

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR7509

THÈSE présentée par :

Fabien STAUFFERT

soutenue le : **27 novembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Conception et Synthèse
d'Iminosucres Di- à Tétravalents
comme Sondes Mécanistiques et
Agents Thérapeutiques Potentiels**

THÈSE dirigée par :

M. COMPAIN Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

THÈSE encadrée par :

Mme BODLENNER Anne

Maître de Conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. VAUZEILLES Boris

Directeur de Recherche, Université Paris-Sud 11

M. POISSON Jean-François

Professeur, Université Joseph-Fourier – Grenoble 1

MEMBRES DU JURY :

Mme COLOBERT Françoise

Professeur, Université de Strasbourg

M. VAUZEILLES Boris

Directeur de Recherche, Université Paris-Sud 11

M. POISSON Jean-François

Professeur, Université Joseph-Fourier – Grenoble 1

M. COMPAIN Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR7509

THÈSE présentée par :

Fabien STAUFFERT

soutenue le : **27 novembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Conception et Synthèse
d'Iminosucres Di- à Tétravalents
comme Sondes Mécanistiques et
Agents Thérapeutiques Potentiels**

THÈSE dirigée par :

M. COMPAIN Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

THÈSE encadrée par :

Mme BODLENNER Anne

Maître de Conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. VAUZEILLES Boris

Directeur de Recherche, Université Paris-Sud 11

M. POISSON Jean-François

Professeur, Université Joseph-Fourier – Grenoble 1

MEMBRES DU JURY :

Mme COLOBERT Françoise

Professeur, Université de Strasbourg

M. VAUZEILLES Boris

Directeur de Recherche, Université Paris-Sud 11

M. POISSON Jean-François

Professeur, Université Joseph-Fourier – Grenoble 1

M. COMPAIN Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

*À Antoine,
À mon pépé,*

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr Philippe Compain, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir proposé ces projets passionnants à l'interface entre la chimie et la biologie. Sa clairvoyance, sa culture et sa rigueur scientifique m'ont permis de beaucoup apprendre à ses côtés et pour cela je lui en suis très reconnaissant. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié ses qualités humaines d'écoute et de compréhension, sa grande disponibilité ainsi que ses précieux conseils qui me serviront, j'en suis certain, tout au long de ma carrière.

Mes remerciements les plus sincères vont également au Dr Anne Bodlenner qui m'a encadré tout au long de ces trois années de thèse. Très impliquée dans mes travaux, elle a toujours été présente pour m'écouter et répondre à mes questions. Je retiendrai également sa bonne humeur permanente, son enthousiasme à toute épreuve et sa passion pour la chimie qui ont rendu ces années de thèse en sa compagnie si enrichissantes et agréables.

Je remercie le Dr Boris Vauzeilles et le Pr Jean-François Poisson d'avoir accepté de lire ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs ainsi que la Pr Françoise Colobert qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

J'exprime ensuite mes remerciements à tous les laboratoires avec lesquels nous avons collaboré au cours de cette thèse. Je remercie dans un premier temps le Pr Frédéric Becq, le Dr Caroline Norez et la doctorante Khadidja Sidelarbi pour les tests réalisés dans le cadre de la mucoviscidose ainsi que le Dr Antonio Delgado pour l'évaluation de nos composés comme chaperons pharmacologiques pour la maladie de Gaucher. Je remercie également le Dr Jean-François Nierengarten et le Dr Thi Minh Nguyet Trinh pour la synthèse du dérivé du fullerène ainsi que le Dr Raymond Ziessel et le Dr Antoine Mirloup pour la préparation des plateformes fluorescentes BODIPY.

J'adresse également toute ma gratitude au Dr Damien Hazelard qui a toujours su m'aider quand j'en avais besoin au laboratoire. Je me souviendrai en particulier de nos discussions, article scientifique à l'appui, sur la chimie dans la série Breaking Bad.

Je remercie par la même occasion tous mes collègues doctorants du laboratoire. Camille, la figure iconique du laboratoire que j'ai pu côtoyer quelques mois. Pierre-Antoine, une machine de synthèse qui a été un exemple pour moi et qui m'a tout appris du fonctionnement du laboratoire. Mathieu, bien plus qu'un collègue, un ami très proche et mon colocataire. Chimiste ingénieux et généreux, je le remercie pour tout ce qu'il m'a apporté et lui souhaite plein de réussite pour la suite de son parcours. Merci également à Jérémy, digne héritier du R5N2 et des projets de multivalence, ainsi qu'à Raphaël, nouvel expert des petits cycles contraints. Je leur souhaite plein de courage pour la fin de leur thèse. Enfin, merci à Maëva, toute nouvelle recrue que j'ai eu la chance d'encadrer en tant que stagiaire M2 et qui a déjà bien avancé dans son projet de thèse. Bon courage pour la suite. Je n'oublie pas le post-doc papy Antoine qui a débuté sur le sujet des correcteurs multivalents et qui est maintenant maître de conférences à Rouen.

J'ai également une pensée particulière envers tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire et qui ont contribué à mettre une très bonne ambiance : Guillaume, Nadia et Julien, avec qui j'ai débuté en stage master, Éric, mon compatriote franc-comtois, Najet, Hélène et Manon, des pronostiqueuses brillantes pendant la Coupe du monde de football, Marie, jeune stagiaire d'IUT très compétente que j'ai suivie et enfin Luis, Sandra et Robin avec qui j'ai passé de bons moments autour de bonnes sangrias. Je n'oublie évidemment pas notre ancien technicien Émile avec qui j'ai noué une vraie amitié. Chimiste très talentueux, je lui souhaite plein de réussite pour sa carrière.

Je remercie aussi tous les services d'analyse de l'Université de Strasbourg et en particulier le Dr Michel Schmitt pour son aide en RMN et pour les analyses longues que je lui ai régulièrement demandées. Je lui souhaite d'ailleurs une bonne retraite.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'UMR et de l'ECPM que j'ai rencontrées et qui m'ont accompagné pendant ces trois années de thèse. Je pense notamment à Mickaël, avec qui je me suis payé de bonnes tranches de rigolade, Joanna et Armen, jeunes chargés de recherche très sympathiques et toujours à l'écoute, Didier, qui m'a bien aidé quand il fallait bricoler au laboratoire, et sans oublier Élodie, Xavier, Franck, Sébastiano, Haifa, Angéline, Lobna et Antonella. Un grand merci également à toutes les personnes que j'ai côtoyées pendant les enseignements de travaux pratiques : Barbara, Christine, Sabine, Marie Céline, Claude, Vincent, Loïc et Jean Luc.

J'ai également une grosse pensée pour mes colocataires de l'Embuscade qui se sont succédés au fil des années : Thibaud, Guillaume, Benoît, Mathieu, Camille, Alexandre et Aymeric. Je n'oublierai pas tous les supers moments que l'on a partagés ensemble et qui rendent notre amitié vraiment précieuse. Je pense aussi à tous mes amis de Franche-Comté et d'ailleurs que je n'ai pas pu voir autant de fois que je le voulais, j'espère pouvoir un jour rattraper le retard accumulé.

Finalement, je tiens à remercier toute ma famille pour leur soutien inconditionnel : mes parents, à qui je dois tout et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, ma mémé aimante, mon petit frère adoré, Éric pour ses appels pleins de gentillesse, mon tonton chimiste Frédo, ma tante Joëlle et Pierre et tous les autres évidemment.

Enfin, je remercie du fond du cœur Betty qui a su me soutenir, me supporter, m'encourager pendant toute la durée de ma thèse et plus particulièrement durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été des plus faciles. Malgré mon éloignement, sa confiance, ses conseils et son affection m'ont guidé et porté tous les jours. Cette thèse et moi te devons beaucoup. Merci infiniment.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

1. LES IMINOSUCRES	3
1.1. Historique	3
1.2. Les iminosucres, de puissants inhibiteurs de glycosidases	5
1.2.1. Les glycosidases	5
1.2.2. Mécanismes d'action des glycosidases.....	5
1.2.3. L'inhibition des glycosidases par les iminosucres	7
1.3. Intérêt thérapeutique des iminosucres.....	7
2. MULTIVALENCE ET INHIBITION DE GLYCOSIDASES	8
2.1. La multivalence dans les interactions lectine-sucre.....	9
2.1.1. Effet de cluster glycosidique	9
2.1.2. Les mécanismes de la multivalence	10
2.2. Iminosucres multivalents et inhibition de glycosidases.....	12
2.2.1. Premiers exemples d'iminosucres di- et tétravalents	13
2.2.2. La chimie click : un accès rapide aux iminosucres multivalents.....	14
2.2.3. Aspects mécanistiques	18
2.3. Application à l'inhibition de glycosidases d'intérêt thérapeutique.....	22
2.3.1. β -Glucocérébrosidase (maladie de Gaucher)	22
2.3.2. Glucosidases du réticulum endoplasmique (mucoviscidose).....	23
2.3.3. α -Mannosidases II de l'appareil de Golgi (cancer)	24
3. PLAN DU TRAVAIL DE THÈSE.....	25

CHAPITRE 1. Iminosucres di- à tétravalents comme correcteurs de la protéine CFTR 27

1. LA MUCOVISCIDOSE.....	29
1.1. Épidémiologie.....	29
1.2. Physiopathologie.....	29
1.3. Traitements actuels.....	30
1.4. Historique et découverte de la maladie.....	31
1.5. Origine de la maladie	31
1.6. Biosynthèse de la protéine CFTR.....	34
1.7. Les différentes classes de mutations et leurs conséquences sur la protéine CFTR.....	35
1.8. Approches thérapeutiques à visée curative	36
2. CORRIGER LA PROTÉINE DELF508-CFTR EN INHIBANT LES GLYCOSIDASES DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE ?	37
2.1. Biosynthèse des protéines <i>N</i> -glycosylées et contrôle-qualité au sein du RE.....	38

2.1.1.	Transfert du <i>N</i> -glycane sur la protéine	38
2.1.2.	Repliement de la protéine et contrôle-qualité : le cycle calnexine/calréticuline	39
2.1.3.	Sortie des protéines correctement repliées du RE vers l'appareil de Golgi	40
2.1.4.	Reconnaissance et dégradation des protéines mal repliées	41
2.2.	Le cas de la <i>N</i> -butyl-DNJ, un inhibiteur des glucosidases I et II du RE	42
2.3.	Premiers effets multivalents sur la correction de la protéine delF508-CFTR	43
2.4.	Une nouvelle stratégie thérapeutique en inhibant l' α 1,2-mannosidase I du RE	45
2.4.1.	L' α 1,2-mannosidase I du RE	46
2.4.2.	La DMJ et la <i>N</i> -butyl-DMJ, deux correcteurs de la protéine delF508-CFTR.....	46
2.5.	Conception d'iminosucres multivalents basés sur la <i>N</i> -butyl-DMJ	47
2.5.1.	La réaction de CuAAC comme outil synthétique puissant	48
a)	Une réaction de chimie click.....	48
b)	Mécanisme	48
c)	Avantages de la CuAAC.....	50
2.5.2.	Choix de la plateforme, de la valence et du ligand.....	51
3.	SYNTHÈSE DE CLUSTERS DI- À TÉTRAVALENTS EN SÉRIE DMJ	52
3.1.	Synthèse des ligands <i>N</i> -(azidoalkyl)-DMJ	52
3.1.1.	Obtention de la 1-désoxymannojirimycine (DMJ).....	52
a)	Exemples de synthèse de la DMJ	53
b)	Une nouvelle synthèse de la DMJ	57
3.1.2.	<i>N</i> -alkylation de la DMJ.....	61
3.2.	Synthèse des plateformes dérivées du pentaérythritol.....	62
3.3.	Synthèse des clusters di-, tri- et tétravalents par CuAAC et déprotection.....	64
3.4.	Synthèse des analogues monovalents	66
4.	EFFET CORRECTEUR DES CLUSTERS SYNTHÉTISÉS	69
4.1.	Concentration efficace médiane (EC_{50})	69
4.2.	Preuve de la restauration de l'adressage défectueux de la protéine delF508-CFTR.....	70
4.3.	Mécanisme d'action du cluster de DMJ trivalent	72
5.	SYNTHÈSE D'UNE SONDE FLUORESCENTE	72
5.1.	Conception d'un cluster de DMJ trivalent et fluorescent.....	73
5.2.	Synthèse d'un cluster basé sur une plateforme F-BODIPY fluorescente.....	74
5.2.1.	Synthèse de la plateforme	74
5.2.2.	Couplage des ligands à la plateforme et déprotection	75
5.3.	Futures évaluations biologiques	78
6.	RÉSUMÉ DU CHAPITRE	79

CHAPITRE 2. Iminosucres hétérodivalents comme nouveaux chaperons pharmacologiques.....81

1.	LA MALADIE DE GAUCHER.....	83
1.1.	Épidémiologie.....	83

1.2.	Causes de la maladie.....	83
1.3.	Historique et découverte de la maladie.....	84
1.4.	Physiopathologie.....	84
1.5.	Les différents phénotypes.....	86
1.5.1.	Type 1, sans atteinte neurologique.....	86
1.5.2.	Type 2, forme neurologique aigüe.....	86
1.5.3.	Type 3, forme neurologique subaigüe.....	87
1.6.	Les différentes mutations affectant la GCCase.....	87
1.6.1.	Mutations du gène <i>GBA</i>	87
1.6.2.	Corrélations génotype-phénotype.....	87
1.6.3.	Impact des mutations sur l'enzyme.....	88
1.7.	Traitements existants.....	89
1.7.1.	Traitement enzymatique substitutif (ERT).....	89
1.7.2.	Traitement par réduction de substrat (SRT).....	90
2.	UNE NOUVELLE APPROCHE THÉRAPEUTIQUE : LA THÉRAPIE CHAPERON	91
2.1.	Une approche contre-intuitive.....	92
2.2.	Les iminosucres comme chaperons pharmacologiques.....	94
2.2.1.	Une attention particulière sur la mutation N370S la plus fréquente.....	94
a)	Les dérivés <i>N</i> -alkylés de la DNJ.....	94
b)	Les dérivés α -1- <i>C</i> -alkyl-DNJ et α -1- <i>C</i> -alkyl-DIX.....	96
c)	L'isofagomine et ses dérivés alkylés.....	96
d)	D'autres iminosucres et glycomimétiques.....	97
2.2.2.	Les mutations sévères G202R et L444P.....	98
2.3.	Les chaperons pharmacologiques basés sur une structure non glycosidique.....	100
2.3.1.	Les composés inhibiteurs de la GCCase.....	100
2.3.2.	Les composés activateurs purs de la GCCase.....	101
3.	VERS DE NOUVEAUX CHAPERONS PHARMACOLOGIQUES CIBLANT UN SITE SECONDAIRE DE LA GCASE.....	101
3.1.	Conception d'un système hétérodivalent pour cibler et identifier un site secondaire de la GCCase.....	102
3.2.	Exemples de systèmes (hétéro)divalents : le cas de l'acétylcholinestérase et de l'anhydrase carbonique I.....	103
3.3.	Stratégie de synthèse du système hétérodivalent.....	105
3.4.	Analogues homodivalents et monovalents.....	107
4.	SYNTHÈSE DES DEUX TÊTES ÉNANTIOMÈRES ACÉTYLÉNIQUES.....	108
4.1.	Une approche synthétique stéréodivergente.....	108
4.2.	Synthèse du D-xylose protégé en position C-3.....	109
4.3.	Synthèse du précurseur commun D-xylono- δ -lactame.....	110
4.3.1.	Première stratégie : amidation oxydante et cyclisation intramoléculaire.....	110
a)	Étape d'amidation oxydante.....	110
b)	Tentatives d'introduction d'un groupement partant (bromure ou tosyle).....	111

4.3.2.	Deuxième stratégie : ouverture d'une γ -lactone par l'ammoniaque et cyclisation intramoléculaire	113
a)	Essai avec le groupement partant mésitylène sulfonyle	114
b)	Changement de groupement partant pour un groupement iodure.....	115
c)	Optimisation de l'étape de formation du lactame	116
d)	Aspect mécanistique	118
4.4.	Synthèse divergente des deux têtes acétyléniques.....	119
5.	SYNTHÈSE DES SYSTÈMES HÉTÉRODIVALENTS, HOMODIVALENTS ET MONOVALENTS.....	120
5.1.	Systèmes hétérodivalents avec un bras espaceur à 6 ou 10 chaînons (type alkyle).....	120
5.2.	Système hétérodivalent avec un bras espaceur à 13 chaînons (type éther).....	125
5.3.	Systèmes hétérodivalents avec un bras espaceur mixte à 15 ou 22 chaînons (type alkyle/PEG)	127
5.4.	Analogues homodivalents.....	129
5.5.	Analogues monovalents.....	130
6.	ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES SYSTÈMES HÉTÉRODIVALENTS, HOMODIVALENTS ET MONOVALENTS	133
6.1.	Rappels de notions d'enzymologie	133
6.1.1.	La cinétique enzymatique	133
6.1.2.	L'inhibition enzymatique	134
a)	Les inhibiteurs réversibles compétitifs.....	135
b)	Les inhibiteurs réversibles incompétitifs.....	136
c)	Les inhibiteurs réversibles non compétitifs.....	137
d)	La concentration inhibitrice médiane IC_{50}	139
6.2.	Résultats et discussion	140
6.2.1.	Activités inhibitrices vis-à-vis de la GCCase	140
6.2.2.	Effet chaperon sur la GCCase	142
6.2.3.	Recherche d'un effet de synergie.....	144
6.2.4.	Réduction du taux de GlcCer dans les fibroblastes	145
6.2.5.	Sélectivité vis-à-vis d'autres glycosidases.....	147
7.	RÉSUMÉ DU CHAPITRE	148

CHAPITRE 3. C-Glycosides multivalents comme sondes mécanistiques 151

1.	LES C-GLYCOSIDES	153
2.	C-GLYCOSIDES MULTIVALENTS ET INTERACTIONS NON SPÉCIFIQUES....	154
3.	APPROCHE SYNTHÉTIQUE POUR LES C-GLUCOSIDES MULTIVALENTS....	156
4.	SYNTHÈSE DES LIGANDS (AZIDOHXYL)-C-GLUCOSIDES.....	158
4.1.	Synthèse des deux partenaires de métathèse	158
4.2.	Réaction de métathèse croisée	159

4.3. Hydrogénation et introduction de l'azoture	163
5. SYNTHÈSE DES CLUSTERS DE C-GLUCOSIDES ET DE LEUR ANALOGUE MONOVALENT	164
5.1. C-Glucoside monovalent de référence	164
5.2. Clusters de C-glucosides dodéca- et tétradécavalents	165
6. RÉSUMÉ DU CHAPITRE	168
CONCLUSION GÉNÉRALE	169
PARTIE EXPÉRIMENTALE	173
BIBLIOGRAPHIE	245
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS	259

Liste des abréviations et acronymes

1,4-BQ	1,4-Benzoquinone
1N-ONJ	1-Amino-5 <i>N</i> ,6 <i>O</i> -oxométhylidènenojirimycine
ABC	Adenosine triphosphate binding cassette
Ac	Acétyle
AC ₅₀	Concentration nécessaire pour obtenir une réponse de 50% en test <i>in vitro</i>
AChE	Acétylcholinestérase
ADP	Adénosine diphosphate
AllylTMS	Allyltriméthylsilane
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTS	Acide para-toluènesulfonique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
asc.	Ascorbate
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
BFA	Bréfeldine A
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
BODIPY	Dipyrométhène de bore
Bu	Butyle
BuChE	Butyrylcholinestérase
CaCC	Ca ²⁺ -Activated chloride conductance channel
cat.	Catalyseur ou en quantité catalytique
CAZy	Carbohydrate active enzymes (database)
Cbz	Carboxybenzyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CNX	Calnéxine
COSY	Correlation spectroscopy
CRT	Calréticuline
CuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée au cuivre(I)
Cy	Cyclohexyle
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DEPT	Distortionless enhanced by polarization transfer
DGJ	1-Désoxygalactonojirimycine
DIX	1,5-Didésoxy-1,5-imino-D-xylitol
DMAP	<i>N,N</i> -Diméthyl-4-aminopyridine
DMDP	2,5-Dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrrolidine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMJ	1-Désoxymannojirimycine
DMSO	Diméthylsulfoxyde

DNJ	1-Désoxynojirimycine
EC ₅₀	Concentration efficace médiane
EDEM	Endoplasmic reticulum degradation-enhancing α -mannosidase-like protein
EG	Ethylène glycol
ELLA	Enzyme-linked lectin assay
ENaC	Epithelial sodium channel
éq.	Équivalent
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation
ERGIC-53	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 53 kDa
Erp57	Endoplasmic reticulum resident protein 57 kDa
ERQC	Endoplasmic reticulum quality control
ERT	Enzyme replacement therapy
ESI-MS	Spectrométrie de masse en ionisation par électronébuliseur
FOS	Free oligosaccharide
Gal	Galactose
GBA	Glucosidase, Beta, Acid
GCase	β -Glucocérébrosidase
GCS	Glucosylcéramide synthase
GH	Glycosyle hydrolase
GI	α -Glucosidase I du réticulum endoplasmique
GII	α -Glucosidase II du réticulum endoplasmique
Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylcéramide
GlcNAc	<i>N</i> -Acétylglucosamine
GM	α -Mannosidases II de l'appareil de Golgi
GP	Groupe protecteur
GSL	Glycosphingolipide
hCA-I	Anhydrase carbonique humaine I
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
Hsp70	Heat shock protein 70 kDa
Hsp90	Heat shock protein 90 kDa
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HTS	High throughput screening
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ICGG	International collaborative Gaucher group
ICP-AES	Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy
IDA	Iminodiacétate
IFG	Isofagomine
imid.	Imidazole
IR	Infrarouge
Ir	Inhibition relative
Ir/ <i>n</i>	Inhibition relative par unité d'iminosucre
ITC	Titration calorimétrique isotherme

IUBMB	International union for biochemistry and molecular biology
K_D	Constante de dissociation du complexe ligand-récepteur
kDa	Kilodalton
K_i	Constante d'inhibition (constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur)
K_M	Constante de Michaelis
Man	Mannose
Me	Méthyle
Mes	Mésityle
MOM	Méthoxyméthyle
MsCl	Chlorure de méthanesulfonyle
MSD	Membrane-spanning domain
Mts	2,4,6-Triméthylbenzènesulfonyle
MW	Microwave (micro-ondes)
n.d.	Non déterminé
Na ₂ EDTA	2,2'-{1,2-Éthanediylobis[(carboxyméthyl)imino]}diacétate de disodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NBD	Nucleotide-binding domain
NB-DMJ	<i>N</i> -Butyl-1-désoxymannojirimycine
NB-DNJ	<i>N</i> -Butyl-1-désoxynojirimycine
NN-DNJ	<i>N</i> -Nonyl-1-désoxynojirimycine
OST	Oligosaccharyltransférase
PCT	Pharmacological chaperone therapy
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
PKA	Protéine kinase A
PMA	Phosphomolybdic acid
PPase	Protéine phosphatase
ppm	Partie par million
PPTS	Para-toluènesulfonate de pyridinium
Pr	Propyle
pyr.	Pyridine
quant.	Quantitatif
RE	Réticulum endoplasmique
REManI	α 1,2-Mannosidase I du réticulum endoplasmique
R_f	Rapport frontal
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée au ruthénium(II)
RX	Rayons X
SapC	Saposine C
Ser	Sérine
SLT-I	Shiga-like toxin I
SRT	Substrate reduction therapy
t.a.	Température ambiante

TBAB	Bromure de tétrabutylammonium
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphénylsilyle
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyle
Tf ₂ O	Anhydride trifluorométhanesulfonique
TFA	Acide trifluoroacétique
THA	9-Amino-1,2,3,4-tétrahydroacridine
THF	Tétrahydrofurane
Thr	Thréonine
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Triméthylsilyle
Ts	Para-toluènesulfonyle
UDP	Uridine diphosphate
UGGT	Uridine diphosphate-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase
UPLC-MS	Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry
UV	Ultraviolet
<i>vs</i>	<i>Versus</i>
WT	Wild type (native)
α -Gal	α -Galactosidase
α -Glu	α -Glucosidase
β -Gal	β -Galactosidase
β -Hex	β -Hexosaminidase

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LES IMINOSUCRES

1.1. Historique

Les glucides représentent une des quatre classes majeures de biomolécules avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Ils sont utilisés par le vivant comme source d'énergie (amidon, glycogène), comme architecture moléculaire (cellulose, chitine) et interviennent aussi dans un très grand nombre de processus biologiques comme la reconnaissance cellulaire ou la maturation des protéines. L'abondance des sucres dans la nature, leur diversité structurale et leurs différents rôles en biologie en font des molécules de grand intérêt pour le développement de nouvelles thérapies. Cependant, le développement de médicaments basés sur des sucres n'a pas été à la mesure de leur intérêt biologique. Les sucres sont en effet de mauvais candidats comme agents thérapeutiques, principalement à cause de leur instabilité métabolique, de leur faible biodisponibilité et de leur complexité structurale.

Pour palier à ces problèmes, les chimistes se sont attachés à concevoir et synthétiser des mimes de sucres, offrant une plus grande stabilité, affinité, sélectivité et efficacité vis-à-vis des cibles biologiques.¹ Ces analogues de sucres, conçus pour mimer le substrat naturel d'enzymes à l'état fondamental ou à l'état de transition, présentent une certaine organisation spatiale et les groupements fonctionnels essentiels pour mimer la structure des sucres. Parmi les différentes classes de glycomimétiques (**Figure 1**), on retrouve les thiosucres pour lesquels l'oxygène endocyclique est remplacé par un atome de soufre, les iminosucres pour lesquels il est remplacé par un atome d'azote, les carbasucres où celui-ci est remplacé par un méthylène, ou encore les C-glycosides où l'oxygène glycosidique est remplacé par un carbone.

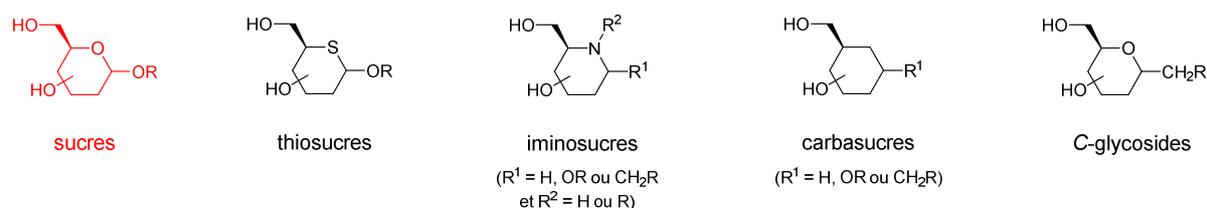


Figure 1. Principales classes de glycomimétiques.

Parmi les nombreuses structures étudiées, les iminosucres représentent la classe de glycomimétiques la plus importante.² Ces composés organiques sont classifiés suivant leur structure en cinq différentes classes : pyrrolidines, pipéridines, pyrrolizidines, indolizidines et nortropanes (**Figure 2**). Ces différents cycles sont majoritairement substitués par des fonctions hydroxyles mais peuvent également être substitués par d'autres groupements fonctionnels tels que des acides carboxyliques ou des groupements NHAc comme pour les sucres naturels. Les analogues synthétiques peuvent quant à eux présenter de nombreuses autres variations.

INTRODUCTION GÉNÉRALE



Figure 2. Les cinq grandes classes d'iminosucres.

Dans les années 1960, les groupes de Paulsen,³ Hanessian⁴ et Jones⁵ ont été les premiers à synthétiser des analogues de sucres basés sur un hétérocycle comportant un atome d'azote. Ces synthèses ne représentaient à l'époque qu'un exercice purement académique et les travaux de Paulsen dans ce domaine ont conduit, en 1966, à la première synthèse de la 1-désoxynojirimycine (DNJ, **1**).⁶ Quelques mois après la publication des travaux de Paulsen, le groupe d'Inouye a mis en évidence les propriétés antibiotiques de la nojirimycine (**2**), un iminosucre naturel isolé dans des extraits bactériens de *Streptomyces* (dont *Streptomyces nojiriensis*).^{7,8} Après cette découverte des propriétés biologiques des iminosucres, l'étude de ces composés s'est peu à peu développée et bon nombre d'entre eux ont alors été isolés à partir de plantes, bactéries et micro-organismes. La moraline (1-désoxynojirimycine), déjà synthétisée par Paulsen, a par exemple été extraite des racines du mûrier blanc.⁹ Des composés très proches comme la 1-désoxymannojojirimycine (**3**, DMJ),¹⁰ la fagomine (**4**),¹¹ ou la DMDP (**5**; 2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrrolidine)¹² ont également été isolés à partir de plantes. Parmi les structures bicycliques isolées et identifiées, on retrouve la swainsonine (**6**)¹³ ou encore la castanospermine (**7**).¹⁴ Au final, plus d'une centaine d'iminosucres d'origine naturelle ont été isolés à ce jour.¹⁵

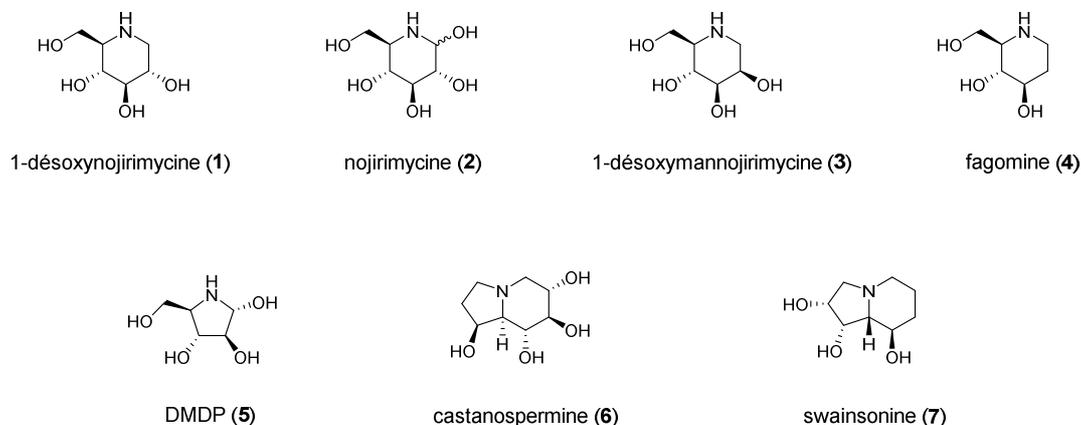


Figure 3. Exemples d'iminosucres naturels.

Les iminosucres n'ont cependant déclenché un très grand intérêt et des études biologiques approfondies qu'à la suite de la mise en évidence par les chimistes de Bayer, en 1976, de leurs propriétés comme inhibiteurs de glycosidases. C'est d'ailleurs cette découverte qui a conduit à la première application thérapeutique des iminosucres avec le Glyset[®] (miglitol), un inhibiteur de glycosidases intestinales qui est aujourd'hui utilisé pour traiter les complications associées au diabète de type II. En réalité, ces propriétés antidiabétiques étaient déjà exploitées depuis longtemps car les feuilles de mûrier blanc, qui contiennent des iminosucres dont la DNJ, étaient utilisées en médecine traditionnelle chinoise pour soigner le « Xiao-ke » (diabète).¹⁶

1.2. Les iminosucres, de puissants inhibiteurs de glycosidases

1.2.1. Les glycosidases

Les glycosidases, aussi appelées glycosyle hydrolases (GH), sont une grande famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison glycosidique dans les polysaccharides ou les glycoconjugués. Elles sont présentes chez tous les organismes vivants et sont impliquées dans une grande variété de processus biologiques comme la production d'énergie, le catabolisme des glycoconjugués ou encore les modifications post-traductionnelles des glycoprotéines. L'ensemble des gènes codant pour les glycosidases représente environ 1% du génome d'un être vivant,¹⁷ et plus de 260 000 glycosidases ont été découvertes à ce jour.¹⁸ Ces enzymes ont alors été répertoriées dans une base de données appelée CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*) et classées en 133 familles (GH 1 à 133) suivant leur séquence d'acides aminés et la similarité de leur structure tridimensionnelle.¹⁹ Ces familles sont elles-mêmes regroupées en 14 clans (GH A à N) dans lesquels les glycosidases partagent des caractéristiques communes comme la structure tertiaire, le mécanisme d'action ou encore la configuration du carbone anomérique du substrat. Un autre classement des glycosidases a également été réalisé par l'IUBMB (*International Union for Biochemistry and Molecular Biology*) en se basant sur leur spécificité et/ou leur mécanisme moléculaire.

1.2.2. Mécanismes d'action des glycosidases

La liaison glycosidique est la liaison plus stable des polymères naturels; en effet, le temps de demi-vie pour l'hydrolyse spontanée de cette liaison dans la cellulose est estimé à 4,7 millions d'années.²⁰ Les glycosidases catalysent cette réaction d'hydrolyse avec des constantes de vitesse impressionnantes allant jusqu'à 1000 s^{-1} , ce qui les classe parmi les enzymes les plus efficaces rencontrées dans la nature. À partir des années 1950, les biologistes se sont alors intéressés à comprendre les mécanismes d'action de ces enzymes.

On distingue aujourd'hui deux mécanismes différents pour l'hydrolyse de la liaison glycosidique par les glycosidases : le premier implique une inversion de configuration au niveau du carbone anomérique du substrat et le second une rétention de configuration. En 1953, Koshland a proposé un premier modèle pour ces deux mécanismes faisant intervenir dans le premier cas une seule substitution nucléophile et dans le second cas, deux substitutions nucléophiles et la formation d'un intermédiaire substrat-enzyme lié de façon covalente.²¹ Plus tard, un second modèle mécanistique a été proposé impliquant cette fois-ci la formation d'un intermédiaire oxocarbénium.²² Aujourd'hui, ces deux modèles sont largement reconnus et impliquent deux résidus du site actif de l'enzyme (acide aspartique et/ou acide glutamique) positionnés de façon à « encercler » le substrat lorsque celui-ci vient se lier dans le site actif.

