
Chapitre 1

Exploration du concept de chimie combinatoire dynamique et de bibliothèques combinatoires virtuelles

1.1. Introduction

1.1.1. Aspects de la chimie combinatoire

La découverte de nouvelles substances bioactives, et plus particulièrement de molécules présentant des propriétés spécifiques en vue d'une application thérapeutique précise, repose sur la mise en œuvre de plusieurs stratégies : la synthèse en série de molécules individuelles soumises, l'une après l'autre, à des tests, notamment de leur activité potentielle pour une cible biologique donnée. Ces stratégies se sont développées sous l'approbation du précepte que notre aptitude à prédire des propriétés de molécules sur la base de leur structure est toujours à son début.^[23] Le besoin de découvrir rapidement et de manière productive des molécules dotées de nouvelles propriétés utiles a émergé ainsi dans le développement de la *chimie combinatoire*,^[24,25] révolutionnant les méthodes de travail en chimie médicinale. Plus de 10000 publications et 500 revues apparues durant les 15 dernières années témoignent du succès de ce domaine hautement pluridisciplinaire. Aujourd'hui, aucune entreprise pharmaceutique renoncerait à se servir pleinement de cet outil puissant et performant, indispensable à sa productivité et à sa compétitivité.

La chimie combinatoire implique la synthèse rapide d'un grand nombre de composants. Cette collection de molécules, appelée bibliothèque combinatoire, peut être un mélange chimique de composants ou un ensemble de composants individuels purs. Cette collection est ensuite soumise au criblage (« screening ») pour une activité biologique, permettant d'identifier d'éventuels composants actifs. D'une manière simplifiée, l'approche combinatoire est donc caractérisée par deux étapes principales : la *synthèse de la bibliothèque* et l'*identification du composant actif*.

La chimie combinatoire a ses racines conceptuelles dans le système immunitaire. Dans le corps, lorsqu'un antigène entre en contact avec la large collection d'anticorps existante,

l'anticorps capable de lier le mieux l'antigène est identifié et ensuite reproduit en grande quantité, déclenchant ainsi la réaction immunitaire.

1.1.1.1. La synthèse de bibliothèques combinatoires

La chimie combinatoire est la science de la *synthèse divergente* efficace. Plutôt que de n'utiliser qu'un seul réactif dans une réaction chimique, l'idée de base est de conduire des réactions avec plusieurs réactifs de départ à la fois, soit en parallèle (petites bibliothèques), soit avec des mélange (grandes bibliothèques ; > 10000 composants). Ainsi, toutes les combinaisons possibles sont formées systématiquement à chaque étape, générant une *bibliothèque* avec une *grande* population de composants à partir d'un *petit* nombre de réactifs de départ. La taille de la bibliothèque en nombre de composants croît de manière exponentielle avec le nombre de réactifs de départ et la quantité d'étapes mise en jeu. La *diversité* ainsi créée aux niveaux moléculaire et structural n'est, en principe, limitée que par la disponibilité et la diversité de ces réactifs de départ.

La synthèse combinatoire, également appelée synthèse à haute capacité (« high throughput synthesis »), a stimulé le développement de nouveaux outils puissants, notamment la synthèse hétérogène sur support solide.[26] Elle requiert de nouvelles méthodes de synthèse telles que par exemple la méthode « divide-couple-and-recombine » (« split method »)[27] (Schéma 1-1), permettant de contourner les problèmes de purification et d'isolation et de générer des bibliothèques avec une distribution statistique idéale (équimolaire) des composants. La chimie combinatoire met en jeu de faibles quantités de réactifs et requiert des méthodologies de synthèse efficaces et sélectives. Elle permet également une automatisation, en particulier l'utilisation des robots de synthèse, afin d'augmenter la productivité et d'optimiser la rentabilité.

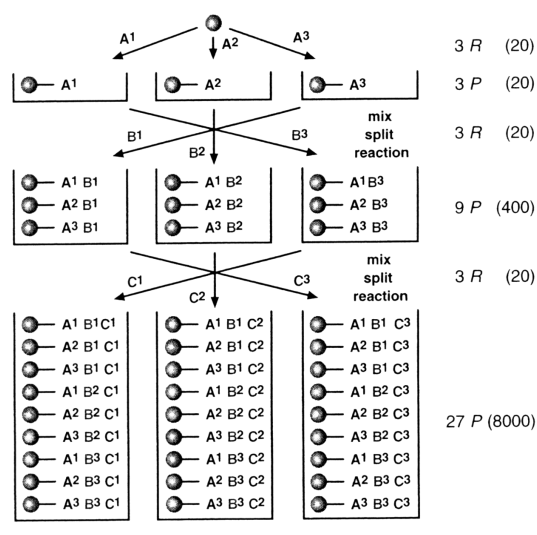


Schéma 1-1. Méthode «Split».

1.1.1.2. Conception de bibliothèques combinatoires et génération de diversité

Si l'on considère que le nombre total de composants organiques ayant une masse moléculaire inférieure à 750 g.mol⁻¹ est estimé à 10²⁰⁰,[‡] il est évident que, malgré le grand potentiel de la chimie combinatoire, il est impossible de synthétiser et de tester tous les composants potentiellement actifs. Un choix doit donc être fait par rapport aux réactifs de départ et aux produits désirés. La probabilité de trouver un composé actif augmente avec la diversité et la dissemblance des constituants de la bibliothèque. Il est important de souligner que la diversité d'une bibliothèque en nombre et en structure de composants est à distinguer de la variété qu'une telle bibliothèque présente pour une cible donnée. La variété dépend de manière critique du site

[‡] Ce chiffre est à comparer avec la masse de la terre de 6.10²⁷ g ou même avec la masse de l'univers de 2.5.10⁵⁵ g. (La plupart des molécules bioactives connues ont des masses molaires en dessous de 750.)

d'interaction moléculaire. Une bibliothèque combinatoire peut donc avoir une grande variété pour une cible donnée, mais aucune variété pour une autre.^[24e]

Si des informations structurales sur le site actif de la cible sont connues, l'évaluation des paramètres interactionnels à l'aide de méthodes assistées par ordinateur telle que la modélisation moléculaire, permet de concevoir intelligemment une bibliothèque ciblée (« rational design », « structure based combinatorial synthesis »). Ceci permet de focaliser la diversité des bibliothèques autour d'un point d'intérêt spécifique. Malheureusement, de telles informations structurales ne sont pas disponibles pour la plupart des cibles biologiques. C'est alors que les méthodes d'essai et d'erreur (« random design ») trouvent leur intérêt, essayant de couvrir le plus grand espace interactionnel possible en créant des bibliothèques avec des réactifs de départ les plus variés possibles. Le succès d'une telle démarche repose en grande partie sur un bon équilibre entre le nombre et la diversité des composés testés, les critères de diversité considérés devant rendre compte, dans la mesure du possible, des différentes propriétés susceptibles de moduler l'activité biologique. La composition des bibliothèques varie selon le but visé : la recherche d'une piste, c'est-à-dire d'un produit ayant une activité intéressante sur la cible donnée, ou l'optimisation d'une piste (Tableau 1-1).

Tableau 1-1. Caractéristiques de bibliothèques combinatoires.

Recherche de piste	Optimisation de piste
Bibliothèques aléatoires	Bibliothèques ciblées
Plusieurs cibles	Une cible ou une famille de cibles
Synthèse sur support solide (synthèse de bibliothèques de petites molécules)	Synthèse en solution/support solide (la structure de la piste détermine la chimie)
Synthèse « split » Mélanges de composants (« one bead, one compound »)	Synthèse parallèle automatisée Composants individuelles
>> 10000 composants	<< 10000 composants
< 1 mg par produit	> 1 mg par produit
Criblage de mélanges (avec déconvolution)	Criblage de composants individ. (avec décodage)

1.1.1.3. L'identification d'un composant actif

Le principe mathématique sous-jacent au concept de la chimie combinatoire est celui de l'avantage de parallélisme (« parallelism advantage »).^[28] Imaginons une bibliothèque de tripeptides composés à partir de 20 acides aminés. Cette bibliothèque contient alors un ensemble de $20 \times 20 \times 20 = 8000$ composants. Pour déterminer le composant actif dans cette bibliothèque, il suffit d'un maximum de $20 + 20 + 20 = 60$ expériences ($\equiv$ séquences de synthèse de sous-bibliothèques et leur criblage), au lieu de 8000 dans le cas de produits isolés. En plus de la réduction du nombre de tests, la rapidité et la sensibilité des tests biologiques ont été considérablement augmentées grâce au progrès en biologie moléculaire, en microbiologie et en technologie de gènes. Cela a permis la mise en place des systèmes automatisés de criblage à haut débit (« high throughput screening ») capables de tester les bibliothèques fournies par la synthèse combinatoire à haute capacité.

Le criblage de mélanges implique le développement de procédures pour identifier le composant actif. La déconvolution, l'utilisation de bibliothèques indexées, le balayage positionnel

et l'utilisation de bibliothèques codées (code chimique ou non-chimique) sont des techniques couramment utilisées^[24e] et ne seront pas détaillées ici.

Toutefois, dans le contexte du criblage de mélanges, deux méthodes récemment décrites méritent une courte présentation dans le contexte de ce chapitre. Il s'agit des méthodes de *sélection par affinité*. Elles permettent l'identification rapide d'une piste dans une bibliothèque combinatoire en tirant parti d'une discrimination des ligands lorsqu'ils s'associent à la cible. Une première méthode consiste à incuber une bibliothèque combinatoire avec le récepteur cible suivi d'une séparation par chromatographie d'exclusion de taille. Le récepteur, contenant le/des substrat(s) lié(s), est récupéré, son substrat libéré et analysé par spectrométrie de masse « electrospray ». La Figure 1-1 montre un exemple d'une telle sélection par affinité à l'aide d'un exemple de la littérature.^[29]

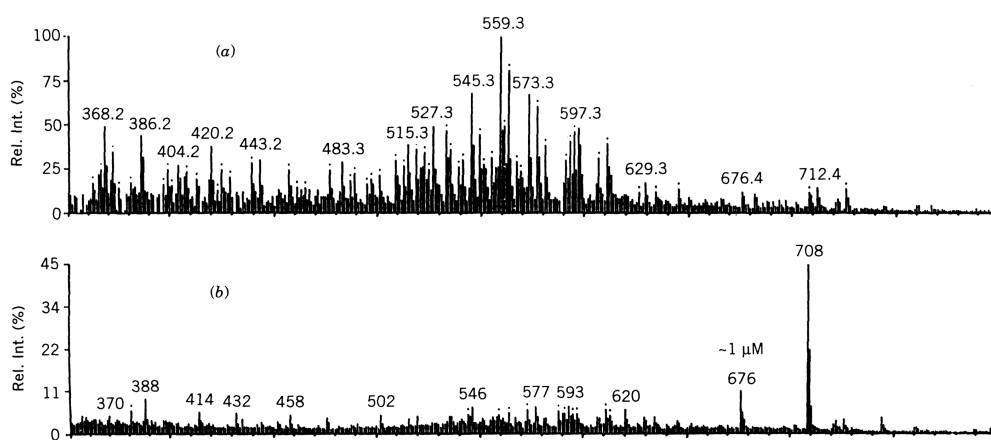


Figure 1-1. a) MS « Electrospray » d'une bibliothèque combinatoire de 600 composants. b) Bibliothèque de a) après la sélection par affinité avec un excès du récepteur. À constater le fort enrichissement et sélection du composant avec la masse 708.

Une autre méthode consiste à faire passer le mélange dans une phase sur laquelle la cible a été greffée. Cela conduit à la rétention sélective et à la séparation des meilleurs ligands suivies de leur identification par une analyse chimique.^[34c] Ce sont donc des méthodes de criblage qui se servent de la reconnaissance moléculaire non seulement pour détecter une affinité mais, à un niveau supérieur, pour isoler de la bibliothèque le(s) produit(s) ayant la plus grande affinité. On parle alors de « target-assisted screening » de mélanges combinatoires.

Il est important de noter certaines restrictions pratiques à la taille des mélanges criblés. Pfizer a montré que la complexité optimale pour le criblage de mélanges est d'environ 20 substances.^[30] En cas de complexité supérieure, le rapport signal sur bruit devient trop important, de plus en plus de tests faux-positifs apparaissent et le temps de déconvolution peut devenir trop important. C'est la raison pour laquelle en pratique, la synthèse parallèle automatisée de petites quantités de produits purs ou de mélanges simples par des robots de synthèse est souvent préférée à la préparation de mélanges complexes.

1.1.1.4. Résumé des caractéristiques les plus importantes de la chimie combinatoire

Une bibliothèque combinatoire 'classique' consiste en un ensemble réel de différents composants organiques discrets, covalents, chimiquement stables, préparés de manière irréversible à partir d'une collection d'unités de base (réactifs de départ) en appliquant des séquences répétitives de synthèse propres et quantitatives (cas idéal), afin de créer la plus grande

diversité structurale possible. Idéalement, cette bibliothèque statique est constituée de composants en fractions équivalents. Si le composant actif ne se trouve pas ou en quantité très faible dans le mélange, le criblage de la bibliothèque restera négatif, bien que tous les éléments pour construire le substrat idéal puissent être contenues dans l'ensemble des constituants de la bibliothèque. De plus, il y a stricte séparation entre la synthèse des bibliothèques, qui se fait en absence de la cible, et leur criblage. Le criblage, à son tour, implique des procédures de déconvolution et/ou d'encodage pour la détermination du composant actif dans la bibliothèque.

1.1.2. Le concept de chimie combinatoire dynamique - l'approche supramoléculaire à la chimie combinatoire

Récemment, un nouveau domaine de la chimie combinatoire s'est développé nommé *chimie combinatoire dynamique* (« Dynamic Combinatorial Chemistry » ≡ DCC). La DCC met en jeu des connections réversibles entre les unités de base (réactifs de départ) et les équilibres consécutifs entre les composants de la *bibliothèque combinatoire* dite *dynamique* (« Dynamic Combinatorial Library » ≡ DCL) ou *virtuelle* (« Virtual Combinatorial Library » ≡ VCL) ainsi formée. Le mot 'virtuel' a été délibérément choisi pour exprimer la notion qu'une VCL peut contenir ou exprimer *potentiellement*, mais *pas nécessairement*, toutes les combinaisons possibles réversibles entre les unités de base. La réversibilité permet la variation des proportions entre les composants de la bibliothèque et leur adaptation à des facteurs externes. Ainsi, le rajout d'une cible donnée à une VCL va sélectivement stabiliser le composant avec la plus forte affinité par des interactions non-covalentes attractives, entraînant le déplacement des équilibres en faveur de sa formation (Figure 1-2). La cible joue alors le rôle de « template ».[‡]

Cette *amplification dynamique* du meilleur substrat contraste avec le caractère statique de bibliothèques combinatoires 'classiques'. Synthèse combinatoire et criblage ne sont plus considérés comme des processus séparés, mais la synthèse des composants à l'équilibre thermodynamique est effectuée *en présence* de la cible, permettant de discriminer et d'identifier le composant avec les propriétés désirés comme *produit majeur* du mélange. Cette morphogenèse complémentaire peut être vu comme un processus de moulage de la cible par effet template. Selon que la cible soit un récepteur (concave) ou un substrat (convexe), on parle alors de coulage (« casting ») et de moulage (« molding »), respectivement. Eliseev et Lehn^[34e] ont également mis l'accent sur la ressemblance entre de tels processus et l'évolution Darwinienne où la génération du composant avec la plus grande affinité pour la cible est favorisée au sein du mélange, au détriment d'autres espèces. Figure 1-2 illustre le principe de la DCC.

1.1.2.1. Les caractéristiques de DCLs et VCLs

- La *réversibilité* est la caractéristique fondamentale de la DCC qui rend l'approche dynamique et permet la création de VCLs par l'interconversion permanente et spontanée de ses composants. C'est elle qui assure le caractère adaptatif d'une telle bibliothèque.

[‡] L'utilisation de ce terme anglo-saxon sera préférée plutôt qu'une traduction incomplète en français. Le terme le plus proche, matrice, ne permet que de recouvrir la notion de support physique de la réaction mais n'exprime pas la complémentarité entre formes.

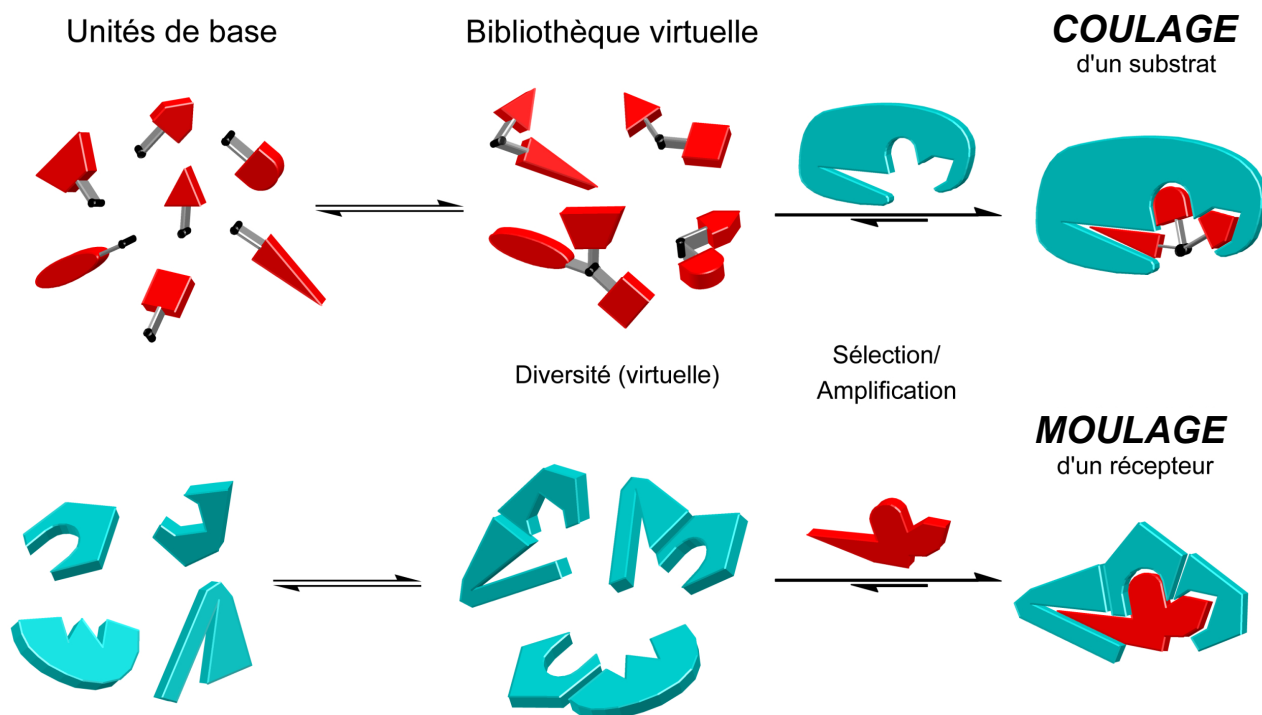


Figure 1-2. Principe du moulage dans des conditions thermodynamiques d'un substrat (« substrate casting ») ou d'un récepteur (« receptor molding ») en utilisant respectivement le substrat ou le récepteur en qualité de template.

- VCLs peuvent être de *nature moléculaire* ou *supramoléculaire* dépendant de leur mécanisme de formation réversible. Un processus d'assemblage covalent par des réactions chimiques covalentes résulte en une VCL moléculaire, tandis que l'auto-assemblage par interactions non-covalentes réversibles crée une VCL supramoléculaire.
- Le processus dynamique est conduit *en présence* de la cible et utilise une procédure de recherche thermodynamique qui contourne le besoin de synthétiser et cribler tous les composants possibles, laissant la cible diriger l'évolution du système envers le produit à plus forte reconnaissance moléculaire.
- Bien que désirable, une DCL isoénergétique, c'est-à-dire à énergie libre similaire pour tous les composants en absence de la cible, n'est pas obligatoire. Même si la formation à l'équilibre thermodynamique du bon substrat est défavorisé en absence de la cible, sa stabilisation par la dernière peut tout de même balancer les équilibres envers la formation de l'espèce désirée.

1.1.2.2. Réflexions sur les composants et processus mis en jeu

Le succès de l'implémentation du concept de DCC repose en grande partie sur l'élaboration de processus réversibles pour la génération de la diversité dynamique. La chimie offre un certain nombre de connections réversibles, covalentes ou non-covalentes, résumées en Figure 1-3.

