C_{61}H_{86}N_{14}O_{28}$: 1462.57; trouvé: 1463.58 $[M + H]^+$.

Synthèse du composé 33a :**Procédure D:**

X = **31** (31 mg, 0.001 mmol),

CuSO₄·5H₂O (3.9 mg, 0.02 mmol),

t-BuOH (1 mL)

Y = **7** (14.1 mg, 0.04 mmol, 4.4 eq.),

Ascorbate de sodium (5.44 mg, 0.03 mmol),

H₂O (1 mL).

Purification: Colonne chromatographique sur gel de silice, éluant 5% MeOH/DCM

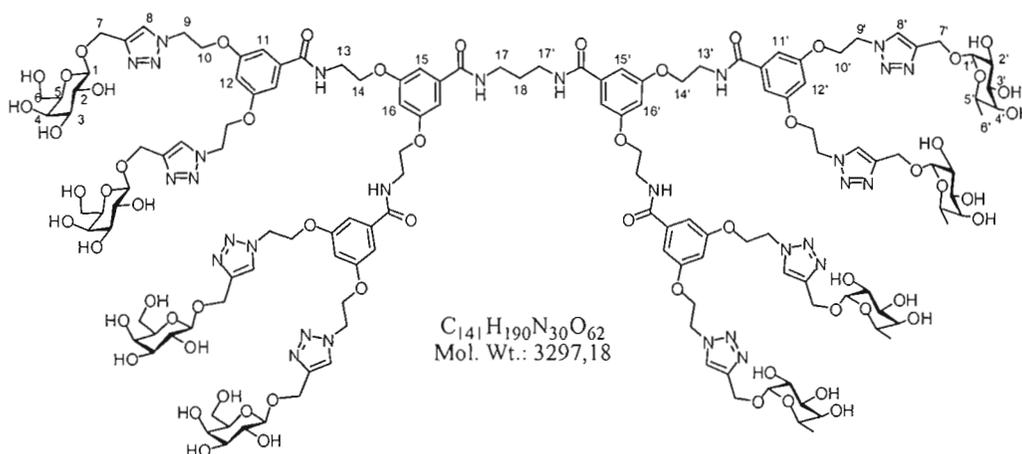
Produit: 30 mg, 0.007 mmol,

Rendement: 68%

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.76 (s, 4H, H8), 7.74 (s, 4H, H8'), 7.72-7.55 (m, 4H, NH), 6.9 (s, 4H, H15' et H15), 6.90 (s, 8H, H11' et H11), 6.42 (s, 4H, H12' et H12), 6.39 (s, 2H, H16' et H16), 5.38 (s, 4H, H4), 5.31-5.28 (m, 4H, H3'), 5.22-5.16 (m, 12H, H4', H2 et H1'), 5.11-5.08 (m, 4H, H2'), 5.03-4.94 (m, 8H, H7a et H3), 4.80-4.62 (m, 32H, H10, H9', H7b, H7' et H1), 4.28 (br s, 16H, H10', et H9) 4.17-3.94 (m, 20H, H13, H6, H5' et H5), 3.73 (br s, 8H, H14), 3.49 (br s, 4H, H17), 2.13 (s, 12H, HAC), 2.11 (s, 12H, HAC), 2.02 (s, 12H, HAC), 1.97 (s, 12H, HAC), 1.95 (s, 12H, HAC), 1.92 (s, 12H, HAC), 1.91 (s, 12H, HAC), 1.82 (br s, 2, H18), 1.07 (d, 12H, J = 6.35 Hz, H6);

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ = 170.6, 170.4, 170.2, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 167.1, 159.5, 158.9, 158.8, 144.1, 144.0, 136.7, 136.3, 124.0, 106.2, 106.1, 105.7, 104.8, 104.7, 103.6, 100.4, 95.6, 70.9, 70.7, 70.6, 68.7, 67.9, 67.8, 67.1, 66.9, 66.4, 65.7, 64.6, 62.8, 61.1, 61.0, 49.5, 39.3, 36.6, 24.6, 20.7, 20.6, 20.5, 15.7;

SM(IES): m/z calc. C₁₉₇H₂₄₆N₃₀O₉₀: 4471.56; trouvé: 2236.78 [M + 2H]²⁺.