Dans le cas de l'hydrolyse avec inversion de configuration (**Schéma 1**), l'un des résidus sous forme carboxylate permet la déprotonation d'une molécule d'eau (catalyse basique) qui réalise une attaque nucléophile sur le centre anomérique. Simultanément, l'autre résidu sous forme acide carboxylique active la liaison glycosidique par protonation de l'oxygène (catalyse acide) et facilite ainsi le départ de la partie aglycone. La réaction passe alors par un seul état de transition de type oxocarbénium.²³ Dans le site actif de l'enzyme, la distance entre les deux résidus est de 9,0 à 9,5 Å.²⁴

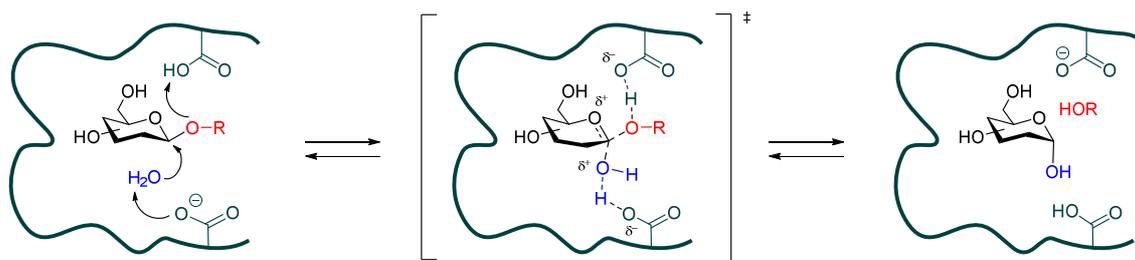


Schéma 1. Mécanisme d'hydrolyse de la liaison glycosidique par une β -glycosidase avec inversion de configuration (le cas d'une α -glycosidase est similaire).

Dans le cas des glycosidases impliquant une rétention de configuration (**Schéma 2**), la distance entre les deux résidus du site actif est plus courte, entre 4,8 et 5,3 Å,²⁴ ce qui contrairement au cas précédent ne permet pas l'insertion d'une molécule d'eau entre le substrat et le résidu carboxylate. Dans un premier temps, ce carboxylate va donc jouer le rôle de nucléophile et s'insérer au niveau du carbone anomérique. Simultanément, l'autre résidu sous forme acide carboxylique active la liaison glycosidique par protonation de l'oxygène (catalyse acide) et facilite le départ de la partie aglycone pour former un intermédiaire enzyme-substrat lié de façon covalente. Dans un deuxième temps, une molécule d'eau déprotonée par le résidu carboxylate nouvellement formé (catalyse basique) réalise une attaque nucléophile sur le carbone anomérique pour former un hémiacétal, de même stéréochimie que le substrat de départ. Chacune de ces deux étapes se fait *via* un état de transition de type oxocarbénium.²³

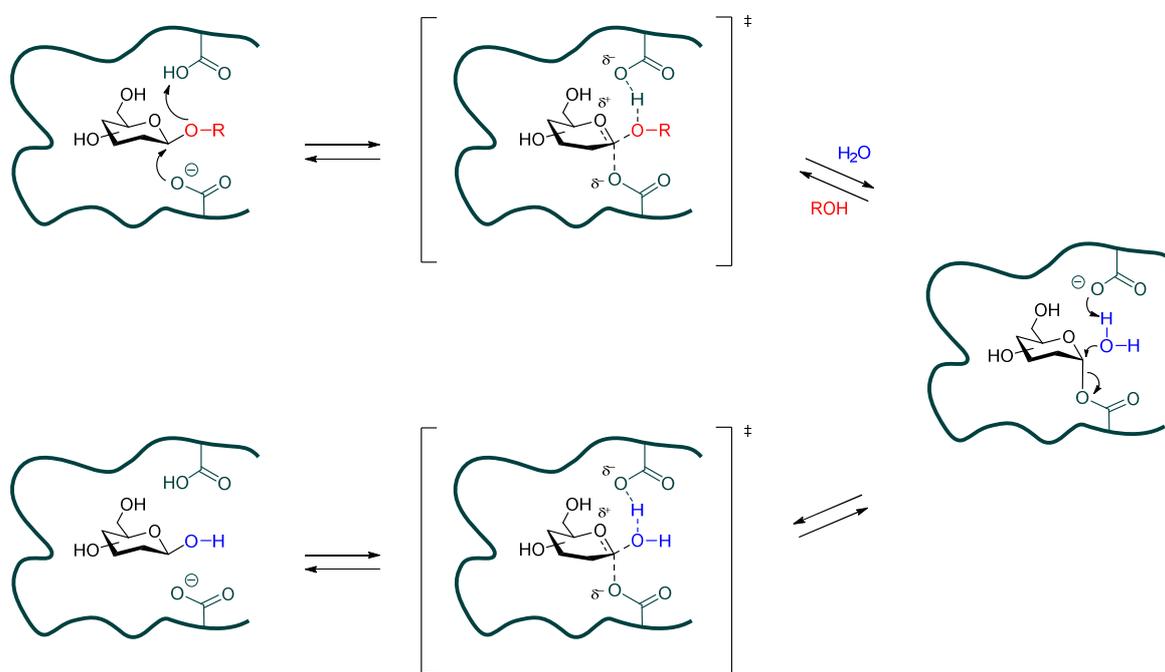


Schéma 2. Mécanisme d'hydrolyse de la liaison glycosidique par une β -glycosidase avec rétention de configuration (le cas d'une α -glycosidase est similaire).

1.2.3. L'inhibition des glycosidases par les iminosucres

Au regard de ces considérations mécanistiques, il est plus facile de comprendre les propriétés inhibitrices des iminosucres vis-à-vis des glycosidases. Tout d'abord, les iminosucres miment la partie glycone du substrat naturel avec leur structure polyol et créent ainsi des interactions de type liaison hydrogène dans le site actif de l'enzyme. D'autre part, l'atome d'azote endocyclique peut se protoner à pH physiologique et interagir fortement avec le résidu carboxylate du site actif de l'enzyme *via* des interactions électrostatiques (**Figure 4**). Ces caractéristiques expliquent par conséquent pourquoi les iminosucres sont des inhibiteurs compétitifs réversibles des glycosidases, dont les constantes d'inhibition peuvent être inférieures au pM.²⁵

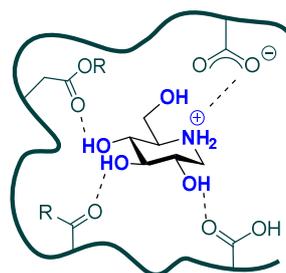


Figure 4. Interactions d'un iminosucre (DNJ) dans le site actif des glycosidases.

1.3. Intérêt thérapeutique des iminosucres

Étant donné que les glycosidases participent à une grande variété de processus biologiques, la possibilité de développer des agents thérapeutiques pour certaines pathologies à partir d'iminosucres a rapidement été envisagée.^{2,26} L'inhibition des glycosidases intestinales a été et reste une application thérapeutique majeure des iminosucres puisqu'elle permet de réguler l'absorption des sucres dans le sang et peut être utilisée pour traiter les complications associées au diabète de type II. Cette stratégie a abouti en 1996 à la première mise sur le marché d'un médicament basé sur une structure de type iminosucre, le Glyset[®] (**8**, miglitol) (**Figure 5**).²⁷

L'inhibition des glycosidases cellulaires du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi représente également une voie thérapeutique très prometteuse pour le traitement de nombreuses pathologies. En effet, ces glycosidases participent à l'élaboration du motif *N*-glycane qui est un oligosaccharide présent à la surface des glycoprotéines et qui joue un rôle clé dans le repliement de ces dernières et dans les processus de contrôle-qualité (voir **CHAPITRE 1**).²⁸ En inhibant ces glycosidases, les iminosucres peuvent donc moduler la structure des *N*-glycanes et par conséquent les processus dans lesquels ils sont impliqués.²⁹ À partir de là, les iminosucres ont montré des propriétés antivirales (**9**, Celgosivir[®]),^{30,31} des propriétés anticancéreuses (**6**, swainsonine)^{32,33} ou encore des propriétés anti-inflammatoires.³⁴ Dans le cas de la mucoviscidose, l'inhibition des glucosidases I et II du RE est actuellement envisagée comme voie thérapeutique potentielle pour traiter cette maladie.³⁵

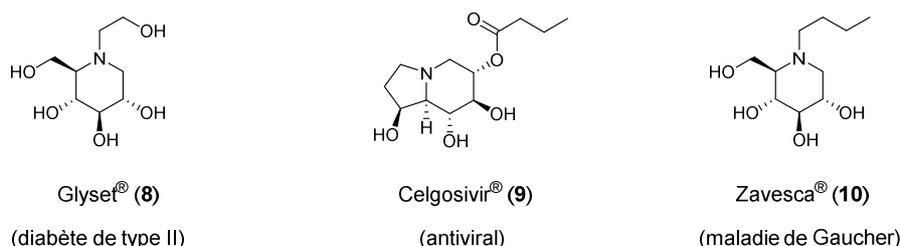


Figure 5. Exemples d'iminosucres possédant des propriétés thérapeutiques.

Les glycosidases ne sont toutefois pas les seules cibles enzymatiques des iminosucres, en effet le nombre d'enzymes inhibées par ces glycomimétiques s'est largement étendu, élargissant ainsi le nombre de cibles thérapeutiques (**Tableau 1**). Le Zavesca® (10) est également un exemple représentatif des applications thérapeutiques des iminosucres puisque cet inhibiteur de la glucosylcéramide synthase (une glycosyltransférase) est aujourd'hui utilisé pour le traitement de la maladie de Gaucher (**Figure 5**). Les iminosucres sont aussi largement utilisés comme chaperons pharmacologiques en vue de traiter des maladies lysosomales telles que la maladie de Gaucher et la maladie de Fabry (voir **CHAPITRE 2**).^{36,37}

Tableau 1. Autres cibles enzymatiques et thérapeutiques des iminosucres.²

Cibles enzymatiques	Cibles thérapeutiques
Glycosyltransférases (1992)	Maladies virales (années 1980)
Enzymes du métabolisme des nucléotides (1993)	Cancers (années 1980)
Nucléotide-sucre mutase (1997)	Maladies lysosomales (années 1990)
Glycogène phosphorylases (1997)	
Métalloprotéinases (2004)	Mucoviscidose (2006)
Kinases (2011) ³⁸	Cancers (2011) ³⁸
Acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase (2015) ³⁹	

2. MULTIVALENCE ET INHIBITION DE GLYCOSIDASES

Depuis l'intérêt déclenché par les travaux de Bayer en 1976, plusieurs milliers d'iminosucres actifs présentant une forte affinité pour leurs cibles enzymatiques ont été identifiés. Cependant parmi tous ces candidats potentiels, seulement très peu d'entre eux ont abouti au développement d'un médicament et bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché. Dans la plupart des cas, la raison est un manque de sélectivité qui conduit le plus souvent à des effets secondaires gênants. À partir de ce constat, les chimistes et les biologistes ont commencé à s'intéresser aux mécanismes de la multivalence, bien connus pour les interactions lectine-sucre, pour augmenter d'une part la sélectivité des iminosucres pour leurs cibles mais aussi leur affinité.

2.1. La multivalence dans les interactions lectine-sucre

2.1.1. Effet de cluster glycosidique

Les interactions de type lectine-sucre jouent un rôle clé dans les processus de reconnaissance moléculaire qui ont lieu à la surface des cellules (adhésion inter-cellulaire, réponse inflammatoire etc) (**Figure 6**).⁴⁰ Pour faciliter ces interactions entre deux entités ayant une faible affinité l'une pour l'autre ($K_D \sim 10^{-3}$ M),⁴¹ la nature utilise la multivalence; en effet, la formation simultanée de multiples interactions lectine-sucre permet de gagner en affinité ($K_D \sim 10^{-9}$ M) mais aussi en sélectivité.^{42,43} Pour décrire ce phénomène d'augmentation d'affinité entre les ligands glycosidiques multivalents et leurs récepteurs (lectines), Y. Lee et R. Lee introduisent en 1995 le concept d'effet de cluster glycosidique,⁴⁴ que l'on connaît aussi sous le nom d'effet multivalent. On considère alors qu'il y a un effet multivalent si l'affinité d'un système multivalent possédant n ligands pour un récepteur est au moins n fois supérieure à l'affinité du ligand monovalent pour ce récepteur. Si l'affinité du ligand multivalent est seulement égale à n fois celle du ligand monovalent, l'effet observé est dans ce cas là purement statistique.⁴⁵

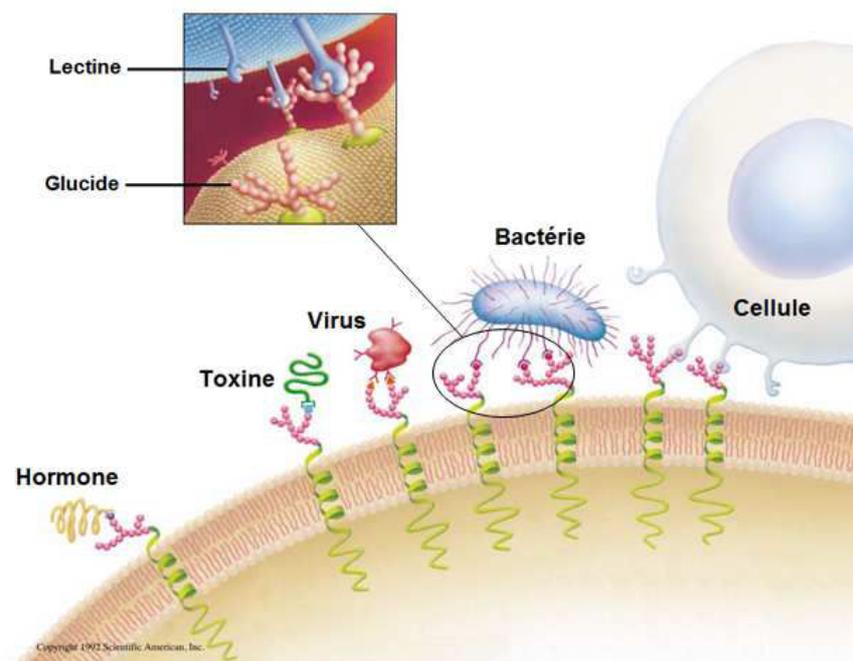


Figure 6. Les interactions lectine-sucre régissent de nombreux phénomènes de reconnaissance cellulaire.⁴⁶

Une fois mises en évidence, les interactions multivalentes lectine-sucre ont connu un intérêt sans précédent. De nombreux groupes de recherche ont alors commencé à exploiter cette spécificité et un grand nombre de ligands glycosidiques multivalents ont été développés et synthétisés afin de se fixer fortement aux lectines et moduler les processus cellulaires dans lesquelles elles sont impliquées.^{47,48} Les augmentations d'affinité obtenues avec ces ligands synthétiques ont été extraordinaires. Par exemple, le groupe de Whitesides a rapporté la synthèse de ligands glycosidiques multivalents à base de polymères capables de se fixer à l'hémagglutinine, une lectine à la surface du virus *influenza*, à des concentrations subnanomolaires.^{49,50} Les gains d'affinité obtenus par rapport à un

composé monovalent ont alors été supérieurs à un facteur 10^6 . D'autres exemples impressionnants ont également été rapportés pour l'inhibition de toxines bactériennes pentamériques comme la toxine SLT-I (*Shiga-Like Toxin I*). Le résultat le plus fort a été obtenu par l'équipe de Bundle avec un ligand décavalent nommé STARFISH (**11**) dont l'affinité vis-à-vis de cette toxine était cinq million de fois plus forte que le ligand monovalent correspondant **12** (P^k trisaccharide) (**Figure 7**).⁵¹

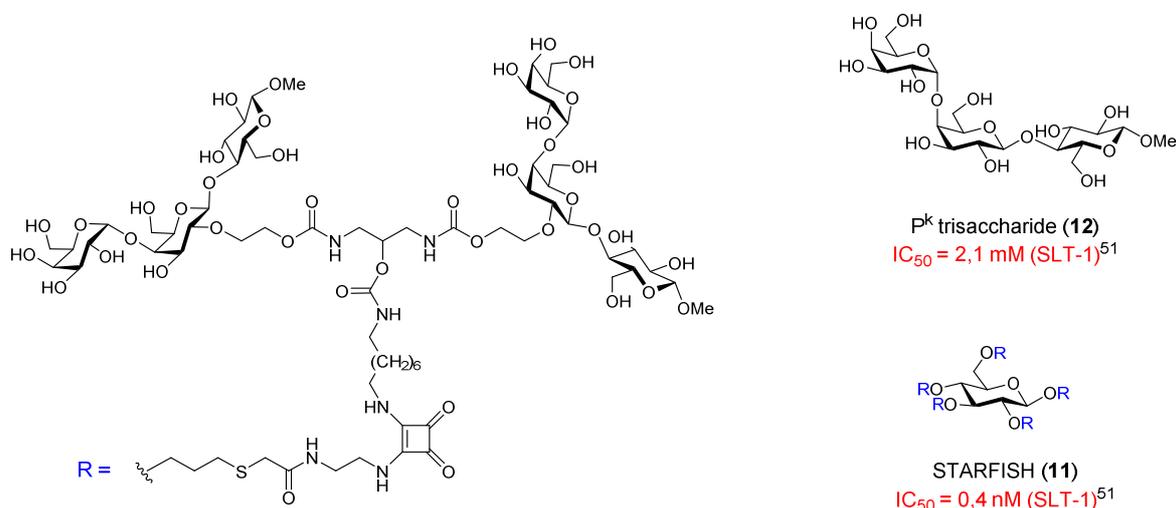


Figure 7. Activités inhibitrices du ligand multivalent STARFISH (**11**) et de son analogue monovalent **12** vis-à-vis de la toxine SLT-1.⁵¹

2.1.2. Les mécanismes de la multivalence

Plusieurs types de mécanismes ont été avancés pour expliquer ces augmentations d'affinité.^{52,53} Toutefois, ces différents mécanismes n'interviennent pas tous simultanément et dépendent de la nature du récepteur (un ou plusieurs sites de reconnaissance) et des caractéristiques structurales des ligands.

Effet chélate (**Figure 8B**)

L'effet chélate est l'un des principaux mécanismes avancés pour expliquer l'effet multivalent. Il est à l'origine des augmentations d'affinité les plus fortes observées à ce jour, en particulier dans le cas de l'inhibition des toxines pentamériques.^{51,54,55} On observe un effet chélate lorsque plusieurs ligands d'un système multivalent peuvent se lier simultanément à plusieurs sites de liaison d'une lectine multimérique.⁵⁶ Ce mécanisme peut être expliqué en terme de gain énergétique : la majeure partie du coût entropique de chélation étant payée lors de l'adhésion du premier ligand, la liaison intramoléculaire des autres ligands aux autres sites de liaison est par conséquent favorisée entropiquement.⁵⁷⁻⁵⁹ De plus, lorsque le premier ligand se lie à un site, la concentration locale en ligands non liés augmente à proximité des sites de liaison non occupés et favorise ainsi l'adhésion intramoléculaire des autres ligands.⁶⁰

Liaison à un site secondaire (Figure 8C)

Lorsqu'un site de liaison secondaire est présent à proximité du site de liaison principal d'une protéine monomérique, on peut observer un type d'effet chélate.^{61,62} Dans ce cas là, la liaison simultanée du ligand multivalent au site principal et au site secondaire permet de renforcer l'interaction lectine-ligand et augmente par conséquent l'affinité du ligand. Le site secondaire peut être indépendant du site principal ou une extension de celui-ci.

Phénomènes d'agrégation ou de « cross-linking » (Figure 8D)

Des phénomènes d'agrégation peuvent également survenir entre les glycosides multivalents et plusieurs lectines multimériques.⁴⁵ Ce genre de phénomène est possible lorsque la distance entre les ligands est suffisamment grande et lorsque la liaison intermoléculaire des ligands est plus favorable d'un point de vue entropique que la liaison intramoléculaire (effet chélate). Il se forme alors des réseaux plus ou moins organisés suivant la nature et la valence des glycoconjugués et des lectines. Les plus gros agrégats peuvent précipiter dans des conditions particulières (stœchiométrie ligand:lectine, température, pH etc).⁴⁵

Phénomènes de glissement (Figure 8E)

Lorsque la distance entre les ligands d'un système multivalent est trop petite pour permettre des phénomènes d'agrégation ou de chélation, ou si la protéine ne possède qu'un seul site de liaison, les gains d'affinité observés peuvent alors être expliqués par un phénomène de glissement.^{63,64} En effet, un ligand d'un système multivalent peut se lier de façon non covalente à l'unique site de liaison, quitter ce site et laisser la place à autre ligand tout proche qui se fixera à son tour, augmentant ainsi le temps d'interaction entre le système multivalent et le récepteur. La forte concentration locale en ligands à proximité du site de liaison permet de favoriser ce phénomène de glissement.

Effet de stabilisation stérique (Figure 8F)

Un effet de stabilisation stérique peut également être envisagé lorsqu'un ligand multivalent stériquement encombré empêche l'interaction entre le(s) récepteur(s) et tout autre ligand compétitif.⁶⁵

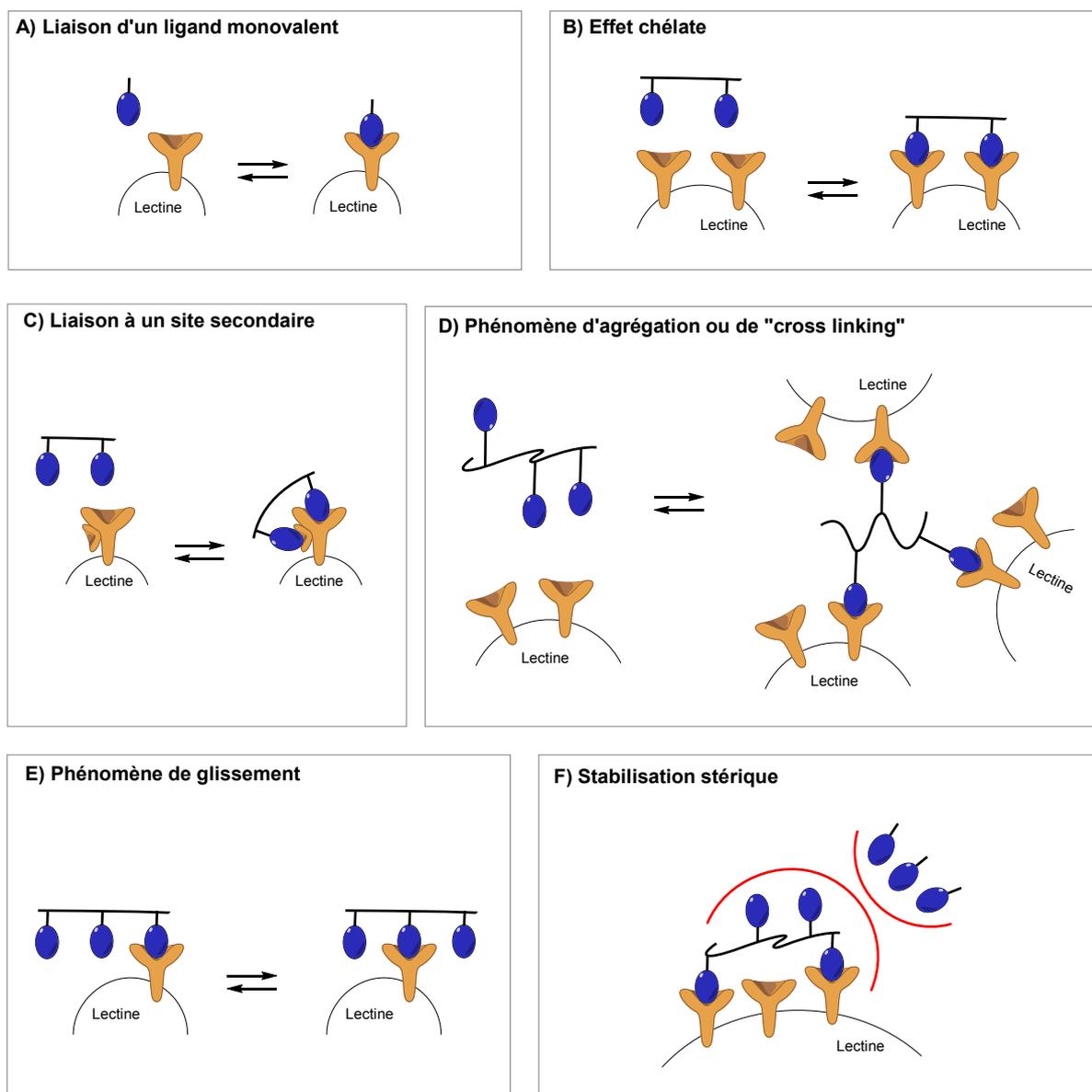


Figure 8. Les différents mécanismes de liaison entre un ligand monovalent, un ligand multivalent et le(s) récepteur(s) d'une lectine.

2.2. Iminosucre multivalents et inhibition de glycosidases

Malgré le potentiel que représente la multivalence pour augmenter l'affinité et la sélectivité des iminosucre vis-à-vis des glycosidases, très peu d'exemples d'iminosucre multivalents ont été rapportés avant 2009. Ce manque d'intérêt pour cette classe de composés pourrait être dû à plusieurs facteurs. Premièrement, les glycosidases possèdent contrairement à la plupart des lectines, un seul site de liaison, leur site actif, qui est moins accessible. L'un des principaux mécanismes à l'origine d'effets multivalents puissants, l'effet chélate,^{47,56} devenait donc *a priori* inapplicable puisqu'il implique la liaison à au moins deux sites de liaison. Deuxièmement, le développement d'iminosucre multivalents a été freiné par des difficultés synthétiques car ces glycomimétiques sont des composés bien plus difficiles à synthétiser que les sucres habituellement utilisés en multivalence. De plus, avant le

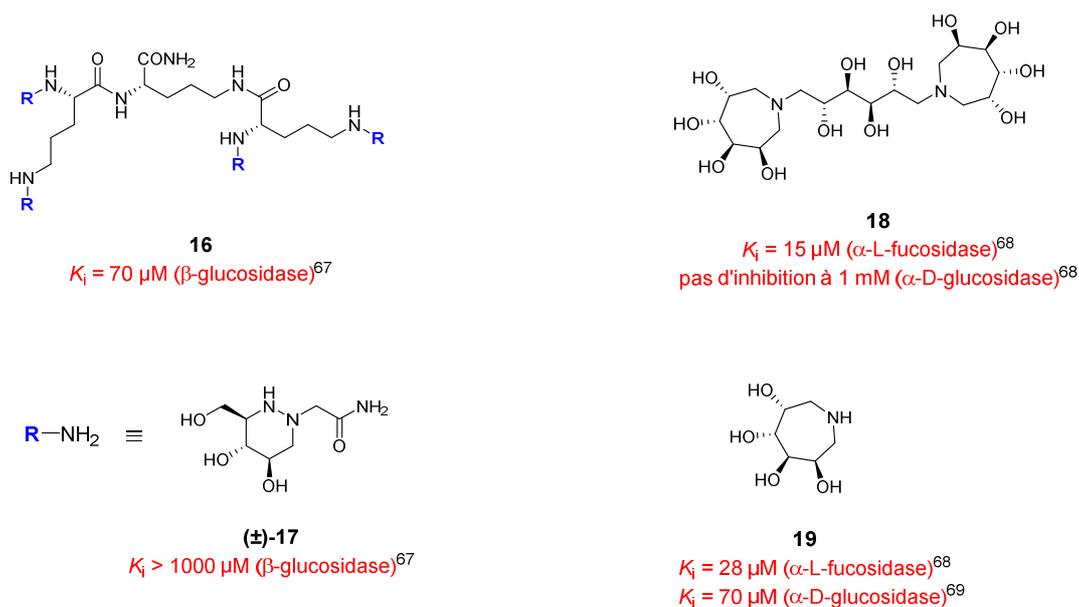


Figure 10. Activités inhibitrices d'iminosucres di- à tétravalents (**16**⁶⁷ et **18**⁶⁸) et de leurs références monovalentes (**17**⁶⁷ et **19**^{68,69}) vis-à-vis de différentes glycosidases.

2.2.2. La chimie click : un accès rapide aux iminosucres multivalents

Après ces premiers exemples, la synthèse d'iminosucres multivalents a bénéficié du développement spectaculaire des réactions de chimie click et de sa représentante la plus connue : la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC pour *Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) (voir **CHAPITRE 1**). Déjà utilisée pour la synthèse de glycoclusters, glycodendrimères ou glycopolymères,^{71,72} cette réaction permet en effet de greffer simultanément plusieurs ligands fonctionnalisés avec une fonction azoture ou alcyne sur une plateforme possédant la fonction complémentaire. La synthèse devient par conséquent divergente et permet d'accéder à des clusters de haute valence.

En 2009, Gouin et Kovensky ont été les premiers à exploiter la réaction de CuAAC pour synthétiser des iminosucres multivalents et à rapporter une étude systématique de l'influence de la multivalence sur l'inhibition des glycosidases.⁷³ Dans cette étude, une série de trois clusters d'iminosucres di- et trivalents (**20** et **21**) a été alors obtenue en greffant un ligand *N*-propyl-DNJ portant un azoture terminal sur différentes plateformes acétyléniques dérivées d'oligoéthylène glycol (**Figure 11**). Après avoir évalué l'activité inhibitrice de ces composés sur un panel de sept glycosidases commerciales, le premier effet multivalent quantifiable sur l'inhibition de l' α -mannosidase de Jack Bean a pu être observé avec le composé divalent **20b** et le composé trivalent **21**. Ces composés se sont en effet montrés respectivement 2,6 et 6,6 fois plus affins que leur modèle monovalent de référence **22a**, ce qui correspondait à un gain d'affinité de 1,3 et 2,2 par unité d'iminosucre. Au-delà de cet effet multivalent, les auteurs ont aussi souligné le gain en sélectivité du composé trivalent **21** (bon inhibiteur de l' α -mannosidase de Jack Bean et mauvais inhibiteur de l'isomaltase de levure de boulanger) par rapport aux analogues monovalents **22** (inhibiteurs moyens des deux enzymes).

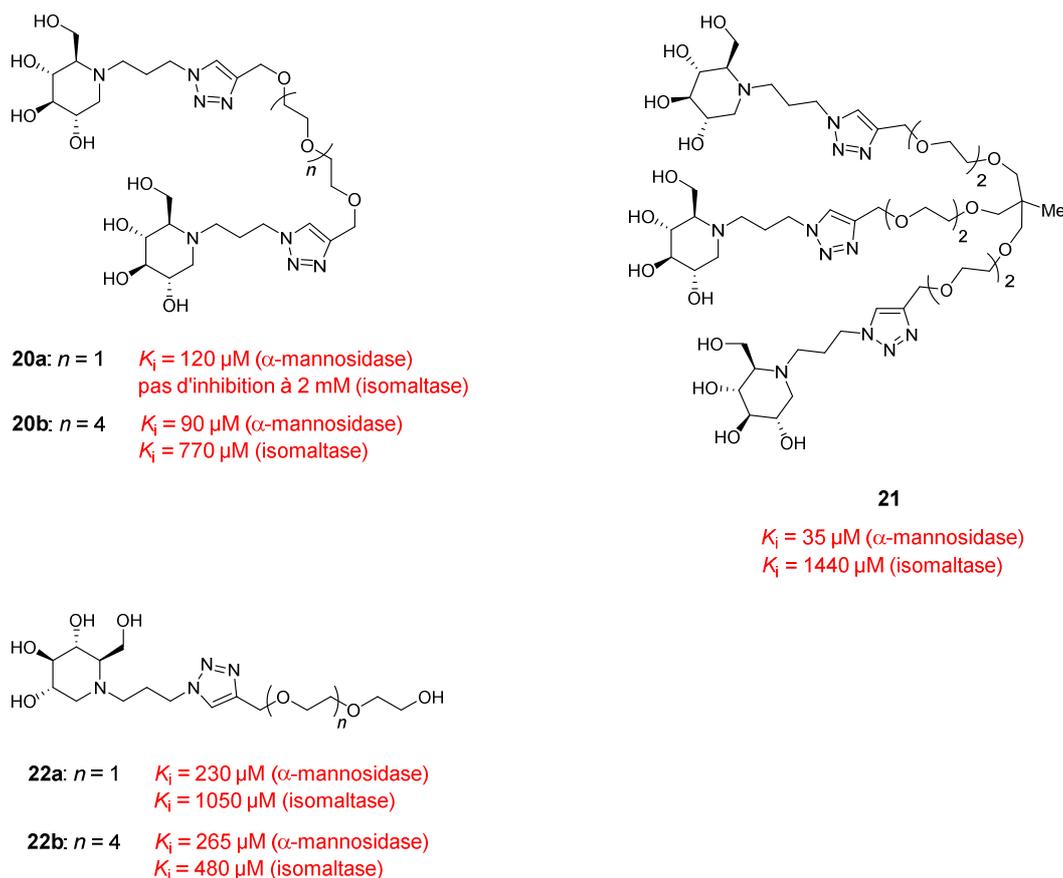


Figure 11. Propriétés inhibitrices des composés mono-, di- et trivalents (**20**, **21** et **22**) vis-à-vis de l' α -mannosidase de Jack Bean et de l'isomaltase de levure de boulanger.⁷³

Un an plus tard, notre groupe a rapporté la synthèse d'un cluster dodécavalent basé sur une charpente fullerène C_{60} (**23**) qui a montré un gain d'affinité impressionnant sur l'inhibition de l' α -mannosidase de Jack Bean (**Figure 12**).⁷⁴ Ce cluster était effectivement 2147 fois plus affiné que le composé monovalent de référence **24a**, soit un gain d'affinité de 180 par unité de ligand. Lors de cette étude, des effets multivalents significatifs ont également pu être observés vis-à-vis de quatre autres glycosidases.