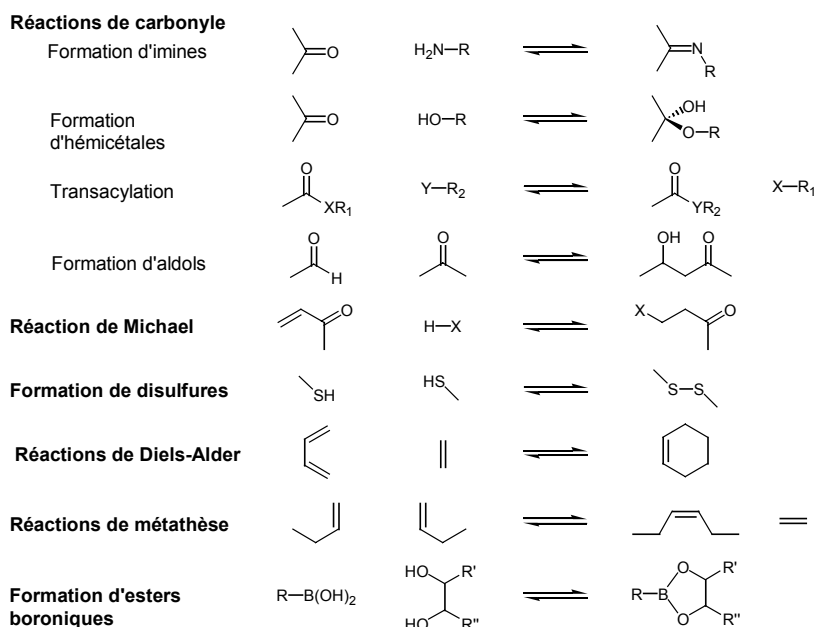
Au *niveau moléculaire*, le groupement réactif le plus intéressant est sans doute la fonction carbonyle, en particulier par condensation réversible avec des amines en imines, oximes ou hydrazones. Les réactions de transimination, -estérification et -amidation, mais aussi l'échange entre disulfures ou esters de boronates, ou encore des réactions de type Diels-Alder, condensation de Michael ou réactions de métathèse peuvent être de bons candidats. Ces réactions réversibles covalentes forment alors des bibliothèques de molécules. Au *niveau supramoléculaire*, la connexion

non-covalente réversible entre les composants peut être assurée par des liaisons hydrogène, par des interactions donneur-accepteur ou van-der-Waals ou par la coordination de métaux, menant à des bibliothèques de supermolécules. Le *niveau intramoléculaire* englobe tous les processus capables de générer la diversité dynamique par des modifications de formes et de dispositions spatiales tels que les équilibres conformationnels, configurationnels et structuraux.

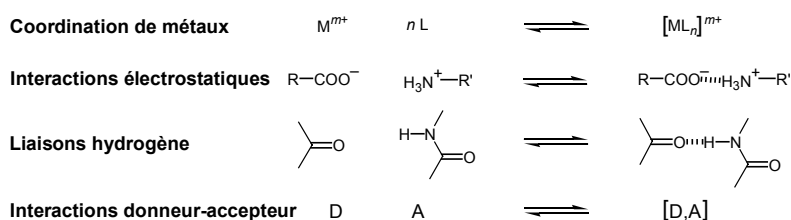
Les unités de base portent en plus de leur fonction réactive des groupements de reconnaissance avec la cible. Une proximité entre ces groupements peut parfois induire, par des effets électroniques, des différences entre réactivités des unités de base et stabilities relatives des composants à l'équilibre thermodynamique. Afin de réaliser des bibliothèques isoénergétiques, il peut être souhaitable de séparer, par l'introduction d'un espaceur, site de reconnaissance et fonction réactive.

Si les méthodes d'analyse ne permettent pas d'identifier le composant dans son complexe avec la cible, il est indispensable de disposer de méthodes pour bloquer les équilibres dans la bibliothèque en préservant les proportions des composants, afin de permettre une analyse du mélange sans crainte de perturbation des équilibres par le système analytique. Ainsi, des imines peuvent être réduites irréversiblement en amines ou stabilisées par augmentation du pH, par exemple.

Formation de liaisons covalentes réversibles



Interactions réversibles



Processus intramoléculaires réversibles

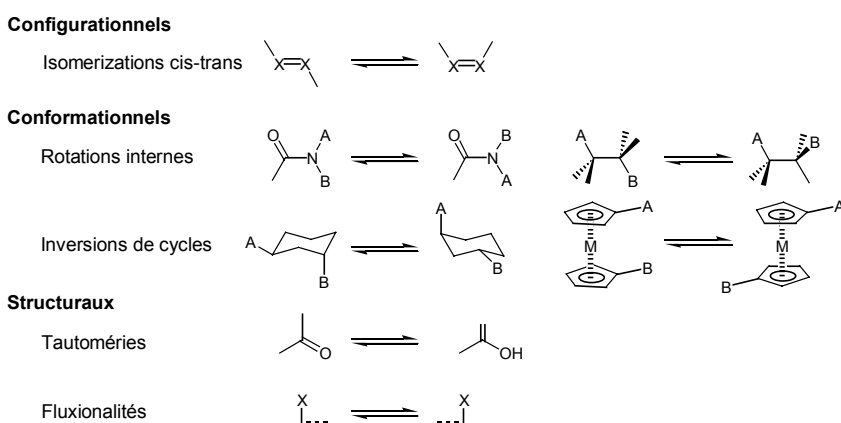


Figure 1-3. Sélection de processus réversibles potentiels pour la génération de VCLs moléculaires et supramoléculaires.

1.1.3. Diversité dynamique/virtuelle moléculaire et supramoléculaire : l'implémentation du concept de DCC – une brève revue

Bien avant la présentation du concept de DCC par Jean-Marie Lehn, l'effet template dans des conditions thermodynamiques, le principe de Le Chatelier sous-jacent, avait déjà été appliqué pour diriger sélectivement des équilibres d'isomères de stéroïdes,^[31a] porphyrines^[31b] et ionophores naturels^[31c] ainsi que pour générer des architectures bien définies par l'association dirigée non-covalente de groupement de reconnaissance. Ainsi, il a été démontré que le pré-assemblage réversible sous contrôle thermodynamique de nucléotides complémentaires promeut le couplage sélectif de fragments d'ADN.^[32] De plus, l'empreinte moléculaire (« molecular imprinting ») de petites molécules dans un support polymérique a été décrite comme une technique prometteuse pour la formation de nouveau supports pour la reconnaissance moléculaire et la catalyse.^[33]

Depuis la présentation du concept en 1996, de nombreux exemples de processus dynamiques, à voir la génération de diversité dynamique et des méthodes de sélection et amplification, ont été étudiés sous l'aspect de la chimie combinatoire dynamique dans différents domaines de la chimie organique et inorganique et de la biochimie. Les résultats prometteurs et le développement dans ce domaine ont déjà été commentés par un certain nombre de revues.^[34] De ce fait, la présentation suivante ne se veut pas complète, mais illustrative pour introduire le concept à l'aide de quelques exemples choisis.

1.1.3.1. Exemples des travaux de notre laboratoire

L'idée du concept de la génération de diversité moléculaire et supramoléculaire est née des études qui ont mis en évidence l'auto-sélection de ligands dans la formation de double-hélices à coordination métallique.^[35] Après le mélange des ligands, seuls les brins de même type (longueur) se mettent ensemble pour former quantitativement des homohélices, sans traces de hétérohélices également imaginables (*Figure 1-4*).

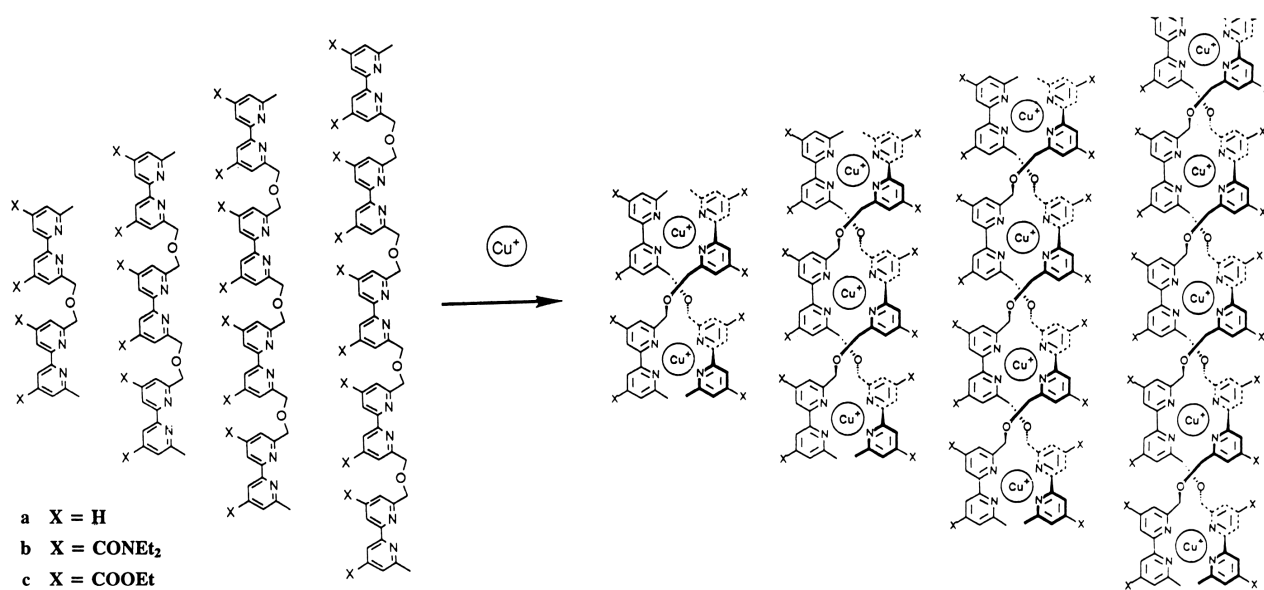


Figure 1-4. Auto-reconnaissance dans l'auto-assemblage de doubles hélices d'un mélange de brins oligobipyridines.

Ce processus est dynamique et combinatoire dans le sens de la réversibilité de la formation des auto-assemblages double-hélicoïdaux supramoléculaires, et du fait de la sélection quantitative du partenaire correct.

Le concept a ensuite été constaté dans le contexte de l'auto-assemblage d'hélicates circulaires.^[36a,b] Ce sont des complexes métalliques circulaires capables de lier un substrat anionique à l'intérieur de leur cavité. La forte complémentarité entre l'ion chlorure et la cavité formée par les ligands oriente les équilibres vers une seule espèce, le *pentamère* cyclique, bien que de nombreux auto-assemblages circulaires ou polymériques soient potentiellement envisageables. Quand la réaction est conduite en présence de sulfate ferreux ou de bromure ferreux, un *hexamère* cyclique est quantitativement formé. Sulfate et bromure sont des anions plus volumineux que le chlorure et agissent peut-être aussi comme des templates, mais il se peut que l'hexamère soit simplement la structure thermodynamiquement la plus stable du fait de la disposition des fonctionnalités sur la molécule. Il est intéressant de noter que dans ce système, les conditions thermodynamiques de coordination du fer ferreux par une bipyridine sont sévères (170°C). Dans des conditions plus douces, des hélicates non circulaires sont obtenus comme produits cinétiques de la réaction^[36c] (Figure 1-5).

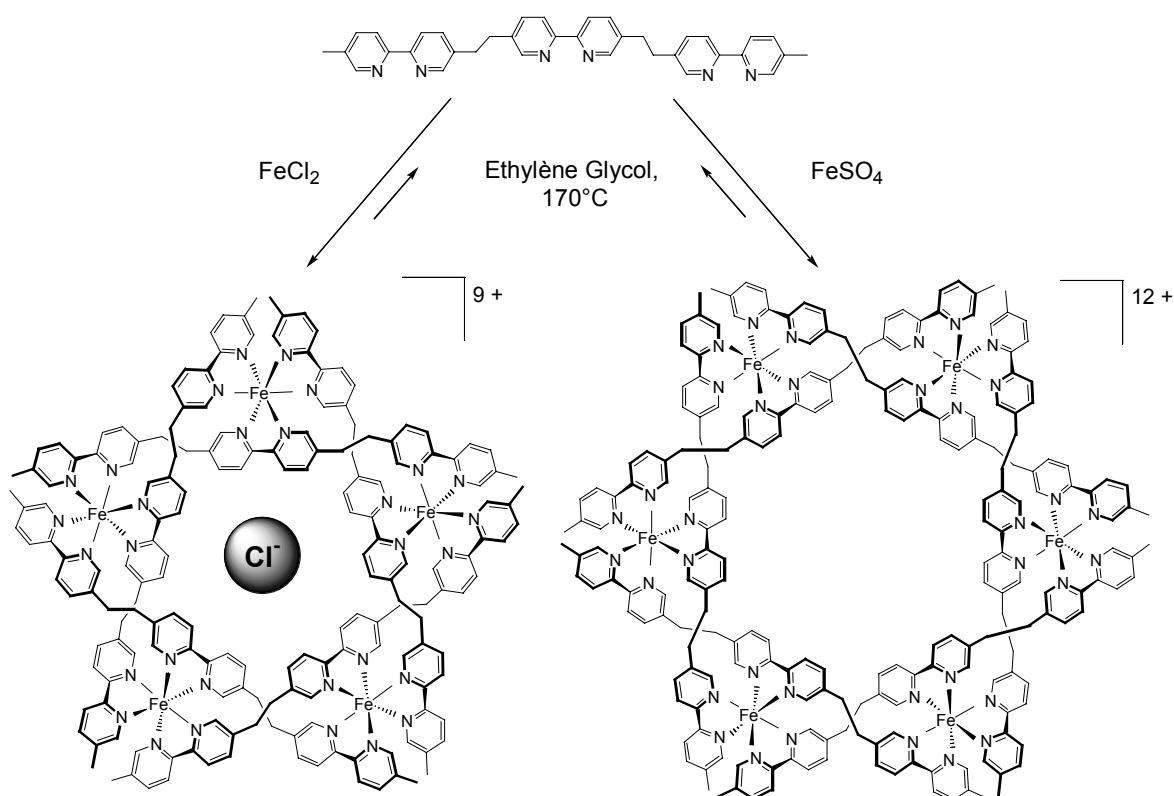


Figure 1-5. Formation d'hélicates circulaires à partir d'un ligand tris-bipyridine, et de fer ferreux. Orientation quantitative de la réaction vers le pentamère ou l'hexamère en fonction de l'anion chlorure ou sulfate.

Le premier exemple bio-organique,^[37] permettant de présenter le concept de DCC/VCL en détail, porte sur un processus de moulage d'un substrat (casting) à l'aide de l'enzyme anhydrase carbonique (AC). Il se base sur une VCL d'imines générée à partir de la réaction réversible entre 3 aldéhydes et 4 amines. Les aldéhydes et amines mis en jeu ont été sélectionnés de manière à ce que certaines des 12 imines formées présentent des caractéristiques structurales et interactionnelles proches de celles d'un inhibiteur connu de l'anhydrase carbonique (CA) (Figure 1-6).

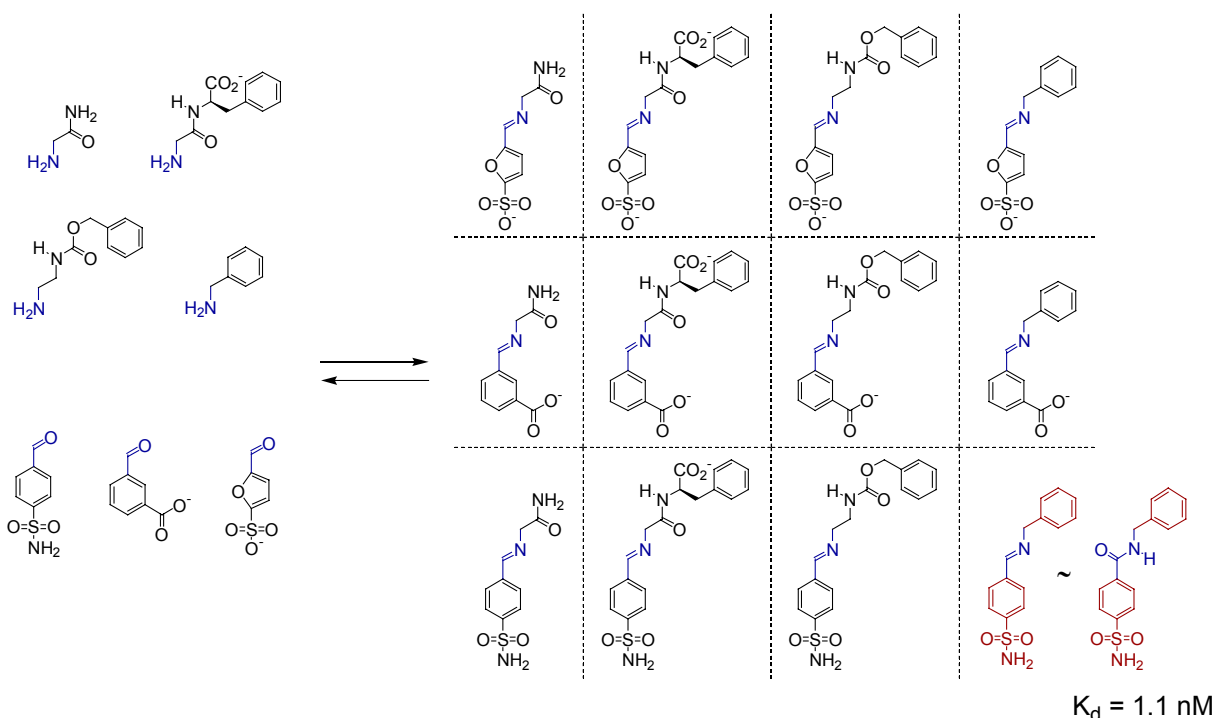


Figure 1-6. Bibliothèque dynamique d'imines formées à partir de trois aldéhydes et quatre amines. Un composant de la bibliothèque est quasi isostructural d'un inhibiteur connu de la CA.

Les imines peuvent être réduites de manière irréversible en amines dans des conditions douces (NaBH_3CN) permettant d'analyser la composition de la bibliothèque par HPLC. Les deux chromatogrammes représentés en Figure 1-7 révèlent la composition du mélange préparé en absence de CA et présence d'un équivalent de CA. Comme attendu, la présence de l'enzyme n'a pas eu d'influence sur les proportions des produits n'ayant aucune affinité pour elle, mais a amplifié par un facteur 2.5 la proportion du meilleur inhibiteur dans le mélange (++).

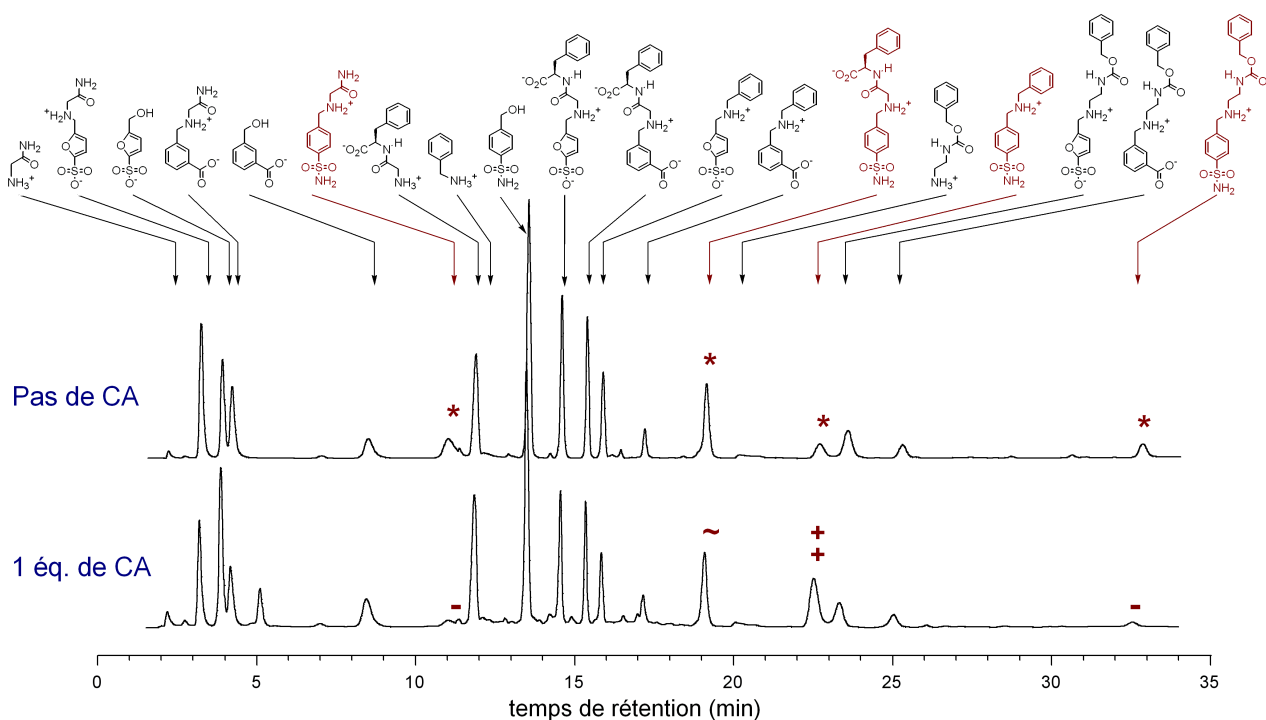


Figure 1-7. Chromatogrammes HPLC après réduction des bibliothèques à l'équilibre sans et avec l'enzyme.