Synthèse du composé 33:

Procédure E: X = **33a** (22.2 mg, 0.005 mmol),
MeOH (1 mL).

Produit: 16.4 mg, 0.005 mmol,

Rendement: Quantitatif

RMN 1H (300 MHz, DMSO): δ = 8.67 (br s, 2H, NH), 8.46 (br s, 1H, NH), 8.17 (s, 4H, H8), 8.16 (s, 4H, H8'), 7.02 (br s, 12H, H15, H15', H11 et H11'), 6.67 (br s, 6H, H16, H16', H12 et H12'), 4.91-4.40 (m, 56H, H10, H10', H9, H9', H7, H7', H4' et H1'), 4.19 (d, 4H, J = 6.53 Hz, H1), 4.11 (br s, 8H, H13 et H13'), 3.78 (br q, 4H, H5'), 3.61-3.26 (m, 44H, H17, H17', H14, H14', H6, H5, H4, H3, H3', H2, et H2'), 1.74 (br s, 2H, H18), 1.04 (d, 12H, J = 6.59 Hz, H6');

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ = 165.8, 159.4, 158.8, 144.1, 143.9, 136.6, 136.3, 124.7, 124.4, 106.3, 102.7, 98.6, 75.3, 73.4, 71.6, 70.5, 69.6, 68.2, 68.0, 66.4, 66.1, 61.3, 60.5, 60.1, 48.9, 37.3, 29.0;

SM(IES): m/z calc. $C_{141}H_{190}N_{30}O_{62}$: 3295.26; trouvé: 1099.42 $[M + 3H]^{3+}$.

RÉFÉRENCES

- ¹ a) Mizrahi, A.; Ben-Ner, E.; Katz, M. J.; Kedem, K.; Glusman, J. G.; Libersat, F. *J Comp. Neurol.* **2000**, *422*, 415; b) Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2719.
- ² a) Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 3083; b) Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 3091; c) Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 3096; d) Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 132.
- ³ Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, 155.
- ⁴ Tomalia, D. A.; Dewald, J. R.; Hall, M. R.; Martin, S. J.; Smith, P. B. *Preprints of the 1st SPSJ International Polymer Conference, Society of Polymer Science Japan, Kyoto 1984*; 65.
- ⁵ a) Newkome, G. R.; Yao, Z. Q.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003; b) Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym J.* **1985**, *17*, 117.
- ⁶ a) Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Vögtle, F. *Dendritic molecules: Concepts, Syntheses, Perspective*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **1996**; b) Fréchet J. M. J.; Tomalia D. A.. *Dendrimers and other Dendritic Polymers*, Eds. John Wiley & Sons Ltd.: New York, **2001**; c) Tomalia, D. A. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 294.

⁷ Rutt, J. S.; *Dendrimers and nanotechnology: a patent explosion*, Foley and Larner, Paper Presented at the National Nanotechnology, Initiative Conference, Washington DC, April 29, **2002**, (<http://www.foley.com>).

⁸ a) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder J.; Smith, P. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2466; b) Tomalia, D. A. *Sci. Am.* **1995**, *272*, 62.

⁹ a) Grayson, S.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819; b) de Gennes, P. G.; Hervet, H. *J. Phys. Lett.* **1983**, *44*, 351.

¹⁰ Newkome, G. R.; Yao, Z. Q.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003; b) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.

¹¹ Buhleiser, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, 155.

¹² a) Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Baker, G. R.; Johnson, A. L.; Behera, R. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1176; b) Newkome, G. R.; Young, J. K.; Baker, G. R.; Potter, R. L.; Audoly, L.; Cooper, D.; Weis, C. D.; Morris, K.; Johnson, C. S. Jr. *Macromolecules* **1993**, *26*, 2394.

¹³ Majoral, J. P.; Caminade, A. M. *Top. Curr. Chem.* **1998**, *197*, 79.

¹⁴ a) Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638; b) Hawker, C.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Commun.* **1990**, 1010.