Afin d'étudier précisément l'importance des paramètres structuraux sur l'effet multivalent, une plateforme β -cyclodextrine a ensuite été envisagée par notre groupe pour la synthèse de nouveaux clusters d'iminosucres (**Figure 12**).^{75,76} Une étude systématique de type relation structure-activité a alors été réalisée à partir d'une librairie de clusters hepta- et tétradécavalents possédant différents ligands (DNJ et DMJ), différentes longueurs de bras espaceur (C_6 ou C_9) et différentes orientations des ligands. L'évaluation de ces composés sur l' α -mannosidase de Jack Bean a montré que l'affinité des clusters en série DNJ augmentait significativement avec la valence et la longueur du bras espaceur. Combinant ses paramètres optimaux, le cluster tétradécavalent **25** a alors montré un gain d'affinité proche de quatre ordres de grandeur par rapport au composé monovalent correspondant **24b**, soit un gain de 610 par unité iminosucre. Il s'agit de l'effet multivalent le plus fort publié à ce jour pour l'inhibition des glycosidases. Une plus grande augmentation d'affinité a néanmoins été obtenue un an plus tard avec un cluster de plus haute valence (**26**) dont l'affinité était 9900 fois plus forte que celle du composé monovalent **24b** (contre 8546 fois pour **25**).⁷⁷ Ce cluster d'iminosucres avait été préparé

en couplant un dendron possédant trois iminosucres à une plateforme β -cyclodextrine heptavalente (**Figure 12**).

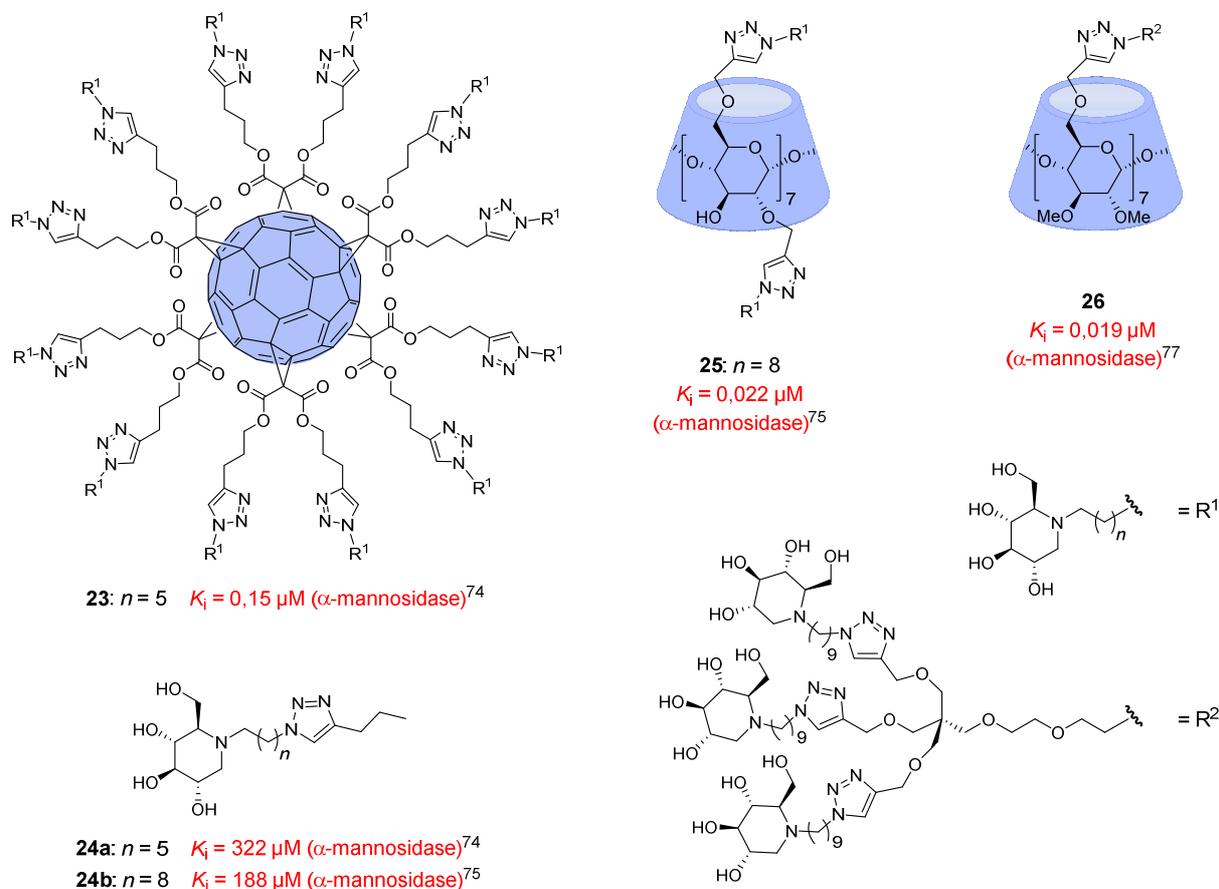


Figure 12. Activités inhibitrices des clusters d'iminosucres dodéca-, tétradéca- et hénicosavalents (**23**,⁷⁴ **25**⁷⁵ et **26**⁷⁷) et de leurs références monovalentes (**24**)^{74,75} vis-à-vis de l' α -mannosidase de Jack Bean.

Dans le but de poursuivre l'étude des paramètres architecturaux, plusieurs groupes ont synthétisé des clusters d'iminosucres en faisant varier la nature de la plateforme, la nature du ligand iminosucre et la longueur de l'espaceur.⁷⁷⁻⁸³ Le groupe de Gouin a par exemple rapporté la synthèse d'une série de clusters (**27**) possédant un ligand DNJ *N*-alkylé en C₃ et qui étaient basés sur des plateformes de type glucose, galactose, tréhalose, γ -cyclodextrine, calix[4]arène et porphyrine (**Figure 13**).⁸² Des plateformes cyclopeptoïdes ont également été utilisés par notre groupe pour former des clusters de DNJ et dont le meilleur représentant en termes d'effet multivalent possédait dix ligands DNJ *N*-alkylés avec une chaîne en C₉ (**28**).⁸³

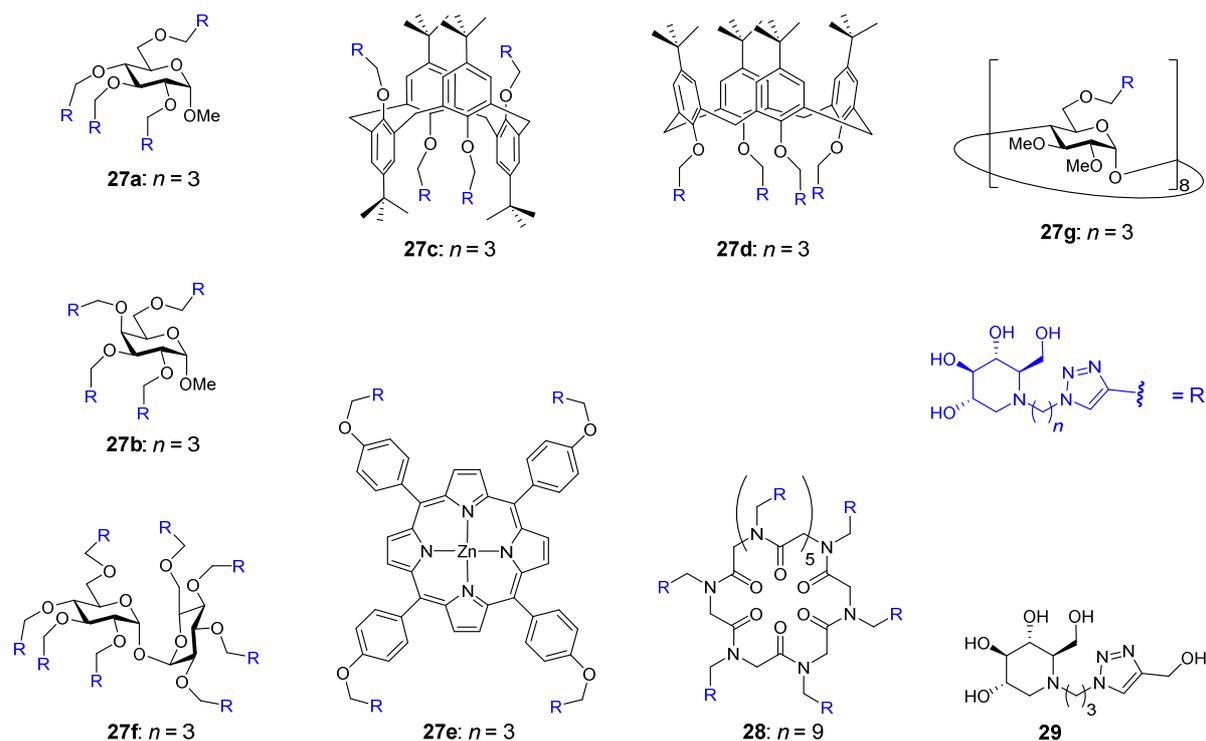


Figure 13. Clusters de DNJ basés sur diverses plateformes (**27** et **28**) et leur analogue monovalent **29**.^{82,83}

En analysant les valeurs de K_i obtenues avec ces composés sur l' α -mannosidase de Jack Bean (**Tableau 2**), on remarque que l'orientation spatiale des ligands, dictée par le type de plateforme, influence de façon significative l'affinité des clusters. L'exemple le plus marquant concerne les composés **27c** et **27d**, deux composés dérivés du calix[4]arène différant seulement de par leur conformation et qui ont montré des valeurs d'inhibition relative différentes d'un ordre de grandeur. Néanmoins, l'orientation des ligands semble moins importante pour les clusters de plus haute valence (**27f** versus **27g**). Cette étude a également mis en évidence la capacité d'une plateforme rigide comme la porphyrine (**27e**) à atteindre un effet multivalent puissant ($Ir/n = 200$). Ce résultat est d'autant plus remarquable si l'on considère la petite valence de ce cluster.

Le dérivé cyclopeptidique **28** a quant à lui exposé un K_i intéressant de $5 \mu\text{M}$ cependant, ramené au nombre d'iminosucre, le gain d'affinité obtenu restait relativement faible. Il est possible que la flexibilité de la plateforme cyclopeptoïde, due à l'interconversion conformationnelle des liaisons amides (*E/Z*), ne soit pas favorable en termes d'effet multivalent.

Tableau 2. Activités inhibitrices des clusters de DNJ **25**,⁷⁵ **27**⁸² et **28**⁸³ et de leurs analogues monovalents **24b**⁷⁶ et **29**⁸² sur l' α -mannosidase de Jack Bean.

Composé	Valence	Plateforme	K_i (μ M)	$I_r^{[a]}$	$I_r/n^{[b]}$
24b	1	–	188	–	–
29	1	–	400	–	–
27a	4	glucose	76	5	1,3
27b	4	galactose	41	10	2,5
27c	4	calix[4]arène	20	20	5
27d	4	calix[4]arène	1,5	267	67
27e	4	porphyrine	0,5	800	200
27f	8	tréhalose	21	19	2,4
27g	8	γ -cyclodextrine	23	17	2,2
28	10	cyclopeptide	5	38	3,8
25 ^[c]	14	β -cyclodextrine	0,022	8545	610

^[a] Inhibition relative: K_i (modèle monovalent)/ K_i (cluster d'iminosucres). ^[b] Inhibition relative/nombre d'unité iminosucre.

^[c] Composé de référence ayant conduit au meilleur effet multivalent sur l' α -mannosidase de Jack Bean publié à ce jour.⁷⁵

En 2014, notre équipe a également rapporté les premiers exemples de nanoparticules décorées avec des iminosucres.⁷⁹ Ces biomimétiques présentant différentes densités d'iminosucres à leur surface ont été obtenus par auto-assemblage d'un copolymère à blocs fonctionnalisés avec des ligands DNJ avec une quantité variée d'un autre copolymère à blocs fonctionnalisés avec des ligands galactoses. Évalué sur l' α -mannosidase de Jack Bean, ces structures de type micelle (taille ~50 nm) ont montré des gains d'affinité allant jusqu'à environ 3500 par rapport au composé monovalent de référence.

Au final, pas moins d'une cinquantaine d'iminosucres multivalents ont été synthétisés depuis 2009,⁸⁴ et leur efficacité vis-à-vis de l'inhibition des glycosidases est maintenant bien établie.^{84–86} Les augmentations d'affinité proches de quatre ordres de grandeur observées démontrent aussi que les effets multivalents puissants observés avec les lectines peuvent être atteints. Outre ces augmentations d'affinité, d'importants gains de sélectivité ont aussi été rapportés. Au regard de ces études, la multivalence représente donc une voie prometteuse pour le développement d'iminosucres ciblant sélectivement des glycosidases d'intérêt thérapeutique.

2.2.3. Aspects mécanistiques

Après le rapport d'effets multivalents forts sur l'inhibition des glycosidases, les chimistes ont cherché à comprendre les mécanismes qui étaient à l'origine de ces augmentations d'affinité. Pour cela, l'analogie a été faite avec les modes de liaison observés pour les interactions lectine-glycocluster. Étant donné que les glycosidases ne possèdent qu'un seul site de liaison, leur site actif, certains mécanismes clés responsables de très gros gains d'affinité, comme l'effet chélate, ont été dans un premier temps écartés.⁶⁴ En se basant sur les mécanismes des lectines monomériques,⁸⁷ on peut s'attendre à ce que le phénomène de glissement soit un des mécanismes mis en jeu lors de l'inhibition des glycosidases, d'autant plus que les phénomènes d'adhésion/dissociation entre l'enzyme et les iminosucres (inhibiteurs compétitifs réversibles) sont des phénomènes plutôt rapides.

Néanmoins, ce mécanisme est généralement associé à des gains d'affinité modestes, de moins de deux ordres de grandeur par rapport aux références monovalentes,⁴⁵ il ne permet donc pas d'expliquer à lui tout seul les effets multivalents très forts observés. Il faut par conséquent envisager d'autres mécanismes, comme des phénomènes d'agrégation, des interactions secondaires avec un éventuel site proche du site actif ou des interactions non spécifiques à la surface de l'enzyme. Pour étayer ces considérations théoriques, plusieurs études mécanistiques ont été réalisées sur l'inhibition des glycosidases par les clusters d'iminosucres *via* différentes approches et techniques biophysiques.^{76,78,81,82}

Dans une étude de l'effet multivalent sur l' α -L-fucosidase, le groupe de Robina a obtenu une structure par diffraction aux rayons X de cette enzyme complexée à un iminosucre trivalent (**30**), qui avait alors montré un effet multivalent vis-à-vis de cette enzyme ($Ir/n = 2,3$) (**Figure 14**).⁸¹ L'analyse de cette structure RX a démontré qu'un des ligands du dérivé trivalent était bien lié dans le site actif (présence de densité électronique autour du ligand jusqu'au cycle benzénique). Par contre, l'absence de densité électronique au-delà du cycle aromatique suggère que les deux autres ligands ne sont pas ordonnés spatialement et donc non liés à un éventuel site secondaire proche du site actif. Dans ce cas précis, le phénomène de glissement semble donc être le principal mécanisme mis en jeu.

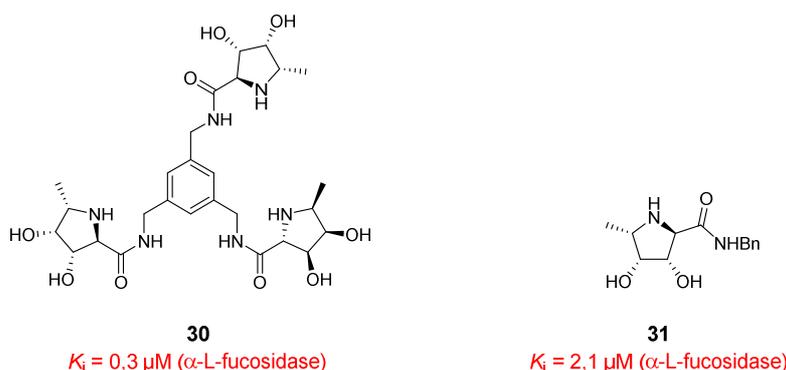


Figure 14. Activités inhibitrices de l'iminosucre trivalent **30** et de son analogue monovalent **31** vis-à-vis de l' α -L-fucosidase de rein de bœuf.⁸¹

En 2013, notre groupe a rapporté la première étude thermodynamique de l'interaction entre l' α -mannosidase de Jack Bean et des iminosucres multivalents.⁷⁶ Des mesures de titration calorimétrique isotherme sur les clusters **32-36** ont alors démontré que le rapport stœchiométrique (n) entre l'enzyme et ces composés était pratiquement égal à un (excepté pour **36** où $n = 2,3$), signifiant ainsi qu'une seule enzyme se liait au cluster d'iminosucres (**Figure 15**). Dans le cas de **36**, le rapport stœchiométrique obtenu suggère la formation d'agrégats, ce qui pourrait également expliquer l'augmentation d'affinité plus forte observée avec ce composé par rapport aux autres.

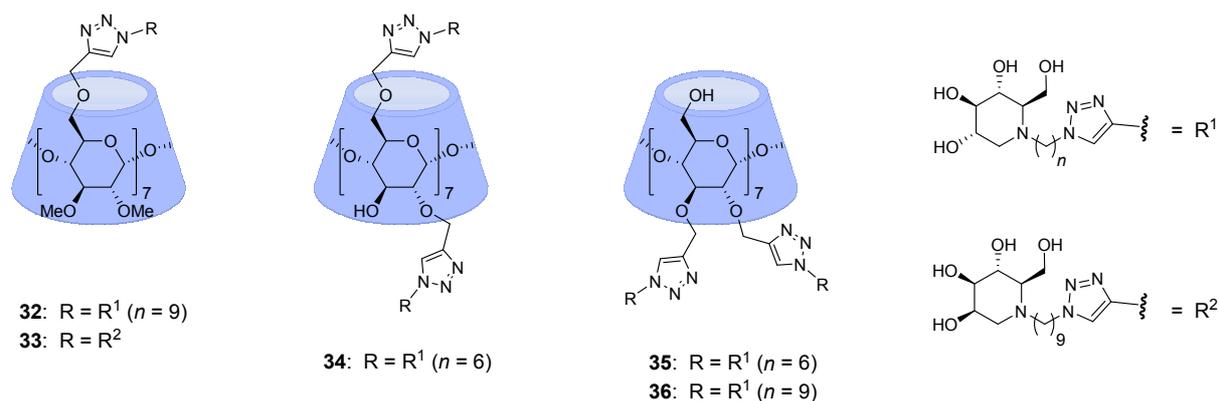


Figure 15. Iminosucres hepta- et tétradécavalents (**32-36**) dont l'interaction avec l' α -mannosidase de Jack Bean a été évaluée par titration calorimétrique isotherme (ITC).⁷⁶

De leur côté, Gouin *et al.* ont réalisé sur leurs clusters en série C_3 -DNJ (**27**) des expériences de diffusion dynamique de la lumière et de microscopie à force atomique.⁸² Dans le cas de l' α -mannosidase de Jack Bean, il a été montré que ces clusters provoquaient la formation d'agrégats de taille et de forme différente. Les agrégats de plus grosse taille ont alors été observés pour les composés à l'origine des effets multivalents les plus forts (porphyrine **27e** et calix[4]arène **27d**). *A contrario*, aucun phénomène d'agrégation n'a été observé pour l' α -glucosidase (levure de boulanger) et la β -galactosidase (*E. coli*), deux glycosidases peu sensibles à une présentation de ligands multivalente. Dans ce cas, ces résultats suggèrent que les forts gains d'affinité observés sont dus à un mécanisme de « cross linking » où plusieurs enzymes et clusters se lient entre eux *via* des liaisons intermoléculaires. De plus, la formation de ces liaisons intermoléculaires pourrait être favorisée par le caractère dimérique de l' α -mannosidase de Jack Bean; en effet, d'après Gaikwad *et al.*, l' α -mannosidase de Jack Bean serait un dimère d'hétérodimères actifs composés eux-mêmes de deux monomères de 49 kDa et 66 kDa, et l'association de ces deux différentes sous-unités formerait le site actif.⁸⁸

Dans une autre étude, les groupes d'Ortiz Mellet, Fernández et Nierengarten ont mis en évidence un composé **37** capable à la fois d'inhiber les lectines et les glycosidases (**Figure 16**).⁷⁸ Cette caractéristique unique a alors été exploitée pour développer un test d'inhibition compétitive enzyme-lectine ELLA modifié (*Enzyme-Linked Lectin Assay*) dans lequel une glycosidase et une lectine sont en compétition pour se lier au composé multivalent **37**. L'expérience est alors réalisée en absence ou présence d'un puissant inhibiteur compétitif (monovalent) de la glycosidase afin de déterminer l'implication du site actif sur l'effet multivalent.

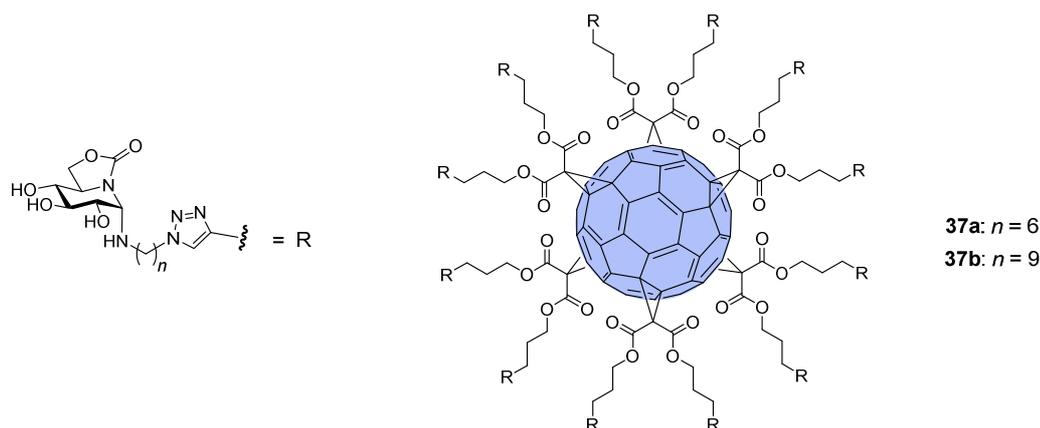


Figure 16. Iminosucres dodécavalents (**37**) basés sur une charpente fullerène C_{60} en série 1-amino-5*N*,6*O*-oxométhylidènojirimycine (1*N*-ONJ).⁷⁸

Dans le cas de l' α -mannosidase de Jack Bean, les résultats obtenus ont montré que les iminosucres multivalents se liaient à l'enzyme *via* des interactions spécifiques (site actif) mais aussi *via* des interactions non spécifiques qui ont lieu à la surface de l'enzyme. Dès lors, les effets multivalents très forts obtenus pour cette enzyme pourraient être dus à une combinaison d'interactions spécifiques et non spécifiques qui pourrait faire penser à un *pseudo* effet chélate (**Figure 17A**).

Par contre, dans le cas l' α -glucosidase maltase, il a été montré que le site actif de l'enzyme n'était quasiment pas impliqué dans la formation des complexes enzyme-cluster; en conséquence, l'inhibition de l'enzyme serait uniquement due à des interactions non spécifiques bloquant l'entrée du site actif. Ce mécanisme est en tout cas cohérent avec les propriétés structurales de l'enzyme, à savoir la présence d'un site actif assez profond et peu accessible (**Figure 17B**). Les faibles augmentations d'affinité observées avec l' α -glucosidase maltase suggèrent néanmoins que ces interactions non spécifiques sont relativement faibles.

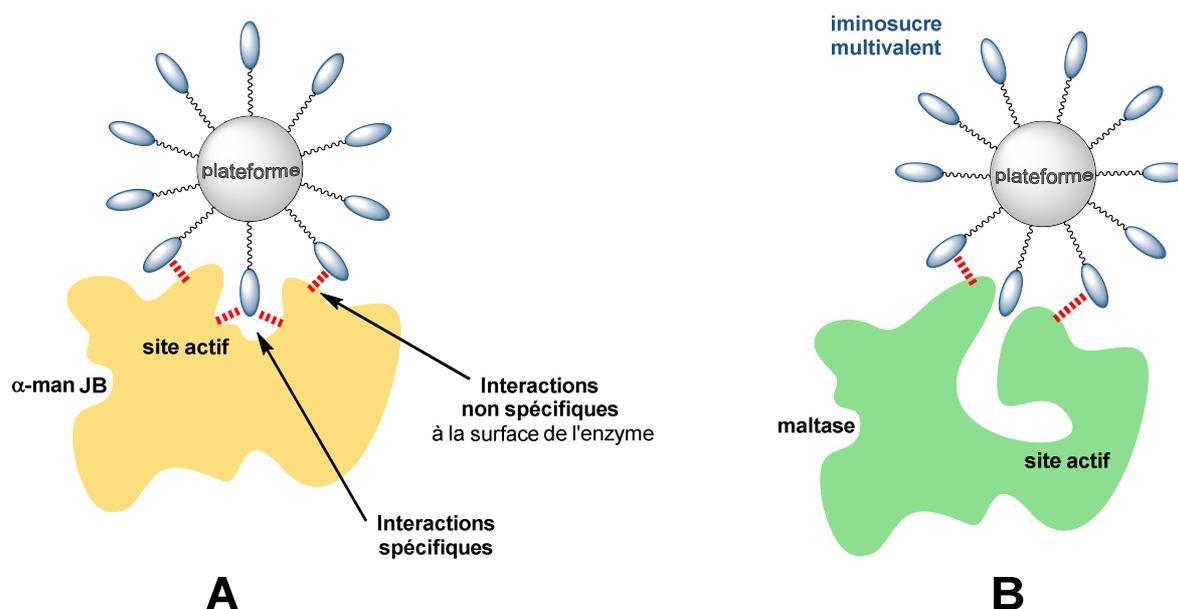


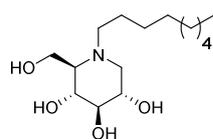
Figure 17. Représentation schématique des modes de liaison entre un iminosucre multivalent et l' α -mannosidase de Jack Bean (α -man JB) ou l' α -glucosidase maltase (maltase).

Finalement, les différents mécanismes mis en évidence grâce à ces études ont permis une meilleure compréhension des augmentations d'affinité observées sur l'inhibition des glycosidases. De plus amples études sont toutefois nécessaires pour comprendre entièrement ces phénomènes d'effet multivalent et apporter des éléments rationnels pour la conception de nouveaux ligands multivalents très affins et sélectifs vis-à-vis de leur cible.

2.3. Application à l'inhibition de glycosidases d'intérêt thérapeutique

2.3.1. β -Glucocérébrosidase (maladie de Gaucher)

La première étude de l'impact de la multivalence sur une glycosidase d'intérêt thérapeutique a été rapportée pour la β -glucocérébrosidase (GCCase),⁸⁹ l'enzyme déficiente impliquée dans la maladie de Gaucher (voir **CHAPITRE 2**).⁹⁰ Une des stratégies aujourd'hui envisagée pour traiter cette maladie, la thérapie chaperon, est basée sur le fait que des inhibiteurs réversibles de l'enzyme déficiente (appelés chaperons pharmacologiques) sont capables d'augmenter son activité catalytique résiduelle à des concentrations sub-inhibitrices.³⁶ L'un des premiers chaperons pharmacologiques de la GCCase à avoir été rapporté est la *N*-nonyl-DNJ (**38**, **Figure 18**) qui a permis d'augmenter l'activité de l'enzyme mutée (effet chaperon) d'un facteur 2 à une concentration de 10 μ M.⁹¹



N-Nonyl-DNJ (**38**)

effet chaperon (N370S) :
 $\times 2$ à 10 μ M⁹¹
 $K_i = 300$ nM (GCCase)⁹²

Figure 18. Activités inhibitrices⁹² et chaperon⁹¹ de la *N*-nonyl-DNJ (**38**) sur la GCCase.

Suite au succès de la multivalence sur l'inhibition des glycosidases, l'idée d'évaluer des clusters d'iminosucres dérivés de la *N*-nonyl-DNJ comme inhibiteurs de la GCCase s'est rapidement imposée. L'objectif était d'obtenir un effet multivalent fort sur l'effet chaperon car il avait été rapporté par Fan et Asano que les inhibiteurs les plus puissants étaient les chaperons les plus efficaces.⁹³ Dans ce contexte, notre équipe a donc évalué le potentiel de quatre clusters *N*-alkyl-DNJ basés sur des β -cyclodextrines en tant qu'inhibiteurs et chaperons de la GCCase.⁸⁹ Le premier effet multivalent sur l'inhibition de la GCCase a alors été mis en évidence avec le cluster heptavalent **32** ($IC_{50} = 8$ nM) qui s'est montré 200 fois plus affiné que son analogue monovalent **24b** ($IC_{50} = 1,6$ μ M) et 80 fois plus affiné que la *N*-nonyl-DNJ ($IC_{50} = 660$ nM). Par contre, aucune amélioration significative de l'effet chaperon n'a pu être observée puisque l'activité chaperon du cluster **32** ($\times 1,5$ à 10 μ M) était équivalente à celle de **24b** ($\times 1,6$ à 10 μ M).

Ces premiers résultats encourageants, qui ont montré que les clusters d'iminosucres pouvaient traverser les membranes cellulaires, ont par la suite motivé une étude plus systématique impliquant des systèmes multivalents avec différents ligands, valences et plateformes.⁹⁴ Outre la β -cyclodextrine, des plateformes basées sur le pentaérythritol ont été utilisées pour atteindre de plus petites valences et un nouveau ligand en série DIX (1,5-didésoxy-1,5-imino-D-xylitol) a également été choisi pour sa très forte affinité avec la GCCase.⁹² Parmi les quatorze clusters évalués, seuls le composé heptavalent déjà

évalué **32** et un composé trivalent en série DIX **39** ont démontré de faibles mais significatifs effets multivalents ($Ir/n \approx 2$) par rapport à leurs analogues monovalents **24b** et **40** (Figure 19). On remarque que l'effet multivalent obtenu avec **32** lors de la précédente étude réalisée sur la Cérédase® ($Ir/n \approx 28$)⁸⁹ n'a pas été reproduit avec la GCCase humaine placentaire utilisée lors de cette étude. En ce qui concerne l'effet chaperon, les meilleurs résultats ont été obtenus en série C₉-DNJ et une légère amélioration de l'effet chaperon a pu être observée en augmentant la valence des clusters, pour atteindre un maximum de $\times 3,3$ à $10 \mu\text{M}$ avec le dérivé tétravalent **41**. Cependant, aucun effet multivalent sur l'effet chaperon n'a pu être démontré.

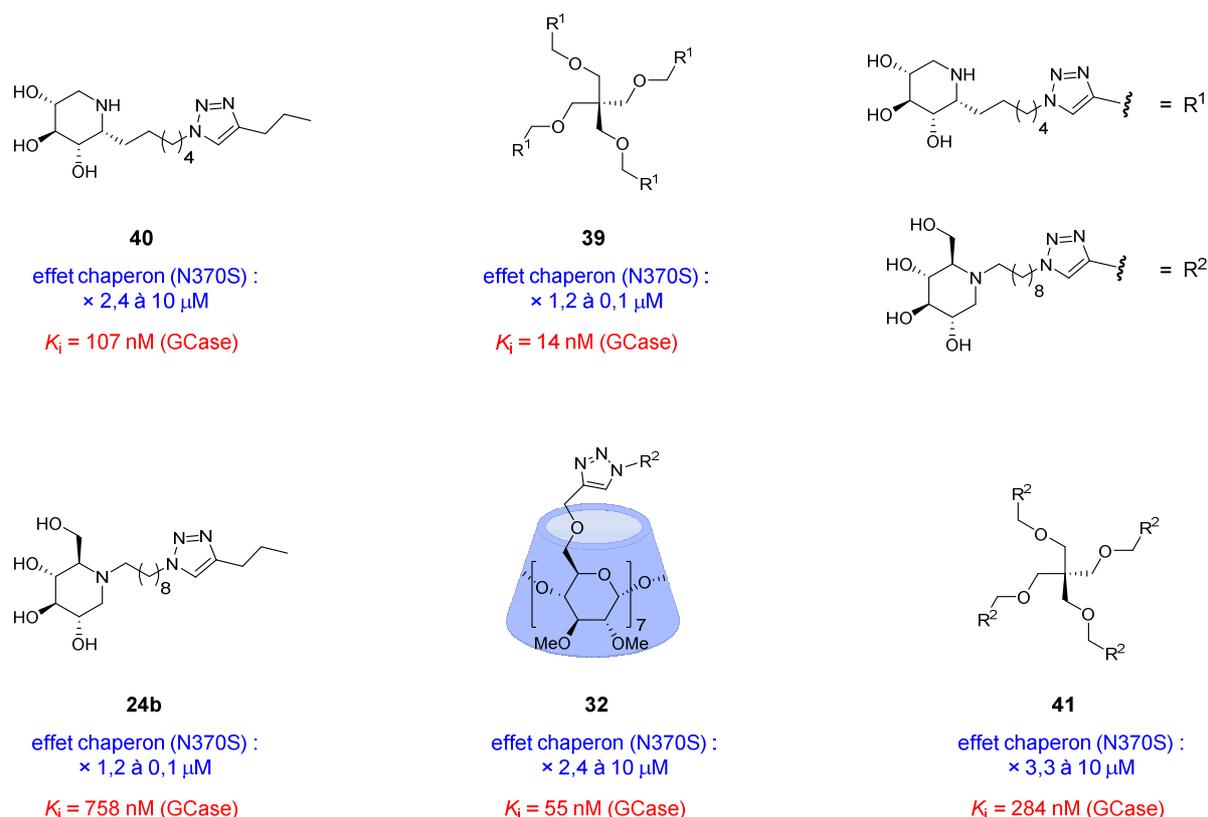


Figure 19. Iminosucres multivalents (**32**, **39**, **41**) et monovalents (**24b**, **40**) évalués pour l'inhibition de la β -glucocérébrosidase (GCCase) et pour leur activité chaperon.⁹⁴

2.3.2. Glucosidases du réticulum endoplasmique (mucoviscidose)

D'importants efforts de recherche sont aujourd'hui dédiés à la mucoviscidose, une maladie génétique rare due à la déficience de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) (voir **CHAPITRE 1**). En 2006, le groupe de Becq et Norez a montré que la *N*-butyl-DNJ (miglustat, **10**), un inhibiteur des α -glucosidases I et II du RE, agissait comme un correcteur de la protéine CFTR mutée en restaurant son activité.³⁵ C'est dans ce contexte que notre équipe, en collaboration avec cette équipe française de biologistes, a décidé d'explorer le potentiel de systèmes multivalents sur la correction de la protéine CFTR mutée.⁹⁵ L'évaluation d'une librairie de douze clusters *N*-alkyl DNJ tri- à tétradécavalents a alors permis d'identifier un correcteur trivalent (**42**) 225 fois plus puissant que la *N*-butyl-DNJ (**10**) et 920 fois plus puissant que son analogue monovalent **24b**

(**Figure 20**). Ce résultat représente le premier exemple d'un effet multivalent sur la correction d'une protéine mutée mal repliée.