Une autre étude biochimique concerne l'expression préférentielle du 'meilleur' substrat d'une DCL isoénergétique de saccharides, générée par l'échange entre disulfures, en présence de l'enzyme concanavalin A (*Figure 1-8*).^[38] L'enzyme est immobilisée sur un support solide d'aragose, ce qui permet l'isolation des membres ayant la plus forte reconnaissance moléculaire par un mécanisme de sélection par affinité (cf. 1.1.1.3) et leur analyse, après libération du support, par HPLC.

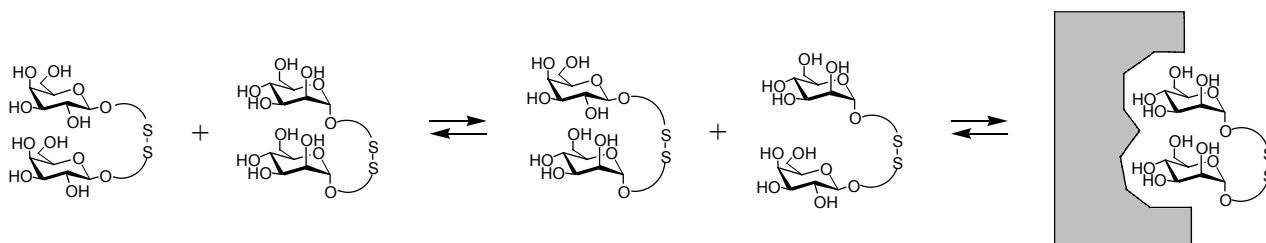


Figure 1-8. Représentation simplifiée des membres équilibrants de la VCL de saccharides et de la sélection (de la structure bis-mannose) par l'enzyme.

D'autres travaux menés au sein de notre équipe ont conduit à l'auto-assemblage dirigé de récepteurs, à base de complexes métalliques de bipyridines substituées, en présence d'un substrat,^[39] ou encore à l'auto-assemblage adaptatif réalisé par la formation et l'interconversion de metallocyclophanes polynucléaires en fonction de la concentration et du solvant (cf. 1.2., *Figure I-4*).^[22]

1.1.3.2. Autres contributions

Le groupe de Sanders *et al.* a produit de nombreux exemples concernant la génération et d'identification de bibliothèques combinatoires dynamiques.^[40] Une première approche repose sur l'utilisation de la réaction de transestérification réversible sous catalyse basique pour former des bibliothèques combinatoires dynamiques de macrocycles. Ainsi, l'oligomérisation d'un hydroxyester dérivé de la quinine^[40b] conduit à un mélange contenant plus de 80% de produits cycliques (*Figure 1-9 a*). La tendance de cyclisation émane de facteurs entropiques et enthalpiques qui facilitent une réaction intramoléculaire par rapport à une réaction intermoléculaire. L'abondance particulière du trimère comparé à celle des autres isomères cycliques reflète une prédisposition liée à la géométrie de la molécule.

Cette prédisposition peut être tellement importante qu'elle conduit quantitativement à un seul produit. Ceci est le cas de la transestérification réversible d'un dérivé de la cinchonidine sous contrôle thermodynamique,^[40d] où uniquement le trimère est formé (*Figure 1-9 b*). Il est important de noter que ce n'est *pas* la formation de l'espèce trimérique qui est plus rapide que la formation d'autres oligomères (les réactifs sont tous identiques, le trimère linéaire est flexible, et donc n'est pas particulièrement préorganisé pour cycliser). C'est plutôt la dégradation du trimère qui est *défavorisée* par rapport à la dégradation d'autres produits.

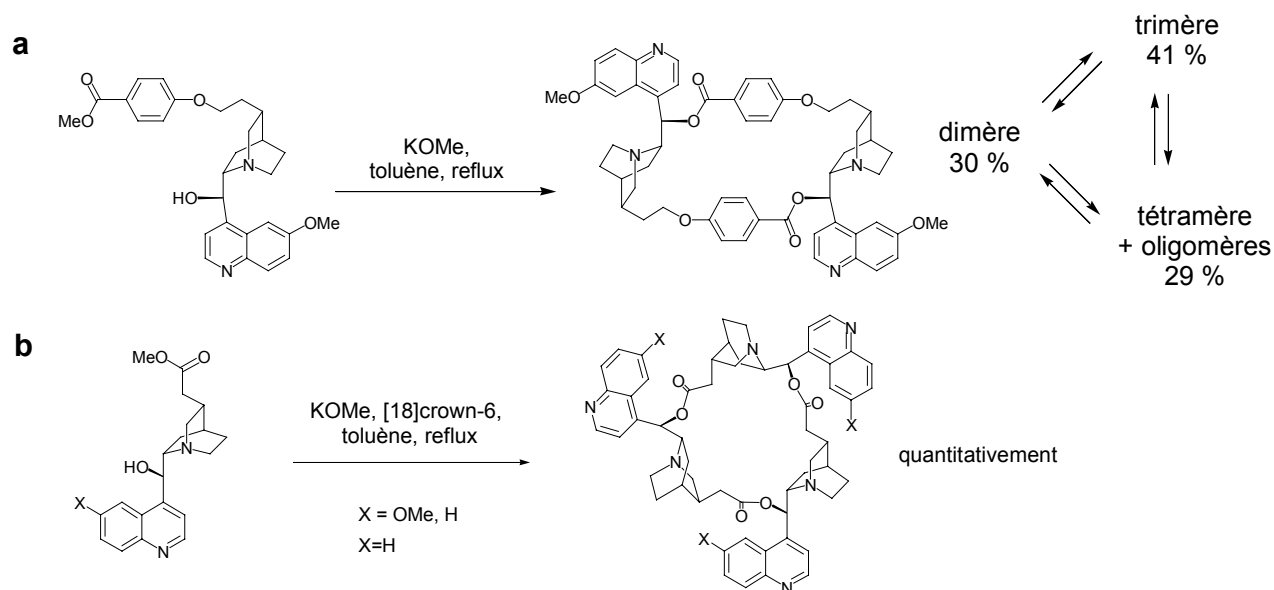


Figure 1-9. a) Équilibre entre oligomères cycliques d'un hydroxyester dérivé de la quinine. b) Formation quantitative à l'équilibre thermodynamique d'un trimère d'un dérivé de la cinchonidine.

Une autre bibliothèque de macrocycles de stéroïdes (Figure 1-10), générée par transestérification d'oligocholates substituées par des chaînes latérales de polyéthers, est plus intéressante dans le sens qu'elle montre une faible réponse à l'ajout d'ions de métaux alcalins. La présence d'ions Na^+ , par exemple, favorise la formation de tétramères et de pentamères au détriment de la formation du trimère.^[40c]

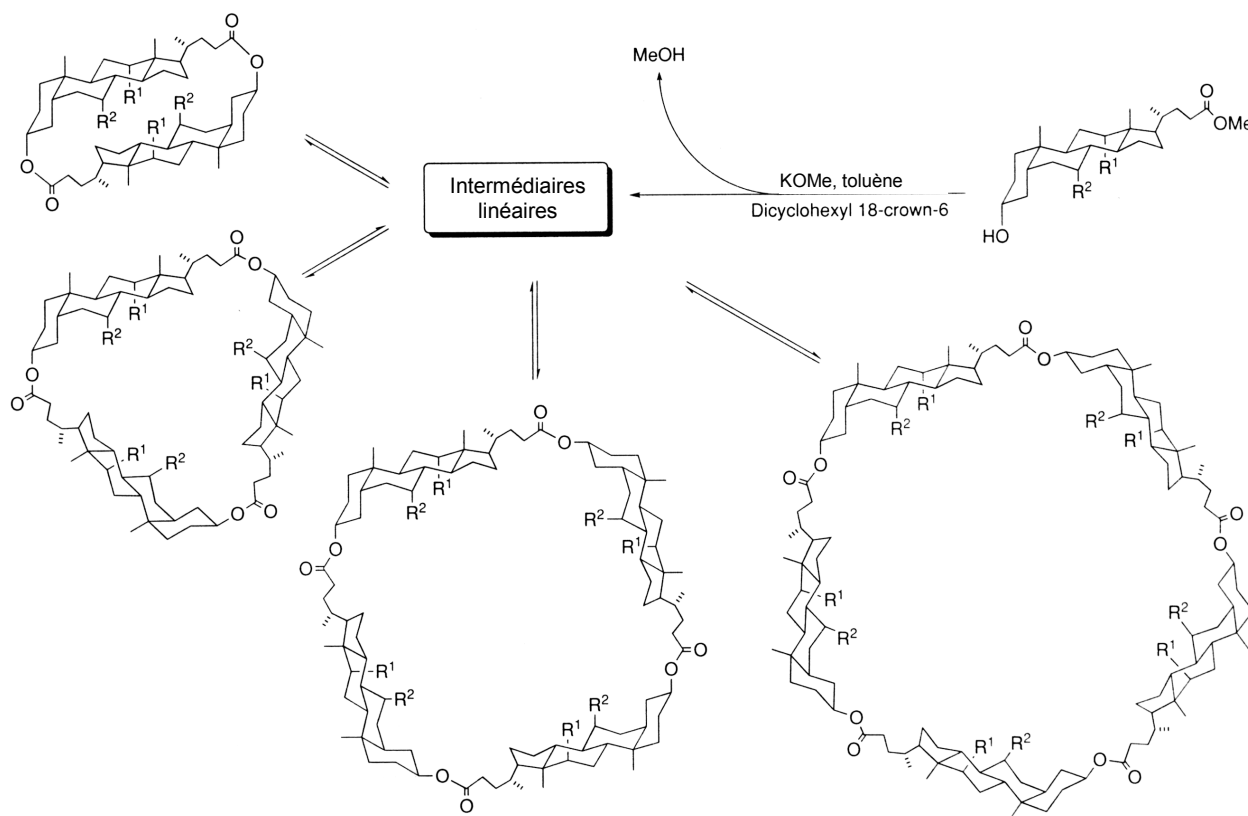


Figure 1-10. Mélange d'oligomères cycliques de stéroïdes en équilibre.

La variation sélective de la composition d'une VCL par le moulage d'un biopolymère a été testée par Miller *et al.* à l'aide d'un mélange dynamique de ligands potentiels de l'ADN à base de complexes de zinc.^[41] Un ensemble de salicylaldimines monomériques a été utilisé pour générer 36 différents complexes bidentates de Zn(II). Le rajout de la cible immobilisée (poly(dAT)-ADN) déplace les équilibres en faveur du complexe Zn(S1)₂ présentant la plus grande affinité, et identifié par une série d'expériences de contrôle (Figure 1-11).

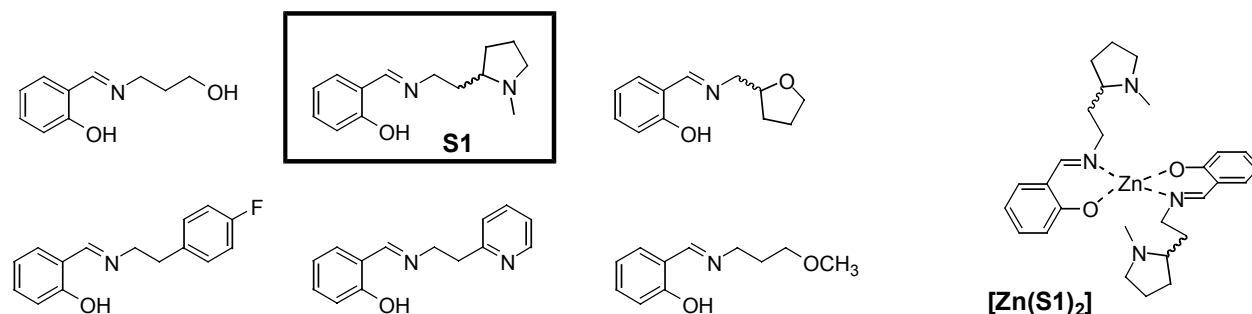


Figure 1-11. Salicylaldimines synthétisées pour la génération d'une VCL de 36 complexes de Zn(II).

Still *et al.* ont démontré un déplacement sélectif d'équilibres à l'exemple dans la formation réversible de disulfures (Figure 1-12).^[42] Le récepteur – le tripeptide Pro-L-Val-L-Val-L – connu pour sa forte affinité pour le disulfure A-SS-A, a été immobilisé sur un support solide de polystyrène. Si A-SS-C, formé par couplage de A-SH et C-SH, est disproportionné sous les conditions d'échange de disulfures en absence du tripeptide, on obtient 35% de A-SS-C et 65% de A-SS-A et C-SS-C. La présence (en excès) du tripeptide conduit, dans les mêmes conditions d'échange, à la formation presque exclusive (95%) de A-SS-A et C-SS-C, la majorité du A-SS-A étant lié à la résine de tripeptide. Une amplification similaire du récepteur le plus efficace est observé par la dismutation de A-SS-B.

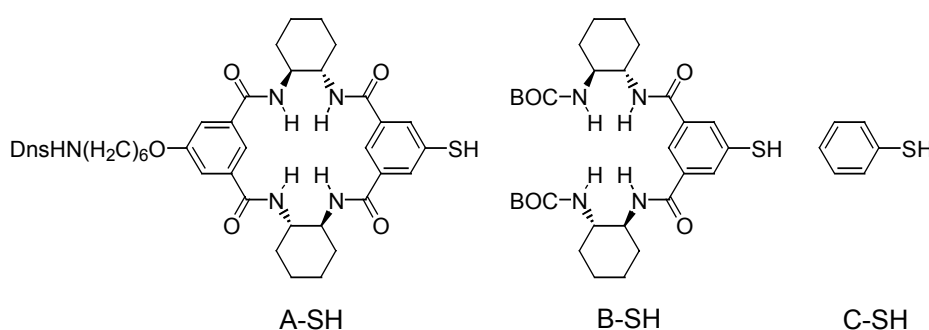


Figure 1-12. Unités de base pour la formation réversible de récepteurs macrocycliques de tripeptides.

Le groupe de Reinhoudt *et al.* s'est récemment consacré à la génération de mélanges dynamiques de structures auto-assemblées par liaisons hydrogène^[43] et a récemment publié un très bel exemple décrivant les processus de sélection et d'amplification.^[43d] Les représentations schématiques en Figure 1-13 illustrent le processus d'auto-assemblage d'un mélange dynamique à 4 composants, à partir duquel la proportion du récepteur capable de lier un substrat organisateur est amplifié quantitativement.

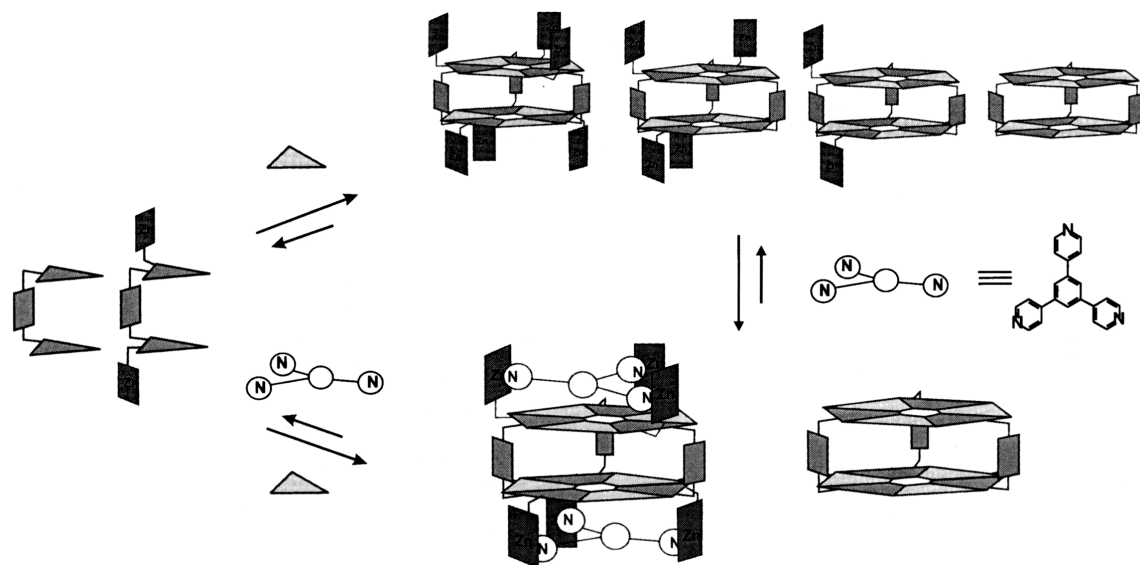


Figure 1-13. Représentation schématique de la formation des auto-assemblages à l'équilibre en absence (en haut) et en présence (en bas) d'un substrat cible.

Pour compléter cette présentation, un certain nombre de citations supplémentaires doivent être faites de travaux basés sur des concepts similaires.

- Le criblage d'une bibliothèque dynamique de peptides par affinité pour un anticorps agissant comme piège moléculaire.^[44] Cet exemple est particulièrement intéressant car la génération de diversité dynamique est basée sur l'activité d'une protéase, la thermolysine, qui peut catalyser à la fois la formation et la coupure de liaisons peptidiques.
- La formation d'un site récepteur de dipeptides par réarrangement de tensioactifs, portant de multiples motifs de reconnaissance à liaisons hydrogène, organisés dans une monocouche (à l'interface air-eau).^[45]
- Des exemples d'auto-assemblage de structures cycliques inorganiques dont la formation est fonction d'un substrat organisateur.^[46]
- Un exemple de diversité à base de fluxionalités et de configurations par la reconnaissance moléculaire dynamique de complexes de métaux comportant des résidus de sucre en présence de lectines.^[47]
- La génération de bibliothèques d'oligopeptides par l'appariement réversible d'oligonucléotides greffés par des unités peptidiques.^[48]

1.1.4. Diversité dynamique/virtuelle intramoléculaire : équilibres conformationnels et configurationnels et processus d'ajustement induit

Des composés recherchés dans une bibliothèque combinatoire doivent à la fois (a) contenir une combinaison de motifs de reconnaissance complémentaires à ceux de la cible et (b) permettre de positionner et d'orienter ces groupements dans l'espace pour interagir de manière optimale avec la cible. Typiquement, seule la première condition est prise en compte dans l'élaboration de bibliothèques combinatoires ou dans les exemples de VCLs/DCLs présentés auparavant. La question de savoir comment ces groupements sont disposés dans l'espace est souvent négligée.

Ceci est un oubli fondamental, surtout dans le contexte de la recherche de produits bioactifs interagissant avec des cibles hautement complexes, dont la structure, la propriété et la fonction biologique dépendent de manière capitale de leur repliement dans une conformation clé.^[49] Il est donc clair que la compréhension de la fonction biologique d'une molécule requiert la description de sa conformation en plus de sa composition et de sa configuration. Or, la conformation fait en quelque sorte le lien entre composition moléculaire et fonction moléculaire.

Des isomérisations conformationnelles[‡] et configurationnelles[†] sont des processus réversibles par essence. Des rotations internes, des inversions de cycles, des isomérisations de double-liaisons sont des équilibres thermiques ou photochimiques (*Figure 1-3*). Ces processus dynamiques intramoléculaires ne sont pas passés inaperçus dans le contexte de leur exploitation en chimie combinatoire dynamique. Suit une brève présentation illustrée de quelques exemples décrits où des mélanges à base de processus dynamiques intramoléculaires ont été explorés pour leur aptitude à sonder des interactions.