-
- ¹⁵ Grayson S. M.; Fréchet J. M. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819.
- ¹⁶ Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4252.
- ¹⁷ Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 82.
- ¹⁸ Kawaguchi, T.; Walker, K. L.; Wilkins, C. L.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2159.
- ¹⁹ Ihre, H.; Hult, A.; Fréchet, J. M. J.; Gitsov, I. *Macromolécules* **1998**, *31*, 4046.
- ²⁰ Spindler, R.; Fréchet, J. M. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, *113*, 913.
- ²¹ a) Cornils, B.; Herrmann, W. A. *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*, Eds.; VCH: Weinheim, 1996; b) Tomalia, D. A.; Dvornic, P. R. *Nature* **1994**, 617.
- ²² Stoddart, F. J.; Welton, T. *Polyhedron* **1999**, *18*, 3575.
- ²³ Reetz, M. T.; Lohmer, G.; Schwickardi, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1526.
- ²⁴ Alonso, E.; Astruc, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3222.
- ²⁵ Chow, H.-F.; Mak, C. C. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5116.
- ²⁶ Maraval, V.; Laurent, R.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *Organometallics* **2000**, *19*, 4025.

-
- ²⁷ Brunner, H. *J. Organomet. Chem.* **1995**, *500*, 39.
- ²⁸ a) Brunner, H.; Fürst, J. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4303; b) Brunner, H.; Janura, M.; Stefaniak, S. *Synthesis* **1998**, 1742.
- ²⁹ Astruc, D.; Chardac, F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2991.
- ³⁰ Cameron, J. H.; Facher, A.; Lattermann, G.; Diele, S. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 398.
- ³¹ Barrs, M. W. P. L.; Söntjens, S. H. M.; Fischer, H. M.; Peerlings, H. W. I.; Meijer, E. W. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2456.
- ³² Percec, V.; Cho, W.-D.; Ungar, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10273.
- ³³ Campidelli, S.; Deschenaux, R.; Eckert, J.-F.; Guillon, D.; Nierengarten, J.-F. *Chem. Commun.* **2002**, 656.
- ³⁴ a) Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.*, **1953**, *21*, 836; b) Förster A. *Phys.* **1948**, *2*, 55.
- ³⁵ Adronov, A.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Commun.*, **2000**, 1701.
- ³⁶ a) Choi, M-S.; Aida, T.; Yamazaki, T.; Yamzaki, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3194; b) Choi, M-S.; Aida, T.; Yamazaki, T.; Yamzaki, I. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 12, 2667; c) Hasobe, T.; Kashiwagi, Y.; Absalon, M. A.; Sly, J.; Hosomizu, K.; Crossley, M. J.; Imahori, H.; Kamat, P. V.; Fukuzum, S. *Adv. Mat.* **2004**, *16*, 12, 975.

-
- ³⁷ Cotlet, M.; Gronheid, R.; Habuchi, S.; Stefan, A.; Barbafina, A.; Mullen, K.; Hofkens, J.; De Schryver, F. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13609.
- ³⁸ Tomalia, D. A. *Aldrichimica Acta*. **2004**, *37*, 39.
- ³⁹ Svenson, S.; Tomalia, D. A. *Advanced Drug Reviews* **2005**, 2106.
- ⁴⁰ Singh, P. *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 54.
- ⁴¹ Boas, U.; Heegaard, P. M. H. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.
- ⁴² a) Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263; b) El-Sayed, M.; Ginski, M.; Rhodes, C.; Ghandehari, H. *J. Control. Release* **2002**, *81*, 355.
- ⁴³ Malik, N. R.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, K.; Lorenz, H.; Frey, J. W.; Weenerc, E. W.; Meijerc, W.; Paulusd, R.; Duncana, R. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 133.
- ⁴⁴ Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121.
- ⁴⁵ Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263.
- ⁴⁶ Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K.; Zera, R. T. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 53.
- ⁴⁷ a) Roberts, J. C.; Bhalgat, M. K.; Zera, R. T. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 53; b) Bourne, N.; Stanberry, L. R.; Kern, E. R.; Holan, G., B.; Matthews, B.; Bernstein, D. I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2471.