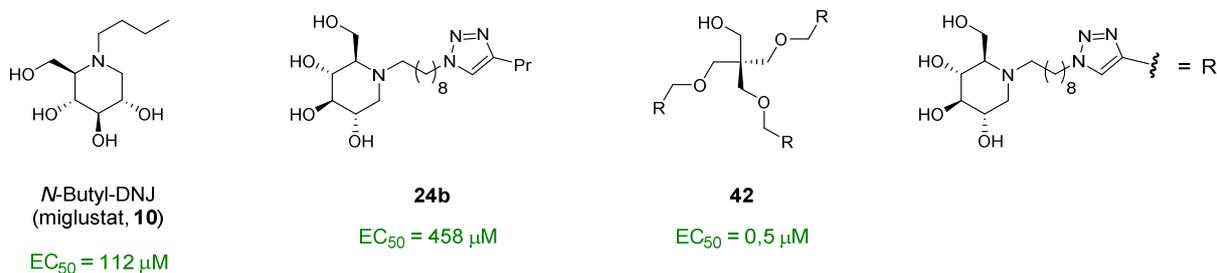


Figure 20. Iminosucres monovalents (**24b** et **42**) et trivalents (**10**) évalués pour la correction de la protéine CFTR.⁹⁵

2.3.3. α-Mannosidases II de l'appareil de Golgi (cancer)

Après avoir mis en évidence des clusters d'iminosucres présentant de forts effets multivalents sur l'inhibition de l'α-mannosidase de Jack Bean, le groupe de Gouin a voulu évaluer l'activité des deux composés les plus actifs (**27d** et **27e**) sur des mannosidases d'intérêt thérapeutique.⁸² Ce groupe s'est alors intéressé aux α-mannosidases II de l'appareil de Golgi (GM-II) dont l'inhibition permettrait de moduler la structure des *N*-glycanes des glycoprotéines et ainsi de réduire la métastase et la croissance tumorale.^{33,96} Les inhibiteurs de ces enzymes ont par conséquent un fort potentiel comme agent anti-cancéreux. Cette stratégie thérapeutique nécessite néanmoins une grande sélectivité pour éviter la co-inhibition des α-mannosidases lysosomales (structurellement très proches des GM-II) qui conduit à des effets secondaires indésirables. Les résultats d'inhibition obtenus par l'équipe de Gouin ont alors montré que le composé tétravalent basé sur une porphyrine (**27e**) permettait d'augmenter l'affinité vis-à-vis des GM-II d'un facteur 15 par rapport au composé monovalent de référence **29** (soit $Ir/n = 3,8$). Une très bonne sélectivité pour les GM-II a également pu être démontrée puisque ni le cluster **27e** ni le composé monovalent **29** n'inhibaient les α-mannosidases lysosomales à une concentration de 1 mM.

3. PLAN DU TRAVAIL DE THÈSE

Dans un contexte où les iminosucres multivalents représentent, en tant qu'inhibiteurs puissants de glycosidases, des structures privilégiées pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques, nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse à ce type de composés pour le traitement de deux maladies génétiques rares : la mucoviscidose et la maladie de Gaucher.

Dans un **premier chapitre**, nous présenterons la synthèse d'iminosucres di- à tétravalents comme correcteurs potentiels de la protéine CFTR (**Figure 21**). Ces systèmes multivalents ont été conçus à partir de la 1-désoxymannojirimycine (**3**) pour inhiber l' α 1,2-mannosidase I du réticulum endoplasmique qui serait une enzyme impliquée dans la dégradation de la protéine CFTR déficiente. Ce chapitre inclura la synthèse de la 1-désoxymannojirimycine, la fonctionnalisation par chimie click des plateformes multivalentes avec cet iminosucre et enfin les résultats des tests biologiques réalisés sur ces composés.

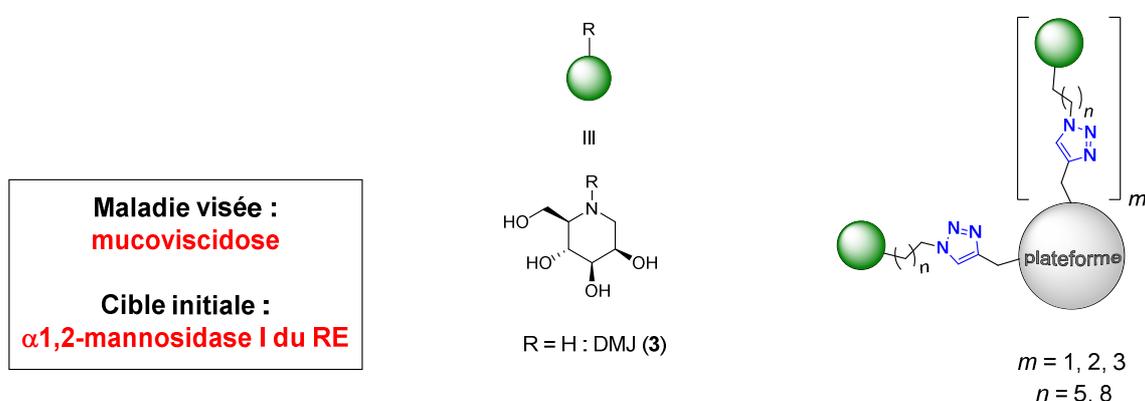


Figure 21. Synthèse d'iminosucres di- à tétravalents comme correcteurs de la protéine CFTR (**Chapitre 1**).

Dans un **deuxième chapitre**, nous présenterons une stratégie originale d'accès à de nouveaux chaperons pharmacologiques de la β -glucocérébrosidase. Cette stratégie repose sur la synthèse d'iminosucres hétérodivalents capables de cibler simultanément le site actif et un site secondaire de cette enzyme (**Figure 22**). Nous décrirons dans ce chapitre l'approche stéréodivergente qui a permis d'obtenir les deux ligands iminosucres énantiomères puis leur couplage successif à un bras espaceur de longueur variable. Les résultats des tests biologiques seront également détaillés dans cette partie.

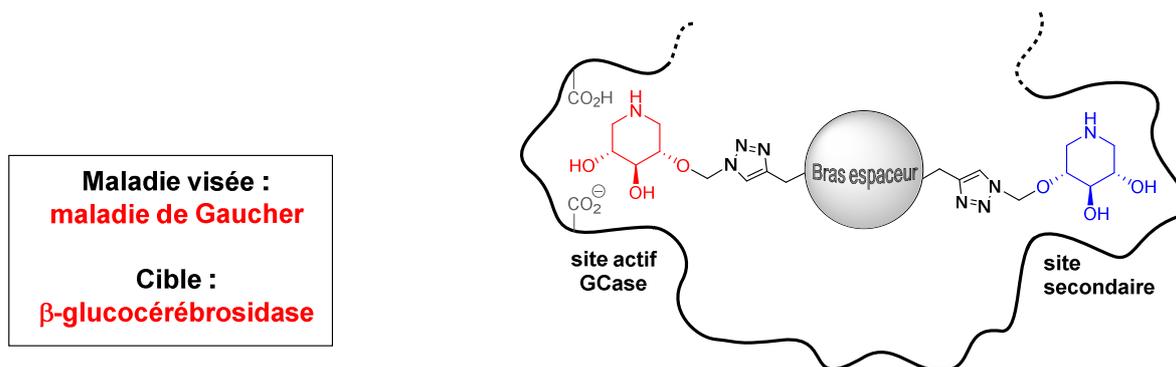


Figure 22. Synthèse d'iminosucres hétérodivalents comme chaperons pharmacologiques de la β -glucocérébrosidase (**Chapitre 2**).

Enfin, le **troisième chapitre** sera consacré au développement d'une sonde mécanistique dont le but est de préciser les mécanismes à l'origine des effets multivalents forts observés pour l'inhibition des glycosidases, en particulier pour l' α -mannosidase de Jack Bean. Cette sonde mécanistique sera basée sur un C-glycoside multivalent qui, grâce à sa structure particulière, permettra de déterminer la contribution des interactions non spécifiques multivalentes qui ont lieu à la surface de l'enzyme ou dans les sous-poches de reconnaissance des glycanes (**Figure 23**). Basée également sur une stratégie de chimie click, la synthèse de ces composés a nécessité la synthèse du ligand C-glycoside adéquat.

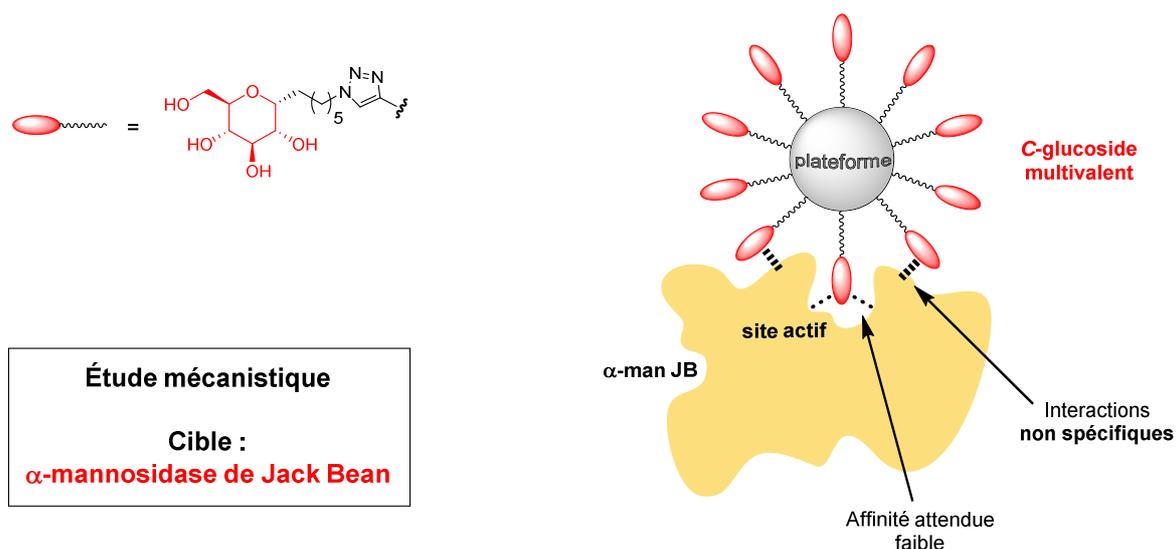


Figure 23. Synthèse de C-glycosides multivalents comme sondes mécanistiques pour préciser les mécanismes de l'effet multivalent (**Chapitre 3**).

CHAPITRE 1

**Iminosucres di- à tétravalents
comme correcteurs
de la protéine CFTR**

1. LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose est une maladie génétique rare et létale qui touche tous les tissus épithéliaux des différents organes de l'organisme. Elle se transmet de manière autosomique récessive : les deux parents doivent porter le gène défectueux pour transmettre la maladie.

1.1. Épidémiologie

La mucoviscidose est la maladie génétique rare la plus fréquente dans la population caucasienne.⁹⁷ En Europe et en Amérique du Nord, la maladie touche un nouveau-né sur 2500, alors qu'en Afrique et en Asie très peu de cas sont rapportés. Entre 2004 et 2005, il a été recensé environ 62 000 personnes atteintes de la mucoviscidose en Europe et en Amérique du Nord.⁹⁸ En France, l'incidence de cette maladie est d'une naissance sur 4500, ce qui représente environ 200 enfants qui naissent chaque année avec la maladie. D'après le registre français de la mucoviscidose, 6329 patients (dont 51% d'adultes) étaient atteints de cette maladie en France en 2013.⁹⁹

1.2. Physiopathologie

La mucoviscidose altère la production des sécrétions (mucus, sueur, ...) des cellules épithéliales de l'organisme et provoque alors des atteintes gastro-intestinales et respiratoires, ces dernières étant la cause majeure de mortalité. Au niveau des voies respiratoires, le mucus produit par les cellules épithéliales bronchiques est plus visqueux et plus abondant. Cet excès de mucus hypervisqueux provoque une obstruction des bronches et une altération de la clairance muco-ciliaire[§], ce qui favorise les infections bronchiques par des bactéries opportunistes (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa* entre autres).¹⁰⁰ Ces infections déclenchent un processus inflammatoire et commencent alors un cercle vicieux entre inflammation, infection et obstruction des bronches qui conduit à une spirale inflammatoire perpétuelle.¹⁰¹ Ceci aboutit à une destruction des tissus pulmonaires et à une perte de la fonction respiratoire qui conduit finalement au décès du malade.

Au moins 85% des malades présentent également des atteintes gastro-intestinales qui sont associées à une insuffisance pancréatique exocrine et à une altération des sécrétions au niveau des intestins.¹⁰⁰ L'insuffisance pancréatique exocrine est due à une obstruction des canaux pancréatiques par le mucus épais ou à la destruction du tissu pancréatique (à cause de l'inflammation). La production et la libération des enzymes digestives par le pancréas sont alors fortement perturbées, ce qui réduit par conséquent la capacité de l'organisme à digérer les aliments (graisses, protéines etc) et assimiler les substances nutritives. L'obstruction du tractus intestinal par le mucus épais provoque quant à elle un ralentissement du transit intestinal et également une malabsorption des nutriments et des vitamines. Les signes cliniques de ces atteintes gastro-intestinales sont entre autres une perte de poids, une constipation et une stéatorrhée (selles molles, huileuses et malodorantes).

[§] Clairance muco-ciliaire : élimination des particules étrangères et agents pathogènes par l'action combinée du mucus et des cils au niveau des muqueuses respiratoires.

Parmi les nombreux autres symptômes et manifestations de la maladie, on observe également un excès de chlorure de sodium dans la sueur dû à l'affectation des glandes sudoripares, une stérilité chez l'homme (97 à 98% des patients) due à l'obstruction ou à l'atrophie des canaux déférents ou encore une cirrhose biliaire (**Figure 24**).

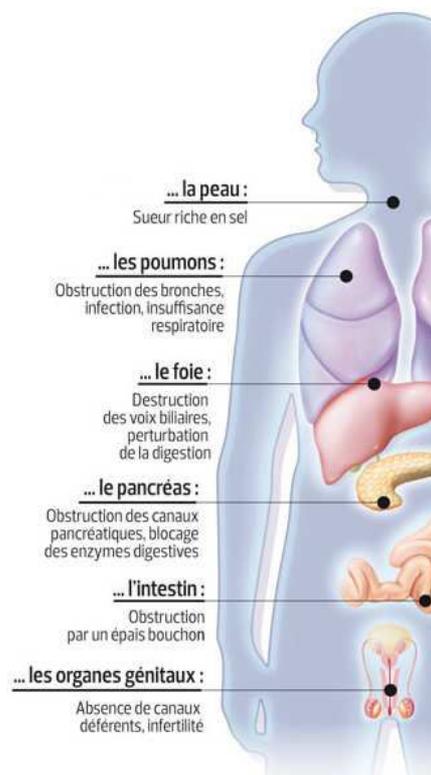


Figure 24. Conséquences de la maladie sur les différents organes de l'organisme.¹⁰²

1.3. Traitements actuels

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif pour la mucoviscidose. Beaucoup de progrès ont néanmoins été faits au niveau de la prise en charge des patients, ce qui a permis d'augmenter leur qualité de vie ainsi que leur espérance de vie. On estime aujourd'hui que les patients nés dans les années 1990 vivront jusqu'à plus de 40 ans,¹⁰³ alors que dans les années 1970, l'espérance de vie n'était que d'environ 14 ans. Ces progrès sont dus à un diagnostic plus précoce de la maladie et aux traitements symptomatiques ciblant les différents organes touchés. Les traitements symptomatiques visent principalement les atteintes respiratoires et les atteintes digestives et nutritionnelles.¹⁰⁴ La désobstruction des bronches et la réduction de l'infection bactérienne pulmonaire repose sur la kinésithérapie respiratoire, l'antibiothérapie et le traitement avec des anti-inflammatoires, bronchodilatateurs et mucofluidifiants. Une greffe pulmonaire ou cardio-pulmonaire peut aussi être envisagée pour les cas critiques. Les problèmes de malnutrition peuvent quant à eux être prévenus avec un régime alimentaire adapté et une supplémentation avec des enzymes pancréatiques et des vitamines.

1.4. Historique et découverte de la maladie

La première description de la mucoviscidose date des années 1930, cependant certains symptômes de la maladie étaient déjà connus depuis longtemps. En effet, au XVIII^{ème} siècle, un vieil adage de l'Europe du nord rapportait déjà : « *Wehe dem Kind, das beim Kuß auf die Stirn salzig schmeckt, es ist verhext und muss bald sterben* », ce qui peut se traduire par : « Malheur à l'enfant pour lequel un baiser sur le front a un goût salé, il est ensorcelé et doit bientôt mourir ». Cet adage faisait alors référence à l'excès de chlorure de sodium présent dans la sueur des malades.¹⁰⁰ La première étude faisant mention de cette maladie a été publiée en 1936 par le pédiatre suisse Fanconi qui reliait la mucoviscidose à la maladie cœliaque.¹⁰⁵ En 1938, la première description complète de la mucoviscidose fut donnée par le docteur Dorothy Andersen, pathologiste et pédiatre au *Babies' Hospital* de New York.¹⁰⁶ Elle montra alors l'absence de lien avec la maladie cœliaque et utilisa pour décrire la maladie le terme médical de « fibrose kystique du pancréas ». Plus tard, dans les années 1940, les infections chroniques respiratoires furent identifiées comme étant des symptômes majeurs et les médecins abandonnèrent la référence anatomique au pancréas pour n'utiliser que le terme « fibrose kystique » (*Cystic Fibrosis*), qui est encore aujourd'hui employé dans les pays anglo-saxons. En 1943, Farber relia les sécrétions anormales de mucus à la maladie,¹⁰⁷ c'est ainsi qu'apparut le terme « *mucoviscidosis* » faisant référence aux termes « mucus » et « visqueux ». Aujourd'hui, le terme « mucoviscidose » est très employé, surtout en France, et fait référence à l'obstruction caractéristique des voies respiratoires et digestives par des bouchons muqueux. En 1953, le groupe de di Sant'Agnese montra que la sueur des malades avait une composition anormale en électrolytes (forte concentration en ions sodium et chlorure).¹⁰⁸ C'est d'ailleurs à la suite de cette étude qu'est né le test de la sueur¹⁰⁹ qui permet de diagnostiquer la maladie et qui reste encore aujourd'hui le test le plus fiable avec l'analyse génétique.

1.5. Origine de la maladie

La mucoviscidose est due à une ou plusieurs mutations sur le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) localisé sur le bras long du chromosome 7 et codant pour une glycoprotéine transmembranaire nommée CFTR. Cette protéine est un canal chlorure qui régule le transport des ions chlorures à travers la membrane apicale des cellules épithéliales de l'organisme (voies aériennes, intestin, pancréas, voies biliaires, tractus génital, glandes sudoripares etc).¹¹⁰ Afin de pouvoir comprendre l'impact de la déficience de cette protéine mutée sur l'organisme, il est nécessaire de préciser ses propriétés structurelles et fonctionnelles.

La protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs membranaires ABC (*ATP Binding Cassette*) et est composée de cinq domaines : deux domaines transmembranaires MSDs (*Membrane-Spanning Domain*), deux domaines de liaisons aux nucléotides NBDs (*Nucleotide-Binding Domain*) et un unique domaine régulateur R (**Figure 25A**). Chacun de ces domaines contribue au fonctionnement général de la protéine CFTR comme canal chlorure (**Figure 25B**) : les domaines MSDs contribuent à la formation d'un pore sélectif des ions chlorures, les domaines NBDs hydrolysent l'ATP en ADP*

* ATP pour adénosine triphosphate et ADP pour adénosine diphosphate.

pour réguler l'ouverture du canal et la phosphorylation du domaine R par la protéine kinase A contrôle l'activité du canal.¹¹⁰

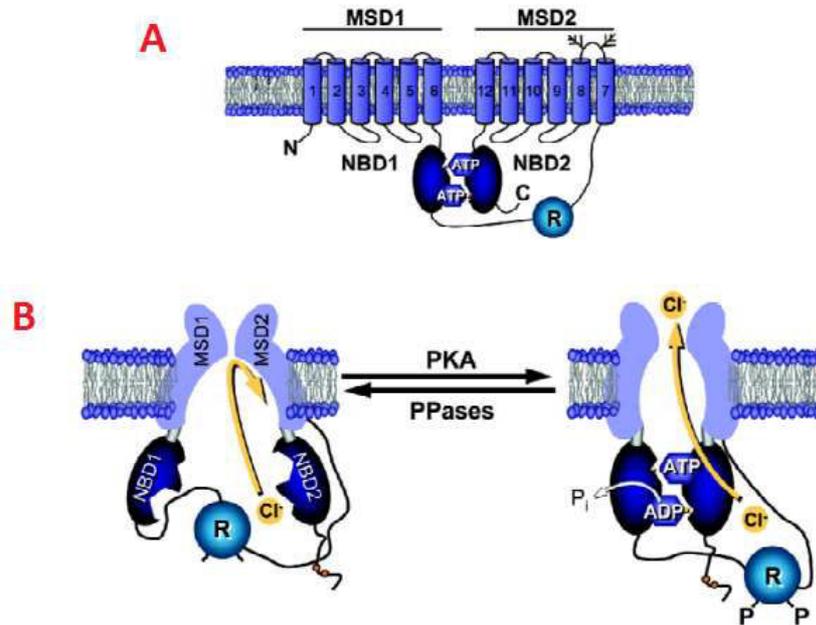


Figure 25. A) Schéma de l'organisation de la protéine CFTR. B) Modèle simplifié du canal chlorure CFTR qui est activé d'une part par phosphorylation du domaine R et d'autre part par fixation et hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBDs.¹¹¹ (PKA) : protéine kinase A. (PPases) : protéine phosphatases.

Dans les glandes sudoripares, le canal CFTR permet en temps normal de réabsorber les ions chlorures à travers l'épithélium afin de réduire la perte de NaCl contenu dans la sueur. Dans tous les autres épithélia, les ions chlorures sont par contre transportés par le canal CFTR vers l'extérieur de la cellule pour fluidifier les muqueuses *via* un phénomène d'osmose (**Figure 26**). Outre son rôle de canal ionique, la protéine CFTR semble également interagir directement et indirectement avec un réseau de protéines dont les fonctions sont très variées, incluant des protéines de transport ionique, des protéines d'inflammation etc.¹¹² Il a été postulé que ce réseau comptait au moins 140 protéines.¹¹³ Par exemple, la protéine CFTR régule l'activité du canal sodique ENaC (*Epithelial Sodium Channel*) qui permet le transport des ions sodium à travers la membrane apicale des cellules épithéliales (**Figure 26**). Au niveau du colon et des voies respiratoires, la protéine CFTR a un effet inhibiteur sur ENaC alors que dans les glandes sudoripares la protéine CFTR active ce canal sodique.¹¹⁴ Le canal chlorure CaCC (*Ca²⁺-activated Chloride Conductance channel*)¹¹⁴ ou encore les protéines d'échange ionique Cl⁻/HCO₃⁻¹¹⁵ sont également régulés par la protéine CFTR qui joue donc un rôle clé dans la régulation des échanges hydroélectrolytiques à travers l'épithélium.

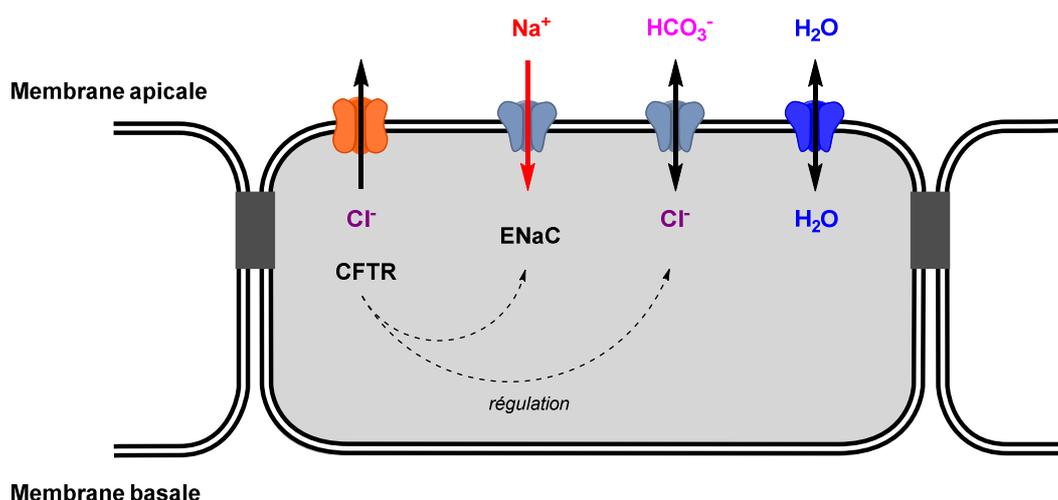


Figure 26. Schéma représentant une partie des échanges hydroélectrolytiques à travers les cellules épithéliales des voies respiratoires.

Lorsqu'elle est mutée, la protéine CFTR est déficiente et *quasi* absente au niveau de la membrane apicale. Dans les glandes sudoripares, cela se traduit par une diminution de l'absorption transépithéliale des ions chlorure et des ions sodium, par conséquent la sueur devient fortement salée.¹⁰³ Au niveau des autres épithélia (voies respiratoires, intestin, canaux pancréatiques et biliaires etc), cette déficience provoque un défaut de sécrétion transépithéliale d'ions chlorure et une hyperabsorption transépithéliale d'ions sodium suite à l'absence de régulation négative de ENaC. La forte concentration en ions Na^+ et Cl^- dans l'épithélium provoque alors une forte absorption d'eau (phénomène d'osmose) et donc une déshydratation et un épaissement du mucus. Au niveau des voies respiratoires, cette hyperabsorption d'eau va avoir pour effet de réduire la couche lubrifiante entre l'épithélium et le mucus (liquide périciliaire) et provoquer la compression des cils par le mucus (**Figure 27**), enrayant ainsi le phénomène de clairance muco-ciliaire.¹⁰⁴

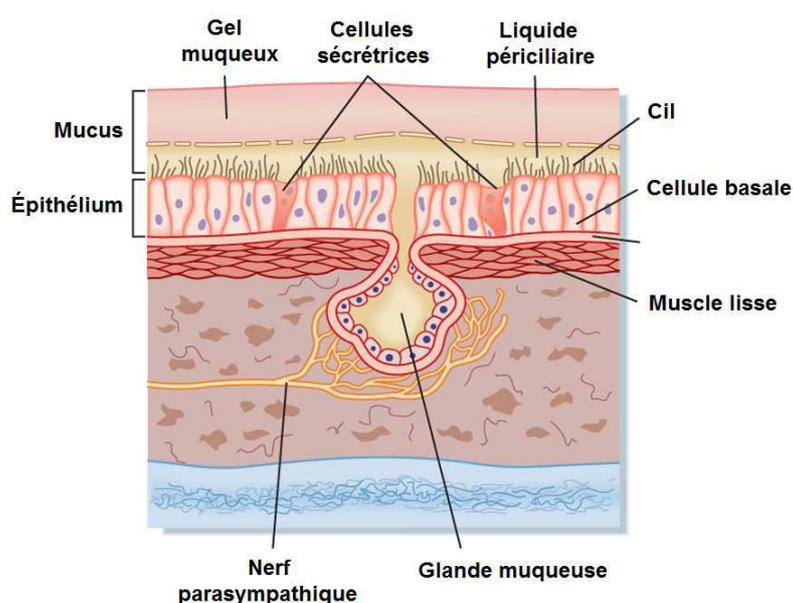


Figure 27. Vue microscopique d'une muqueuse saine des voies respiratoires.¹¹⁶

Le dysfonctionnement du canal CFTR engendre également une réduction des sécrétions transépithéliales d'ions HCO_3^- et donc un abaissement du pH au niveau de la surface de l'épithélium.¹¹⁷ Cette acidification conduit alors à une perturbation de l'activité antibactérienne de l'épithélium et à la perte d'une partie des mécanismes de défense innés.¹¹⁸ De plus, la perturbation des sécrétions de bicarbonate provoque la formation d'agrégats de mucines qui sont des protéines de grande taille composant la plupart des mucus.¹¹⁹ Ces agrégats, qui sont peu solubles et peu transportables, rendent ainsi le mucus très visqueux et difficile à évacuer.

De façon générale, l'ensemble des symptômes de la maladie ne peut pas être uniquement expliqué par la diminution de l'activité canal chlorure de la protéine CFTR, il faut aussi prendre en compte la rupture de toutes les interactions existantes entre la protéine CFTR et d'autres protéines, qui va engendrer un dysfonctionnement dans de nombreuses autres fonctions cellulaires.

1.6. Biosynthèse de la protéine CFTR

Dans le cas d'une personne non atteinte de la mucoviscidose, la biosynthèse de la protéine CFTR commence par la transcription de la séquence d'ADN codant pour la protéine en ARN messager. La traduction de cet ARNm au sein du ribosome permet ensuite de former la chaîne protéique qui, une fois dans le réticulum endoplasmique, subit des modifications post-traductionnelles (glycosylation, voir 2.1) et acquiert sa conformation tridimensionnelle finale.¹⁰⁰ Une fois correctement repliée, la protéine est transportée jusque dans l'appareil de Golgi où les dernières modifications post-traductionnelles sont apportées. Finalement, la protéine mature est adressée à la membrane cellulaire par un système de vésicules où elle peut accomplir son rôle de canal chlorure (**Figure 28**).

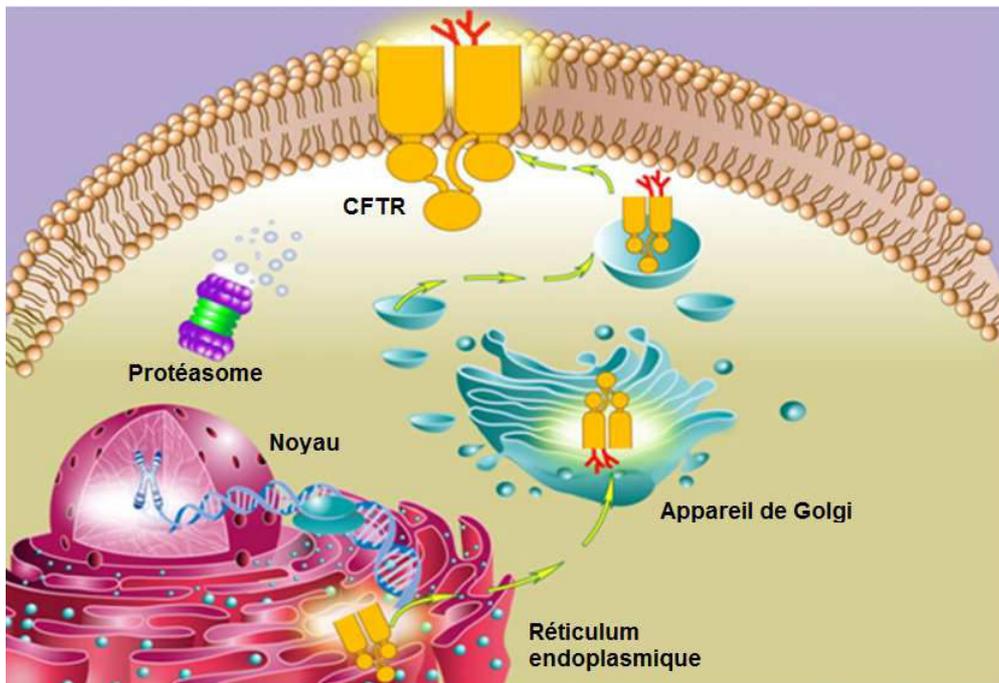


Figure 28. Biosynthèse de la protéine CFTR.¹⁰⁰

1.7. Les différentes classes de mutations et leurs conséquences sur la protéine CFTR

Le gène codant pour la protéine CFTR a été découvert en 1989.¹²⁰⁻¹²² Cette découverte a permis de recenser un très grand nombre de mutations relatives à la maladie, on en compte aujourd'hui pas loin de 2000 (source : *The Cystic Fibrosis Mutation Database*). Ces différentes mutations ont été subdivisées en six différentes classes en fonction de leurs conséquences sur la protéine CFTR (**Tableau 3**). Néanmoins, certaines mutations spécifiques peuvent appartenir à plusieurs classes en même temps.