Eliseev *et al.* ont conduit des études illustrant comment les équilibres photochimiques entre isomères configurationnels peuvent être dirigés par la reconnaissance moléculaire de l'arginine.^[50] L'orientation relative de fonctions carboxylates comme groupes de reconnaissance est modulée par l'isomérisation photochimique de deux double-liaisons. La bibliothèque dynamique est donc composée de trois espèces : les isomères *E/E*, *E/Z* et *Z/Z*. Le dernier a une affinité pour l'arginine bien plus élevée que les autres. Le mélange est alternativement exposé à l'arginine immobilisée qui retient son 'meilleur' récepteur, et à l'irradiation rétablissant l'équilibre photostationnaire initial. Après 30 cycles d'irradiation et de chromatographie d'affinité, la phase stationnaire contient un mélange (en %) 2 : 13 : 85 *E/E* : *E/Z* : *Z/Z*. Ce chiffre est à comparer avec la population des isomères à l'équilibre photostationnaire : 17 : 31 : 52. La sélection et le déplacement des équilibres peuvent être clairement constatés. L'amplitude de l'effet n'est pas spectaculaire considérant bien que l'expérience soit conduite, d'une manière itérative, en de nombreux cycles de sélection et d'équilibration, du fait que la constante d'association du complexe récepteur-substrat n'est que de $K_d = 980 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ (*Figure 1-14a*).

Lindsey *et al.* ont décrit l'évolution d'un mélange dynamique d'isomères de *meso*-tétrakis(*o*-aminophényl)porphyrine vers la formation de l'isomère désiré par affinité à la silice.^[51] Dans un système analogue, développé par Ogoshi *et al.*, les quatre conformères $\alpha\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta\beta$, $\alpha\beta\alpha\beta$ de *més*o-tétrakis(2-hydroxyphényl)porphyrine peuvent être caractérisés par RMN, grâce à la lenteur de leur équilibration.^[52] À température ambiante dans le chloroforme, le rapport des proportions de ces quatre espèces est de 1.0 : 4.4 : 2.2 : 0.8, respectivement. L'addition d'un template approprié, la tétraméthoxy-*p*-benzoquinone, entraîne le déplacement de l'équilibre en faveur du constituant $\alpha\alpha\alpha\alpha$, présentant la plus grande affinité pour le substrat. Sa proportion dans le mélange augmente de 12.5% à 80% (*Figure 1-14b*).

‡ 'Conformation' comprend tout arrangement spatial des atomes d'une molécule de constitution et de configuration données. La conformation peut être modifiée par rotation (rapide) autour d'une ou de plusieurs liaisons simples.

† 'Configuration' décrit l'arrangement spatial des atomes qui distingue les stéréoisomères (isomères de même constitution), dont l'isomérisation n'est pas due à des différences de conformation.

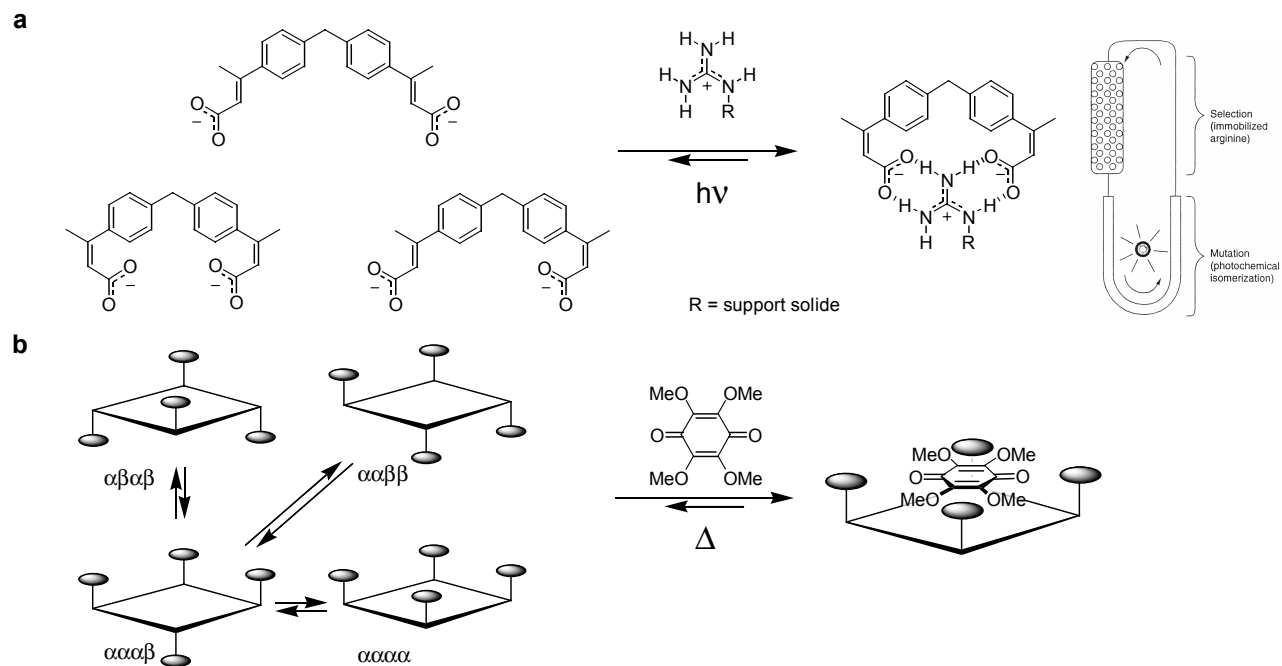


Figure 1-14. Deux exemples de la sélection de récepteurs par orientation relative dans l'espace de leurs groupements de reconnaissance par reconnaissance moléculaire.

D'autres exemples méritent d'être mentionnés dans ce contexte comme l'utilisation des équilibres entre isomères d'un complexe porphyrine-cerium(IV) à double étage,^[53] et la stabilisation de conformations défavorisées des *cis*-rotamères C-N d'amides secondaires^[54a] et de carbamates.^[54b]

Les cas présentés sont donc des exemples où la diversité est générée non pas par assemblage de composants multiples moléculaire ou supramoléculaire, mais par des différents états géométriques des groupements de reconnaissance d'une seule molécule. Une molécule « flexible » peut donc être décrite comme un ensemble à l'équilibre de différentes combinaisons (DCL) de conformations et de configurations, capable de s'adapter de manière structurale spécifique lors de l'interaction avec une cible. Pour chaque combinaison, les fonctions de reconnaissance ont des orientations relatives spécifiques et déterminent un point distinct dans l'espace interactionnel accessible à la molécule. Le changement de conformations provoqué par la cible, notamment la conformation des enzymes quand elles lient un substrat, est bien connu en biochimie sous le nom d'ajustement induit (« induced fit »).^[55] Cette notion étend les concepts classiques de 'clé et serrure' « lock and key principle or template principle » de Emil Fischer^[56] par la notion dynamique conformationnelle. Jusqu'à présent, des changements conformationnels associés à l'interaction d'un ligand selon un mécanisme par ajustement induit ont été mis en évidence pour beaucoup d'enzymes et de récepteurs biologiques. L'adaptation structurale peut être insignifiante, mais peut aussi atteindre une envergure stupéfiante comme pour l'hexokinase liant un substrat glycosidique (Figure 1-15).^[57] Des travaux mimant ces processus d'adaptation structurale à l'aide de systèmes synthétiques ont contribué en grande partie à une meilleure compréhension des phénomènes biologiques.^[58]

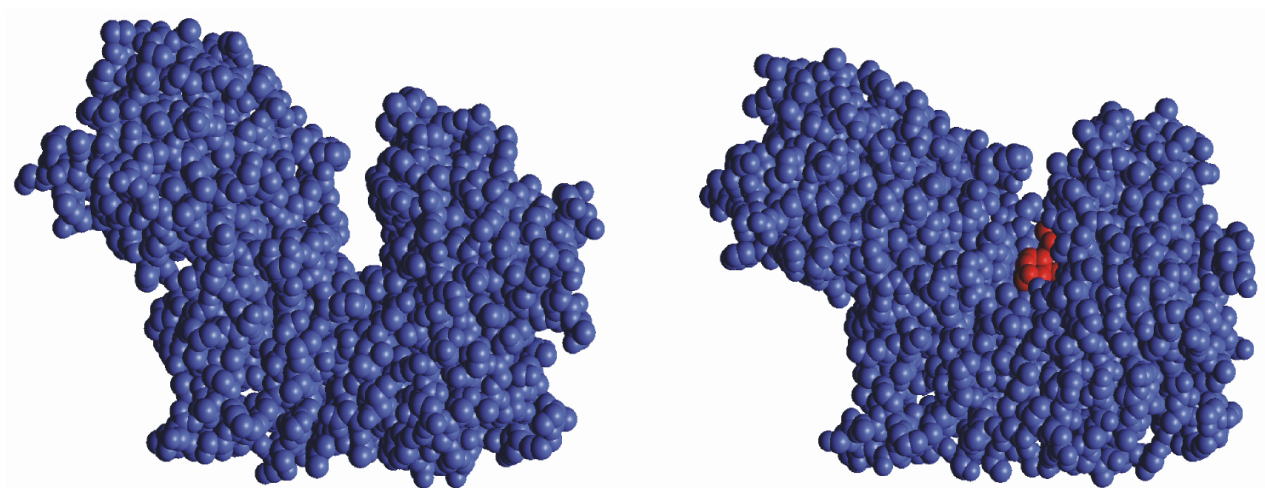


Figure 1-15. Non seulement la conformation du site actif mais l'intégralité de la structure de l'hexokinase (bleu) est considérablement modifiée, si la molécule de glucose (rouge) est liée. Les deux lobes de l'enzyme se replient pour enfermer le substrat.

1.2. Sélection par ajustement induit d'un récepteur de barbiturate à partir d'une bibliothèque combinatoire dynamique d'isomères de conformation et de configuration^[59]

La brève revue présentée en 1.1 a permis de montrer le grand potentiel de la chimie combinatoire dynamique. Elle a relevé le rôle important des considérations de dispositions dans l'espace des fonctionnalités au sein d'une même molécule pour la conception d'un récepteur ou d'un substrat convenable. Nous nous sommes donc consacrés dans un premier temps à l'étude d'un système modèle simple et illustratif, pour démontrer le principe de moulage d'un récepteur par ajustement induit par un substrat approprié, tel que l'acide barbiturique, c'est-à-dire la possibilité de sélection et d'amplification à partir d'une diversité conformationnelle/configurationnelle intramoléculaire à l'équilibre thermodynamique à l'aide de motifs de reconnaissance à liaisons hydrogène. Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication.^[59]

1.2.1. Le système modèle et la génération de diversité structurale

Le système développé est basé sur les équilibres entre les différents produits de condensation de la 5,5-diméthyl-1,3-cyclohexanedione **1** et de la 2-hydrazinopyridine **2** (Schéma 1-2). Mélangés dans une stoechiométrie 1 : 2 dans le chloroforme, ces deux réactifs génèrent une bibliothèque d'au moins six produits issus de mono- et dicondensations, ainsi que la 2-hydrazinopyridine **2** non-réagie. La dicondensation conduit aux isomères Z/Z (**4**), E/E (**4b**) et E/Z (**4c**) de dihydrazones. Les tautomères conjugués de ces dihydrazones, **4d** et **4e**, n'ont pu être identifiés, mais leur formation et leur présence virtuelle dans le mélange ne peuvent pas être exclues. La formation des dihydrazones n'est pas quantitative à l'équilibre. Le mélange contient également une quantité importante des isomères E (**4f**) et Z (**4g**) de la monohydrazone-monocétone, ainsi qu'un tautomère ènehydrazino-cétone **4h**.

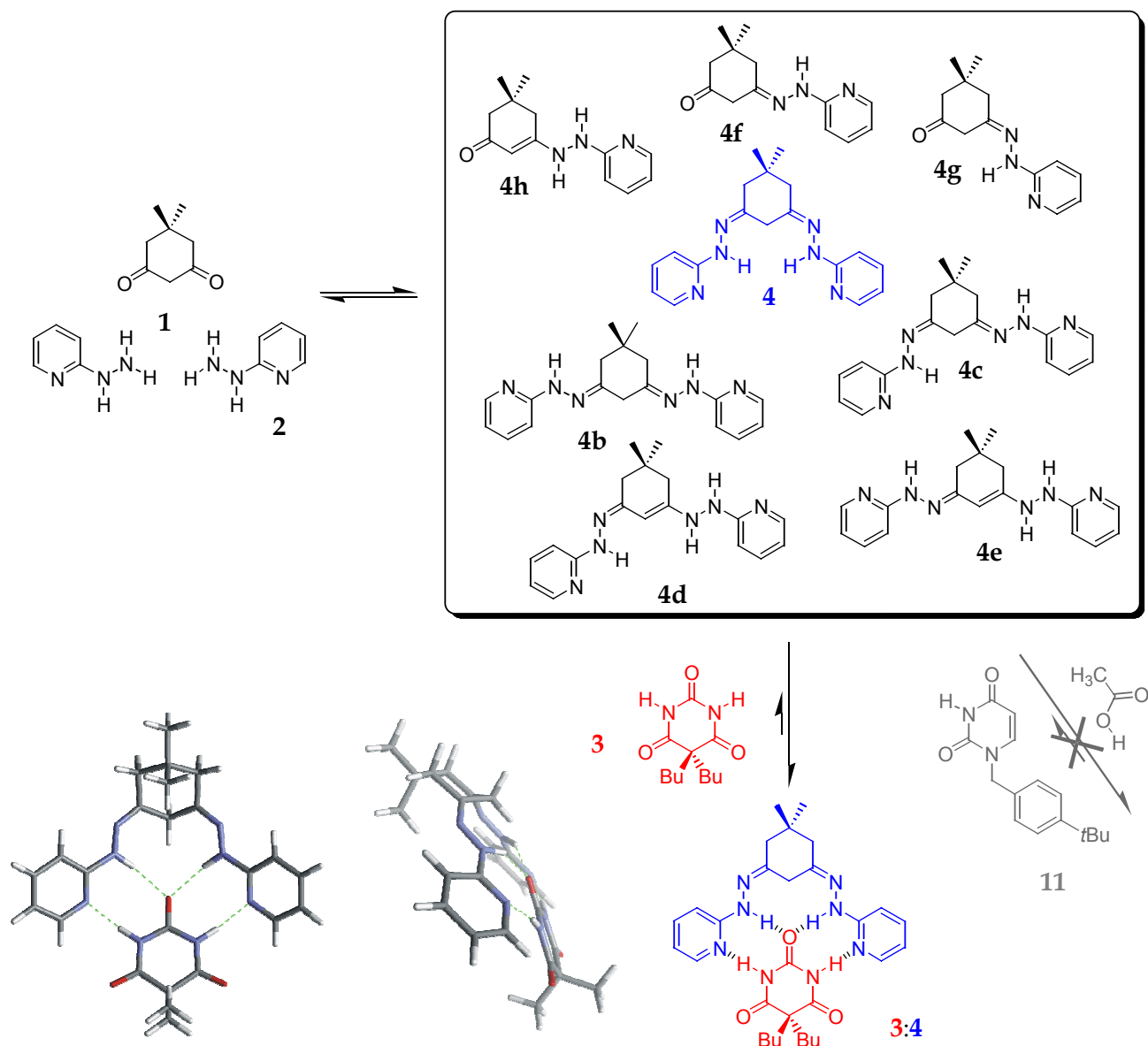


Schéma 1-2. Mélange de produits à l'équilibre issu de la réaction entre dione **1** et hydrazine **2** et sélection de l'isomère Z/Z par l'association avec un dérivé de l'acide barbiturique **3** rajouté. En bas à gauche : vue en plan et vue de côté du complexe **3:4** minimisé (avec le champs de force Amber*, MacroModel).

L'identification de ces composants est basée sur une analyse minutieuse du mélange par RMN et spectrométrie de masse en utilisant **1** et **2** en proportions variables. Plusieurs processus d'équilibration entre ces produits peuvent être évoqués : tautomérie, isomérisation *cis/trans* thermique de la double-liaison d'hydrazone, hydrolyse de dihydrazones en monocétohydrazones, ou encore transamination^[60] par la 2-hydrazinopyridine **2** non-réagie.

La complexité du mélange est bien illustrée par son spectre proton (Figure 1-17a). L'équilibration entre les composants est lente par rapport au temps de la RMN. En conséquence, le spectre contient de nombreux signaux dont seulement une attribution partielle à des différentes espèces est possible.

Sur le plan méthodologique, la question de savoir lequel de ces produits a la plus grande affinité pour un dérivé de l'acide barbiturique **3** peut être résolue de plusieurs manières :

1) La modélisation. La représentation tridimensionnelle du *Schéma 1-2* indique que la structure de l'isomère *Z/Z* est favorable pour pouvoir interagir avec un substrat de type **3** en formant quatre liaisons hydrogène fortes d'angles 170° et 154° et de longueurs 2.86 Å et 3.01 Å.

2) La méthode systématique. Elle consisterait à isoler les produits les uns des autres et à tester séparément leur affinité respective, ce qui n'est *a priori* pas possible du fait même de l'équilibre entre les composants de la bibliothèque. Par contre, le rajout d'un barbiturate **3** dans le mélange devrait être susceptible de déplacer les équilibres vers les produits avec lesquels il forme un complexe stable et ainsi conduire à leur identification.

1.2.2. Moulage par ajustement induit

Le dosage du mélange dynamique des divers isomères et tautomères avec le dibutylbarbiturate **3** conduit effectivement à la disparition progressive des différents produits et à l'apparition concomitante d'une seule nouvelle espèce, illustré par la simplification des spectres RMN du proton (*Figure 1-17b-d*). À un équivalent de barbiturate rajouté, cette nouvelle espèce a quasi quantitativement remplacé le mélange de départ. Elle est caractérisée par un spectre proton fin (*Figure 1-17e*). Un seul ensemble de signaux aromatiques indique l'équivalence des noyaux aromatiques, ce qui suggère une structure symétrique de l'espèce formée. L'isomère *Z/Z* (**4**) avec des groupes NH d'hydrazone convergents a pu être caractérisé, sans équivoque, par une forte corrélation NOE entre l'hydrogène NH et le H-2' du cyclohexane dans le complexe. Aucune corrélation a été observée avec les H-4' et H-6' du cyclohexane, suggérant l'absence des deux autres isomères **4b** et **4c** (*Figure 1-16*). Le barbiturate peut en effet former quatre liaisons hydrogène avec l'isomère **4**, alors que son association aux autres produits du mélange est limitée à deux liaisons hydrogène. C'est la différence d'énergie entre ce complexe à quatre liaisons hydrogène et les complexes à deux liaisons hydrogène qui est mise en balance pour déplacer les équilibres.

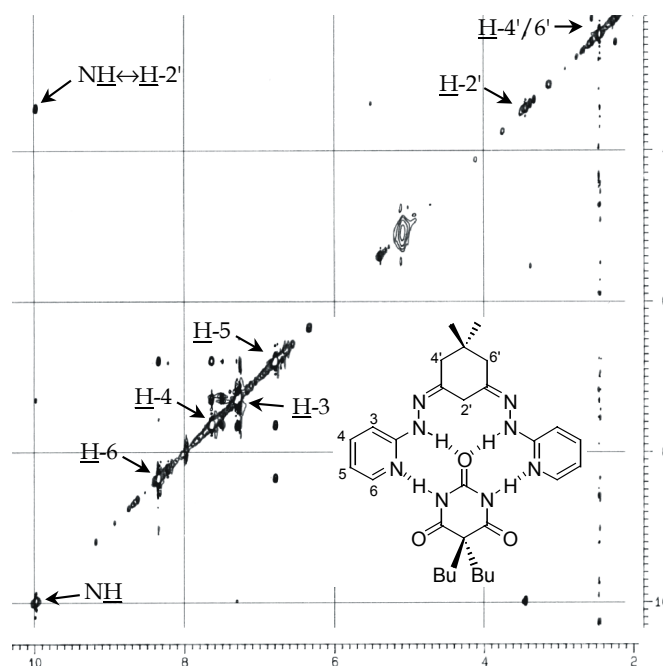


Figure 1-16. Spectre NOESY 500 MHz du complexe **3:4**.

1.2.2.1. Amplitude de l'effet et spécificité de l'association

L'amplitude de l'effet du barbiturate **3** sur le mélange est remarquable. Non seulement les équilibres d'isomérisation conformationnelles sont déplacés vers **4**, l'isomère *Z/Z*. Mais aussi, le barbiturate provoque la réaction des produits de monocondensation restants avec l'hydrazinopyridine non-réagie. Ceci peut clairement être suivi dans les expériences de titration avec le barbiturate par la disparition du signal de l'alcène à 5.38 ppm.