-
- ⁴⁸ Padilla De Jesús, O. L.; Ihre, H. R.; Gagne, L.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C. Jr. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 453.
- ⁴⁹ a) Rajanathanan, P.; Attard, G. S.; Sheikh, N. A.; Morrow, W. J. *Vaccine* **1999**, *17*, 715; b) Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Baker, G. R.; Saunders, M. J.; Grossman S. H.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1178.
- ⁵⁰ Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Saga, T.; Sato, N.; Hiraga, A.; Ishimori, T.; Konishi, J.; Togashi K.; Brechbiel, M. W. *Magn. Reson. Med.* **2001**, *46*, 781.
- ⁵¹ Tajarobi, F.; El Sayed, M.; Rege, B. D.; Polli, J. E.; Ghandehari, H. *Int. J. Pharm.* **2001**, *215*, 263.
- ⁵² El Saye, M.; Ginski, M.; Rhodes, C; Ghandehari, H. *J. Controlled Release* **2002**, *81*, 355.
- ⁵³ Malik, N.; Evagorou, E. G.; Duncan, R. *Anticancer Drugs* **1999**, *10*, 767.
- ⁵⁴ a) Balogh, L.; Swanson, D. R.; Tomalia, D. A.; Hagnauer, G. L.; McManus, A. T. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 18; b) Malik, N.; Duncan, R. *Dendritic-platinate drug delivery system US* **2003**, *6*, 585, 956; b) Malik, N.; Duncan, R. *Method of treating cancerous tumors with a dendritic-platinate drug delivery system US*, **2004**, *6*, 790, 437.
- ⁵⁵ a) Jansen, J. F. G. A.; Meijer, E. W.; de Brabander van den Berg, E. M. M. *Macromol. Symp.* **1996**, *102*, 27; b) Jansen, J. F. G. A.; de Brabander van den Berg, E. M. M.; Meijer, E.W. *Science* **1994**, *266*, 1226.

⁵⁶ a) Morgan, M. T.; Carnahan, M. A.; Finkelstein, S.; Prata, C. A. H.; Degoricija, L.; Lee S. J.; Grinstaff, M. W. *Chem. Commun.* **2005**, 4309; b) Dhanikula, R. S.; Hildgen, P. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 29.

⁵⁷ Ihre, H. R.; Padilla De Jesus, O. L.; Szoka, F. C. Jr.; Fréchet, J.M.J. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 443.

⁵⁸ Seebach, D.; Herrmann, G. F.; Lengweiler, U. D.; Bachmann, B. M.; Amrein, W.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2795.

⁵⁹ a) McGrath, D. V. *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2*, 253; b) Meijer, E. W.; van Genderen, M. H. P. *Nature* **2003**, *426*, 128.

⁶⁰ Shamis, M.; Lode, H. N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1726.

⁶¹ a) Bielinska, A.; Kukowska-Latallo, J. F.; Johnson, J.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R. Jr. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2176; b) Shah, D. S.; Sakthivel, T.; Toth, I.; Florence, A. T.; Wilderspin, A. F. *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 41.

⁶² a) Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka Jr. F.C. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 703; b) Tang, M. X.; Szoka, F. C. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 823. c) Dennig, J.; Duncan, E. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 339.

⁶³ Zhang, X.-Q.; Wang, X.-L.; Huang, S.-W.; Zhuo, R.-X.; Liu, Z.-L.; Mao, H.-Q.; Leong, K. W. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 341.

⁶⁴ Haag, R.; Kratz, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198.

⁶⁵ Wiener, E. C.; Brechbiel, M. W.; Brothers, H.; Magin, R. L.; Gansow, O. A.;

Tomalia, D. A.; Lauterbur, P. C. *Magn. Reson. Med.* **1994**, *31*, 1; b) Wiener, E. C.; Auteri, F. P.; Chen, J. W.; Brechbiel, M. W.; Gansov, O. A.; Schneider, D. S.; Belford, R. L.; Clarkson, R. B.; Lauterbur, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7774.