Tableau 3. Classification des mutations du gène *CFTR* et leurs conséquences sur la protéine CFTR.¹⁰⁰

Classe	Conséquences sur la protéine
<i>Phénotype sévère</i>	
I	Pas de synthèse de CFTR (codon stop ou défaut d'épissage).
II	CFTR est synthétisée mais dans une forme immature (partiellement glycosylée, mal repliée) et celle-ci est donc principalement dégradée par la voie ubiquitine-protéasome.
III	CFTR est synthétisée et adressée à la membrane plasmique mais défaut d'activation et de régulation par ATP.
<i>Phénotype modéré</i>	
IV	CFTR est synthétisée et adressée à la membrane plasmique mais diminution de la conductance (transport d'ions chlorure diminué).
V	Synthèse ou maturation partiellement défectueuse : quantité de protéines fonctionnelles diminuée.
VI	CFTR est synthétisée mais diminution de la stabilité à la membrane et du transport d'ions (autres que Cl ⁻).

Les mutations de classe I, II et III sont associées à des phénotypes sévères puisqu'elles impliquent une perte d'activité due à l'absence de la protéine CFTR ou de sa fonction au niveau de la membrane plasmique (**Figure 29**). Quant aux mutations de classe IV, V et VI, elles sont généralement responsables de formes plus modérées de la maladie puisque la protéine CFTR est présente au niveau de la membrane plasmique mais celle-ci n'est que partiellement fonctionnelle.

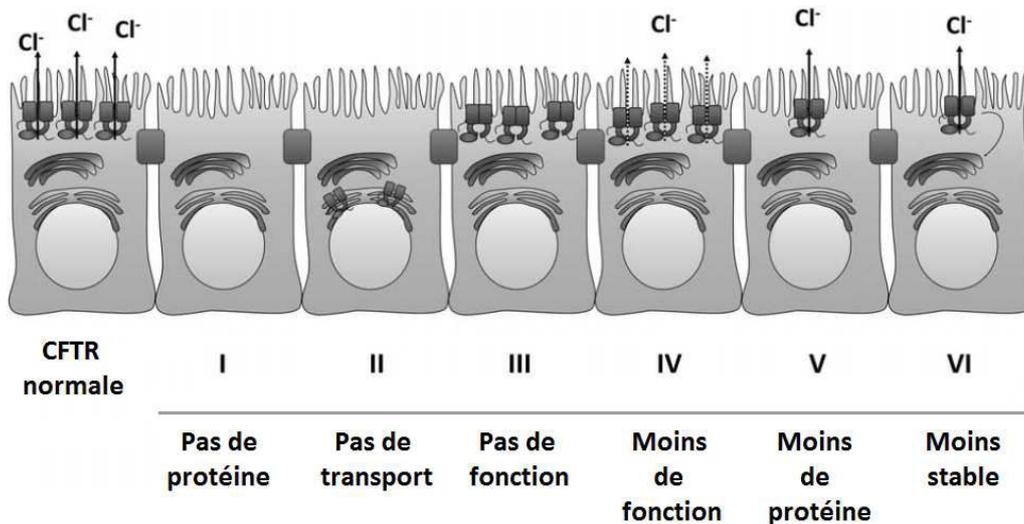


Figure 29. Représentation des différentes classes de mutations du gène *CFTR* et leurs conséquences sur la protéine CFTR.¹²³

À l'échelle mondiale, la mutation la plus fréquente est la mutation delF508 : environ 70% des patients sont des porteurs homozygotes de la mutation delF508. Elle correspond à la délétion d'une phénylalanine en position 508 dans le domaine NBD1 de la protéine CFTR. La mutation delF508 est considérée comme étant une mutation de classe II puisqu'elle perturbe le repliement du domaine NBD1 et empêche la maturation complète de la protéine qui est dégradée prématurément au cours de sa biosynthèse. Ceci conduit donc à une absence quasi-totale de protéine mutée (delF508-CFTR) au niveau de la membrane apicale.¹²⁴ La mutation delF508 peut aussi être considérée comme une mutation de type III puisque la petite quantité de protéine delF508-CFTR qui atteint malgré tout la membrane, peut accomplir son rôle de canal chlorure mais son fonctionnement est diminué à cause d'un défaut d'ouverture du canal.¹²⁵

1.8. Approches thérapeutiques à visée curative

Actuellement, la pharmacothérapie représente la stratégie thérapeutique la plus prometteuse pour traiter la mucoviscidose. L'une des stratégies ayant été développée consiste à activer une voie alternative de sécrétion d'ions chlorure non dépendante de la protéine CFTR. Plusieurs agents pharmacologiques capables d'activer des canaux chlorures tels que CaCC ou de désactiver le canal sodique ENaC ont déjà été identifiés, cependant leur efficacité clinique reste limitée.¹²⁶ Aujourd'hui, la stratégie pharmacologique qui a suscité les plus gros efforts de recherche consiste à restaurer la sécrétion d'ions chlorure de la protéine CFTR. L'avantage d'une telle thérapie est une médication adaptée et personnalisée pour chaque type de patients. En effet, pour les mutations de classe II et V, il est possible de faire appel à des molécules appelées **correcteurs**, qui permettent de sauver la protéine CFTR mutée de la dégradation initiée par les mécanismes de contrôle-qualité du RE et donc de restaurer le transport des protéines vers la membrane plasmique. Les correcteurs peuvent avoir deux différents modes d'action : soit ils interagissent avec la protéine CFTR elle-même et stabilisent sa structure tridimensionnelle (chaperons pharmacologiques); soit ils interagissent avec une ou plusieurs des protéines impliquées dans la maturation de la protéine CFTR et enrayent les mécanismes de contrôle-qualité du RE. En ce qui concerne les mutations de classe III et IV, des molécules stimulant

l'activité de la protéine CFTR défectueuse, appelées **potentiators**, peuvent être utilisées.¹²⁷ Les potentiators permettent d'augmenter le temps d'ouverture du canal chlorure en interagissant directement avec différents domaines de la protéine et stimulent par conséquent les mouvements ioniques.

L'identification de correcteurs et potentiators a été principalement basée sur le criblage à haut débit (HTS pour *High Throughput Screening*) car le manque d'information sur les mécanismes de correction et de potentiation ne permettait pas une conception rationnelle de ces agents pharmacologiques. De cette façon, Vertex Pharmaceuticals Inc. a identifié l'ivacaftor (VX-770), un potentiator qui a été mis sur le marché pour traiter les patients porteurs de la mutation G551D (classe III) et de huit autres mutations de classe III. Ce laboratoire pharmaceutique a également identifié un correcteur très actif *in vitro*, le lumacaftor (VX-809). En phase II d'étude clinique, ce composé n'a cependant montré que de modestes améliorations pour les patients porteurs homozygotes de $\Delta F508$: diminution du chlorure sudoral mais pas d'amélioration au niveau des voies respiratoires. Une thérapie combinatoire avec un potentiator a alors été envisagée en se basant sur le fait qu'une fois adressée à la membrane à l'aide d'un correcteur, la protéine $\Delta F508$ -CFTR aurait besoin d'un potentiator pour fonctionner complètement. Les études cliniques de phase II du lumacaftor en combinaison avec l'ivacaftor (**Figure 30**) ont d'ores et déjà montré des résultats cliniques très encourageants chez des patients porteurs homozygotes de $\Delta F508$ et ont motivé des études cliniques de phase III (réalisées actuellement sur plus de 1000 patients).¹²³

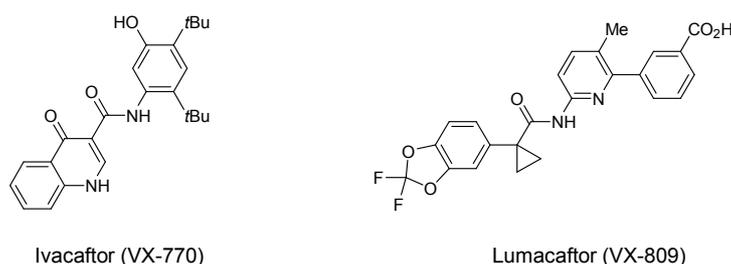


Figure 30. Composés potentiators (VX-770) et correcteurs (VX-809) en études cliniques de phase III chez des patients porteurs homozygotes de $\Delta F508$.

2. CORRIGER LA PROTÉINE $\Delta F508$ -CFTR EN INHIBANT LES GLYCOSIDASES DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE ?

En 2006, le groupe du Pr Becq a émis l'hypothèse selon laquelle l'inhibition des α -glucosidases du RE, impliquées dans la biosynthèse de la protéine CFTR et les mécanismes de contrôle-qualité, pourrait permettre de sauver la protéine mutée des mécanismes de dégradation cellulaire.³⁵ Afin de comprendre le rôle que jouent les différentes protéines/enzymes du RE, dont les α -glucosidases, dans la biosynthèse de la protéine CFTR et dans les mécanismes de contrôle-qualité, le paragraphe suivant détaille le parcours des protéines *N*-glycosylées (dont fait partie la protéine CFTR) au sein du RE.

2.1. Biosynthèse des protéines *N*-glycosylées et contrôle-qualité au sein du RE

Après les étapes transcriptionnelles et traductionnelles, la biosynthèse des protéines se poursuit dans le réticulum endoplasmique, dans lequel interviennent le repliement et la maturation des protéines. Au terme de son passage dans le RE, la protéine est soit acheminée vers l'appareil de Golgi soit dégradée si celle-ci ne correspond pas aux critères de qualité de la cellule.

Pour ce faire, le RE possède un système de contrôle-qualité efficace qui contrôle l'assemblage et le repliement des protéines et s'assure que seules les protéines correctement repliées peuvent atteindre leur destination finale.¹²⁸ À l'inverse, les protéines incapables d'obtenir une conformation satisfaisante sont dirigées vers des mécanismes de dégradation. La force de ce système de contrôle-qualité repose sur la présence d'appendices fonctionnels greffés sur la protéine, les *N*-glycanes, qui agissent comme de véritables marqueurs et déterminent le destin de la protéine. Dans la suite de ce paragraphe, nous nous attacherons à détailler l'implication des *N*-glycanes dans les mécanismes de repliement, de contrôle-qualité et de dégradation qui ont lieu au sein du RE.^{129,130}

2.1.1. Transfert du *N*-glycane sur la protéine

Dans un premier temps, la protéine naissante en train d'être formée par le ribosome entre dans la lumière du RE à travers le translocon Sec61. Sa séquence est simultanément scannée par une oligosaccharyltransférase (OST) qui repère les séquons pour la *N*-glycosylation : séquence de type Asn-X-Ser/Thr.* Lorsqu'un séquon est repéré, l'enzyme transfère à partir du dolichol-pyrophosphate, qui est une ancre lipidique insérée dans la membrane du RE, un *N*-glycane en un bloc sur l'asparagine (**Figure 32**). La présence de ces *N*-glycanes sur la chaîne polypeptidique permet tout d'abord d'augmenter la stabilité et la solubilité de la protéine tout en rigidifiant en partie sa conformation. Ces *N*-glycanes jouent également le rôle de marqueur de l'état de repliement de la protéine et seront reconnus par les différentes enzymes et lectines impliquées dans le système de contrôle-qualité. Le *N*-glycane est un oligosaccharide composé, selon un enchaînement précis, de deux unités *N*-acétylglucosamine, neuf unités mannose et trois unités glucose : Glc₃Man₉GlcNAc₂ (**Figure 31**).

* Séquons pour la *N*-glycosylation : Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, où Asn est une asparagine, Ser une sérine, Thr une thréonine et X un acide aminé différent de la proline.

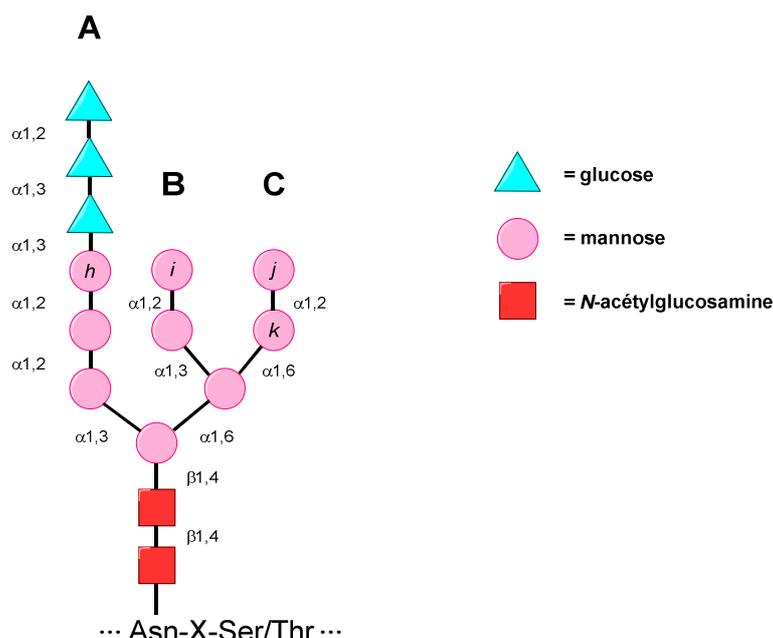


Figure 31. Structure du *N*-glycane ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) transféré par l'oligosaccharyltransférase. A, B et C représentent les trois bras du *N*-glycane.

2.1.2. Repliement de la protéine et contrôle-qualité : le cycle calnexine/calréticuline

Après le transfert des *N*-glycanes sur la protéine, le premier glucose ($\alpha 1,2$) est rapidement hydrolysé par l' α -glucosidase I du RE (GI). Cette coupure est alors suivie de l'hydrolyse du second glucose ($\alpha 1,3$) par l' α -glucosidase II du RE (GII) (**Figure 32**). L'intermédiaire $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ formé est ensuite reconnu par une lectine : la calnexine (CNX) ou la calréticuline (CRT). La liaison avec l'une de ces deux lectines va alors favoriser le repliement des protéines en empêchant leur agrégation et en formant un complexe [protéine]-[CRT/CNX]-[ERp57][†] qui permet la formation de liaisons disulfures stabilisant la structure tridimensionnelle de la protéine. L'interaction avec CNX et CRT prend ensuite fin lorsque l' α -glucosidase II du RE coupe le dernier résidu glucose des *N*-glycanes (formation de l'intermédiaire $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). À ce moment là, trois cas de figure sont possibles :

- si la protéine est correctement repliée, celle-ci est dirigée vers les sites de sortie du RE pour rejoindre l'appareil de Golgi, cette sortie se faisant *via* l'assistance d'autres lectines (paragraphe 2.1.3).
- si la protéine est partiellement repliée, celle-ci est reconnue par l'UGGT (UDP-glucose: Glycoprotéine Glucosyltransférase) qui détecte son mauvais état de repliement par la reconnaissance de zones hydrophobes et du résidu GlcNAc qui est généralement caché/occulté dans le cas des protéines natives. L'UGGT reglucosyle alors les *N*-glycanes

[†] ERp57 (*ER protein 57 kDa*) est une oxydoréductase de thiol-disulfure qui, lorsqu'elle est associée à CNX ou CRT, assiste la formation de liaisons disulfures stabilisantes au niveau de la glycoprotéine.

localisés dans les régions improprement repliées et la protéine est réassociée à la calnexine ou la calréticuline pour subir à nouveau une série de repliement qui lui confèrera sa conformation définitive.

- si la protéine ne parvient pas à obtenir un repliement correct au bout d'un certain temps dans le cycle calnexine/calréticuline (à cause d'une mutation par exemple), plusieurs résidus mannoses ($\alpha 1,2$) sont coupés par l' $\alpha 1,2$ -mannosidase I du RE (REManI) qui joue un rôle de minuteur de part sa faible activité enzymatique. La protéine rentre alors dans un processus de dégradation nommée ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*) (paragraphe 2.1.4).

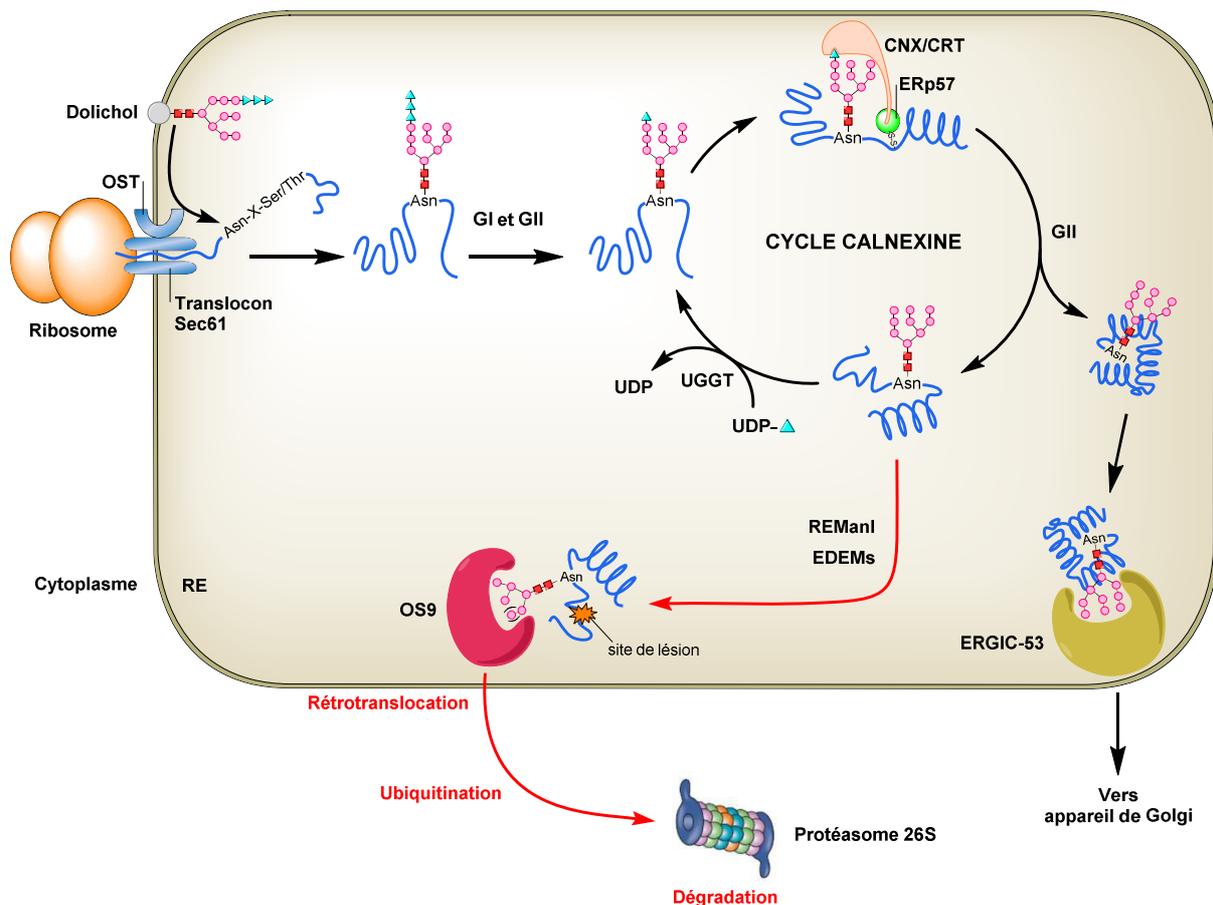


Figure 32. Repliement des protéines N-glycosylées, contrôle-qualité et processus de dégradation au sein du RE.

2.1.3. Sortie des protéines correctement repliées du RE vers l'appareil de Golgi

Une fois sortie avec succès du cycle CNX/CRT, la protéine correctement repliée (sous la forme $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) peut se lier à une protéine « cargo » ERGIC-53[▼] qui est responsable du transport des

[▼] ERGIC-53 pour *ER-Golgi Intermediate Compartment protein 53 kDa*.

glycoprotéines du RE vers l'appareil de Golgi. Étant donné que cette lectine est spécifique des *N*-glycanes hautement mannosylés ($\text{Man}_{8,9}\text{GlcNAc}_2$), les glycoprotéines ayant subi des démannosylations lors des mécanismes de contrôle-qualité ne peuvent pas être reconnues par cette lectine et par conséquent sortir du RE.

2.1.4. Reconnaissance et dégradation des protéines mal repliées

La reconnaissance et la dégradation des protéines mal repliées et irrécupérables sont des processus essentiels pour prévenir leur accumulation dans le RE qui pourrait alors nuire au bon fonctionnement de la cellule. Dans le RE, les protéines mal repliées sont tout d'abord reconnues et marquées par le système ERQC (*Endoplasmic Reticulum Quality Control*) et ensuite dirigées vers la voie de dégradation ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*). Celles-ci seront alors rétrotransloquées du RE vers le cytoplasme puis dégradées par le système ubiquitine/protéasome. Dans ce paragraphe, nous ne décrirons que l'étape de reconnaissance des protéines mal repliées.¹³¹

Après un certain temps de résidence dans le cycle CNX/CRT et un nième échec de repliement, un résidu mannose du *N*-glycane (résidu *i* du bras B) va finir par être hydrolysé par la REManI et les EDEMs (*ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like protein*) qui jouent un rôle de minuteur de part leur faible activité enzymatique (**Figure 33**). Cette coupure n'exclut cependant pas une nouvelle tentative de repliement dans le cycle CNX/CRT et permet aux protéines dont le repliement est relativement lent d'obtenir finalement leur conformation correcte. Par contre, si la protéine n'arrive toujours pas à se replier correctement, un second résidu mannose (résidu *h* ou *j*) va également finir par être hydrolysé et dans les deux cas la protéine sera considérée comme un substrat à dégrader. En effet, dans le premier cas l'hydrolyse du résidu mannose *h* du bras A va stopper définitivement l'entrée dans le cycle CNX/CRT car il ne peut plus y avoir de re-glycosylation par l'UGGT. Dans le second cas, l'hydrolyse du résidu mannose *j* du bras C va mettre à jour le résidu α 1,6-mannose (résidu *k*) qui va être reconnu spécifiquement par les lectines OS9 qui initient les phases de rétrotranslocation et d'ubiquitination du processus ERAD. En réalité, cette seconde coupure de résidu mannose est le plus souvent suivie de coupures supplémentaires jusqu'à atteindre les glycoformes $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ (M6) ou $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (M5) qui sont les formes les plus communes des substrats marqués pour la dégradation.

Pour conclure, le marquage des protéines mal repliées pour la dégradation se fait donc par une hydrolyse progressive des résidus α 1,2-mannose du *N*-glycane et le fait que cette hydrolyse soit un processus relativement lent permet au système ERQC de s'assurer que seules les protéines irréversiblement mal repliées, et non les protéines intermédiairement repliées, soient dirigées vers la voie ERAD.

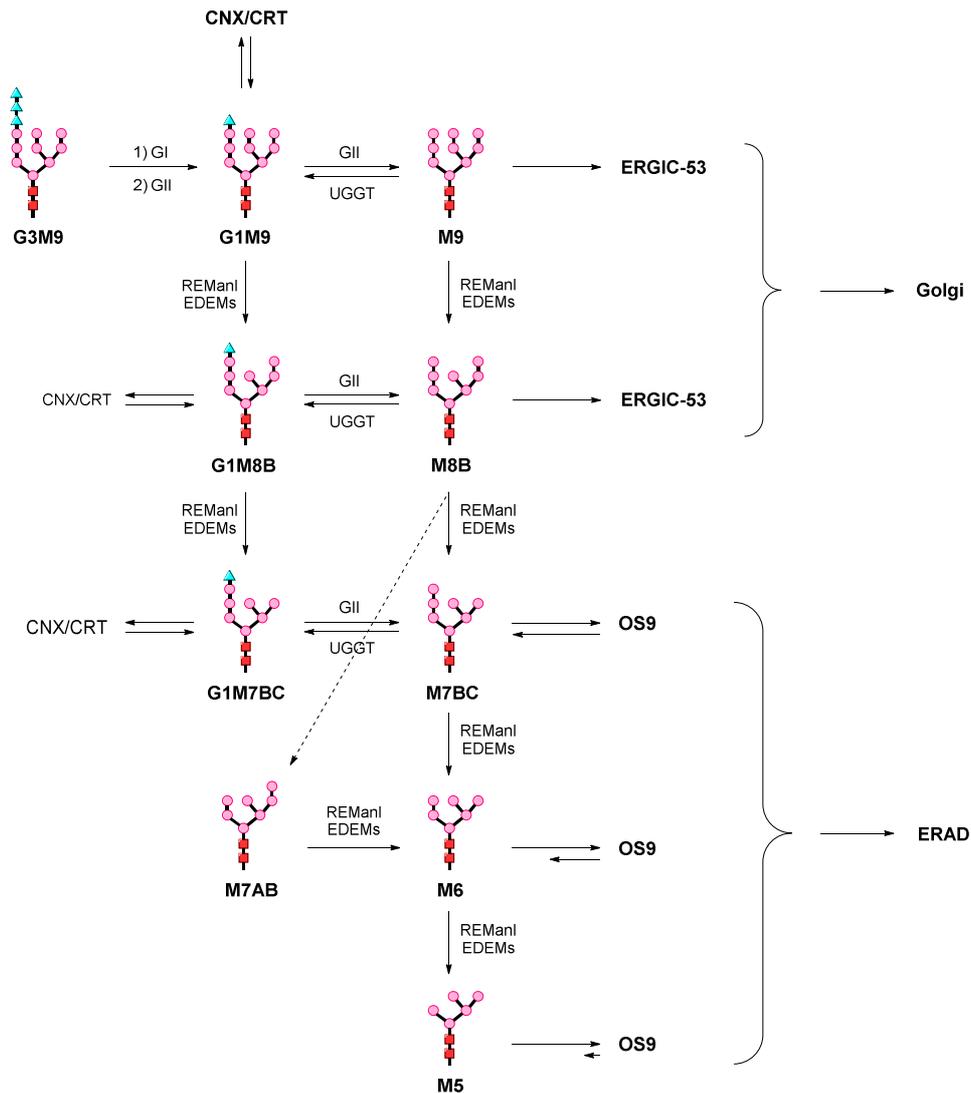


Figure 33. Coupure des différents résidus du *N*-glycane et reconnaissance des différentes glycoformes par les acteurs des systèmes ERQC et ERAD.¹³¹

2.2. Le cas de la *N*-butyl-DNJ, un inhibiteur des glucosidases I et II du RE

D'après l'idée du groupe du Pr Becq, en bloquant la déglucosylation de la protéine delF508-CFTR, les inhibiteurs des glucosidases I et II du RE seraient en mesure de prévenir l'interaction entre la protéine delF508-CFTR (sous la forme $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) et la calnexine et par conséquent son entrée dans les mécanismes de dégradation.³⁵ Pour tester cette hypothèse, le groupe du Pr Becq a choisi la *N*-butyl-DNJ (miglustat, **10**), un iminosucre connu pour inhiber les glucosidases I et II du RE (**Figure 34**).¹³² Il a alors été montré dans des cellules épithéliales de patients atteints de la mucoviscidose que la *N*-butyl-DNJ était capable de restaurer l'adressage membranaire de la protéine delF508-CFTR et permettait à cette dernière de fonctionner à nouveau comme un transporteur ionique

(Figure 34).³⁵ L'EC₅₀^x de la *N*-butyl-DNJ a alors été déterminée à 112 μM (après deux heures de traitement).¹³³ Une analyse basée sur la technique de western blot a également confirmé que le miglustat réduisait l'interaction entre la protéine delF508-CFTR et la calnexine,³⁵ rationalisant ainsi l'hypothèse de départ.

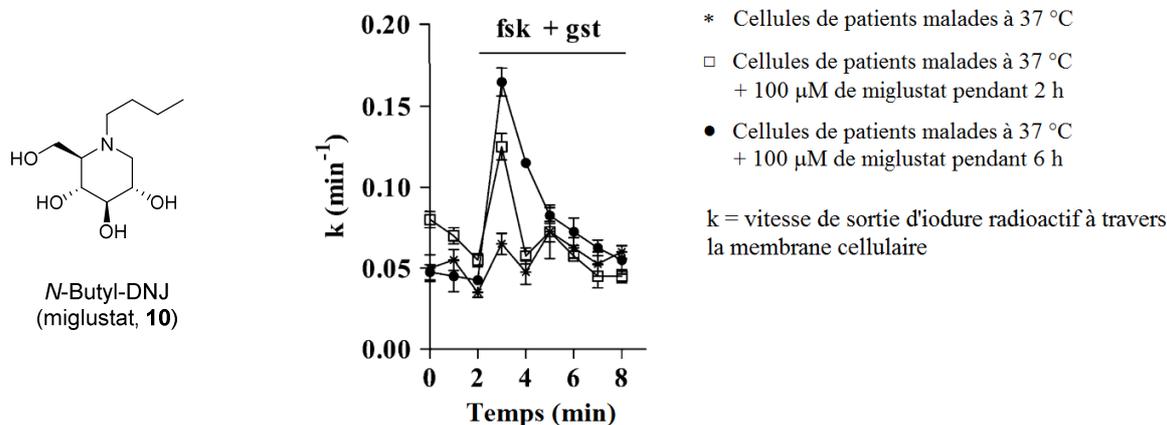


Figure 34. Récupération de l'activité de la protéine delF508-CFTR en présence de miglustat mesurée par la technique d'efflux d'iodure. Courbe d'efflux d'iodure en fonction du temps, en présence d'activateurs de la protéine CFTR : forskoline (10 μM) et genistein (30 μM).¹³³

Suite à cela, une étude réalisée sur des cellules nasales humaines issues de malades a montré qu'un traitement journalier avec le miglustat (concentration de 3 μM) pendant deux mois permettait une correction progressive, stable et réversible du transport de la protéine delF508-CFTR, ainsi qu'une régulation négative de l'hyperabsorption de sodium.¹³³ Deux autres études ont confirmé le potentiel grandissant du miglustat en tant que médicament pour le traitement de la mucoviscidose en démontrant d'une part son efficacité *in vivo* sur un modèle de souris¹³⁴ et d'autre part ses propriétés anti-inflammatoires sur des cellules épithéliales bronchiques.³⁴ Au vu de ces résultats, une étude clinique de phase II visant à évaluer l'effet du miglustat sur des patients porteurs homozygotes de delF508 a été initiée.¹³⁵

2.3. Premiers effets multivalents sur la correction de la protéine delF508-CFTR

La découverte du potentiel thérapeutique du miglustat a naturellement poussé les chimistes et biologistes à développer de nouveaux correcteurs plus efficaces basés sur des analogues du miglustat.¹³⁶⁻¹³⁹ Dans ce contexte, la multivalence a alors été vue comme un moyen simple et efficace de transformer le miglustat en un inhibiteur d' α -glucosidases du RE encore plus puissant et plus sélectif. Fort de notre expérience dans le domaine, notre groupe a alors synthétisé une librairie de clusters tri- à tétradécavalents à partir d'un ligand *N*-alkyl-DNJ et de plateformes de type pentaérythritol, fullerène C₆₀ et β -cyclodextrine.⁹⁵ Après une première évaluation qualitative, l'EC₅₀

^x EC₅₀ : concentration de la molécule qui donne 50% de l'efficacité maximale.

des composés les plus intéressants (**41**, **42-45**) a été déterminée (**Figure 35**). Parmi ceux-ci, les composés trivalents **42** ($EC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$) et **43** ($EC_{50} = 1 \mu\text{M}$) se sont révélés être les correcteurs de la protéine delF508-CFTR les plus efficaces. Finalement, une forte augmentation d'activité correctrice a alors été observée avec le composé **42**, qui s'est révélé être 920 fois plus efficace que son analogue monovalent **24b** et 225 fois plus efficace que le miglustat (**10**). Ce résultat représente le premier exemple d'effets multivalents sur la correction de la protéine delF508-CFTR.