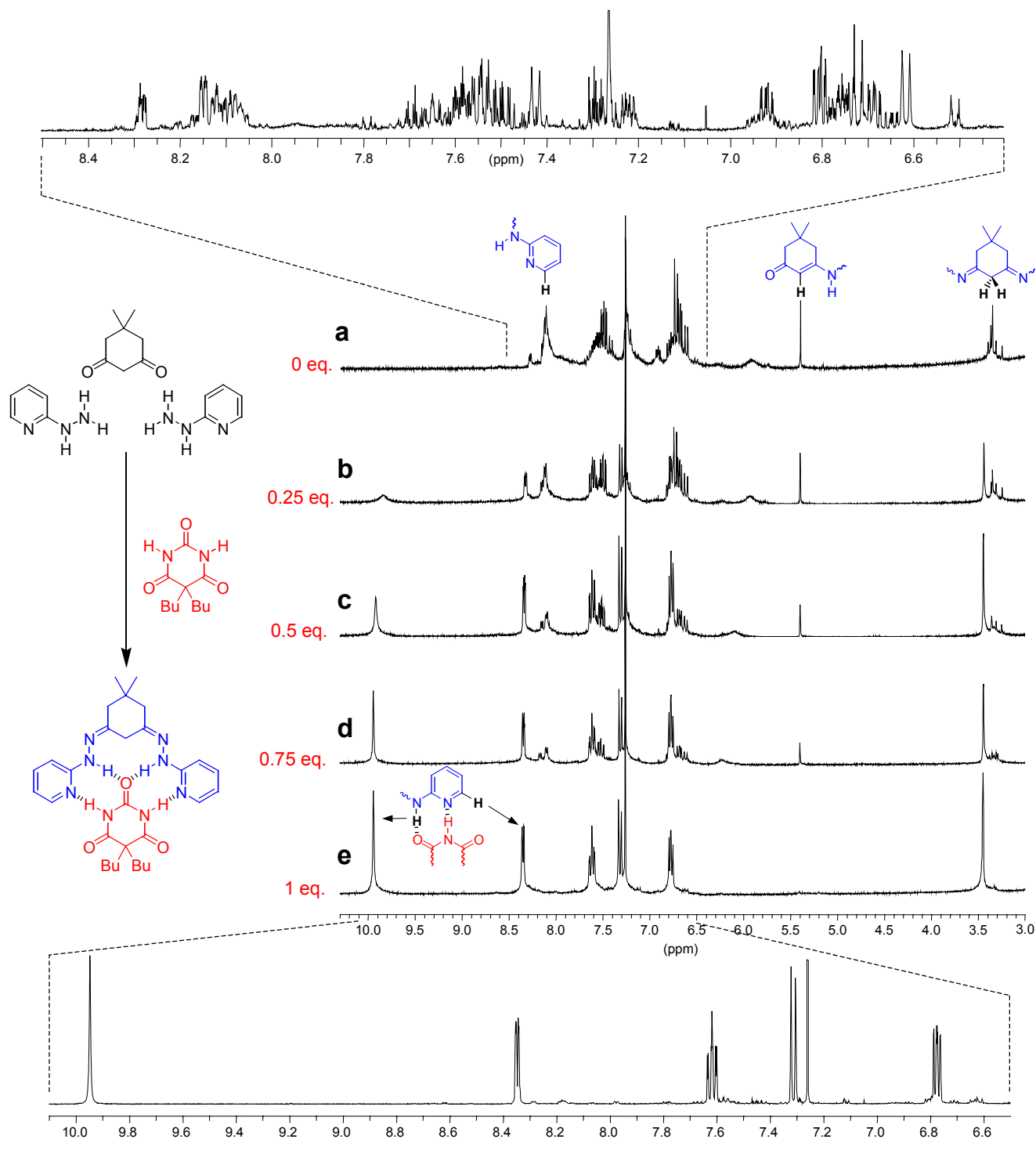


Figure 1-17. a) Spectre RMN du proton (300 MHz) ($\delta = 3.0 - 10.5$ ppm) du mélange dans CDCl_3 après 2 jours d'équilibration de la 5,5-diméthyl-1,3-cyclohexanedione **1** (1 éq.) et de la 2-hydrazinopyridine **2** (2 éq.) sous atmosphère inerte d'argon. Pour une meilleur illustration de la complexité du mélange de produits, la région aromatique $\delta = 6.4 - 8.5$ ppm est représentée (500 MHz). b) - e) Évolution du spectre après addition progressive de dibutylbarbiturate **3** (0.25, 0.50, 0.75, 1.0 éq.). Les structures indiquent l'attribution de quelques signaux. Pour démontrer la pureté du complexe **3:4** formé, la région de $\delta = 6.5 - 10.1$ ppm, prise au spectromètre RMN 500 MHz, est représentée.

De plus, la spécificité de l'association avec le barbiturate a pu être démontrée à l'aide des expériences qui consistent à équilibrer le mélange avec d'autres produits susceptibles d'interagir avec les groupements de reconnaissance du récepteur. L'acide acétique et la 4-*t*-butyl-

benzyluracile **11** ont été choisis. Ces composés ont des acidités comparables à celle de **4** ($pK_a(\text{barbiturate}) = 4-5$) mais n'ont pas la même complémentarité pour le récepteur car il leur manque des éléments de reconnaissance. Leur présence, en quantités stoechiométriques, dans le mélange laisse la proportion des produits à l'équilibre inchangée. Quelques variations des déplacements chimiques de signaux, dues à des interactions non-spécifiques, sont observés mais aucun enrichissement en une espèce n'est observable (Schéma 1-2).

1.2.2.2. Détermination quantitative de la stabilité du complexe **3:4** et preuve de la réversibilité des équilibres décrits

La stabilité du complexe **3:4** est révélée par un certain nombre d'observations et d'expériences. De manière qualitative, les signaux du NH barbiturique ($\delta = 13.71$ ppm), du NH de l'hydrazone ($\delta = 9.95$ ppm) et du H-6 de la pyridine ($\delta = 8.34$ ppm) sont nettement déblindés dans le spectre RMN du proton à température ambiante. De plus, de zéro à un équivalent, l'addition de barbiturate induit le moulage quantitatif du récepteur. À basse température, en dessous de 256 K, un échange lent au temps de la RMN entre le barbiturate lié et libre peut être observé, si ce dernier est rajouté en excès. Ainsi, à quatre équivalents de **3** (40 mM, 256 K), le pic (intégrant pour 1) du NH barbiturique complexé est de $\delta = 14.30$, tandis que le signal du NH barbiturique libre (intégrant pour 3) est situé à $\delta = 10.69$ ppm. Une expérience de dilution d'une solution du complexe **3:4** de 10 mM à 0.156 mM n'occasionne aucune variation des déplacements chimiques dans les spectres du proton et aucune apparition d'autres isomères après 6 heures, ce qui implique une constante d'association $K_a(\mathbf{3:4})$ supérieure à $6400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Comment cette constante d'association peut donc être déterminée ? Il a été constaté lors de multiples expériences de titration que la formation quantitative du complexe **3:4** à partir du mélange d'isomères n'est pas instantanée, mais requiert en moyenne 12 à 24 h pour être quantitative dans le chloroforme deutéré. Si nous disposions d'un autre récepteur de barbiturate avec une constante d'association connue et située dans le même ordre de grandeur que **4**, une expérience de compétition devrait nous renseigner et nous permettre de quantifier la constante d'association par lecture directe des déplacements chimiques dans le mélange.

Hamilton *et al.* ont publié un grand nombre d'études portant sur différents récepteurs artificiels de dérivés barbituriques.^[61] Ainsi, la synthèse d'un tel récepteur **9**, peut être effectuée en trois étapes à partir de diméthyl 5-hydroxyisophtalate **5** (Schéma 1-3).

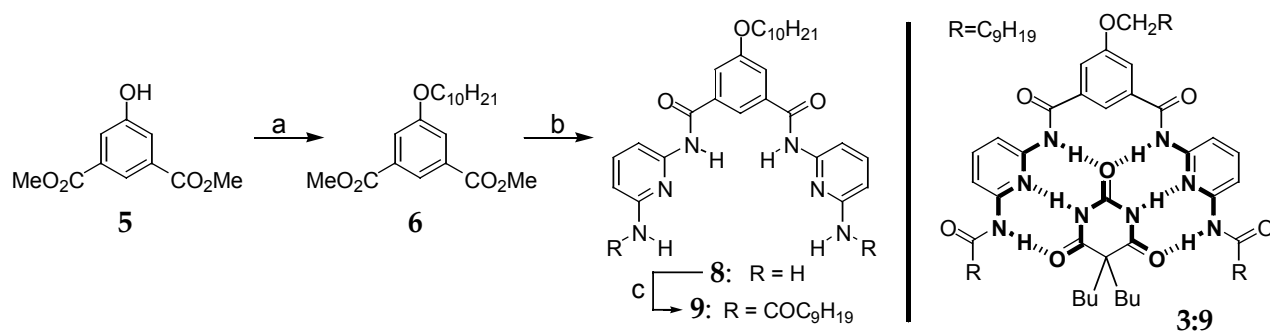


Schéma 1-3. À droite : synthèse du récepteur compétitif **9**. a) $\text{BrC}_{10}\text{H}_{21}$, DMF, K_2CO_3 , r.t., 41% ; b) **7**, $n\text{-BuLi}$, THF, -78° , 91% ; c) $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{COCl}$, Et_3N , THF, 0° , 84%. À gauche : structure du complexe **3:9**.

L'isophtalate **5** est soumis à des conditions d'O-alkylation avec le bromure de décyle et K_2CO_3 dans le DMF à température ambiante. Le diméthyl 5-decyloxyisophtalate **6** ensuite est réagi avec un excès de monosel de lithium de la 2,6-diaminopyridine **7** dans le THF anhydre à $-78^\circ C$. La diamine **8** ainsi obtenue est diacylée avec le chlorure de décanoyle en THF à température ambiante. Le récepteur **9**, soluble dans le chloroforme grâce à ces longues chaînes alkyles, est obtenu avec un rendement de 32% pour les trois étages.

La constante d'association pour le complexe **3:9** dans $CDCl_3$ a été déterminée par titration par RMN. (Un protocole typique de titration est décrit en 5.2.4.) **3** a été ajouté progressivement dans une solution de **9** (1 mM) et la variation des déplacements chimiques (échange rapide) des deux protons amides (NH) du récepteur suivie et interprétée avec le logiciel *Chem-Equili* (cf. 5.2.3., p. 175) (Figure 1-18). La titration est en parfait accord avec une stoechiométrie 1 : 1 de l'association. De plus, la valeur issue des calculs, $\log K_a(\mathbf{3:9}) = 4.75 (\pm 0.02)$ ou $K_a(\mathbf{3:9}) \sim 58100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, est comparable à celles obtenues pour des systèmes voisins.^[61b]

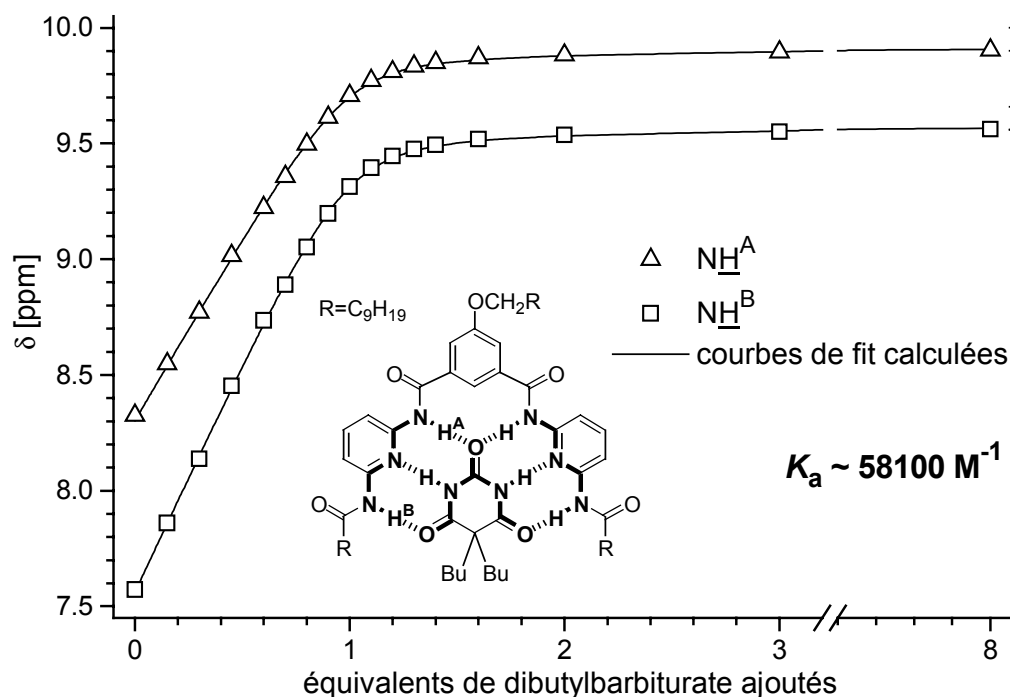


Figure 1-18. Courbes de titration de **9** (1 mM, $CDCl_3$) avec **3**. Variation des déplacements chimiques des deux NH d'amides en fonction du nombre d'équivalents de **3** ajoutés. Les lignes droites représentent les courbes de fit calculées pour les séries de points expérimentaux. Le graphe montre l'excellente correspondance entre les données observées et les valeurs calculées.

Une première indication qualitative permet de délimiter la constante d'association pour le complexe **3:4**. Quand **9** (1 éq.) est présent dans le mélange équilibrant de **1** et **2**, l'addition de **3** ne favorise pas la formation de l'isomère Z/Z **4**. Ceci implique que le barbiturate a une plus grande affinité pour **9**, étant principalement impliqué dans la formation du complexe **3:9** et laissant le mélange de produits généré par **1** et **2** pratiquement inchangé. Cette observation implique une constante d'association pour $K_a(\mathbf{3:4})$ inférieure à $K_a(\mathbf{3:9})$.

Cette affinité plus grande du barbiturate pour le récepteur **9** a été confirmée par une série d'expériences de compétition. Si **9** (1 éq.) est rajouté dans une solution préformée de complexe **3:4**, le mélange contient, peu de temps après l'addition, quatre composants : les complexes **3:4** et **3:9**, ainsi que les récepteurs libres **4** et **9**. Les proportions entre ces espèces, déterminées à partir

des valeurs des déplacements chimiques des NH de **9**, nous permettent de déterminer la constante d'association pour le complexe **3:4** à $K_a(\mathbf{3:4}) \sim 15000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\log K_a(\mathbf{3:9}) = 4.18$) (Figure 1-19a-d).

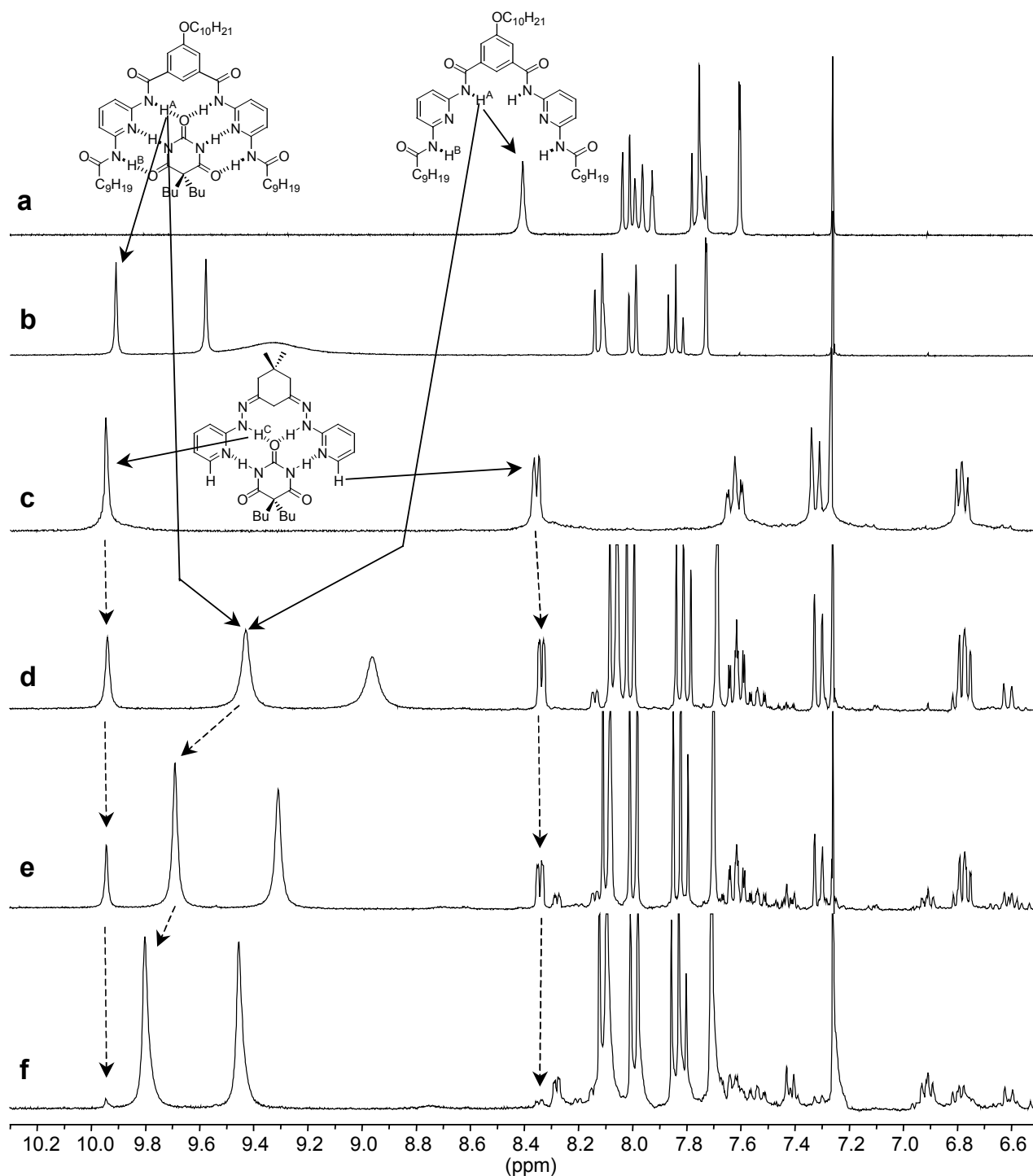


Figure 1-19. Spectres proton (300 MHz, 10 mM). a) **9** libre ; b) **9** avec **3** en excès (40 mM) ; c) complexe **3:4** (une journée d'équilibration) ; d) spectre de c) 1 heure après addition de 1 éq. de **9** ; e) spectre de c) une journée après addition de 1 éq. de **9** ; f) spectre de c) 5 jours après l'addition de 1 éq. de **9**.

Il est intéressant de noter que l'enlèvement partiel du barbiturate du complexe **3:4** par l'association plus forte avec **9** rétablit les équilibres entre les isomères de **4**. Au bout de 5 jours, le mélange compliqué de produits initial est régénéré (Figure 1-19d-f). De plus, le spectre en Figure 1-19f est identique à celui obtenu quand on mélange **1**, **2** et **3** en présence du compétiteur **9**.

Un comportement similaire peut être observé si du méthanol deutéré (40%) est rajouté dans une solution de complexe **3:4**, préformé dans du chloroforme deutéré pur. À nouveau, l'espèce unique initialement présente, le complexe **3:4**, est remplacée par un mélange d'isomères. Cela traduit que la constante d'association est fortement diminuée par la compétition du méthanol avec les sites de reconnaissance de liaisons hydrogène du récepteur (*Schéma 1-4*).