⁶⁶ Lee, T. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321.

⁶⁷ a) Lundquist, J. J.; Toone, E. J.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555; b) Stoddard, J. F.; Turnbull, W. B. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 231.

⁶⁸ Roy, R. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 255.

⁶⁹ a) Woller, E. K.; Cloninger, M. C. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7; b) Woller, E. K.; Cloninger, M. C. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1052.

⁷⁰ Baek, M.-G.; Roy, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 11.

⁷¹ Roy, R.; Baek, M.G. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 291.

⁷² Reuter, J. D.; Myc, A.; Hayes, M. M.; Gan, Z.; Roy, R.; Yin, D. Q. R.; Piehler, L. T.; Esfand, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R. Jr. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271.

⁷³ Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S. J.; Romanowska A. J. *Chem. Commun.* **1993**, 1869.

⁷⁴ Nagahori, N.; Lee, R.T.; Nishimura, S. I.; Pagé, D.; Roy, R.; Lee, Y. C.; *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 836.

-
- ⁷⁵ Zimmerman, S. C.; Wendland, M. S.; Rakow, N. A.; Zharov, I.; Suslick, K. S. *Nature* **2002**, *418*, 399.
- ⁷⁶ Shukla, S.; Wu, G.; Chatterjee, M.; Yang, W.; Sekido, M.; Diop, L. A.; Muller, R.; Sudimack, J. J.; Lee, R. J.; Barth, R. F.; Tjarks, W.; *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 158.
- ⁷⁷ Devasagayam, T. P.; Kamat, J. P. *Indian J. Exp. Biol.* **2002**, *40*, 680.
- ⁷⁸ Loutsch, J.; Ong, D.; Hill, J.; Mitra A.K. *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. Second Edition. Marcel Dekker. Inc., **2003**, New York, 467.
- ⁷⁹ FitzSimmons, S. *J. Pediatr.* **1993**, *122*, 1.
- ⁸⁰ a) Collins, F. S. *Science* **1992**, *256*, 774; b) Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B. S.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, J. L., Chou, M. L.; Drumm, M. C.; Collins, F. S.; Tsui, L.C. *Science*. **1989**, *245*, 1066.
- ⁸¹ Quinton, P. M. *Nature* **1983**, *301*, 421.
- ⁸² a) Smith, J. J.; Travis, S. M.; Greenberg, E. P.; Welsh, M. *J. Cell.* **1996**, *85*, 229; b) Goldman, M. J.; Anderson, G. M.; Stolzenberg, E. D.; Kari, U. P.; Zasloff, M.; Wilson, J. M.; *Cell* **1997**, *88*, 553.
- ⁸³ Lyczak, J. B.; Cannon, C. L.; Pier, G. B. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 194.
- ⁸⁴ Worlitzsch, D.; Tarran, R. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 317.

-
- ⁸⁵ Davis, P. B.; Drumm, M.; Konstan, M. W. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1996**, *154*, 1229.
- ⁸⁶ a) Henry, R. L.; Mellis, C. M.; Petrovic, L. *Pediatr. Pulmonol.* **1992**, *12*, 158; b) Corey, M.; Farewell, V. *Am. J. Epidemiol.* **1996**, *143*, 1007; c) Chastre, J.; Fagon, J. Y. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *165*, 867.
- ⁸⁷ Stover, C. K.; Pham, X. Q. *Nature* **2000**, *406*, 959.
- ⁸⁸ Wolfgang, M. C.; Kulasekara, B. R.; Liang, X.; Boyd, D.; Wu, K.; Yang, Q.; Miyada, C. G.; Lory, S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 8484.
- ⁸⁹ Kipnis, E.; Sawa, T.; Wiener-Kronish, J. *Med. Mal. Infect.* **2006**, *36*, 78.
- ⁹⁰ a) Davies, D. G.; Parsek, M. R.; Pearson, J. P.; Iglewski, B. H.; Costerton, J. W.; Greenberg, E. P. *Science* **1998**, *280*, 295; b) Erickson, D. L.; Endersby, R.; Kirkham, A.; Stuber, K.; Vollman, D. D.; Rabin, H. R.; Mitchell, I.; Storey, D. G. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 1783.
- ⁹¹ Anwar, H.; Strap, J. L.; Costerton, J. W. *Antimicrob. Agents. Chem.* **1992**, *36*, 1347.
- ⁹² Lamblin, G.; Lhermitte, M.; Klein, A.; Houdret, N.; Scharfman, A.; Ramphal, R.; Roussel, P. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1991**, *144*, S19.
- ⁹³ Lamblin, G.; Degroote, S.; Perini, J. M.; Delmotte, P.; Scharfman, A.; Davril, M.; Lo-Guidice, J. M.; Houdret, N.; Dumur, V.; Klein, A.; Roussel, P. *Glycoconj. J.* **2001**, *18*, 661.