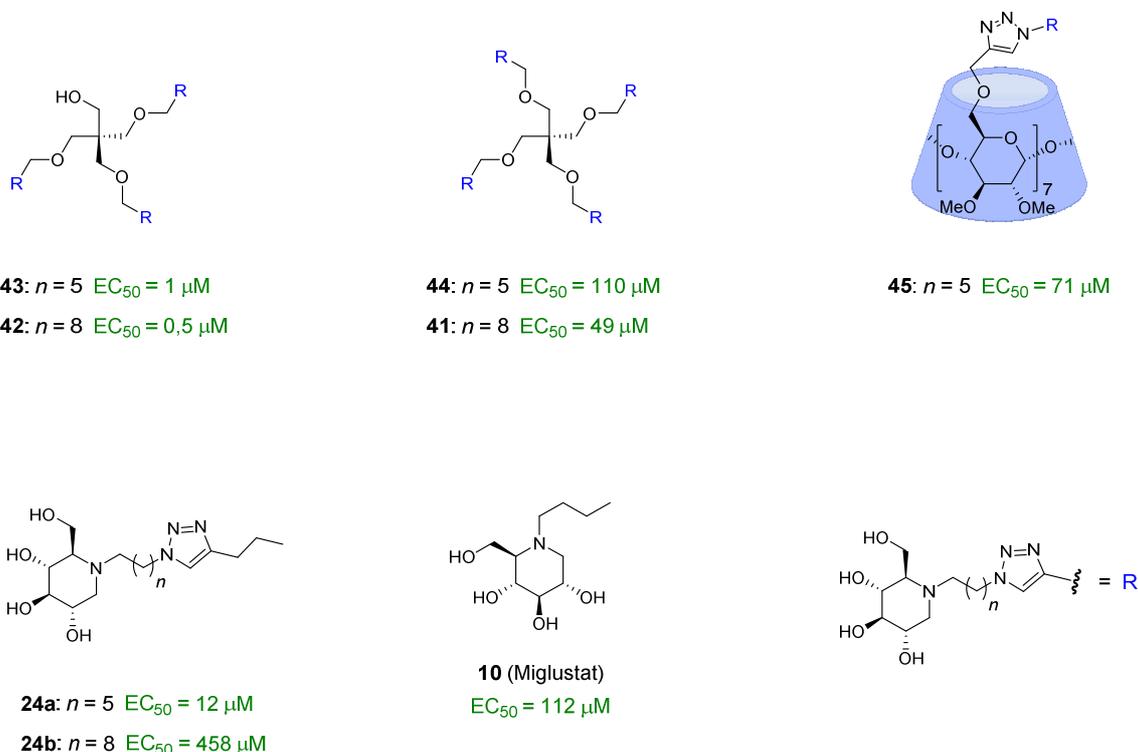


Figure 35. Iminosucres tri-, tétra- et heptavalents (**41**, **42-45**) et leurs analogues monovalents (**24**) évalués pour la correction de la protéine delF508-CFTR.⁹⁵

Plusieurs expériences ont été réalisées afin d'explorer les mécanismes à l'origine de cet effet multivalent puissant.⁹⁵ Dans un premier temps, il a fallu déterminer si le gain d'activité observé avec **42** était dû à un effet multivalent sur l'inhibition des α -glucosidases I et II du RE, comme cela avait été initialement anticipé. Pour cela, des expériences d'analyse cellulaire d'oligosaccharides libres (FOS pour *Free Oligosaccharide*) ont été réalisées selon une méthode précédemment établie.¹⁴⁰ En déterminant la quantité d'oligosaccharides libres glucosylés $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ou $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, il est en effet possible d'évaluer le niveau d'inhibition des α -glucosidases I et II du RE. De façon surprenante, en présence du cluster trivalent **42**, les quantités de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ et de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ étaient beaucoup plus faibles que pour son analogue monovalent **24b**. Cela signifie que le composé **24b** est un inhibiteur d' α -glucosidases I et II du RE plus puissant que le cluster **42** et par conséquent que la forte activité correctrice de ce dernier n'est pas due à un effet multivalent sur l'inhibition des glucosidases du RE. La possibilité d'un mécanisme d'action différent pour le composé trivalent **42** et le composé monovalent **24b** a donc été évaluée à l'aide d'une expérience de compétition basée sur la technique de l'efflux d'iodure. L'absence de potentialisation observée lorsque des cellules de patients malades étaient co-traitées avec les iminosucres **24b** et **42** a démontré que ces

derniers partageaient le même mécanisme de correction. Finalement, des expériences de compétition avec des composés inhibant spécifiquement les étapes de contrôle-qualité du RE ont prouvé que les composés **24b** et **42** agissaient tous deux en perturbant les interactions entre la calnexine et la protéine delF508-CFTR (**Figure 36**). En se basant sur toutes ces considérations mécanistiques, on peut penser que le mécanisme de correction du miglustat est probablement plus complexe qu'initialement prévu et n'est pas uniquement basé sur l'inhibition des α -glucosidases I et II du RE.

	BFA	MG-132	N-Bu DMJ	geldanamycin	thapsigargin	castanospermine
24b	–	*	*	**	n.s.	n.s.
42	–	**	***	**	n.s.	n.s.
	inhibiteur de vésicules		inhibiteur de la dégradation protéasomique		inhibiteur de Hsp90	
					inhibiteurs du cycle calnexine	

Figure 36. Potentialisation de l'effet correcteur des composés **24b** ou **42** en présence de différents inhibiteurs des étapes de contrôle-qualité du RE.⁹⁵ (***) forte potentialisation; (**) potentialisation moyenne; (*) faible potentialisation; (–) inhibition de l'effet correcteur; (n.s.) potentialisation non significative. Hsp90 : *Heat Shock Protein*.

Au final, cette étude a démontré que la multivalence était un outil simple et efficace pour accroître considérablement l'activité thérapeutique d'un correcteur de la protéine CFTR. De plus, l'identification d'un correcteur trivalent au submicromolaire 225 fois plus actif qu'un candidat clinique (miglustat) est un premier pas vers le développement thérapeutique de correcteurs multivalents très efficaces.

2.4. Une nouvelle stratégie thérapeutique en inhibant l' α 1,2-mannosidase I du RE

Après avoir montré que des correcteurs comme le miglustat ou le cluster trivalent de DNJ (**42**) agissaient en perturbant l'entrée de la protéine delF508-CFTR dans le cycle calnexine, le groupe du Pr Becq et du Dr Norez a imaginé un autre angle d'attaque en se concentrant sur les étapes de reconnaissance et de marquage de la protéine mutée. En effet, la perturbation de ces étapes permettrait d'empêcher l'envoi de la protéine delF508-CFTR vers la voie de dégradation ERAD et favoriserait par conséquent l'adressage de la protéine à la membrane plasmique.

Pour valider cette hypothèse, l'équipe du Pr Becq et du Dr Norez a choisi de cibler la REManI car, en coupant les résidus mannoses du *N*-glycane, cette enzyme est d'une part responsable de la sortie des glycoprotéines mal repliées du cycle calnexine et d'autre part marque ces protéines pour la dégradation. Le choix d'inhiber cette enzymes a également été renforcé par le fait qu'il ait été montré que l'inhibition sélective de REManI permettait de stabiliser les protéines *N*-glycosylées mal formées.¹⁴¹

2.4.1. L' α 1,2-mannosidase I du RE

La REManI est une enzyme qui catalyse uniquement la coupure de résidus mannose liés en α 1,2. L'hydrolyse se fait alors avec inversion de configuration.¹⁴² La REManI fait partie de la classe I des α -mannosidases (famille GH47)^{143,144} dans laquelle on retrouve également les α -mannosidases I de Golgi qui sont impliquées dans la maturation des protéines *N*-glycosylées dans l'appareil de Golgi. Plusieurs inhibiteurs des α -mannosidases de classe I ont déjà été identifiés et sont pour la plupart basés sur des structures de type iminosucre, on retrouve la kifunensine (**46**), la 1-désoxymannojirimycine (DMJ, **3**) ou encore la swainsonine (**6**) (**Figure 37**).¹⁴⁵ À titre d'exemple, la DMJ inhibe la REManI de foie de porc avec un K_i de 5 μ M.¹⁴⁴

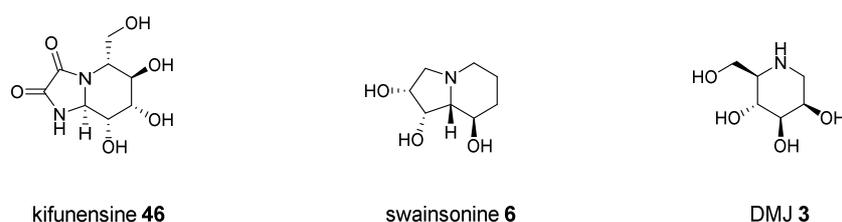


Figure 37. Inhibiteurs des α -mannosidases de classe I.

2.4.2. La DMJ et la *N*-butyl-DMJ, deux correcteurs de la protéine delF508-CFTR

À la suite d'un criblage de dérivés d'iminosucres, le groupe du Pr Becq et du Dr Norez a montré que la DMJ et la *N*-butyl-DMJ, deux inhibiteurs de la REManI, permettaient de restaurer le fonctionnement de la protéine delF508-CFTR (**Figure 38**). Ces mesures d'effet correcteur avaient aussi montré que la *N*-butyl-DMJ était bien plus efficace que la DMJ, dont l' EC_{50} avait été déterminée à 140 μ M.

Ces premiers résultats permettaient par conséquent de valider l'hypothèse avancée par cette équipe de biologistes et ouvraient la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique de correction de la protéine CFTR basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de la REManI. Cette stratégie est particulièrement intéressante car en inhibant les mannosidases, qui sont beaucoup moins présentes que les glucosidases dans l'organisme, on diminue le risque d'effets secondaires. Cette sélectivité permettrait par exemple d'éviter les problèmes rencontrés avec le miglustat qui, à cause de l'inhibition non spécifique de glucosidases intestinales, provoque des effets secondaires sérieux comme des troubles gastro-intestinaux, une perte de poids etc.¹⁴⁶

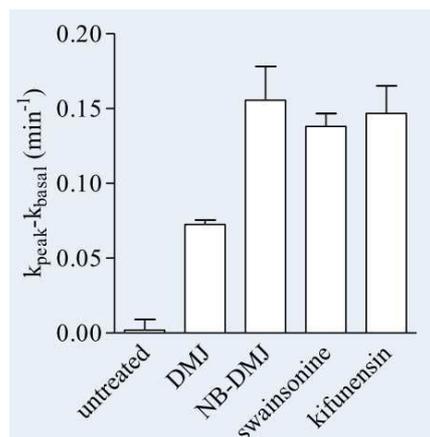


Figure 38. Effet correcteur d'inhibiteurs de REManI mesuré par la technique d'efflux d'iodure sur des cellules de hF508-CFTR traitées pendant 4 h à une concentration de 100 μM d'inhibiteurs.¹⁴⁷ La valeur $k_{\text{peak}} - k_{\text{basal}}$ correspond à la différence d'activation avant et après l'ajout des stimulateurs de la protéine CFTR, elle est représentative de l'efficacité d'un correcteur.

2.5. Conception d'iminosucres multivalents basés sur la *N*-butyl-DMJ

Dans le but d'appuyer les travaux préliminaires réalisés avec la DMJ et la *N*-butyl-DMJ et en nous basant sur les résultats prometteurs observés avec la multivalence dans ce domaine,⁹⁵ nous avons décidé, en collaboration avec l'équipe du Pr Beck et du Dr Norez, de concevoir des iminosucres multivalents dont le ligand périphérique serait un dérivé *N*-alkylé de la DMJ. L'objectif de ce projet consistait à identifier de nouveaux correcteurs efficaces basés sur des inhibiteurs multivalents de REManI. Comme la majorité des clusters d'iminosucres rapportés à ce jour ont été synthétisés à l'aide de la chimie click,⁸⁶ nous nous sommes naturellement orientés vers cette stratégie pour concevoir nos systèmes iminosucres multivalents (**Figure 39**). La force de cette stratégie est principalement due à sa convergence et à l'efficacité de la réaction de CuAAC.

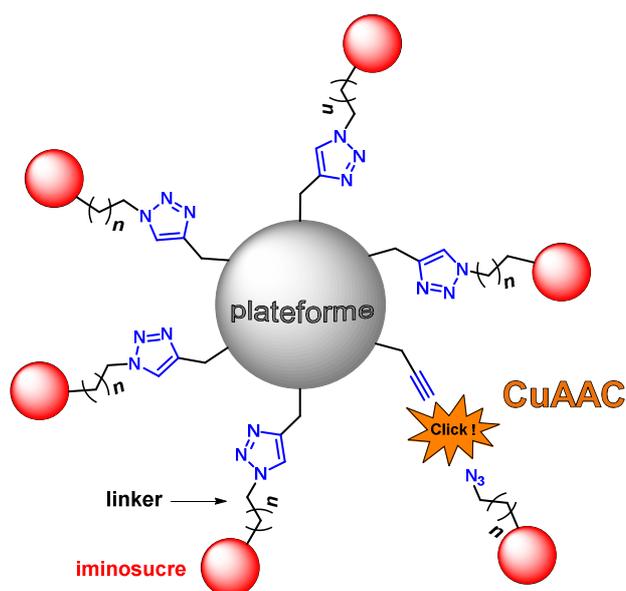


Figure 39. Stratégie de formation d'iminosucres multivalents par CuAAC.

2.5.1. La réaction de CuAAC comme outil synthétique puissant

a) Une réaction de chimie click

Sharpless *et al.* ont été les premiers en 2001 à introduire le concept de chimie « click ». Une réaction de chimie click a alors été définie comme étant une réaction permettant de créer des liaisons carbone-hétéroatome et répondant à plusieurs critères : elle doit entre autres avoir un champ d'application large, donner de très hauts rendements, être stéréospécifique et facile à mettre en œuvre (conditions de réactions simples, réactifs facilement accessibles et purification aisée).¹⁴⁸

Au regard de ces critères, la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne, décrite dans les années 1960 par Huisgen,¹⁴⁹ représente presque idéalement ce concept de chimie click. Cette réaction péricyclique, qui met en jeu un alcyne et un azoture organique, permet de former un 1,2,3-triazole substitué en position 1 et 4 et son régioisomère substitué en position 1 et 5 (**Schéma 3**). En 2002, le groupe de Fokin et Sharpless et le groupe de Meldal ont indépendamment décrit une version régiosélective catalysée au cuivre (I) de cette cycloaddition : la CuAAC (*Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*).^{150,151} Cette réaction permet alors d'obtenir un unique produit 1,2,3-triazole substitué en 1,4 (**Schéma 3**). Quelques années plus tard, une seconde version catalysée par des complexes de ruthénium, nommée RuAAC (*Ruthenium-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*), a permis d'obtenir régiosélectivement l'autre régioisomère, le 1,2,3-triazole substitué en 1,5 (**Schéma 3**).¹⁵²

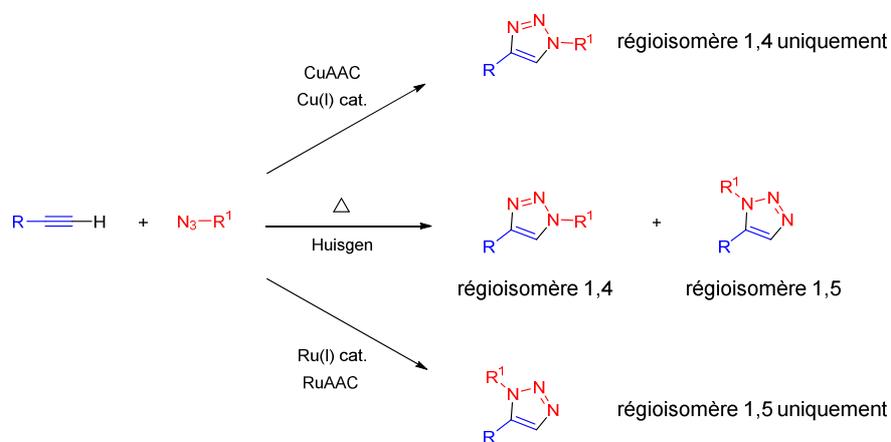


Schéma 3. Cycloaddition 1,3-dipolaire décrite par Huisgen, réactions de CuAAC et de RuAAC.

b) Mécanisme

L'élucidation du mécanisme de la CuAAC a été longue et difficile,¹⁵³ car les intermédiaires réactionnels impliqués dans le cycle catalytique sont hautement réactifs et impliqués dans de nombreux équilibres. Le premier mécanisme, proposé par Fokin et Sharpless en 2002,¹⁵¹ faisait intervenir dans le cycle catalytique des intermédiaires de cuivre (I) uniquement mononucléaires (**Schéma 4**).

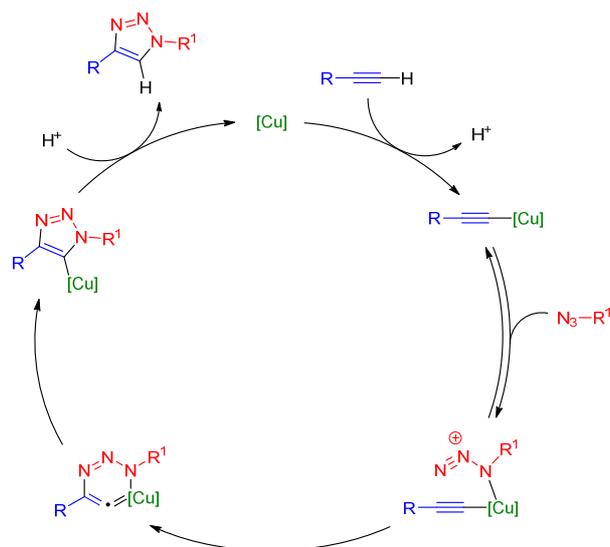


Schéma 4. Premier mécanisme proposé pour la CuAAC.¹⁵¹

Le rôle du cuivre dans le cycle catalytique a cependant été sujet à de nombreuses discussions et révisions¹⁵⁴ et plusieurs études expérimentales et théoriques ont suggéré une possible implication d'intermédiaires de cuivre (I) polynucléaires.¹⁵⁵⁻¹⁵⁹ Récemment, Fokin *et al.* ont démontré à l'aide d'une étude mécanistique rigoureuse la participation d'un intermédiaire à deux atomes de cuivre (I) dans le cycle catalytique.¹⁶⁰ Ce mécanisme binucléaire est actuellement le mécanisme accepté pour la réaction de CuAAC avec un alcyne terminal (Schéma 5).

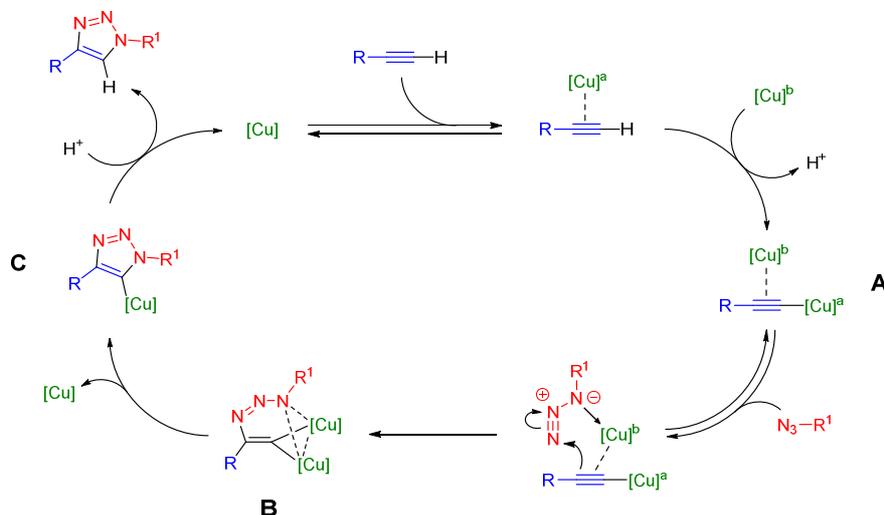


Schéma 5. Mécanisme catalytique de la réaction de CuAAC impliquant deux atomes de cuivre.¹⁶⁰

Le cycle catalytique débute par la génération d'un acétylénure de cuivre ($R-C\equiv C-[Cu]^a$), cette étape est initiée par la complexation du cuivre $[Cu]^a$ sur la triple liaison, qui diminue le pK_a du proton acétylénique et facilite la déprotonation de ce dernier. Simultanément, un second atome de cuivre $[Cu]^b$ se complexent sur la triple liaison de l'acétylénure formant ainsi l'intermédiaire A. L'étape suivante consiste en la coordination réversible de l'azote N-1 de l'azote organique sur le cuivre $[Cu]^b$ de l'intermédiaire A. Consécutivement, l'attaque nucléophile du carbone β de l'acétylénure sur

l'azote N-3 de l'azoture permet la formation de la première liaison covalente C–N (métallacycle **B**). Cet intermédiaire métallacycle binucléaire **B** subit ensuite une élimination réductrice pour former la seconde liaison C–N et donner le triazolure de cuivre **C**. Finalement, une protonolyse de la liaison C–Cu conduit à la formation du 1,2,3-triazole substitué en 1,4 et à la régénération du catalyseur.

c) Avantages de la CuAAC

Outre une régiosélectivité totale, les avantages de la réaction de CuAAC sont très nombreux et permettent de justifier le fait qu'elle soit considérée comme « la crème de la crème »¹⁴⁸ des réactions de chimie click :

- réaction robuste et très facile à mettre en œuvre
- conditions de réaction douces (température ambiante)
- aucune sensibilité à l'air, ni au changement de pH, ni à la température
- compatible avec de nombreux solvants organiques (dont l'eau) et une grande variété de groupements fonctionnels
- rendement très élevé et purification non systématique, etc

Un autre avantage considérable de la réaction de CuAAC est la formation d'un motif 1,2,3-triazole particulièrement stable qui résiste aux hydrolyses acides et basiques, aux oxydations et réductions et aux dégradations métaboliques. La rigidité du triazole permet également de prévenir les interactions entre les deux entités liées.¹⁶¹ Dans le cas où la réaction de CuAAC serait mise à profit pour synthétiser des molécules évaluées sur des cibles biologiques, il est possible que le noyau triazole ne joue plus simplement le rôle de linker mais interagisse directement avec la cible biologique (site actif d'une enzyme par exemple). Le 1,2,3-triazole substitué en 1,4 peut en effet être impliqué dans des interactions de « π - π stacking » à cause de son caractère aromatique. Il peut aussi être impliqué dans des interactions de type liaison hydrogène *via* les doublets non liants des atomes d'azote N-2 et N-3 ou *via* le proton C–H qui peut se comporter comme un donneur de liaison hydrogène.¹⁶² Ce caractère de donneur et accepteur de liaison hydrogène explique en partie pourquoi il peut être considéré comme un bioisostère de la liaison amide (isomère *Z*), l'un des groupes fonctionnels les plus représentés dans les médicaments (**Figure 40**).¹⁶³

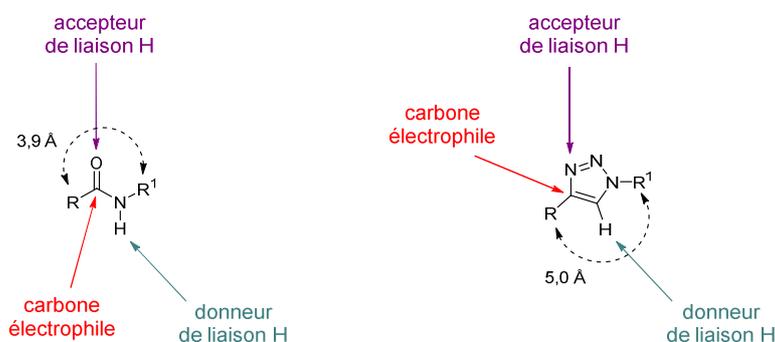


Figure 40. Similarités structurales et électroniques entre le 1,2,3-triazole substitué en 1,4 et la liaison amide *Z*.

Durant cette dernière décennie, les chimistes ont donc su tirer profit de ce puissant outil qu'est la CuAAC et l'appliquer dans de nombreux domaines. Une telle efficacité à relier deux entités entre

elles a été exploitée en glycochimie (synthèse de glycoclusters et clusters d'iminosucres), en chimie médicinale (étude de relation structure-activité, criblage *in situ*), en chimie bioorganique (synthèse de biosenseurs et bioconjugués, marquage *in vivo*) et en science des matériaux (fonctionnalisation de surface, synthèse de polymères).^{154,164}

2.5.2. Choix de la plateforme, de la valence et du ligand

Une fois que nous avons déterminé comment lier le ligand à la plateforme, il était nécessaire de déterminer les paramètres intrinsèques des systèmes multivalents, à savoir la nature de la **plateforme**, la **valence** du système et la nature du **ligand** (comprenant l'iminosucre et le bras espaceur). Les résultats préliminaires de l'équipe du Pr Beck nous ont naturellement poussés à choisir comme ligand un dérivé *N*-alkylé de la DMJ, qui est un inhibiteur de REManI et un correcteur de la protéine delF508-CFTR.

Une chaîne *N*-alkyle en C₆ et C₉ a été choisie comme bras espaceur afin de mimer la structure de l'inhibiteur initialement identifié, la *N*-butyl-DMJ, et donc ne pas perdre l'activité inhibitrice. En effet, il est possible qu'une partie du bras espaceur soit « reconnue » dans le site actif des mannosidases par une poche hydrophobe par exemple. Le nombre de carbones de la chaîne a été augmenté (C₆ ou C₉ contre C₄ pour la *N*-butyl-DMJ) pour que le triazole en bout de chaîne n'interagisse pas avec la cible biologique.

Étant donné qu'en série DNJ le meilleur correcteur était basé sur une plateforme dérivée du pentaérythritol (voir 2.3), nous avons choisi de garder cette plateforme qui permettait d'accéder à des clusters de petite valence (di- à tétravalents); ce paramètre semble en effet être déterminant pour obtenir un effet correcteur fort sur la protéine delF508-CFTR. Outre la rapidité et la simplicité d'accès aux plateformes di- à tétraacétyléniques à partir du pentaérythritol, l'avantage de cette plateforme réside aussi dans la possibilité de fonctionnaliser les fonctions hydroxyles libres restant sur la plateforme afin d'optimiser les propriétés pharmacocinétiques d'un composé ou d'obtenir un composé fluorescent par exemple.

Au final, le choix de ces paramètres nous a permis de sélectionner un panel de six iminosucres di- à tétravalents (47, 48, 49) plus leurs analogues monovalents 50 (Figure 41). Ce panel peut sembler petit en comparaison avec certaines études évaluant plus d'une dizaine de clusters d'iminosucres, cependant dans notre cas nous avons bénéficié des résultats d'une étude réalisée par notre groupe⁹⁵ qui avait déjà permis de réduire le nombre de paramètres à étudier. Cette librairie de systèmes déjà optimisés clusters permettra donc de réaliser une étude fine de type relation structure-activité et d'évaluer l'influence de paramètres clés comme la valence et la longueur du bras espaceur sur la correction de la protéine delF508-CFTR.

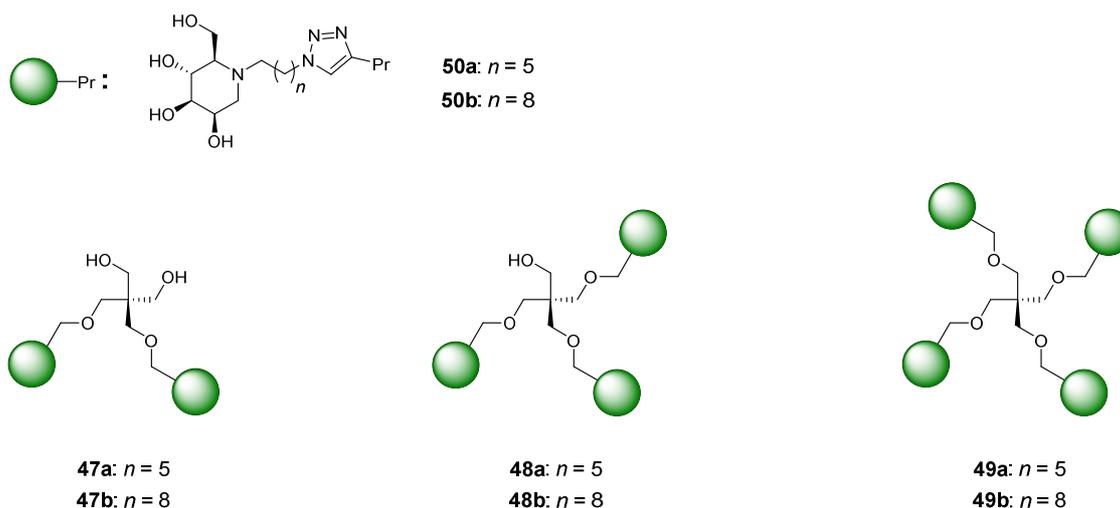


Figure 41. Librairie de clusters di- à tétravalents en série DMJ (**47**, **48**, **49**) conçus comme correcteurs de la protéine delF508-CFTR et leurs analogues monovalents (**50**).

3. SYNTHÈSE DE CLUSTERS DI- À TÉTRAVALENTS EN SÉRIE DMJ

3.1. Synthèse des ligands *N*-(azidoalkyl)-DMJ

Le ligand *N*-(azidoalkyl)-DMJ acétylé (**51**) qui sera couplé à la plateforme polyacétylénique peut être simplement obtenu après couplage de la DMJ entièrement déprotégée (**3**) avec un azido-bromoalcane (**52**), suivi de la protection des fonctions hydroxyles (**Schéma 6**). La préparation du ligand sous une forme protégée permet alors de diminuer grandement la polarité du système multivalent et facilite par conséquent la purification de ce dernier après l'étape de CuAAC. Les groupements acétates ont été choisis comme groupements protecteurs car ceux-ci peuvent être déprotégés par des méthodes simples et efficaces et ne nécessitant pas de purification ultérieure.⁹⁵

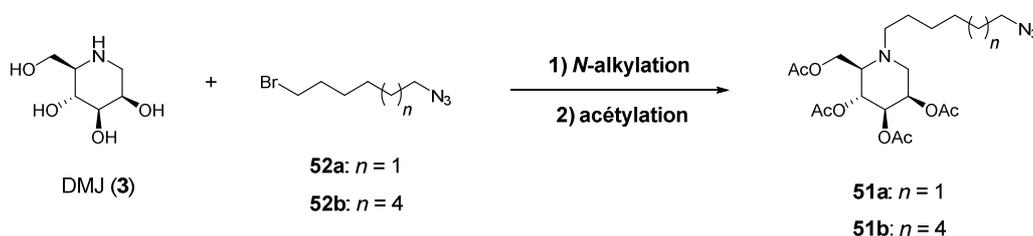


Schéma 6. Approche synthétique pour obtenir les ligands *N*-(azidoalkyl)-DMJ acétylés (**51**).

3.1.1. Obtention de la 1-désoxymannojirimycine (DMJ)

La synthèse du ligand **51** reposant sur un couplage avec la 1-désoxymannojirimycine, notre premier objectif était d'obtenir cet iminosucre en quantité appréciable. Dans un premier temps, nous

avons envisagé d'acheter la DMJ auprès d'un fournisseur de produits chimiques : la meilleure offre trouvée proposait alors 100 mg de chlorhydrate de DMJ à plus de 400\$ (Carbosynth Limited). Au vu de ce coût relativement élevé, nous avons plutôt fait le choix de développer au laboratoire une nouvelle synthèse de la DMJ dont le produit de départ serait un sucre simple.

a) Exemples de synthèse de la DMJ

Les nombreuses voies de synthèse de la DMJ existantes peuvent être divisées en deux catégories selon la nature du produit de départ. Dans ce paragraphe, nous ne donnerons que des exemples de voies de synthèse utilisant un sucre comme produit de départ. Ces exemples ont été choisis pour illustrer les différents précurseurs glycosidiques qui ont déjà pu être utilisés comme produit de départ.

Synthèse à partir de la D-glucono- δ -lactone

L'un des substrats de départ possible pour synthétiser la DMJ est la D-glucono- δ -lactone, comme l'a rapporté le groupe de Lee (**Schéma 7**).¹⁶⁵ Lors de cette synthèse, l'intermédiaire **53** a été obtenu par une suite de réactions visant à introduire un groupement azoture en C-2 avec inversion de configuration.^{166,167} Cet azoture a ensuite été réduit en amine puis cette dernière a été protégée par un groupement Boc pour donner **54**. Après réduction de l'ester et acétylation de l'alcool formé, la déprotection régiosélective de l'acétal terminal a permis d'obtenir le diol **55**. L'étape clé de cette synthèse a été la substitution nucléophile intramoléculaire de l'alcool primaire en C-6, préalablement activé en groupement partant, par l'amine pour former la DMJ protégée **56**. Bien que relativement longue (11 étapes), cette voie de synthèse permet d'obtenir la DMJ avec un bon rendement global de 22%.

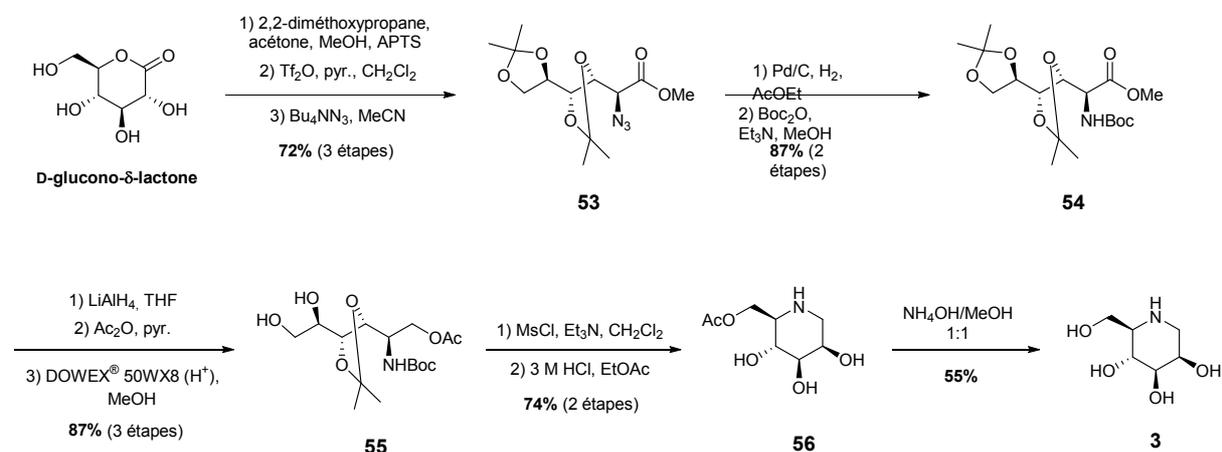


Schéma 7. Synthèse de la DMJ à partir de la D-glucono- δ -lactone selon Lee *et al.*¹⁶⁵

Synthèse à partir de la L-gulono- γ -lactone

D'autres groupes se sont intéressés, pour leur part, à la L-gulono- γ -lactone comme point de départ pour préparer la DMJ. Parmi eux, Fleet *et al.* ont rapporté une synthèse relativement courte en 8 étapes (**Schéma 8**).¹⁶⁸ Les premières étapes ont servi à protéger sélectivement le diol *cis* de la L-gulono- γ -lactone et l'alcool primaire en C-6 pour donner l'intermédiaire **57**. Un groupement azoture a

Synthèse à partir du sucrose

L'une des synthèses de la DMJ les plus courtes a été décrite par Stütz *et al.* à partir du sucrose et *via* une approche chimio-enzymatique (**Schéma 10**).¹⁷¹ Après l'introduction sélective de fonctions azotures en positions C-6 et C-6' du sucrose, l'hydrolyse acide de l'intermédiaire formé (**64**) a permis d'obtenir un mélange de deux produits : un dérivé du glucose (**65**) et un dérivé du fructose (**66**). La glucose isomérase a ensuite été utilisée pour isomériser **65** en **66**. La cyclisation réductive de ce dernier par hydrogénation a alors conduit à la DMJ avec un rendement global de 35% (5 étapes).