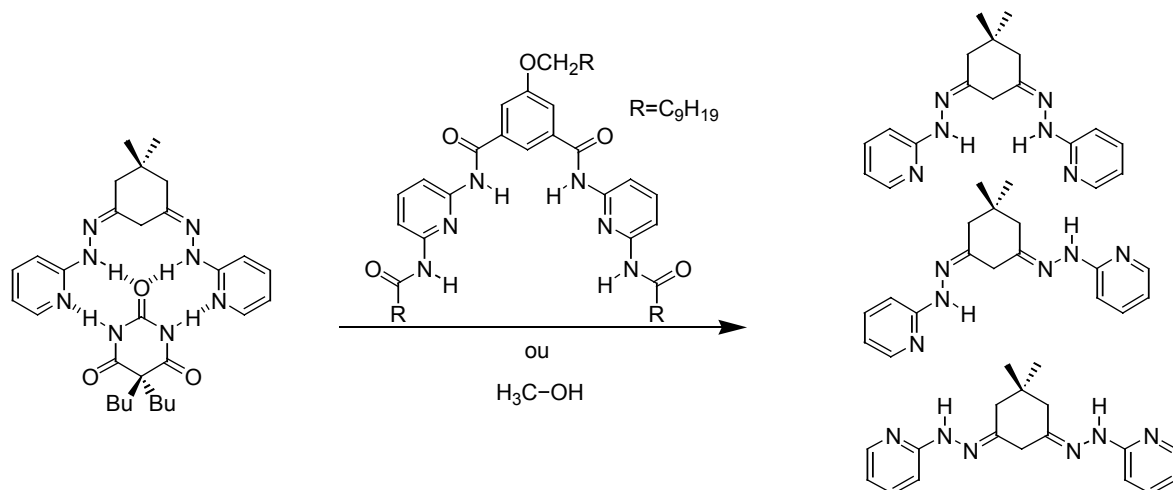


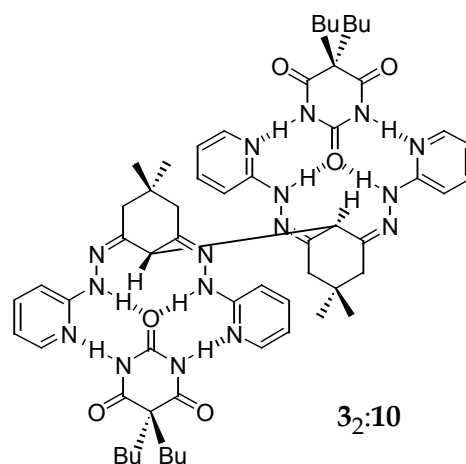
Schéma 1-4. Les expériences de compétition régénérant le mélange d'isomères de départ.

L'ensemble de ces expériences démontre la forte affinité du récepteur **4** pour le barbiturate. La formation des quatre liaisons hydrogène responsables de l'association entre **3** et **4** apporte presque autant d'énergie de stabilisation que les six liaisons hydrogène du complexe **3:9**. Si l'on considère que la formation de **4** est soumise à un équilibre thermique, le rajout du template induit sa stabilisation et son amplification quantitative dans le mélange. Ce phénomène se présente donc comme une méthode efficace pour l'identification d'un récepteur, comme produit majeur, à partir d'un mélange de molécules à l'équilibre par un processus de moulage (cf. 1.1.2, p. 13).

1.2.3. Informations structurales – étude de rayons-X

Pour obtenir des informations structurales de nos auto-autoassemblages, nous avons eu recours à l'analyse de rayons-X.^[62] Malheureusement, toutes les tentatives d'obtenir des cristaux de l'unité **3:4**, appropriés à une analyse par rayons-X, ont échoué. Mais une autre molécule intéressante (le produit de dimérisation oxydative **3₂:10** du complexe **3:4** comme déterminée plus tard par RMN et RX) a cristallisé après 6 mois à partir d'une solution de **3:4** dans le dichlorométhane (40 mM), en utilisant l'hexane comme précipitant.

La dissolution d'un cristal dans CDCl₃, suivie d'une analyse par RMN, a révélé qu'il s'agit d'une entité bien définie, comportant quelques caractéristiques du complexe **3:4** mais ayant des déplacements chimiques différentes dans la région aromatique. De plus, les singulets des H-2' sont sensiblement déplacés n'intégrant que pour un proton, deux doublets différents pour les H-4' avec une constante de couplage $J = 13.9$ Hz, ainsi que



deux singulets différents pour le CH₃. Ces différences, en particulier l'inéquivalence chimique (diastéréotopie) des hydrogènes géminaux H-4' et H-6' méthyles en position axiale et équatoriale du cyclohexane, nous ont conduit à suggérer la structure d'un dimère **3₂:10**, dans lequel deux cycles sont interconnectés par une liaison carbone-carbone simple en position C-2' (Figure 1-20).

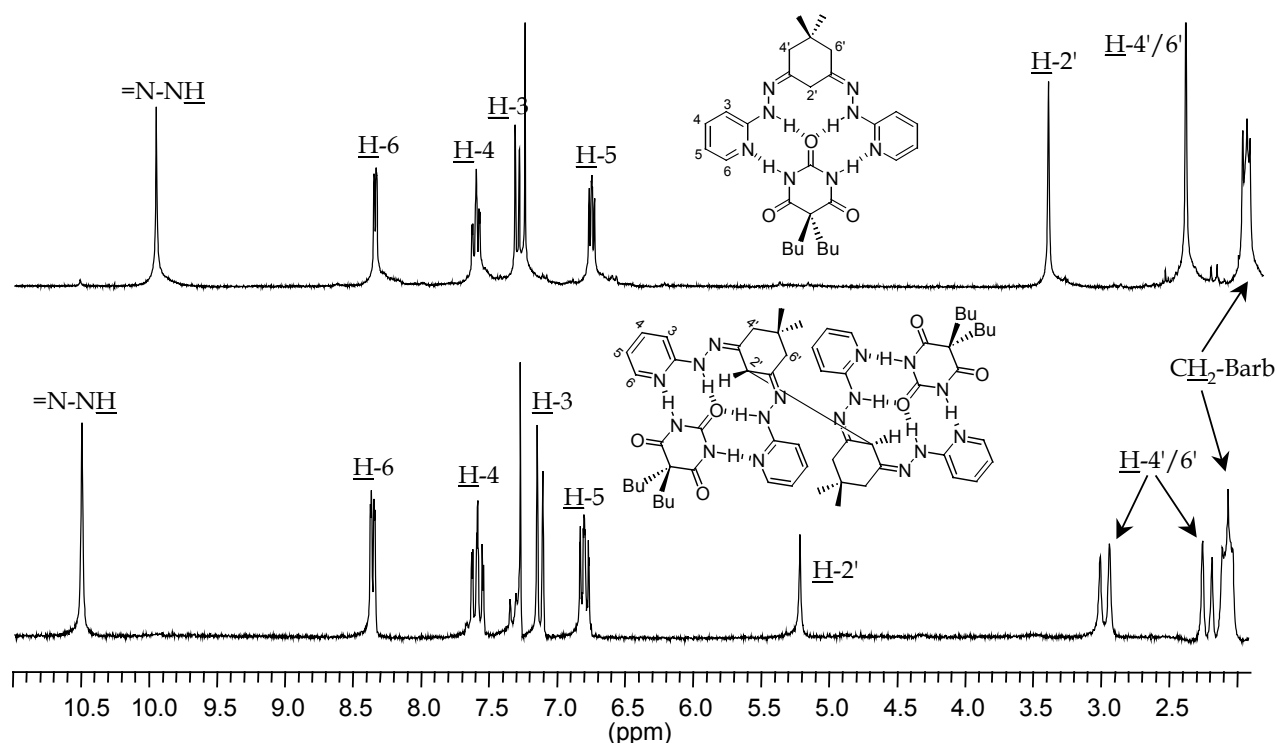


Figure 1-20. Comparaisons des spectres RMN du proton de **3:4** (en haut) et de **3₂:10** (en bas).

L'analyse par rayons-X confirme qu'il s'agit en effet de l'espèce **3₂:10**, suggéré sur la base de la RMN. Cette nouvelle supermolécule représente un auto-assemblage à trois composants, généré durant la longue période de cristallisation par dimérisation oxydative de deux unités de **3:4**. Une liaison carbone-carbone est formée entre deux récepteurs **4** pour donner le récepteur dimérique **10**. Bien que ce ne soit pas le complexe **3:4** attendu, la structure du complexe **3₂:10** à l'état solide permet quand même de confirmer les études en solution et les prédictions structurales sur le complexe **3:4**, car elle montre bien la sélection et le 'verrouillage' conformationnel de l'isomère Z/Z par le barbiturate (Figure 1-21).

Les liaisons hydrogène dans cette supermolécule à trois composants sont presque linéaires et de 'bonnes' longueurs (NH-N: 2.84 Å, 169°; O-HN: 2.97 Å, 173°) ce qui est en excellent accord avec la forte constante d'association observée pour le complexe **3:4**. La structure cristalline diffère quand même nettement de la géométrie trouvée par minimisation avec le champs de force Amber* (cf. Schéma 1-2). Tandis que le barbiturate et les deux unités hydrazonopyridine sont dans une disposition géométrique parfaitement planaire dans le cristal, donnant lieu à la presque linéarité des liaisons hydrogène, cette disposition ne coïncide pas avec le minimum d'énergie trouvé par modélisation. Dans ce dernier, les deux bras hydrazonopyridiniques du récepteur ainsi que le barbiturate sont tournés en dehors de la coplanarité, en introduisant une courbure.

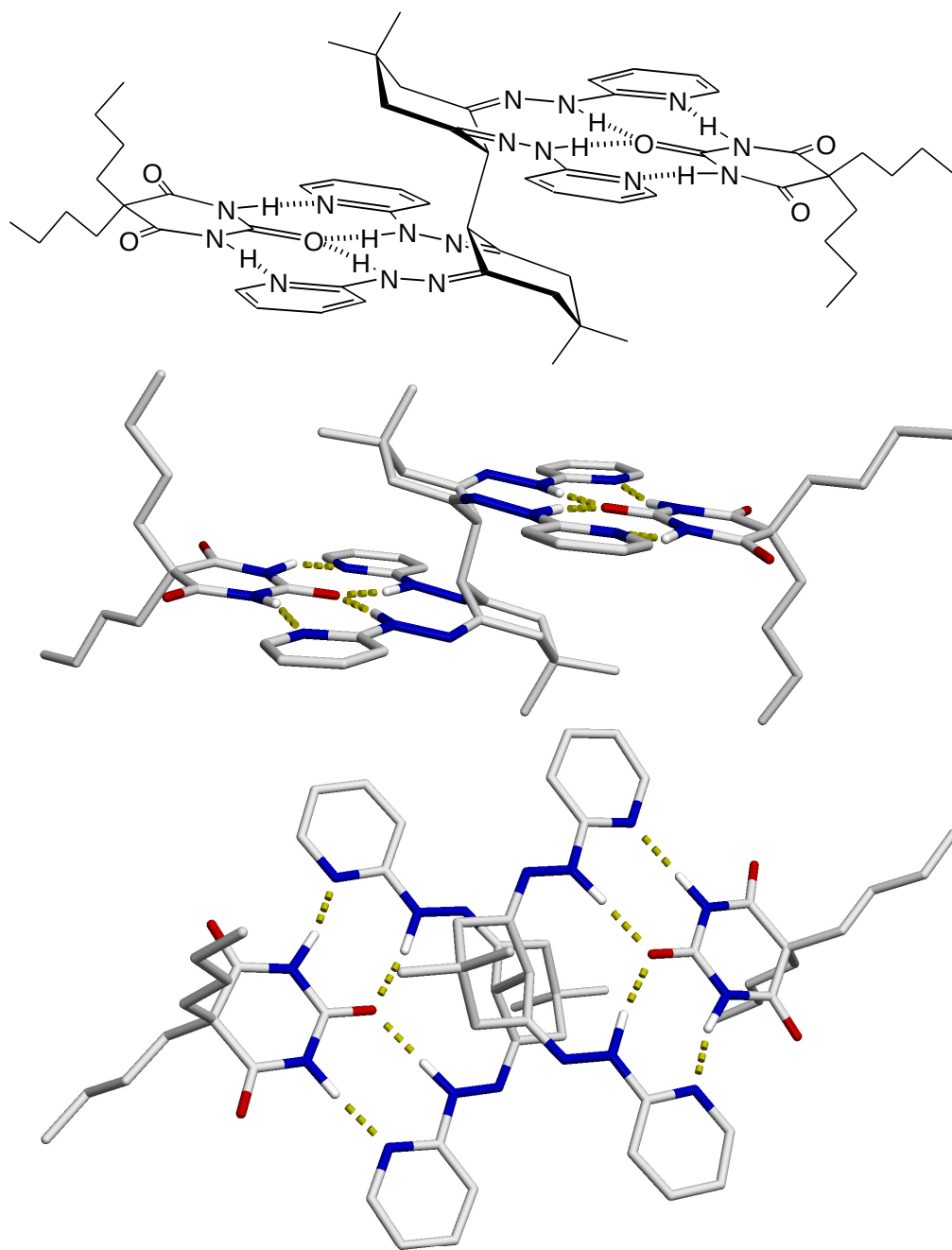


Figure 1-21. Représentation schématique (en haut) et représentation stick (liaisons cylindriques) de la structure cristalline de **32·10**. Vue de côté (au milieu) ; vue en plan (en bas).

1.2.4. Stabilité chimique : dégradation oxydative éliminatoire d'azote *versus* oxydation contrôlée en position 2'

La formation oxydative de **10** n'a été observée dans aucune des études en solution. Du fait de possibilité d'une dégradation oxydative par élimination d'azote des hydrazines en général,^[63] les études en solution ont été conduites en solutions dégazées de chloroforme deutéré sous protection soigneuse (pression positive d'un ballon) d'argon durant toute la période d'équilibration dans des tubes RMN. L'instabilité de **2** se manifeste déjà par le fait que le produit commercial contient des quantités substantielles de pyridine, nécessitant la purification de ce

produit de départ (cf. 5.3.1.). Il a été observé que la dégradation en pyridine du mélange de **1** et **2** est beaucoup plus grande en absence qu'en présence de barbiturate, et presque nulle si le complexe **3:4** a eu le temps de se former quantitativement dans des conditions anaérobiques. Ceci est une indication de la stabilité chimique du complexe induite par le barbiturate. La couleur rouge intense des solutions exposées à l'oxygène de l'air suggère un mécanisme d'élimination d'azote passant par un intermédiaire de type azo (dans le cas de **2** ce serait la forme pyridin-2-yl-diazene). De plus, il a été montré^[64] que l'oxydation d'hydrazines avec l'oxygène moléculaire peut résulter en la formation de H₂O₂. Mais aucune trace dans la littérature décrivant plus en détail le mécanisme d'un tel processus de dégradation oxydative n'a pu être trouvée. Nous proposons le mécanisme suivant de dégradation oxydative basique de la 2-hydrazinopyridine :

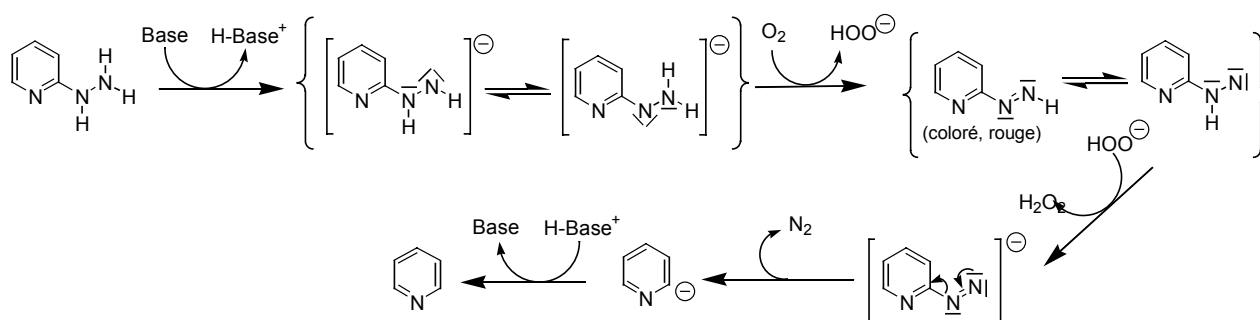


Schéma 1-5. Proposition d'un mécanisme probable pour la dégradation oxydative éliminatoire d'azote de **2**, la base catalytique pouvant être une autre molécule hydrazine.

La résistance du complexe **3:4** à une dégradation en pyridine permet à d'autres processus oxydatifs de se produire. En effet, il y a quelques exemples dans la littérature qui décrivent une réaction de dimérisation oxydative accompagnée de la formation d'une liaison carbone-carbone pour des 1,3-diones cycliques.^[65] Mais une réaction similaire des 1,3-dihydrazones cycliques n'a pas de précédent dans la littérature. Il semblerait qu'un mécanisme d'oxydation radical-anionique soit le plus probable. En optimisant les conditions réactionnelles, on peut suivre cette oxydation par RMN. Le complexe **3:4** préformé (10 mM) est maintenu après le rajout de 2 éq. de triéthylamine sous une atmosphère d'oxygène pur. Dans ces conditions, l'oxydation de **3:4** en **3₂:10** est quantitative après 6 jours. En absence de Et₃N et en présence d'oxygène, le caractère faiblement basique des hydrazines rend possible la formation lente du complexe dimérique **3₂:10** durant la longue période de cristallisation.

1.2.5. Tentatives d'augmenter la complexité structurale

Dans le but de pouvoir évaluer des procédures de sélection à partir d'une plus grande diversité structurale, et en se servant en fin de compte de la réversibilité présumée de la formation d'hydrazones, un certain nombre d'hydrazines ont été synthétisées. Le Schéma 1-6 résume les synthèses effectuées avec leurs intermédiaires et les hydrazines cibles obtenues.

L'étape clé de toutes les synthèses est une *ipso*-substitution nucléophile d'un halogène en position 2 du noyau de la pyridine (mécanisme d'addition-élimination). Ainsi, l'addition d'un nucléophile en position 2 est favorisée par la délocalisation et la stabilisation de la charge par l'azote pyridinique. L'hydrazination se fait aisément avec des pyridines déficientes en électrons portant des atomes de Cl et de Br, donnant **17** et **18**. Les 2,6-dihalogénoypyridines ou 2,4-dichloropyrimidines sont également substituables, une fois, par des amines aliphatiques,

résultant en **12**, **15** et **13/14**. Par contre, il faut un meilleur groupe électroattracteur, le fluor, si le noyau pyridinique est enrichi en électrons, notamment après une première substitution nucléophile d'amine en position 6. De ce fait, l'hydrazination de **12** n'est pas possible, mais **15** se transforme facilement en **16**.

Tous ces produits ont été synthétisés dans le but d'obtenir une variété de structures se comportant différemment de **2**, lorsqu'ils sont mis en réaction avec **1**. Le Schéma 1-6 (en bas) illustre les propriétés prédites. Le produit **18**, modifié dans son groupement de reconnaissance par liaisons hydrogène, et **17**, apportant une gêne stérique du fait de la substitution en position 6 (démontrée par modélisation moléculaire), ne seront pas capables d'interagir avec la cible barbiturique après leur condensation avec **1**. Par contre, **16** et **20**, ayant réagi avec **1**, devraient former des complexes encore plus stables que **3:4** grâce aux 6 liaisons hydrogène qu'ils peuvent former avec le barbiturate.

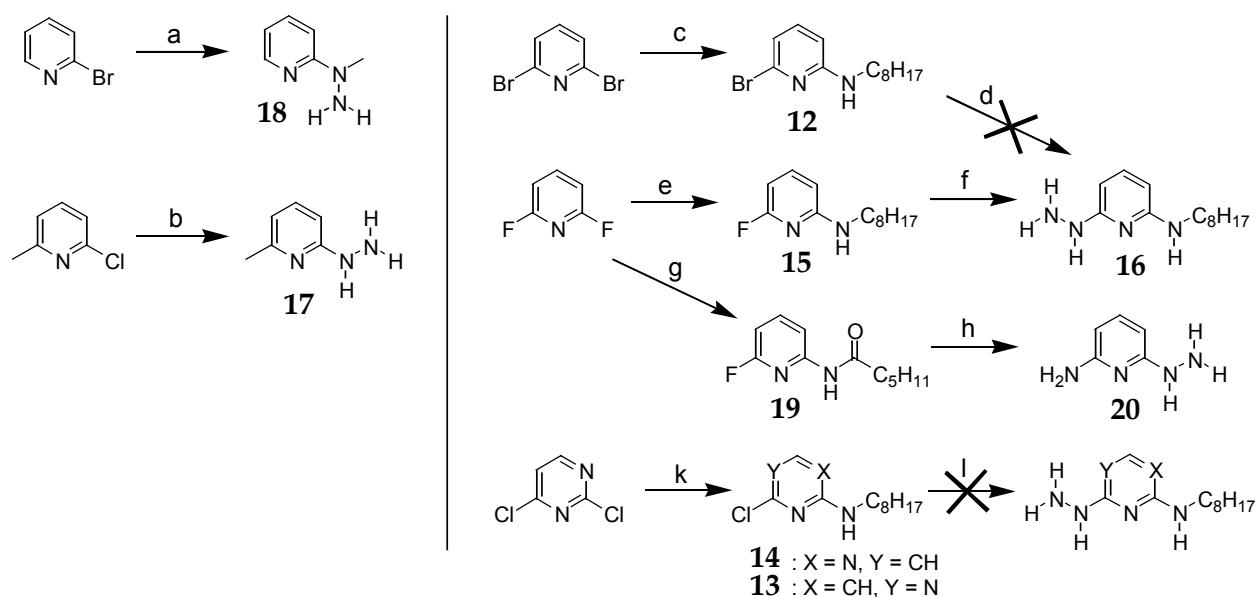


Schéma 1-6. En haut : synthèse d'hydrazines. a) Méthylhydrazine, reflux, 84% ; b) hydrazine anhydre, *n*-BuOH, 120°C, 91% ; c) 1-aminooctane, THF, reflux, 55% ; d) hydrazine anhydre, *n*-BuOH, 120°C ; e) 1-aminooctane, THF, reflux, 58% ; f) hydrazine anhydre, *n*-BuOH, 100°C, 88% ; g) hexanamide, NaH, puis THF, reflux, 25% ; h) hydrazine anhydre, *n*-BuOH, 100°C ; k) 1-aminooctane, THF, reflux, **13** : 66% et **14** : 25% ; l) hydrazine anhydre, *n*-BuOH, 120°C. En bas : aspects structuraux des récepteurs issus de la réaction entre **1** et **18**, **17**, **16** et **20**.