-
- ⁹⁴ Goldstein, I. J.; Hugues, R.C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N. *Nature* **1980**, *285*, 66.
- ⁹⁵ Imberty, A.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. *Microb. Infect.* **2004**, *6*, 222.
- ⁹⁶ Garber, N.; Guempel, U.; Belz, A.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1116*, 331.
- ⁹⁷ Sadovskaya, I.; Brisson, J. R.; Lam, J. S.; Richards, J. C.; Altman, E. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *255*, 673.
- ⁹⁸ Sudakevitz, D.; Gilboa-Garber, N. *Microbios.* **1982**, *34*, 159.
- ⁹⁹ Cioci, G.; Mitchell, E. P.; Gautier, C.; Wimmerova, M.; Sudakevitz, D.; Perez, S.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 297.
- ¹⁰⁰ Imberty, A. Wimmerová, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 221.
- ¹⁰¹ Garber, N.; Guempel, U.; Gilboa-Garber, N; Doyle, R. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *48*, 331.
- ¹⁰² Sudakevitz, D.; Kostlanova, N.; Blatman-Jan, G.; Mitchell, E. P., Lerrer, B.; Wimmerova, M.; Katcoff, D. J.; Imberty, A.; Gilboa-Garber, N. *Mol. Microbiol* **2004**, *52*, 691.
- ¹⁰³ Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K. E. *Microbiology* **2005**, *151*, 1313.

-
- ¹⁰⁴ Adam, E. C.; Mitchell, B. S.; Schumacher, D. U.; Grant, G.; Schumacher, U. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **1997**, *155*, 2102.
- ¹⁰⁵ Rebiere-Huet, J.; Di Martino, P.; Hulen, C. *Can. J. Microbiol.*, **2004**, *50*, 303.
- ¹⁰⁶ a) Desmond, K. J.; Schwenk, W. F.; Thomas, E. *J. Pediatr* **1983**, *103*, 538; b) Reisman J. J.; Rivington-Law B.; Corey, M. *J. Pediatr* **1988**, *113*, 632.
- ¹⁰⁷ Greenwald, R. B. *J. Cont. Rel.* **2001**, *74*, 159.
- ¹⁰⁸ Brouwer, A. J., Mulders, S. J. E.; Liskamp, R. M. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1903.
- ¹⁰⁹ Najlah, M.; Freeman, S.; Attwood, D.; D'Emmanuele, A. *I. Int. Pharm.* **2006**, *308*, 175.
- ¹¹⁰ a) Huisgen, R. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613; b) Huisgen, R. *In 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* Padwa, A., Ed.; Wiley: **1984**, New York, 1, 1.
- ¹¹¹ a) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem, Int. Ed*, **2001**, *40*, 2004; b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- ¹¹² Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210.
- ¹¹³ Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radic, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem, Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053.
- ¹¹⁴ Prihar, H. S.; Behrman, E. J. *Biochemistry* **1973**, *12*, 997.

¹¹⁵ a) Cheng-An, T.; Suvam, S. K.; Shang-Cheng, H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8719; b) Mereyala, H. B.; Gurralla, S. B. *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 351.

¹¹⁶ Deguise, I.; Lagnoux, D.; Roy, R. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1321.

¹¹⁷ Sacchetti, J. C.; Baum, L. G.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10.

¹¹⁸ Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2.