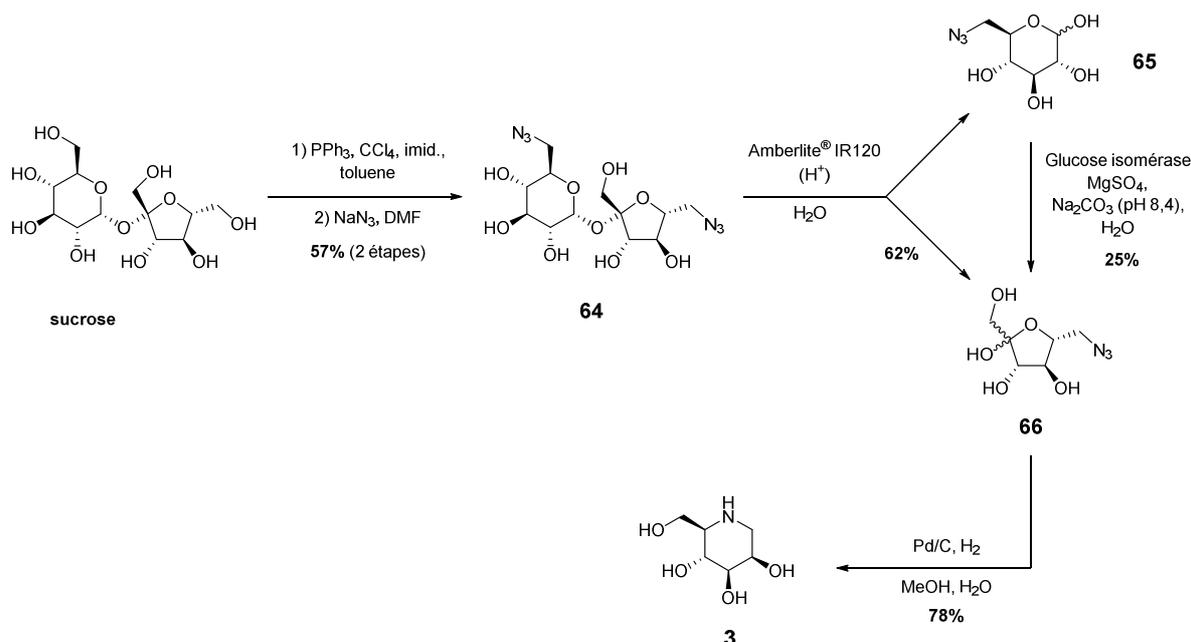


Schéma 10. Synthèse de la DMJ à partir du sucrose selon Stütz *et al.*¹⁷¹

Synthèse à partir du D-glucose

Pour synthétiser la DMJ, le D-glucose a été très fréquemment utilisé. En partant d'un dérivé commercial du D-glucose, Fleet *et al.* ont d'ailleurs développé une des synthèses les plus efficaces de la DMJ (**Schéma 11**).¹⁷² Pour cela, l'intermédiaire **67** a été obtenu en introduisant sélectivement un groupement azoture au niveau de l'alcool primaire (après déprotection sélective de l'acétal terminal) et en benzylant les alcools restants. Après formation du méthyl-furanoside avec du HCl méthanolique, l'alcool en C-2 a été activé avec un triflate pour conduire au dérivé **68**. Ce triflate a alors été déplacé intramoléculairement par l'amine, formée par réaction de Staudinger de l'azoture correspondant, pour donner une amine bicyclique qui a ensuite été protégée sous forme de carbamate (**69**). Après hydrolyse de l'hémiacétal et réduction du lactol **70**, l'hydrogénolyse du diol formé a conduit à la formation de la DMJ avec un rendement de 37% sur 11 étapes.

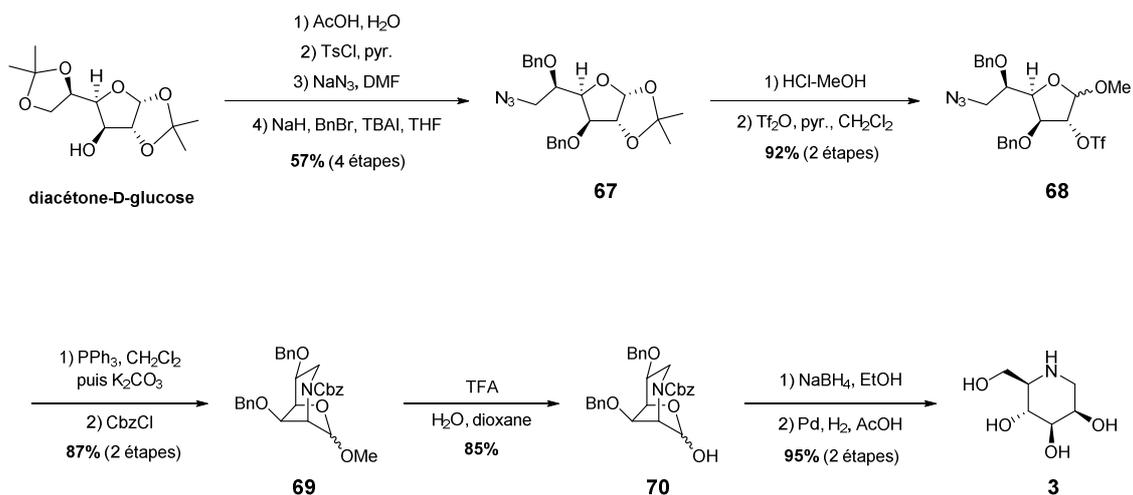


Schéma 11. Synthèse de la DMJ à partir d'un dérivé du D-glucose selon Fleet *et al.*¹⁷²

Synthèse à partir du D-fructose

Récemment, Py *et al.* ont développé une synthèse innovante et stéréosélective de la DMJ *via* une nitrone préparée à partir du D-fructose (**Schéma 12**).¹⁷³ Dans un premier temps, le dérivé tétra-*O*-benzylé **71** a été préparé à partir du D-fructose en trois étapes. Une fonction oxime protégée a ensuite été introduite au niveau du carbone anomérique et après méthylation de l'alcool primaire, un mélange de diastéréoisomères **72a** et **72b** (*E* et *Z*) a été obtenu. La cyclisation de la nitrone a ensuite été induite par la déprotection du groupement TBDPS. Dans ce cas là, seul l'isomère *E* permet d'obtenir la nitrone cyclique **73**, l'autre isomère formant l'oxime déprotégée correspondante. Enfin, la réduction diastéréosélective de la nitrone et la déprotection des alcools benzylés ont été réalisées dans le même pot par hydrogénation catalytique pour finalement obtenir le produit **3** souhaité avec un rendement global de 8% (7 étapes au total).

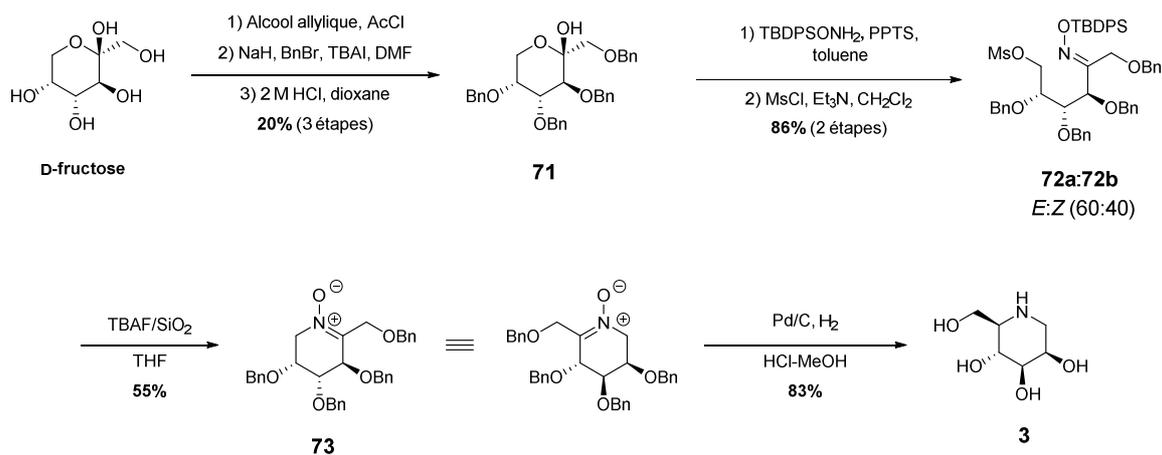


Schéma 12. Synthèse de la DMJ à partir du D-fructose selon Py *et al.*¹⁷³

b) Une nouvelle synthèse de la DMJ

Pour obtenir la DMJ, nous aurions pu utiliser l'une des synthèses déjà existantes comme celles présentées ci-dessus, cependant nous avons décidé de développer une stratégie synthétique basée sur un intermédiaire clé dont la synthèse était déjà maîtrisée à grande échelle au laboratoire. Cet intermédiaire clé **74a** peut en effet être obtenu en trois étapes à partir du 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose, un dérivé du D-glucose disponible commercialement et peu coûteux (20 g pour 30\$) (**Schéma 13**).⁷⁴ Une fois ce gluconolactame benzylé en main, il nous restait deux étapes clés à effectuer, la première consistait à déprotéger sélectivement l'alcool benzylé en position C-2 d'après les conditions développées par Vasella *et al.*¹⁷⁴ (**75**) puis lui faire subir une inversion de configuration pour former l'iminosucre **76** en série *D-manno*. Enfin, une étape finale de déprotection nous conduirait alors à la DMJ souhaitée.

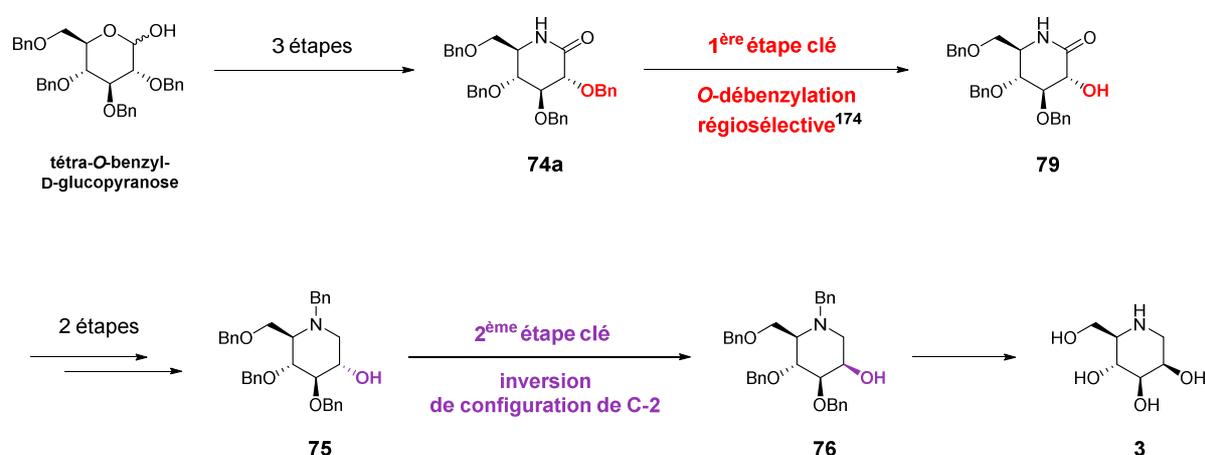


Schéma 13. Stratégie de synthèse envisagée pour obtenir la DMJ.

La synthèse du gluconolactame **74a** qui a été développée au laboratoire⁷⁴ s'inspire des travaux d'Overkleeft *et al.*¹⁷⁵ et des travaux de Vasella *et al.*¹⁷⁶ Pour commencer, le tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose a été engagé dans une réaction d'amidation oxydante^{177,178} en présence de diiode et d'ammoniaque pour donner le 5-hydroxyamide **77** avec un rendement de 80% (**Schéma 14**). Ce dernier a ensuite été oxydé *via* une oxydation d'Albright-Goldman¹⁷⁹ pour former la cétone **78**. Lors de cette étape, le brut réactionnel n'a pas été purifié et a directement été engagé dans une réaction d'amidation réductrice. Le lactame **74a** est alors le diastéréoisomère majoritairement formé et a été isolé avec un rendement de 60% sur deux étapes.

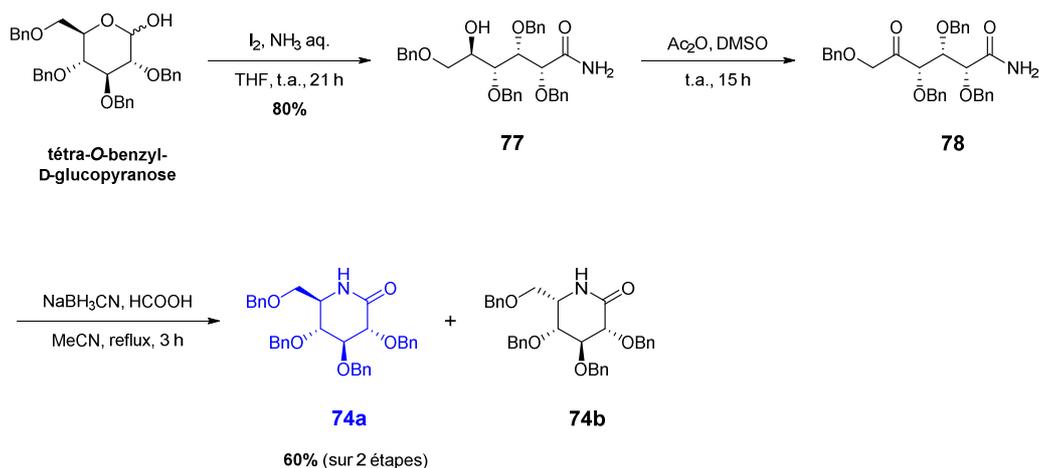


Schéma 14. Synthèse du gluconolactame **74a** à partir du 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose.

Lors de l'étape d'amidation réductrice, l'acide formique favorise l'addition de l'amide sur la cétone en activant cette dernière. La déshydratation du produit d'addition, également catalysée par HCOOH, permet de former majoritairement l'intermédiaire acyliminium le plus stable qui est le conformère en demi-chaise 2C_3 avec tous les substituants en position pseudo-équatoriale (**Schéma 15**). Lors de l'attaque de l'hydrure sur cet intermédiaire, l'attaque axiale est favorisée puisqu'elle conduit à un état de transition de type chaise de plus basse énergie que l'état de transition de type bateau croisé qui serait formé à l'issue de l'attaque équatoriale. Cet état de transition de type chaise conduit finalement au diastéréoisomère **74a** qui est donc majoritairement formé. Le diastéréoisomère minoritaire **74b** est quant à lui issu de l'attaque axiale de l'hydrure sur l'intermédiaire acyliminium le moins stable (conformère en demi-chaise 3C_2).

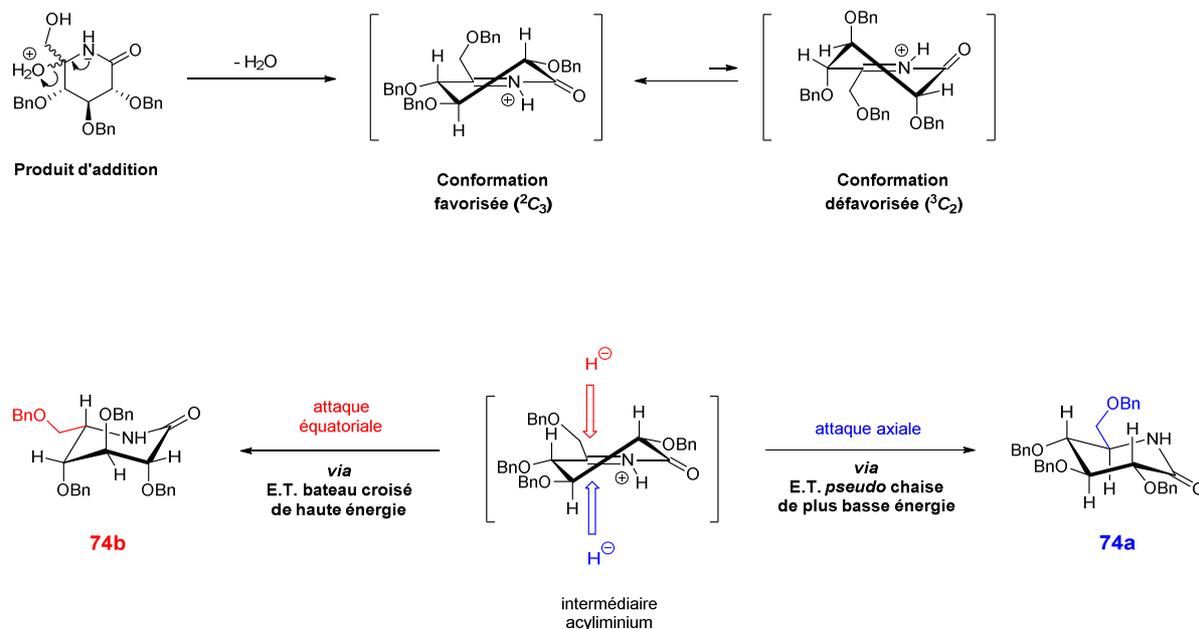


Schéma 15. Explication de la diastéréosélectivité de la réaction d'amidation réductrice. (E.T.) : état de transition.

Une fois le lactame **74a** en main, nous avons pu passer à l'étape de débenzylation régiosélective. Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Vasella *et al.* qui rapportaient la déprotection régiosélective d'une fonction *O*-benzyle en position α d'un carbonyle à l'aide de BCl_3 et du bromure de tétrabutylammonium.¹⁷⁴ Afin de simplifier les conditions décrites par l'auteur, nous avons optimisé quelques paramètres comme le gradient de température et l'addition de BCl_3 et de Bu_4NBr en une fois. Finalement, nous avons obtenu le 2-hydroxylactame **79** avec un très bon rendement de 92% (**Schéma 16**).

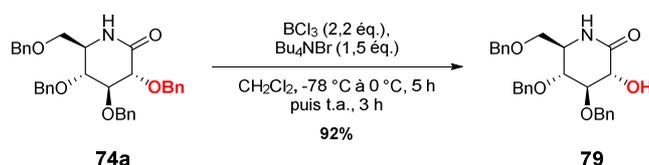


Schéma 16. Synthèse du 2-hydroxylactame **79** via débenzylation régiosélective.

Le mécanisme proposé par Vasella¹⁷⁴ pour cette réaction suggère le passage par un intermédiaire iminium **D** formé après coordination de BCl_3 avec l'oxygène du carbonyle $\text{C}=\text{O}$ et l'oxygène du groupement OBn en position C-2 (**Schéma 17**). Un ion halogénure (probablement un bromure) vient ensuite réaliser la coupure de l'éther benzylique pour former le 2-hydroxylactame complexé et l'halogénure de benzyle. L'hydrolyse finale permet enfin de libérer le produit déprotégé sélectivement **79**.

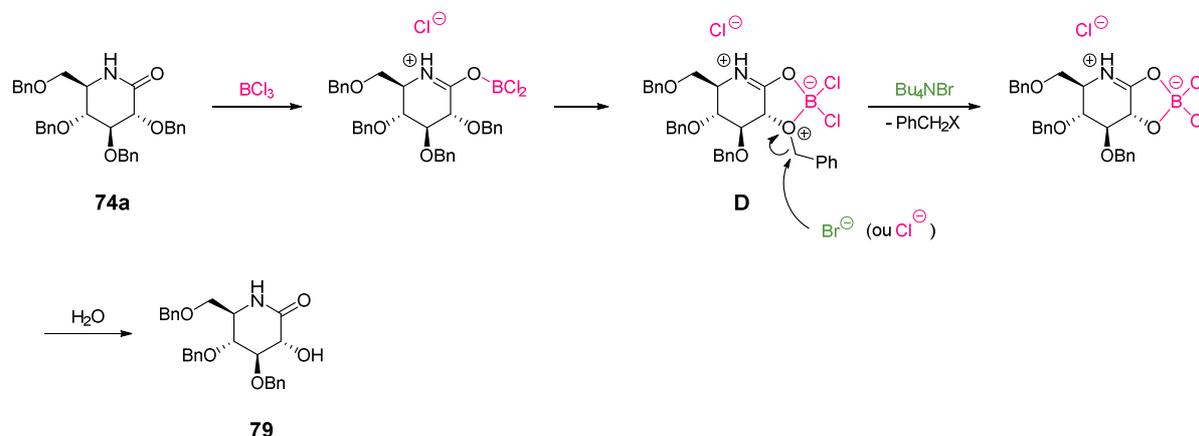
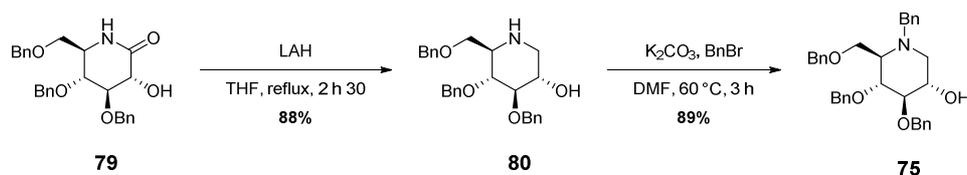
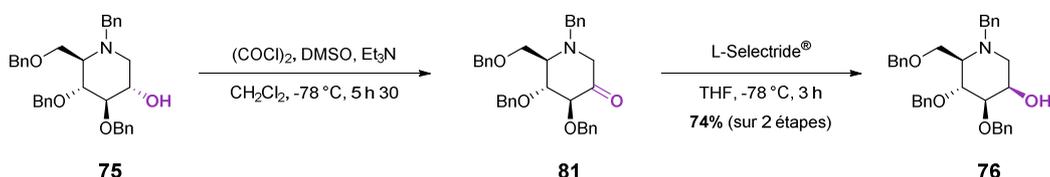


Schéma 17. Mécanisme proposé pour la réaction de débenzylation régiosélective.¹⁷⁴

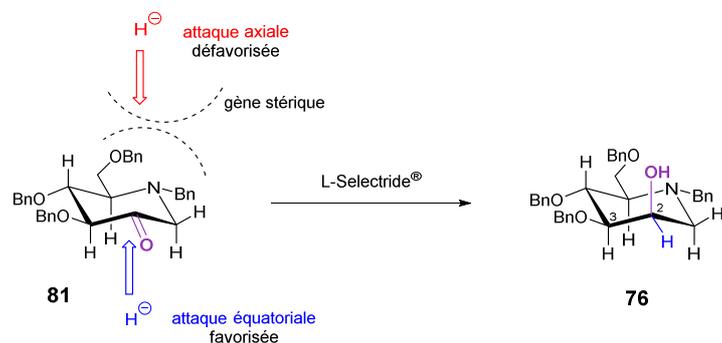
Le lactame **79** est ensuite réduit en pipéridine à l'aide du réducteur LiAlH_4 pour former l'iminosucre correspondant **80** avec un très bon rendement de 88% (**Schéma 18**). En vue d'une future oxydation de l'alcool en C-2, nous avons choisi de protéger l'amine avec un groupement benzyle tout en sachant que cette amine serait libérée en même temps que les alcools lors de la déprotection finale. L'amine **80** a alors été protégée sélectivement par rapport à l'alcool en présence de BnBr et d'une base inorganique faible K_2CO_3 pour donner l'iminosucre en série *D-gluco* **75**.

Schéma 18. Synthèse de l'iminosucre **75** en série *D-gluco*.

L'étape clé suivante consistait à inverser la configuration du carbone en position 2 afin d'obtenir un iminosucre en série *D-manno*. Pour cela, nous avons appliqué une méthode efficace d'oxydation-réduction décrite pour inverser la configuration de carbone sur des iminosucre en série *D-gluco*.¹⁸⁰ Le composé **75** a alors été oxydé *via* une oxydation de Swern puis, après un rapide traitement du brut réactionnel et sans purification préalable, la cétone intermédiairement formée (**81**) a été réduite par le L-Selectride® pour obtenir l'épimère en C-2 (**76**) avec un rendement de 74% sur deux étapes (Schéma 19).

Schéma 19. Synthèse de l'iminosucre en série *D-manno* **76** par une stratégie d'oxydation-réduction.

Cette réaction de réduction a été hautement diastéréosélective car nous n'avons observé la formation que d'un seul produit de configuration *D-manno*. Cette stéréosélectivité est induite par l'encombrement stérique du L-Selectride® (tri-*sec*-butyl-borohydrure de lithium) qui permet de favoriser l'attaque équatoriale du carbone de la liaison C=O (Schéma 20). De façon générale, sur les dérivés de la cyclohexanone, l'attaque favorisée par les hydrures encombrés est une attaque équatoriale car les effets stériques sont alors plus forts que les effets de torsion et les effets stéréoelectroniques favorisant l'attaque opposée.¹⁸¹

Schéma 20. Diastéréosélectivité de la réduction de la cétone **81** par le L-Selectride®.

La configuration *D-manno* de l'épimère **76** a été confirmée sans ambiguïté par analyse RMN ¹H grâce à la constante de couplage entre les protons H-2 et H-3. En effet, la constante qui a été

déterminée ($J_{2,3} = 3,1$ Hz) confirme qu'il s'agit d'un couplage de type axial-équatorial. Nous avons également comparé cette valeur à celle trouvée pour l'iminosucre de configuration *D-gluco* **75**, qui était quant à elle spécifique d'un couplage transdiaxial ($J_{2,3} = 7,4$ Hz).

Pour la dernière étape de cette synthèse, il restait à déprotéger les fonctions hydroxyles et la fonction amine. Une réaction d'hydrogénolyse en présence du catalyseur de Pearlman (hydroxyde de palladium sur charbon) et d'acide chlorhydrique a alors permis de former *quasi* quantitativement le chlorhydrate de DMJ (**Schéma 21**). Cette étape de *N*- et *O*-débenzylation par hydrogénolyse est une étape qui avait déjà été optimisée lors du projet consacré à la synthèse d'iminosucres hétérodivalents comme chaperons pharmacologiques (voir **CHAPITRE 2**). La DMJ formée après hydrogénolyse a été isolée sous forme de sel de chlorhydrate à cause de la présence d'HCl dans le milieu réactionnel; cet acide permet en effet d'accélérer la réaction en prévenant l'empoisonnement du catalyseur par l'amine, qui se trouve alors sous forme d'un ammonium. La DMJ sous forme neutre peut néanmoins être obtenue très simplement après traitement avec une résine basique échangeuse d'ions (Amberlite® IRA400). Dans notre cas, nous avons préféré conserver la DMJ sous forme de sel par souci de stabilité.

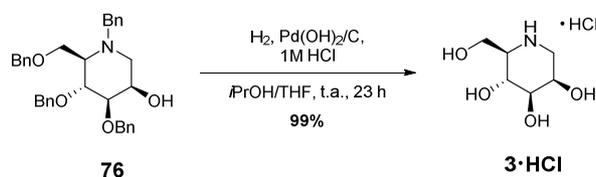
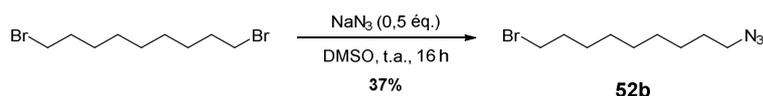


Schéma 21. Débenzylation finale des alcools et de l'amine pour donner la DMJ.

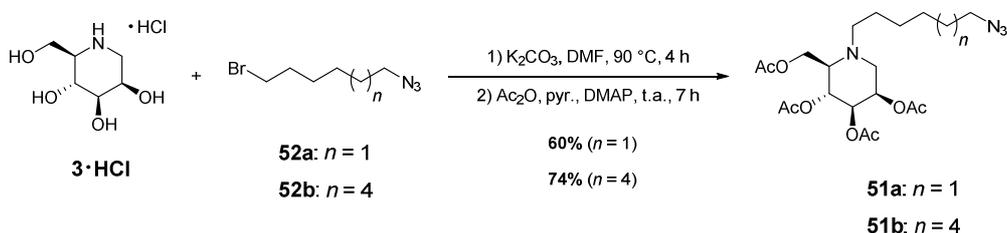
Finalement, cette synthèse robuste nous a permis d'obtenir le chlorhydrate de DMJ en 9 étapes (dont deux sans purification) avec un rendement global de 23% et a également pu être appliquée jusqu'à l'échelle du gramme. Bien que l'objectif n'était pas de développer une synthèse de la DMJ plus efficace que celles déjà rapportées (voir **3.1.1.a**), notre synthèse représente néanmoins un bon compromis entre le nombre d'étapes, le rendement global et la facilité de mise en œuvre, tous les intermédiaires étant sous forme protégée. De façon intéressante, cette approche permet également de diverger à partir du lactame intermédiaire **74a** vers la DNJ et ses dérivés *N*-alkylés,⁷⁴ qui sont une autre classe importante d'iminosucres.

3.1.2. *N*-alkylation de la DMJ

Avant d'effectuer le couplage avec la DMJ, nous avons réalisé la synthèse des bras espaceurs fonctionnalisés avec un groupement azoture. En suivant les conditions décrites dans la littérature,¹⁸² la réaction du 1,9-dibromononane avec NaN₃ nous a donc permis d'obtenir 1-azido-9-bromononane **52b** avec un rendement de 37% (**Schéma 22**). En ce qui concerne le 1-azido-6-bromohexane **52a**, celui-ci avait déjà été synthétisé au laboratoire et était disponible en quantité suffisante.

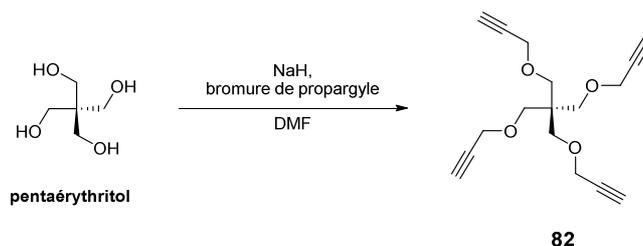
Schéma 22. Synthèse de l'azoture **52b**.

Une réaction de *N*-alkylation a ensuite permis de relier l'azido-bromoalcanes à la DMJ (Schéma 23). Cette substitution nucléophile du brome par l'azote a été réalisée en présence de K_2CO_3 , une base faible inorganique. Le fait d'utiliser la DMJ sous forme de chlorhydrate n'a pas été contraignant puisque l'excès de base utilisé (4 éq.) permet de neutraliser le sel. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le produit *N*-alkylé a été directement acétylé dans des conditions classiques pour former les ligands **51a** et **51b** prêts à être cliqués, avec un rendement de 60% et 74% respectivement sur deux étapes.

Schéma 23. Synthèse des ligands **51** par *N*-alkylation et acétylation.

3.2. Synthèse des plateformes dérivées du pentaérythritol

La plateforme tétraacétylénique peut être obtenue en une étape à partir du pentaérythritol d'après les conditions de propargylation décrites dans la littérature (Schéma 24).¹⁸³ Dans notre cas, cet éther tétrapropargylé **82** avait déjà été synthétisé au laboratoire et était disponible en quantité suffisante.

Schéma 24. Synthèse de l'éther tétrapropargylé **82** décrite par Haag *et al.*

En ce qui concerne la plateforme triacétylénique, celle-ci pouvait être synthétisée en trois étapes à partir du pentaérythritol.¹⁸⁴ En suivant les conditions décrites dans la littérature, le tétrol a été monosilylé en contrôlant les quantités de TBDMSCl et d'imidazole pour former le triol **83** (Schéma 25). L'étape suivante avait alors pour but de propargyler les fonctions hydroxyles libres en présence de NaH et de bromure de propargyle. Après 16 heures de réaction et malgré une bonne conversion, nous avons cependant obtenu le produit tripropargylé **84** avec seulement 19% de rendement. L'autre produit majoritairement isolé s'est alors révélé être le produit dipropargylé **85**. Ce résultat plutôt surprenant

nous a donc poussés à réengager ce produit partiellement propargylé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le composé **83**. Cependant, après 21 heures de réaction, aucune conversion sur CCM n'a été observée malgré un fort excès de base et de bromure de propargyle. Après avoir examiné les facteurs pouvant influencer cette réaction, ce résultat restait difficile à expliquer. En réalité, un tel phénomène avait déjà été observé au sein du laboratoire lors de réactions de propargylation difficiles; dans ce cas, il avait été montré que l'ajout d'une quantité catalytique de méthanol dans le milieu réactionnel permettait d'obtenir une conversion totale de l'alcool.¹⁸⁵ Il avait alors été postulé que le méthanol pouvait promouvoir la réaction en activant le NaH et en améliorant sa solubilité ou encore *via* la formation d'un ion méthanolate plus réactif. En se basant sur ce constat, nous avons ajouté 0,1 équivalent de méthanol dans le milieu réactionnel et nous avons finalement pu isoler le produit tripropargylé **84** avec un rendement de 76%. Pour finir, la plateforme triacétylénique **86** a été obtenue en déprotégeant l'alcool silylé restant avec un rendement de 95%.