En effet, **16** réagit avec **1** en créant une bibliothèque combinatoire d'isomères similaire à celle décrite pour le système **1** et **2**. La réaction n'est pas complète non plus, il reste une grande quantité de monohydrazone-monocétones. Le barbiturate a moins d'effet sur le mélange d'isomères en équilibre que pour le système **3:4**. Bien qu'il déplace sensiblement les équilibres

vers une espèce, caractérisée comme son complexe avec l'isomère Z/Z, même son rajout en excès ne peut provoquer la résolution quantitative du spectre. D'autres espèces restent en solution, notamment des produits n'ayant réagi qu'une fois. Ce résultat peut être interprété comme étant dû à la longue chaîne aliphatique de **16**, pour laquelle il n'y a aucune prédisposition spatiale, et qui peut interférer stériquement avec le barbiturate, rendant le complexe moins stable. De plus, la contribution de l'amine aliphatique à la stabilité du complexe est probablement faible due à sa faible acidité.

En ce qui concerne les hydrazines **18** et **17**, leur réactivité avec **1** est atténuée par rapport à **2**. Confirmant nos prédictions structurales, la présence du barbiturate n'a aucun effet visible sur les mélanges de produits formés ou sur l'achèvement de la réaction.

Par contre, nos espoirs de pouvoir faire jouer la sélection dynamique non seulement au niveau structural mais aussi au niveau moléculaire ont été déçus par les résultats de nos études sur la réversibilité de la formation des hydrazones à partir de cétones et hydrazines. Une fois formée, une telle hydrazone ne s'échange quasiment pas avec une autre hydrazone rajoutée dans le chloroforme. Le passage à un autre solvant, comme l'acétonitrile ou le dichlorométhane, ou encore le rajout de méthanol ou d'acide acétique n'affecte pas l'équilibre avec l'hydrazone ajoutée. Les études montrent que la présence d'un acide fort est indispensable pour établir la réversibilité de ces systèmes. Par exemple, la présence d'un équivalent de TFA permet une rééquilibration de ces systèmes en trois jours. Or, il est évident que dans ces conditions, un sélecteur à base de liaisons hydrogène ne peut pas jouer son rôle, car son association avec des sites de reconnaissance potentiels est quasi nulle dans un environnement hautement protique. Sanders *et al.*^[66] ont démontré indépendamment que la formation réversible d'hydrazones macrocycliques à partir d'hydrazides et d'aldéhydes sous catalyse d'acide se produit dans des conditions beaucoup moins drastiques. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude d'autres systèmes plus prometteurs en terme de réversibilité moléculaire.

1.3. Exploration d'autres systèmes modèles de récepteurs artificiels à base d'imes

La formation d'imes à l'équilibre thermodynamique a déjà prouvé son utilité pour la génération de VCLs de ligands d'enzymes dans des conditions physiologiques.^[37] C'est grâce à cette connexion réversible covalente que la réalisation du moulage de récepteurs artificiels, s'auto-assemblant à partir d'aldéhydes et amines, sous l'effet de liaisons hydrogène avec une molécule cible, a été poursuivie. Deux systèmes prometteurs ont alors été conçus et évalués à l'aide de modélisation moléculaire.

1.3.1. Conception de récepteurs auto-assemblants

Le premier système modèle développé découle des informations structurales acquises lors des études du système **3:4** et de **3:9**. Il se base sur la reconnaissance de dérivés barbituriques possédant deux faces à liaisons hydrogène ADA-ADA (Accepteur/Donneur/Accepteur) par un récepteur complémentaire qui ressemble à celui décrit par Hamilton *et al.*,^[61] généré par un agencement de deux groupements de 2,6-diaminopyridine par un espaceur isophthalique.

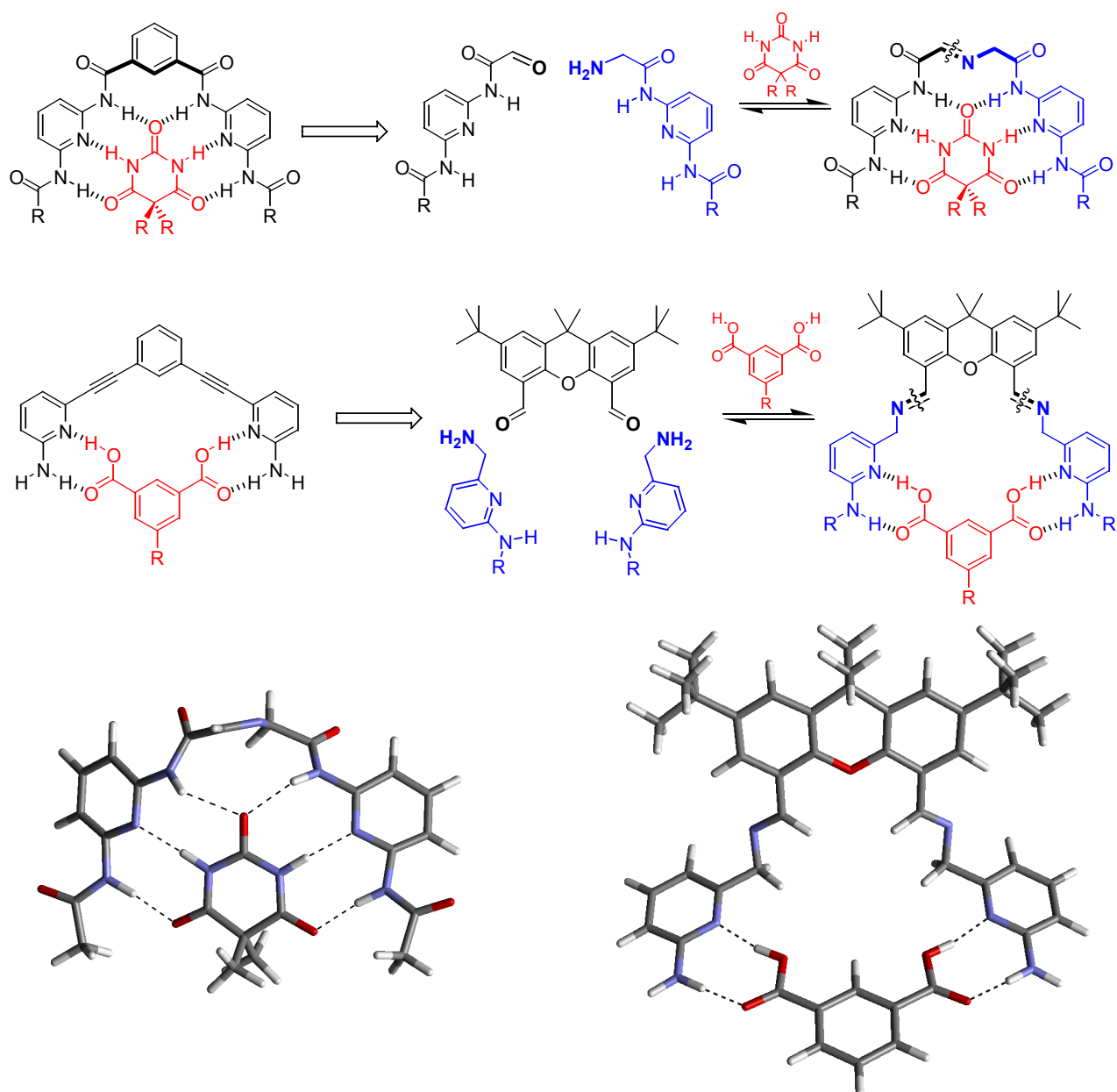


Figure 1-22. Conception des systèmes modèles. En haut : du récepteur de Hamilton vers un récepteur potentiel de barbiturates (rouge) pouvant s'assembler de manière réversible à partir d'un 2-oxoacétamide (noir) et d'un 2-amino-acétamide (bleu). Au milieu : du récepteur de Moore vers un récepteur d'acides isophtaliques (rouge) pouvant s'assembler de manière réversible à partir d'un xanthène-dicarbaldéhyde (noir) et de deux unités de la 6-amino-2-aminométhyl pyridine (bleu). En bas : validation de nos approches par modélisation moléculaire (MacroModel, Amber94*).

En enlevant les atomes de carbones C-4' à C-6' du noyau isophtalique, en effectuant une coupure au niveau du carbone C-2' central et en introduisant des fonctions amines et carbonyles dans les fragments ainsi obtenus, on arrive à une unité *N*-(6-alkanoylamino-pyridin-2-yl)-2-oxoacétamide (noir) et une unité *N*-(6-alkanoylamino-pyridin-2-yl)-2-amino-acétamide (bleu) (Figure 1-22, en haut). Ces molécules constituent les deux précurseurs d'un récepteur analogue à celui de Hamilton, pouvant se condenser par leurs fonctions réactives (aldéhyde et amine) pour former une connexion covalente de type imine. Ce récepteur ainsi obtenu présente davantage de degrés de liberté que le récepteur de Hamilton et on attend de ce fait une plus faible association avec une cible barbiturique. La modélisation nous confirme que la présence d'une telle cible induit une conformation stable de ce récepteur (presque isostructurale à celui de Hamilton) ayant une

géométrie apte à lier la cible avec 6 liaisons hydrogène, au lieu de seulement 3 pour les unités non-condensées. (*Figure 1-22, en bas à gauche*). Cette stabilisation du complexe devrait conduire à son amplification à partir d'un mélange de différentes amines et aldéhydes à l'équilibre.

Un autre système prometteur est dérivé d'un récepteur décrit par Moore *et al.*^[67] dans lequel l'agencement de deux groupements 2-aminopyridine sur un espaceur rigide 1,3-diéthynylbenzène résulte en une complémentarité excellente avec un substrat acide isophthalique. Les 2-aminopyridines exhibent en effet une grande affinité pour des acides carboxyliques.^[68] Dans le cas du récepteur ditopique de Moore, la constante d'association est supérieure à $10^6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans le chloroforme.

Pour disposer favorablement dans l'espace les fonctions de reconnaissance à partir du motif 2-aminopyridine de manière réversible, nous avons proposé un récepteur s'auto-assemblant à partir d'un espaceur xanthène-dicarbaldéhyde et deux unités de la 6-amino-2-aminométhylpyridine. Là aussi, la condensation d'imines, conduite en compétition avec d'autres amines, devrait produire un mélange de différents produits à l'équilibre, sensible au rajout d'une cible isophthalique produisant comme composant majoritaire le complexe désiré (*Figure 1-22, au milieu*). La modélisation moléculaire donne des informations supplémentaires sur la stabilité d'un tel complexe maintenu par quatre liaisons hydrogène fortes (*Figure 1-22, en bas à droite*).

Les deux systèmes modèles ont été conçus de manière à satisfaire un certain nombre de critères :

- Les produits en question devraient être facilement accessibles en modifiant des procédures de synthèse décrites dans la littérature.
- L'emploi d'aldéhydes électrodéficients et d'amines primaires aliphatiques nucléophiles devrait mener à de court temps de réaction et conduire à un équilibre déplacé en faveur de la formation d'imines.[‡]
- Les fonctions réactives créant la diversité dynamique sont géométriquement et chimiquement séparées des groupements de reconnaissance, favorisant ainsi des bibliothèques quasi-isoénergétiques (cf. 1.1.2.1). Dans le cas des amines choisies, il y a un groupe espaceur méthylénique entre la fonction amine et la fonction de reconnaissance, servant de 'tampon' afin d'atténuer les effets électroniques provenant de substituants aromatiques très différents, et qui peuvent jouer sur la réactivité intrinsèque de l'amine.
- Les réactifs et les produits, ainsi que les cibles, doivent être assez solubles dans un solvant peu polaire, favorable à la formation de liaisons hydrogène, tel que le chloroforme, pour maximiser l'effet d'amplification.
- Nous envisageons d'analyser directement les mélanges par RMN ou par spectrométrie de masse « electrospray », ou par HPLC des mélanges après réduction des imines en amines.

[‡] Des études antérieures ont démontré la réactivité quasi-nulle d'amines *aromatiques* peu nucléophiles avec des aldéhydes aromatiques dans des solvants peu polaires tels que le chloroforme. Par contre, la condensation d'une amine aliphatique et d'un aldéhyde aromatique est presque quantitative tout en étant parfaitement réversible dans le chloroforme pur.

1.3.2. Études d'un récepteur d'acides barbituriques s'auto-assemblant de manière réversible par formation d'imines entre oxoamides et amino-acétamides

1.3.2.1. Voies de synthèse explorées pour la préparation des réactifs primaires

La synthèse divergente des deux réactifs de base part d'un intermédiaire commun, **21** (Schéma 1-7). L'acido-acétamide **23** est facilement obtenu par acylation de l'amine primaire avec un dérivé protégé (CBz) de la glycine, suivie de la déprotection de l'amine glycinique. Par contre, la synthèse du produit désiré, le 2-oxoacétamide **26-T**, n'a pas pu aboutir bien qu'une multitude de voies préparatives aient été explorées.

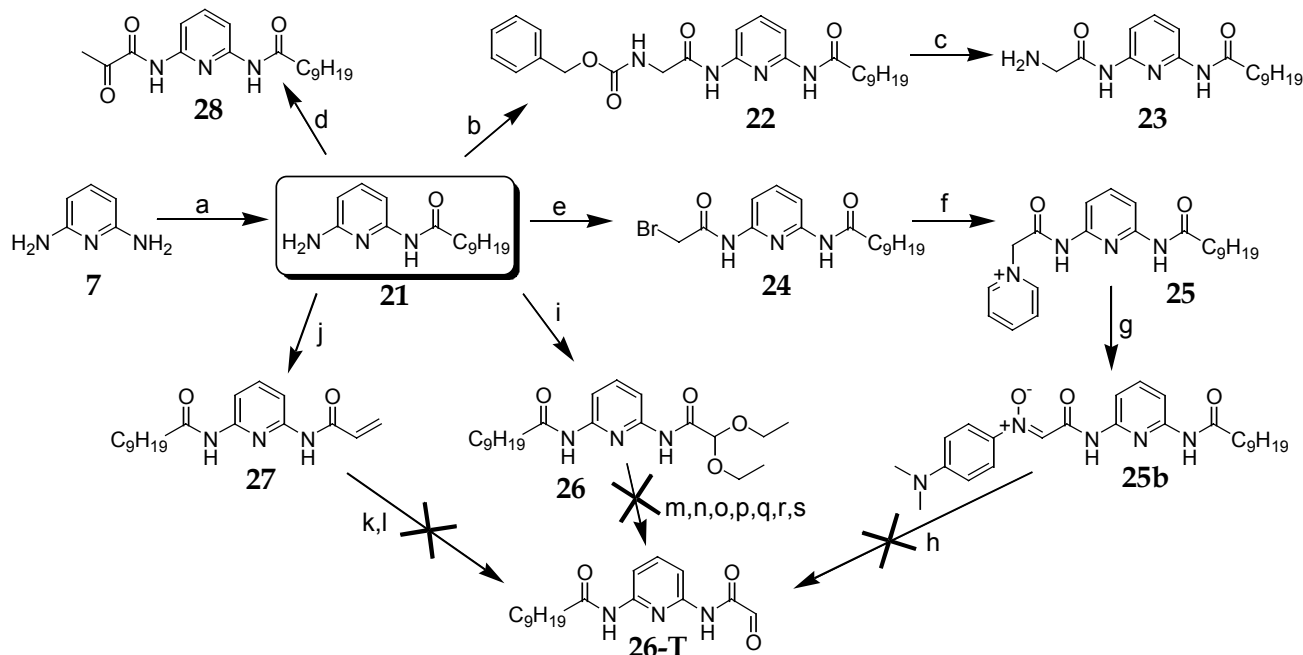


Schéma 1-7. Synthèse des composants moléculaires. a) Chlorure de décanoyle, THF, Et₃N, 0°C, 46% ; b) chlorure d'acide de la carbobenzyloxyglycine, THF, Et₃N, 0°C, 70% ; c) Pd/C, H₂, r.t. ; MeOH/THF, 73% ; d) 1. acide puruvique, dichlorométhyl méthylether, 50°C ; 2. CH₂Cl₂, DMAP, 50% ; e) Et₂O, pyridine, bromure de bromoacétyle, -20°C, 56% ; f) pyridine, 110°C, 92% ; g) DMNA (4-nitroso-N,N-diméthylaniline), EtOH/H₂O ; NaOH, -5°C, 60% ; h) H₂SO₄ ou HCl / r.t. ou 80°C ; i) 2,2-diéthoxy-éthylacétate, KCN, 18-crown-6, toluène (Dean-Stark), reflux, 67% ; j) chlorure d'acryloyle, THF, Et₃N, 0°C, 67% ; k) O₃, CH₂Cl₂/MeOH, -60°C ; l) OsO₄, NaIO₄, THF ; m) 1 M HCl/THF 1:1, 20 min, r.t. ; n) 5% TFA/THF, 2 h, r.t. ; o) 5% CCl₃COOH/THF, r.t. et reflux ; p) H₂O/THF, reflux ; q) AcOH, r.t. et reflux ; r) 1 éq. TsOH/H₂O dans le THF, r.t. et reflux ; s) CAN, MeCN/tampon(Merck/Borate), r.t.

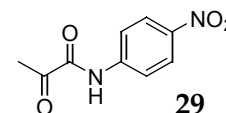
Une première voie, décrite dans la littérature pour des systèmes phényliques,^[69] basée sur une modification de l'oxydation de Kornblum, subit un échec lors de la dernière étape de l'hydrolyse de la nitrone **25b** dans des conditions de forte acidité rendant quantitativement la diaminopyridine **7** de départ. L'hydrolyse acide de l'acétal **26**, pour laquelle une multitude de conditions ont été explorées de manière systématique (voir conditions m à s de la légende du Schéma 1-7), démontrent clairement que l'hydrolyse des fonctions amides se produit *avant* l'hydrolyse de l'acétal. Une déprotection oxydative employant le nitrate de cérium ammonium^[70] provoque la décomposition du produit. Le clivage oxydatif de l'acrylamide **27**, par ozonolyse ou par la séquence OsO₄/NaIO₄, est également accompagné de la décomposition totale en multiples

produits non-identifiés. Par spectrométrie de masse, aucune trace de produit désiré n'a pu être détectée. L'oxoacétamide **26-T** a donc été abandonné comme cible synthétique.

Néanmoins, l'acylation directe de l'amine **21** a été effectuée avec le chlorure d'acide puruvique, donnant le 2-oxopropionamide **28**. Ce produit présente, au lieu de l'aldéhyde, une fonction cétone, dont le caractère électrophile est augmenté par le groupe carbonyle d'amide adjacent.

1.3.2.2. Études de réactivité

La vitesse de condensation entre l'oxopropionamide **28** et l'aminoacetamide **23** dans le chloroforme (20 mM) est très lente et ne peut guère être accélérée par le rajout d'un solvant polaire (le méthanol) ou d'acide (l'acide acétique). Après 10 jours à température ambiante, on n'observe la formation que de 10% d'imine (déterminé par RMN). Par contre quand la réaction entre **28** et **23** a été effectuée en présence de la cible, le barbiturate **3**, la quantité d'imine formé est de 30%. Cet effet accélérateur de la réaction est presque nul quand le *N*-(4-nitro-phenyl)-2-oxo-propionamide **29** et la benzylamine sont condensés dans les mêmes conditions. (Ces produits ne disposent pas des groupements de reconnaissance pour **3**). Dans les deux cas, en présence et en absence de **3**, la réaction est presque quantitative seulement après 20 jours supplémentaires à 50°C dans le chloroforme pur. En présence du barbiturate, les déplacements considérables de signaux des protons d'amide du récepteur **28:23** vers des champs faibles, comparables à ceux observés dans le système rigide de Hamilton, indiquent une forte association de ce récepteur avec le barbiturate.



Bien que prometteur, le projet a été abandonné à ce stade du fait de la cinétique défavorable à l'observation dans des délais raisonnables et les efforts ont été dirigés vers le système suivant, développé en parallèle.

1.3.3. Vers l'amplification d'un récepteur d'acide isophtalique à partir d'une bibliothèque combinatoire dynamique d'imines

1.3.3.1. Synthèse et propriétés des produits

L'espaceur xanthène-4,5-dicarbaldéhyde **32** peut être obtenu avec de bons rendements par une séquence d'estérification du diacide de départ, de réduction en alcool et d'oxydation en aldéhyde (MnO₂). Ses groupes *t*-butyles stériquement encombrants empêchent l'empilement aromatique et assurent une excellente solubilité dans tous les solvants organiques.

La synthèse de la 6-amino-2-aminométhyl pyridine **37** est plus astucieuse. Dans un premier temps, la 6-amino-2-picoline est protégée sous forme d'amide de pivaloyle. La bromation radicalaire allylique de **33** en excès donne le produit monobromé **34** avec un bon rendement. Le bromure est ensuite substitué par un phtalimide (**35**) à partir duquel l'amine primaire **36** peut être libérée par hydrazinolyse. Le pivaloylamide est ensuite hydrolysé par un acide fort (HCl). L'amine **37** désirée, ainsi obtenue, est très soluble dans le chloroforme. Elle porte une première fonction amine aromatique qui ne sera impliquée que dans la reconnaissance de l'acide isophtalique et une deuxième fonction amine aliphatique qui assurera la condensation d'imine avec le dialdéhyde **32**.

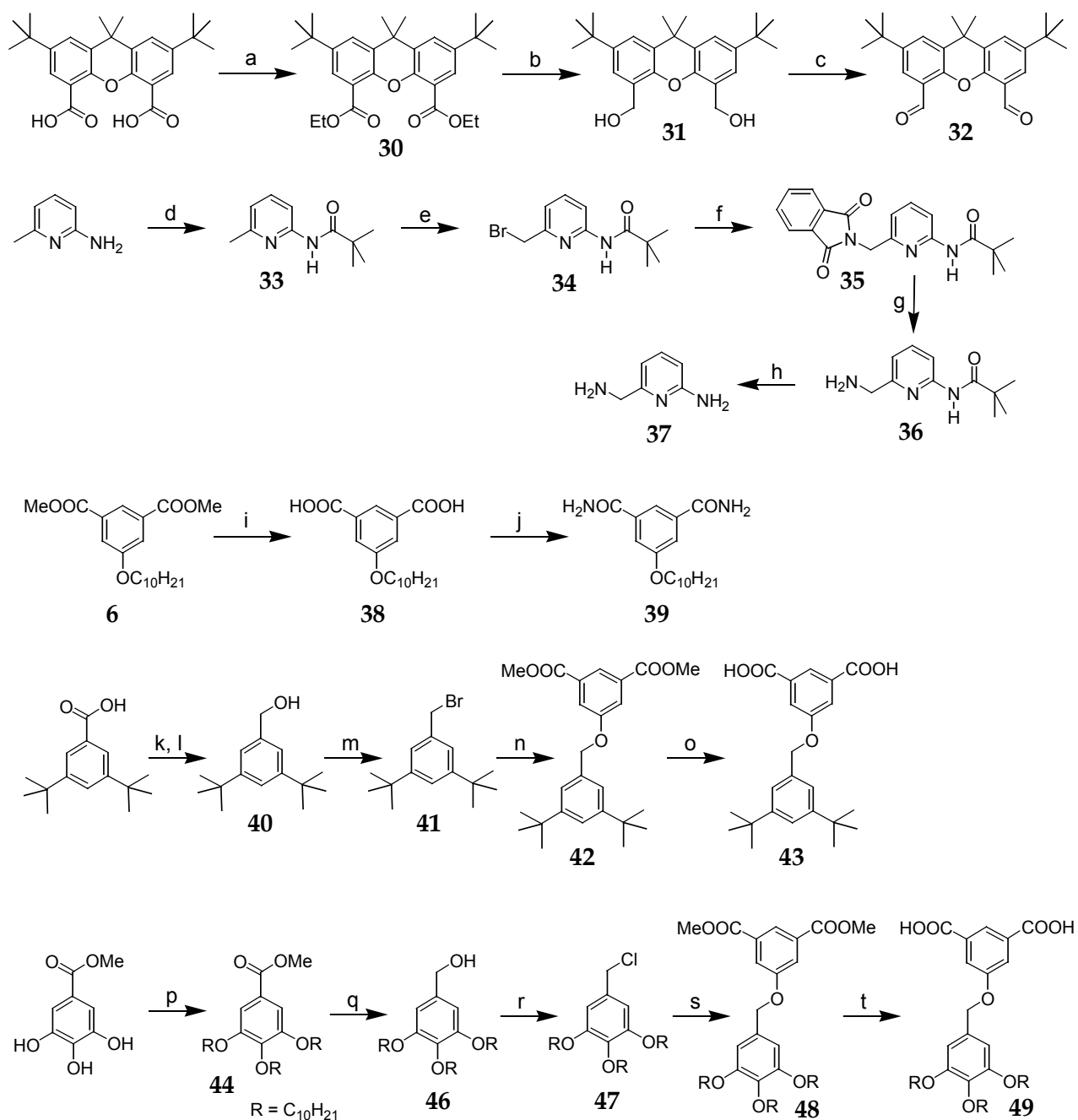


Schéma 1-8. Synthèse des composants moléculaires. a) Éthanol, H_2SO_4 , reflux, 96% ; b) LiAlH_4 , Et_2O , reflux, 100% ; c) MnO_2 , CH_2Cl_2 /toluène, r.t., 95% ; d) chlorure de pivaloyle, THF, Et_3N , 0°C, r.t. 95% ; e) NBS, CCl_4 , reflux, 25% ; f) phthalimide de potassium, DMF anhydre, 140°C, 70% ; g) méthylhydrazine, CH_2Cl_2 , 96% ; h) 6 N HCl, 100°C, 100% ; i) éthanol, 1 M aq. NaOH, 65°C, 95% ; j) SOCl_2 , reflux, puis 2 M aq. NH_3 , 0°C, 99% ; k) méthanol, H_2SO_4 , reflux ; l) LiAlH_4 , Et_2O , reflux, 61% ; m) 33% HBr/AcOH, 80% ; n) 5, K_2CO_3 , DMF, 60°C, 81% ; o) LiOH, THF/eau, reflux, 91% ; p) 1-bromodécane, K_2CO_3 , DMF, 60°C, 31% ; q) LiAlH_4 , Et_2O , reflux, 92% ; r) SOCl_2 , CH_2Cl_2 , DMF cat., r.t., 99% ; s) 5, K_2CO_3 , DMF, 60°C, 69% ; t) LiOH, THF/eau, reflux, 82%.

La synthèse d'un dérivé d'acide isophtalique soluble dans le chloroforme a demandé un certain effort synthétique. L'introduction d'une chaîne décyl oxy sur le noyau isophtalique n'est pas suffisante pour assurer une solubilité du diacide **38** ou du diamide **39**. Même en remplaçant cette chaîne alkyle simple par un groupement 3,5-di-*t*butyl-benzyloxy (5 étapes), on n'obtient qu'un produit, **43**, qui est soluble en faible quantité dans le chloroforme à reflux et précipite en

refroidissant. La présence de deux équivalents de l'amine **37** ne solubilise pas ce diacide à froid, mais quand ce mélange binaire est chauffé à reflux, un précipité volumineux est formé en refroidissant qui constitue le complexe stoechiométrique **43:37**₂. (identifié par RMN dans le [D₆]DMSO).

Nous avons donc eu recours à la synthèse d'un dérivé d'acide gallique afin d'augmenter la solubilité du motif d'acide isophtalique. Ainsi, l'ester méthylique de l'acide gallique de départ est O-alkylé avec le bromure de dodécane et l'ester de méthyle **44**, réduit en alcool **46**, est converti en chlorure **47**. La O-alkylation de l'isophtalate **5** avec **47**, suivie de la saponification des esters de méthyle de **48**, fournit l'acide isophtalique **49**. Ce produit présente toutes les propriétés désirées : il est remarquablement *soluble* à température ambiante dans le chloroforme et *ne précipite pas en présence de l'amine 37*.

1.3.3.2. Études de la formation réversible d'imines et de la possibilité de leur réduction en amines

Pour les études de compétition, deux amines commerciales, 4-aminométhylpyridine **37b** et 2-aminométhylpyridine **37c**, ont été choisies. Ces amines ne portent pas le groupement de reconnaissance de **37** mais peuvent faire concurrence à **37** pour la formation d'imines avec le dialdéhyde **32**. Comme nous l'attendions, le dialdéhyde **32** réagit rapidement avec **37**, **37b** et **37c** pour atteindre un taux de conversion (par rapport à l'amine) à l'équilibre de 88%, 92% et 93%, respectivement. Les réactifs sont employés dans leurs quantités stoechiométriques (10 mM pour **32** et 20 mM pour les amines) dans le chloroforme à température ambiante. Dans ces conditions, l'équilibre est atteint en moins d'une journée. La présence de deux équivalents d'acide acétique dans ces solutions ne modifie ni la cinétique de la réaction ni le taux de conversion à l'équilibre. L'identification des produits dans ces mélanges simples se fait facilement par RMN, en suivant les signaux des protons d'imines ($\delta = 9.0 \pm 0.1$ ppm), et/ou des CH₂ des amines ($\delta = 4.0 \pm 0.2$ ppm) ou des imines ($\delta = 4.9 \pm 0.2$ ppm).

La réversibilité des processus mis en jeu a été démontrée par une expérience qui consiste à rajouter – dans un mélange stoechiométrique à l'équilibre de **32** et une amine donnée – deux équivalents de l'autre amine. Après une journée supplémentaire d'équilibration, des spectres RMN identiques sont alors obtenus, présentant une distribution presque statistique des espèces (DCL isoénergétique). De plus, les mélanges d'imines ainsi formées peuvent être réduits, instantanément et proprement, en amines secondaires par l'addition d'un excès d'une solution 1 M de BH₃ dans le THF, gelant ainsi la distribution des produits à l'équilibre.

1.3.3.3. Études de stabilité du complexe **32:37**₂:**49**

Le rajout d'un équivalent d'acide isophtalique **49** à un mélange stoechiométrique de **32** et **37** déplace les équilibres entre réactifs de départ et produits de condensation vers la formation presque quantitative d'une seule espèce, le complexe **32:37**₂:**49**. Cette évolution de la réaction n'est pas observée quand **37b** et **37c** ont été employés. Une expérience de dilution par RMN donne une première indication de sa stabilité. Les signaux maintiennent leur déplacement chimique jusqu'à la plus haute dilution de l'expérience de 0.156 mM. Une constante d'association supérieure à 6400 M⁻¹ en découle directement.

Une expérience de titration révèle une autre caractéristique intéressante du système. À plus d'un équivalent de **49** ajouté, l'excès d'acide ($pK_{a1} \sim 2.8$) provoque l'hydrolyse des imines et la

destruction du complexe formé, ne permettant pas de déterminer la constante d'association avec précision. Il est à souligner que ce système précis constitue un cas où la cible elle-même, lorsque rajoutée en excès, devient la source de la déstabilisation thermodynamique du produit. Or, sa formation est quantitative lorsque la cible est présente en quantités stœchiométriques. Pour l'analyse des mélanges, il est donc important de ne pas rajouter la cible en excès.

1.3.3.4. Génération de diversité et analyse de l'effet de la cible

Quand on mélange le dialdéhyde **32** (10 mM) à deux équivalents de chacune des trois amines **37**, **37b** et **37c**, on obtient une bibliothèque combinatoire dynamique de 6 produits de dicondensation et un excès des trois amines de départ (*Schéma 1-9*). La diversité moléculaire dynamique est bien visualisée par le spectre proton complexe du mélange à l'équilibre (on attend neuf protons d'imes et de CH₂ d'imes). Il montre bien la bibliothèque quasi-isoénergétique obtenue (amines non-réagies en quantités égales) (*Schéma 1-9, spectre du haut*).

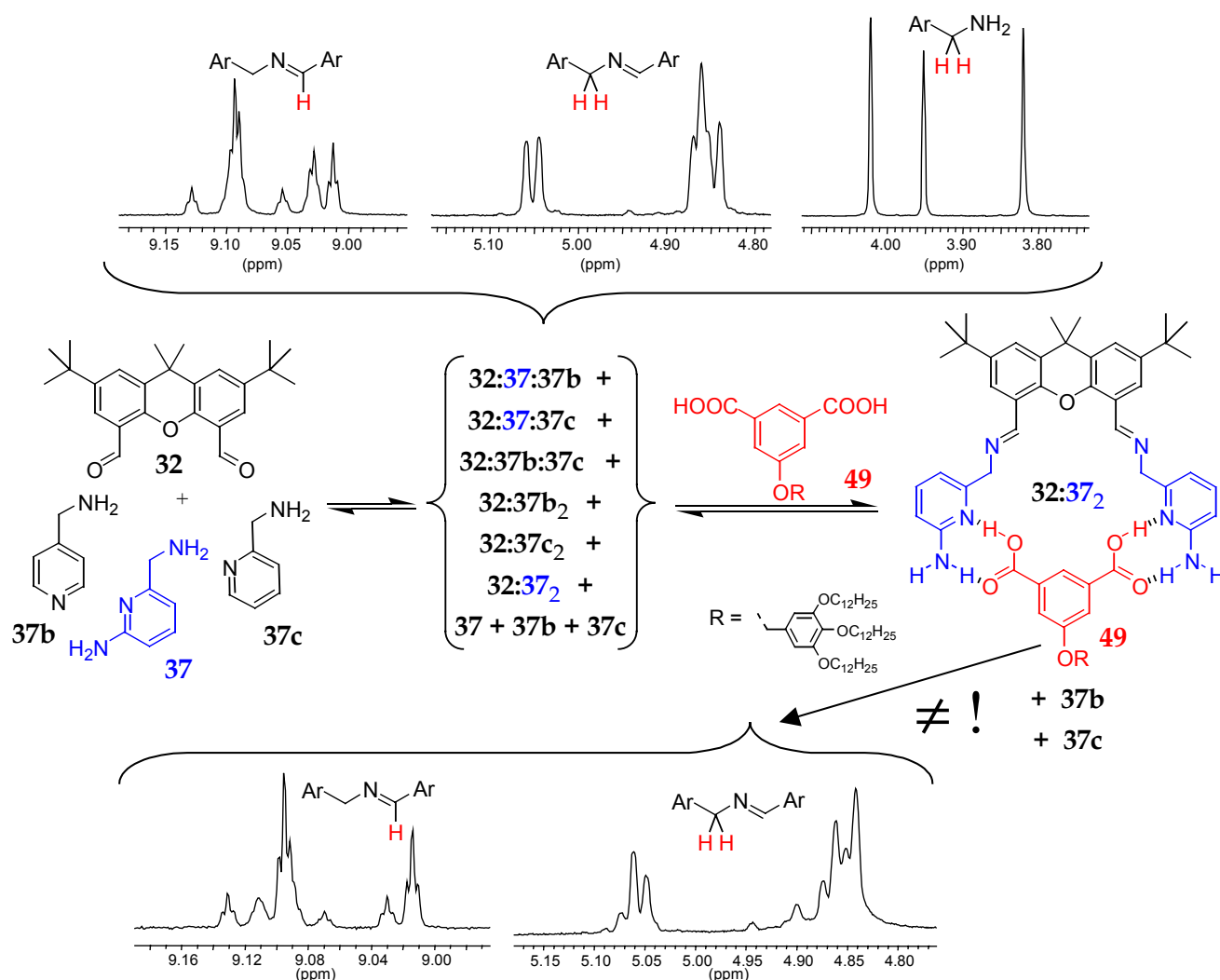


Schéma 1-9. Faible effet de la cible isophthalique sur la population des espèces à l'équilibre d'une DCL d'imes. Le double point définit la formation de liaisons covalentes d'imes entre les composants.

Contrairement à ce que l'on pouvait prévoir, le rajout d'un équivalent de la cible **49**, sensé déplacer de manière significative la composition du mélange vers la formation d'un produit majoritaire, le complexe **32:37₂:49**, a en réalité peu d'effet sur le mélange à l'équilibre, mis à part quelques déplacements chimiques de signaux.

L'influence de la cible a ensuite été minutieusement étudiée par RMN, par Electrospray-MS et par FAB-MS pour de multiples sous-bibliothèques dynamiques. Les résultats obtenus par ces trois techniques se sont avérés être difficiles à interpréter :

- La spectrométrie de masse par Electrospray montre la présence de grandes quantités d'oligomères, ce qui rend difficile la quantification des proportions des espèces.
- La spectrométrie de masse par FAB ne peut amener des conclusions claires à cause de l'inhomogénéité de l'ionisation.
- Quant à la RMN, la superposition de signaux empêche toute interprétation sans ambiguïté.

Les expériences de déconvolution ont tout de même permis de conclure que le faible effet de la cible consiste à diminuer légèrement l'abondance des produits de condensation dissymétriques, c'est-à-dire issus de la condensation du dialdéhyde avec deux différentes amines, mais n'augmente pas de manière significative la proportion du récepteur désiré.

1.4. Conclusion et perspectives

Les travaux présentés ont permis de démontrer le grand potentiel de l'approche de la chimie combinatoire dynamique, en mettant en évidence avec succès la sélection d'un récepteur optimal à partir d'une bibliothèque dynamique structurale conformationnelle et configurationnelle par la présence d'un substrat sélecteur. Il a été démontré que les isomérisations au sein d'une même molécule peuvent être exploitées pour générer une diversité structurale à partir de laquelle une espèce peut être amplifiée quantitativement par une cible ajoutée. Un développement serait l'implémentation simultanée de ces processus d'isomérisations conformationnelles/configurationnelles avec des processus de connections moléculaires et supramoléculaires entre composants pour augmenter la diversité des bibliothèques combinatoires dynamiques. De plus, l'exploitation d'autres processus conformationnels, tels que, par exemple, la rotation entravée autour de liaisons,^[71] représentent des extensions de ce travail, partiellement poursuivies au sein de notre groupe. Une extension d'intérêt particulier est exposée dans le Chapitre 2.

Bien que des efforts considérables sur les plans conceptuels, synthétiques et analytiques aient été fournis afin d'explorer le concept de la DCC à l'aide d'autres systèmes modèles de récepteurs, les résultats obtenus sont plutôt décevants. Les démarches ont mis en évidence un certain nombre de problèmes (et leurs interactions mutuelles) : la réactivité des produits, les faibles taux de sélection et d'amplification et les techniques d'analyse des mélanges. Mais ces études nous ont permis tout de même de faire un certain nombre de constatactions et de retenir des leçons pour des approches futures.

Dans un système combinatoire dynamique, la réversibilité entre les espèces et la reconnaissance moléculaire doivent se produire en parallèle dans un même milieu réactionnel. Souvent, l'incompatibilité entre conditions de réversibilité et conditions de reconnaissance moléculaire représente une restriction par rapport au choix des systèmes combinatoires dynamiques. Ceci a été observé dans le cas de la formation d'hydrazones (cf. 1.2.5). D'autres problèmes peuvent se produire si la cible elle-même est la source d'une certaine déstabilisation du produit (cf. 1.3.3.3). De plus, l'amplitude de l'effet de la cible sur un mélange combinatoire

dépend du nombre d'espèces qu'il contient. La distribution des sous-unités d'un bon ligand dans un grand nombre de combinaisons constitue une barrière entropique à la formation du ligand. Si l'effet de la cible n'est pas fort, elle ne conduit qu'à une faible amplification de certaines combinaisons qui peuvent être difficiles à identifier (cf. 1.3.3.4). On rencontre alors les mêmes problèmes qu'en chimie combinatoire classique pour l'identification du produit actif, présent en faible quantité dans un mélange complexe. L'approche combinatoire dynamique perd alors son intérêt.

De manière générale, la réversibilité dans un système combinatoire dynamique rend possible la décomposition du récepteur ou du ligand moulé en ses divers composants en absence de la cible (cf. 1.2.2.2). Une telle instabilité peut ne pas être compatible avec certaines applications telles que la recherche d'un médicament. Si l'expérience ne permet pas forcément la découverte directe d'un composé immédiatement exploitable dans le cadre d'une application donnée, elle donnera en tout cas l'information structurale nécessaire pour concevoir de tels composés. La chimie combinatoire dynamique est donc une approche intéressante pour la découverte de pistes (« lead structures »).