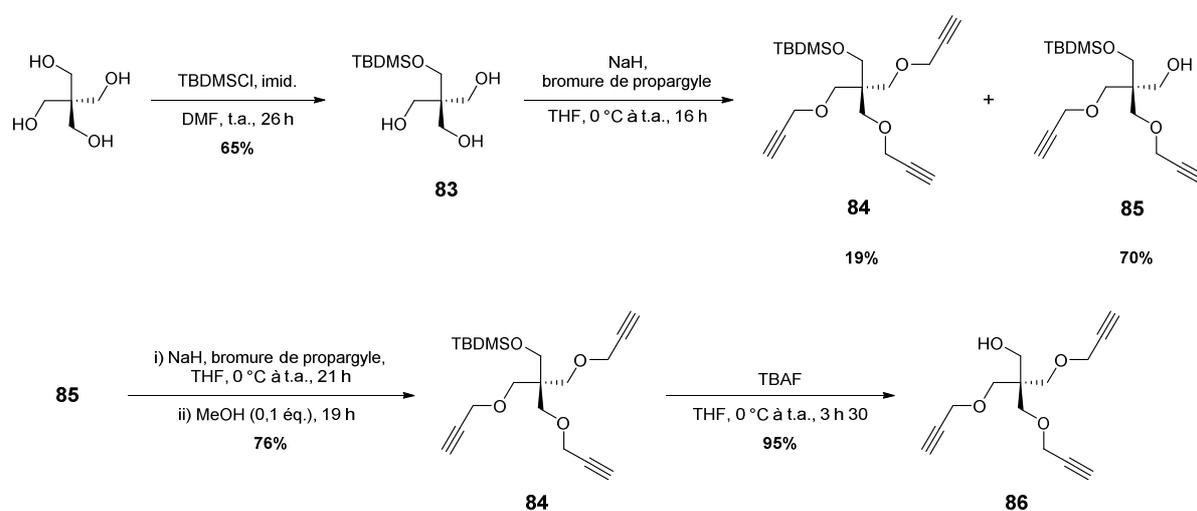


Schéma 25. Synthèse de l'éther tripropargylé **86**.

En tirant profit de la formation inattendue du précurseur dipropargylé **85**, nous avons pu synthétiser la plateforme diacétylénique en déprotégeant simplement l'alcool silylé à l'aide de TBAF (Schéma 26). L'éther dipropargylé du pentaérythritol a alors été obtenu avec un rendement de 71%.

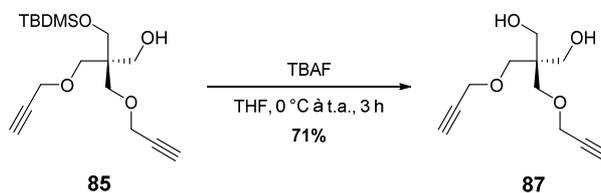


Schéma 26. Synthèse de l'éther dipropargylé **87**.

3.3. Synthèse des clusters di-, tri- et tétravalents par CuAAC et déprotection

Une fois que nous avons à notre disposition les deux composants de nos systèmes multivalents, les ligands **51a-b** et les plateformes **82, 86, 87**, il ne restait plus qu'à les relier entre eux par une réaction de CuAAC. La procédure qui a été utilisée est une procédure standard qui avait été développée par Sharpless et Folkin¹⁵¹ et qui a été adaptée au laboratoire.^{75,76,95} Dans le cas de la synthèse des clusters trivalents, le milieu réactionnel contenait :

- l'éther tripropargylé du pentaérythritol **86**
- le *N*-(azidoalkyl)-DMJ acétylé **51** (1,1 éq. par fonction alcyne)
- CuSO₄·5H₂O (0,1 éq. par fonction alcyne)
- l'ascorbate de sodium (0,2 éq. par fonction alcyne) qui réduit *in situ* CuSO₄·5H₂O pour générer les espèces actives de cuivre (I)
- un mélange de solvants DMF/H₂O qui permet de solubiliser tous les réactifs

Le milieu réactionnel a été chauffé sous irradiation micro-onde à 80 °C pendant 40 minutes pour conduire au produit de cycloaddition **88** (**Schéma 27**). Le chauffage sous irradiation micro-onde permet de réduire considérablement le temps de réaction. Pour éliminer les résidus de cuivre après réaction, une première purification du brut réactionnel a été réalisée sur gel de silice avec un éluant ternaire MeCN/H₂O/NH₄OH (10:1:1). En effet, lorsque le brut réactionnel est dilué avec l'éluant avant le dépôt sur colonne, il y a formation et précipitation de sels de cuivre et d'ammoniaque qui sont ensuite éliminés par filtration sur gel de silice. Le produit est quant à lui élué très rapidement grâce à l'éluant ternaire qui est fortement polaire. Une fois les résidus de cuivre éliminés, le brut réactionnel a été purifié classiquement et facilement sur colonne de gel de silice grâce à la présence des groupements protecteurs acétates.

Finalement, le produit acétylé **88** a été déprotégé à l'aide d'une résine basique échangeuse d'ions Amberlite® IRA400 (OH⁻) dans un mélange méthanol/eau pour donner les produits entièrement déprotégés **48** avec de très bons rendements (**Schéma 27**). Cette méthode de déprotection présente l'avantage de ne former aucun produit secondaire en solution et permet d'obtenir le produit déacétylé pur après une simple filtration de la résine et évaporation des solvants. La simplicité, l'efficacité et l'absence de purification relative à cette technique en font une méthode de choix pour déprotéger les clusters multivalents qui sont des produits très polaires et d'une grande valeur ajoutée.

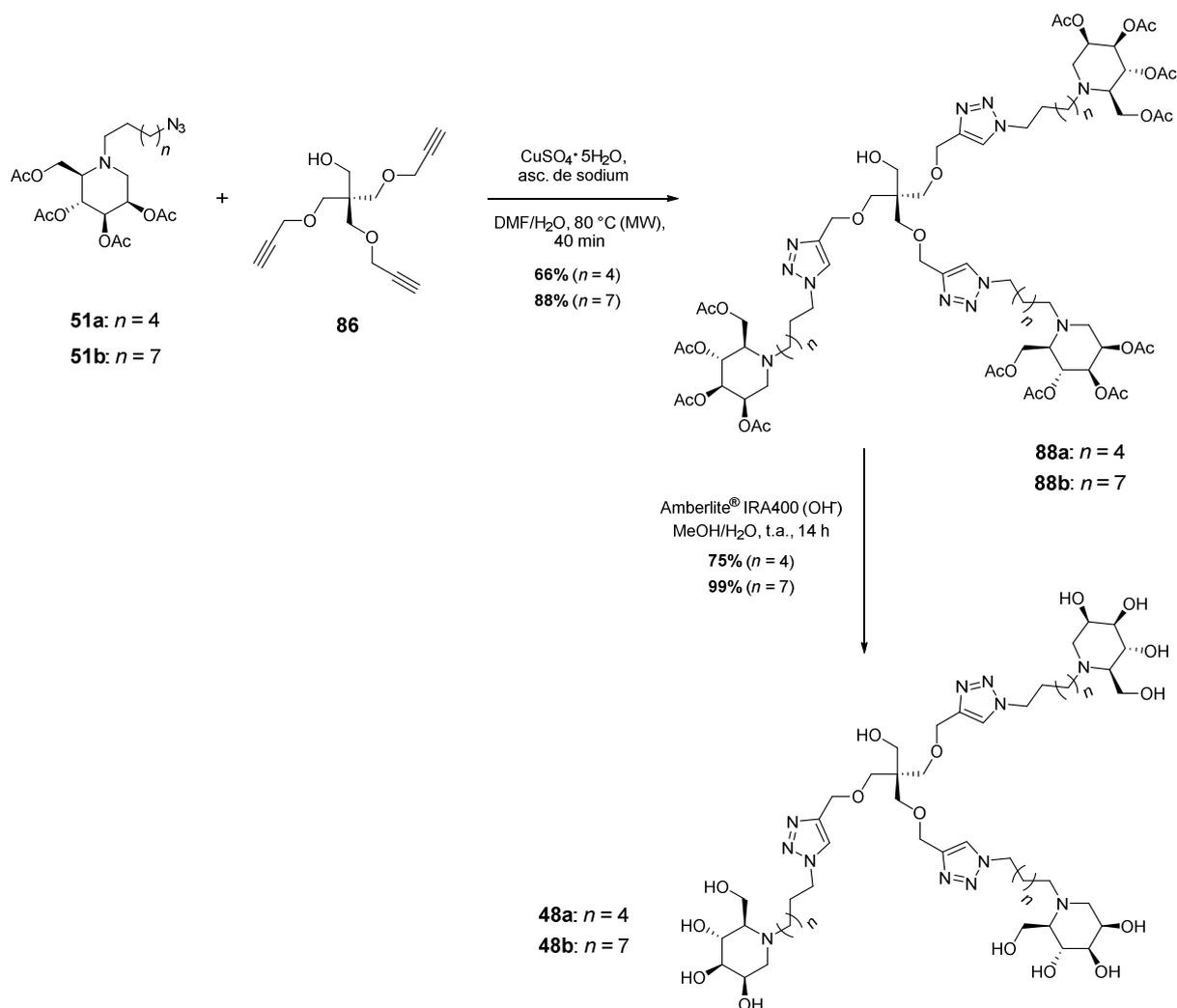


Schéma 27. Synthèse des clusters trivalents en série DMJ (48).

La synthèse des clusters di- et tétravalents a été réalisée de façon rigoureusement identique à partir des éthers di- et tétrapropargylés du pentaérythritol **82** et **87** (Schéma 28). Les rendements moyens observés pour la synthèse par CuAAC de **48a** et **49b** peuvent s'expliquer par le fait que les plateformes tri- et tétrapropargylés utilisées n'étaient pas totalement pures et contenaient des produits de dégradation. En effet, ces composés polypropargylés peuvent se dégrader au bout de quelques semaines, même en étant conservés à -20 °C sous atmosphère inerte.

La structure et la valence des systèmes multivalents (**47b**, **48a-b** et **49b**) a été confirmée par analyse HRMS et par analyse RMN ¹H, pour laquelle l'intégration du signal caractéristique du triazole ($7,90 \text{ ppm} \leq \delta \leq 7,95 \text{ ppm}$) a été déterminée par rapport à celle des signaux du pentaérythritol. La régiochimie 1,4 des triazoles a également été confirmée en RMN ¹³C puisque le déplacement chimique du carbone C-5 du triazole ($\delta = 124,8 \text{ ppm}$) était caractéristique d'un 1,2,3-triazole disubstitué en position 1 et 4.¹⁸⁶

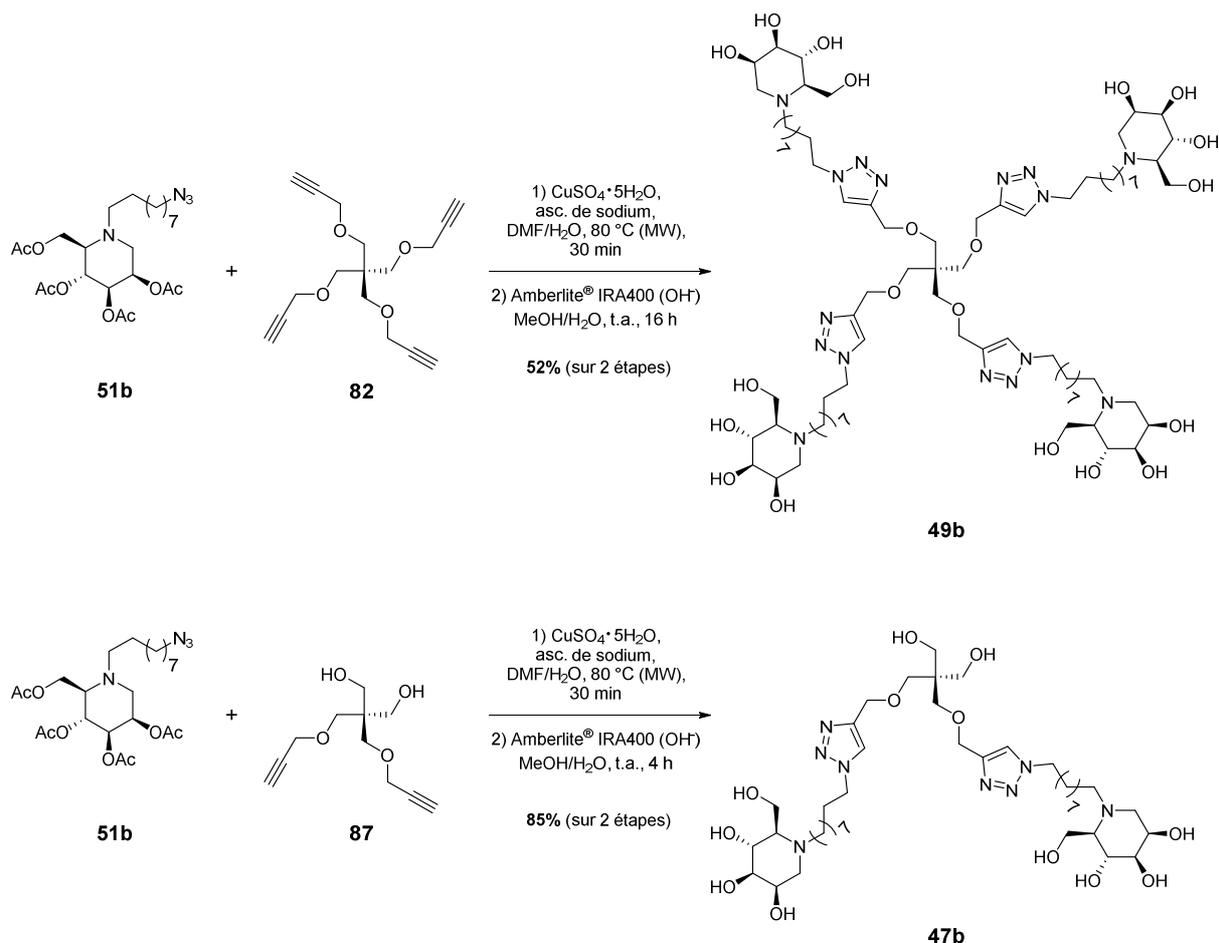


Schéma 28. Synthèse des clusters di- et tétravalents en série DMJ (**47b**, **49b**).

En ce qui concerne les clusters di- et tétravalents, nous avons fait le choix de ne pas synthétiser les dérivés possédant des ligands avec une longueur de chaîne en C_6 (**47a** et **49a**, **Figure 41**). Nous voulions en effet évaluer dans un premier temps l'influence de la longueur du bras espaceur sur la correction de la protéine CFTR avec le couple de clusters trivalents **48a** et **48b**.

3.4. Synthèse des analogues monovalents

Afin d'évaluer un potentiel effet multivalent sur la correction de la protéine CFTR, il était nécessaire de synthétiser des analogues monovalents de nos dérivés, ces derniers pouvaient alors être obtenus en cliquant simplement le 1-pentyne aux différents ligands. Pour cela, nous avons suivi les conditions réactionnelles qui avaient été décrites au laboratoire lors d'une précédente étude.⁷⁶ Le ligand **51b** a alors été mis à réagir dans les conditions classiques de CuAAC avec un fort excès de 1-pentyne (10,5 éq.) (**Schéma 29**). À la suite à cette réaction, nous avons cependant observé la formation d'un mélange de deux produits : le composé souhaité **89** et un produit secondaire possédant un motif α -céto-triazole (**90**).⁷⁶

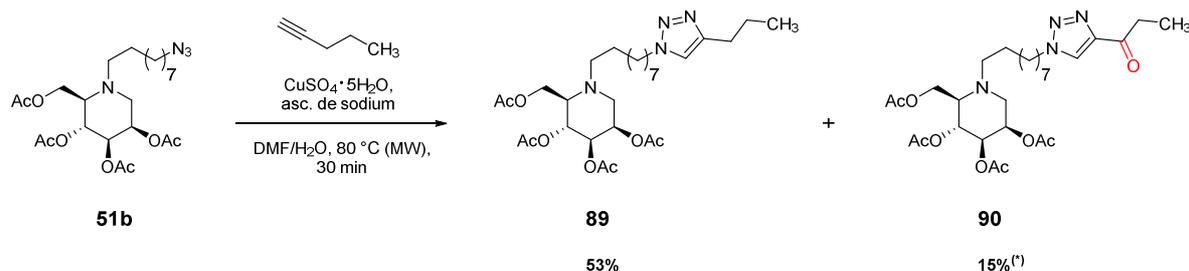


Schéma 29. Formation du composé monovalent acétylé **89** et d'un produit secondaire α -céto-triazole **90** par CuAAC. (*) : rendement déterminé à partir du spectre RMN ^1H du brut réactionnel.

Après avoir aussi observé cette réaction d'oxydation avec des dérivés semblables en série DNJ et en série C-glucoside (voir **CHAPITRE 3**), des expériences ont été menées au laboratoire afin de comprendre comment se formait ce produit d'oxydation. Les premiers résultats obtenus tendent à penser qu'une fraction du 1-pentyne en excès serait d'abord oxydée dans les conditions de CuAAC pour former la cétone α,β -acétylénique **91** et que cette dernière réagirait ensuite beaucoup plus rapidement avec le ligand **51b** que le 1-pentyne pour donner l' α -céto-triazole **90** (**Schéma 30**).

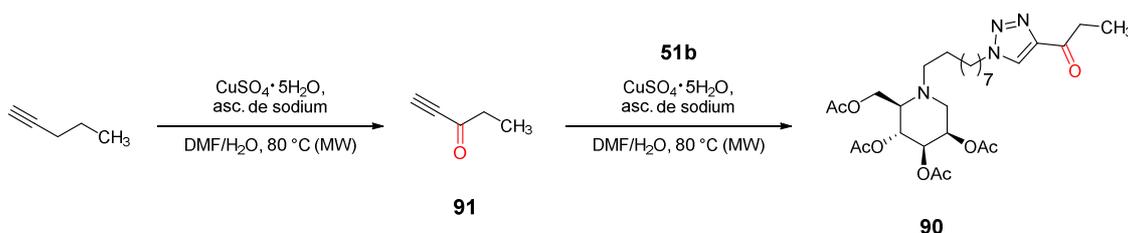


Schéma 30. Hypothèse de formation du produit α -céto-triazole **90** dans les conditions de CuAAC.

L'oxydation du 1-pentyne dans les conditions de CuAAC peut être appuyée par le fait qu'il existe dans la littérature des exemples d'oxydation aérobie d'alcynes terminaux aliphatiques en cétone α,β -acétylénique en présence d'hydroperoxyde et d'un catalyseur métallique comme CuCl_2 .^{187,188} En effet, la décomposition de l'hydroperoxyde catalysée par le cuivre (II) permet la formation de radicaux qui vont initier une réaction radicalaire entre l'alcyne et le dioxygène (catalysée également par le cuivre) et conduire à la formation de la cétone α,β -acétylénique.¹⁸⁸ Dans le cas de la réaction de CuAAC, des radicaux peuvent être présents dans le milieu réactionnel puisque ceux-ci sont impliqués dans la réduction du cuivre (II) par l'ascorbate (**Schéma 31**). Il est donc tout à fait possible que les espèces présentes dans le milieu réactionnel lors de la réaction de CuAAC (cuivre (I), cuivre (II) et radicaux) soient à l'origine de l'oxydation aérobie du 1-pentyne.

Cependant, lors de cette première étape d'oxydation, la quantité de cétone α,β -acétylénique formée est supposée faible par rapport à la quantité d'alcyne non oxydé. Statistiquement, la formation d' α -céto-triazole devrait donc être très faible. En réalité, les cétones α,β -acétyléniques sont beaucoup plus réactives que les alcynes non activés dans la réaction de CuAAC,¹⁸⁹ ce qui augmente donc la vitesse de formation de l' α -céto-triazole par rapport à celle du triazole classique. La quantité non négligeable de produit secondaire α -céto-triazole formée peut donc être expliquée par le fait que toute la quantité de cétone α,β -acétylénique formée est transformée en α -céto-triazole.

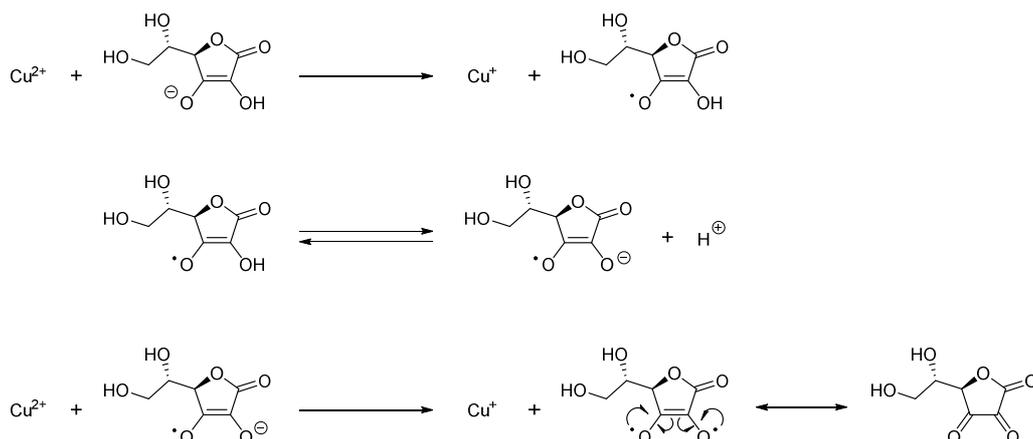


Schéma 31. Réduction du cuivre (II) en cuivre (I) par l'ascorbate de sodium.

Finalement, après purification et élimination du produit secondaire α -céto-triazole, le composé non oxydé **89** a pu être déprotégé dans les conditions précédemment décrites en présence de résine basique pour donner le composé monovalent en C₉ (**50b**) avec un rendement de 81% (**Schéma 32**).

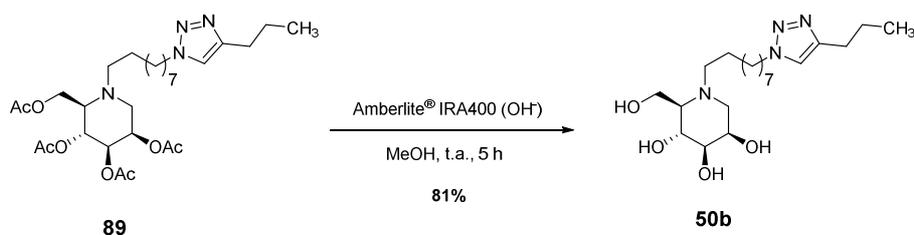


Schéma 32. Synthèse du composé **50b**, analogue monovalent en C₉.

Le composé monovalent en C₆ (**50a**) a été obtenu à partir du composé **51b** avec un rendement de 41% sur deux étapes en suivant également les conditions déjà décrites au laboratoire⁷⁶ (**Schéma 33**). Après réaction de CuAAC, seul le produit non oxydé **92** a été isolé; en effet, nous n'avons pas cherché à identifier ni à isoler le produit α -céto-triazole car ce sous produit n'avait pas été observé lors de la première synthèse de **50a** au laboratoire.⁷⁶ Tout bien considéré, la formation de ce produit secondaire oxydé pourrait néanmoins expliquer le faible rendement obtenu pour la formation de **92**.

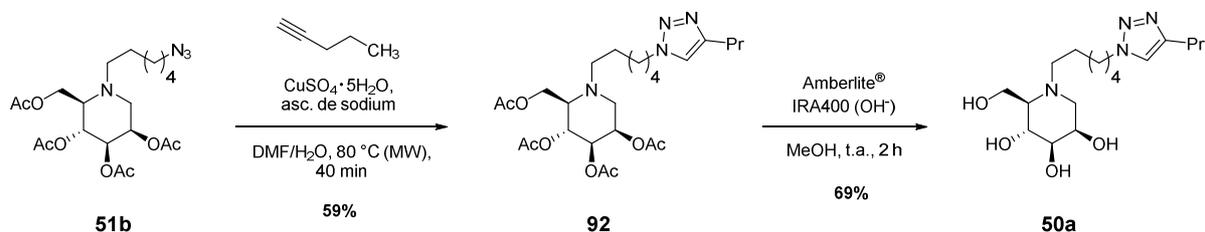


Schéma 33. Synthèse du composé **50a**, analogue monovalent en C₆.

Pour les futures synthèses de composés monovalents, la formation du produit secondaire α -céto-triazole pourrait être évitée en réalisant la réaction de CuAAC en milieu anaérobie ou en remplaçant le 1-pentyne par un alcyne inoxydable en position α , comme l'éthynylcyclopropane.

4. EFFET CORRECTEUR DES CLUSTERS SYNTHÉTISÉS

4.1. Concentration efficace médiane (EC_{50})

La concentration efficace médiane (EC_{50}) d'une molécule agoniste est définie comme étant la concentration qui induit 50% de l'effet maximal que peut produire cette molécule. Celle-ci est couramment utilisée pour mesurer l'efficacité d'un agent thérapeutique. L' EC_{50} des clusters en série DMJ a été déterminé par le groupe du Pr Beck et du Dr Norez à partir de courbes dose-réponse lesquelles sont obtenues en mesurant le pourcentage d'activation de la protéine CFTR pour différentes concentrations de correcteur (**Figure 42**).

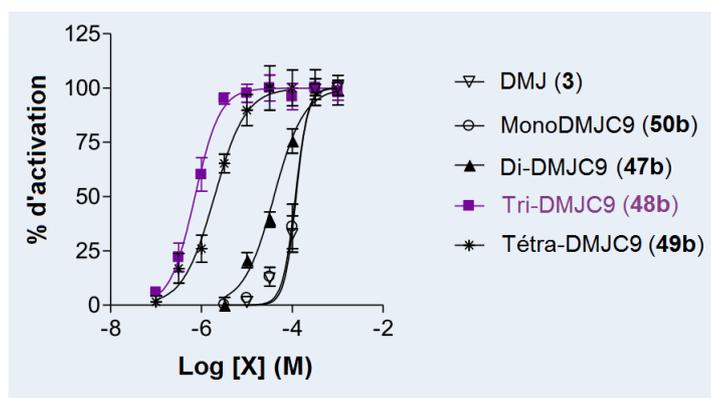


Figure 42. Courbes dose-réponse obtenues après traitement de cellules delF508-CFTR avec la DMJ (**3**), les clusters de DMJ en C_9 (**47b**, **48b**, **49b**) ou leur analogue monovalent **50b**. Le pourcentage d'activation a été mesuré par la technique d'efflux d'iodure [activité de la protéine CFTR stimulée avec un mélange de forskoline (10 μ M) et de genistein (30 μ M)].

Les valeurs d' EC_{50} obtenues pour les différents clusters et leurs analogues monovalents sont présentés en **Figure 43**. On remarque tout d'abord que le cluster trivalent **48b** et le cluster tétravalent **49b** possédant un ligand en C_9 sont les correcteurs les plus efficaces du panel. De plus, ces deux clusters sont à l'origine d'un effet multivalent fort sur la correction de la protéine CFTR, en effet le cluster trivalent **48b** ($EC_{50} = 0,8 \mu$ M) et le cluster tétravalent **49b** ($EC_{50} = 1,3 \mu$ M) se sont montrés respectivement 140 fois et 86 fois plus efficaces que leur analogue monovalent **50b** ($EC_{50} = 112 \mu$ M). Comparé au cluster trivalent en série DNJ **42** (920 fois plus efficace que son analogue monovalent, paragraphe 2.3), ces gains d'efficacité sont bien moins importants, néanmoins la valeur d' EC_{50} au submicromolaire obtenue pour **48b** est assurément comparable à celle obtenue pour le composé **42** ($EC_{50} = 0,5 \mu$ M).

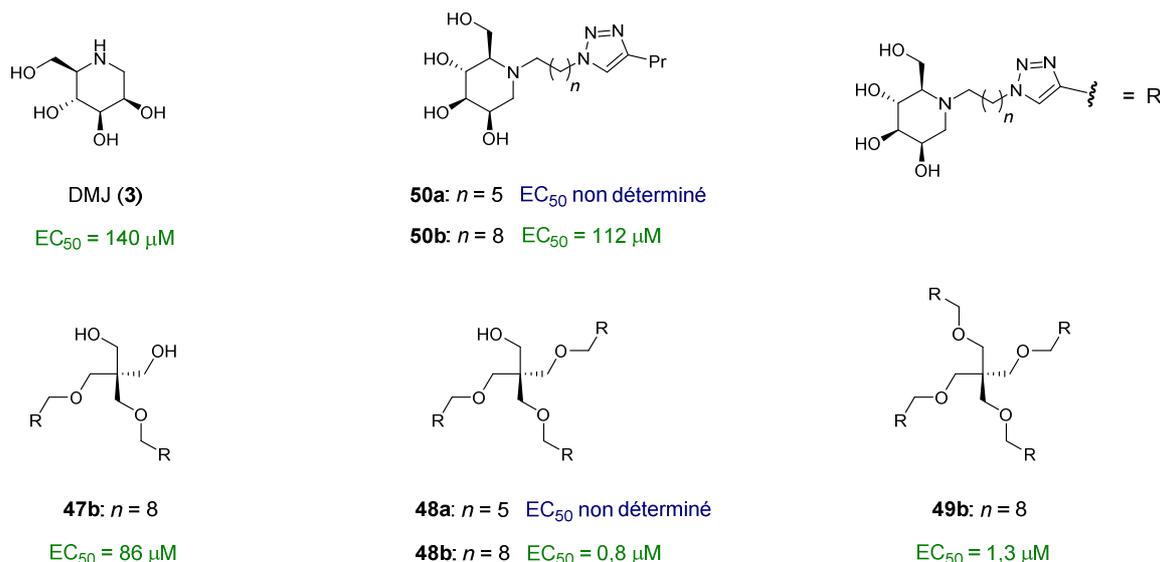


Figure 43. Concentration efficace médiane de la DMJ (**3**), des clusters DMJ di-, tri- et tétravalents (**47**, **48**, **49**) et de leurs analogues monovalents (**50**).

Ces résultats nous montrent également que la valence des clusters influence beaucoup leur efficacité sur la correction de la protéine CFTR. En effet, diminuer la valence de trois à deux conduit à une diminution de l'efficacité de deux ordres de grandeur; par contre, contrairement à ce qui a été observé en série DNJ (paragraphe 2.3), une augmentation de la valence de trois à quatre n'a pas d'impact significativement négatif sur l' EC_{50} . En ce qui concerne l'influence de la longueur du bras espaceur, nous ne pouvons conclure car le cluster trivalent possédant un ligand en C_6 (**48a**) est toujours en cours d'évaluation. Pour conclure, ces premiers résultats nous ont donc permis d'identifier de nouveaux correcteurs très efficaces et prouvent par conséquent la pertinence d'une stratégie de correction de la protéine delF508-CFTR basée sur des inhibiteurs multivalents de REManI.

4.2. Preuve de la restauration de l'adressage défectueux de la protéine delF508-CFTR

Au regard de ces résultats préliminaires encourageants, des études supplémentaires ont été réalisées par le groupe du Pr Beck et du Dr Norez[‡] afin de confirmer l'effet correcteur des inhibiteurs de REManI par des techniques biochimiques. Ces études se sont concentrées sur le correcteur en série DMJ qui présentait la meilleure efficacité : le cluster trivalent **48b**.

La restauration de l'adressage défectueux de la protéine delF508-CFTR par le cluster trivalent **48b** a dans un premier temps été vérifiée par des expériences d'immunomarquage. Ces expériences ont alors mis en évidence une localisation membranaire de la protéine delF508-CFTR dans les cellules traitées avec le composé **48b** (Figure 44), prouvant ainsi que ce correcteur permet effectivement la sortie de la protéine mutée hors du RE.

[‡] L'évaluation biologique des clusters de DMJ a été réalisée par Khadidja Sidelarbi, doctorante au Laboratoire de Signalisation et Transports Ioniques Membranaires à l'Université de Poitiers sous la direction du Pr Becq et du Dr Norez.

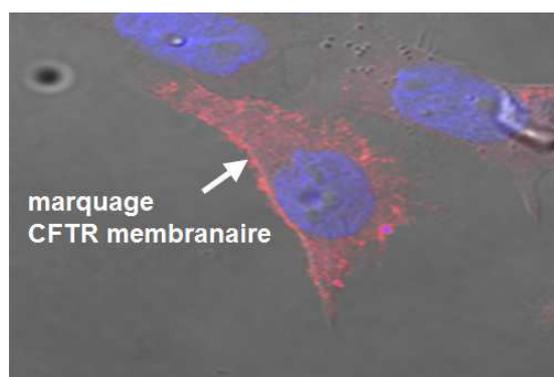


Figure 44. Image obtenue à la suite de l'immunomarquage de la protéine delF508-CFTR dans des cellules delF508-CFTR traitées avec le composé **48b**. La protéine CFTR est marquée en rouge et le noyau cellulaire en bleu.

Dans un second temps, des expériences de western blot ont été réalisées afin de déterminer l'effet du composé **48b** sur la maturation de la protéine delF508-CFTR. Cette étude a alors montré que la maturation de la protéine delF508-CFTR était incomplète suite au traitement avec le correcteur **48b** (**Figure 45**). Il est possible d'expliquer ce résultat par le fait que le cluster **48b** inhibe, en plus de la REManI, les α -mannosidases I de Golgi qui sont responsables de la maturation des protéines.

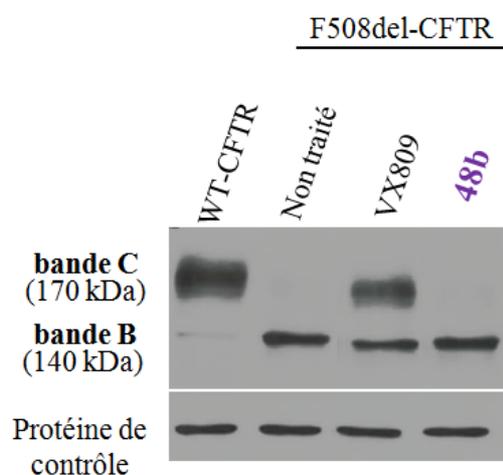


Figure 45. Détection d'une forme immature (bande B) et d'une forme mature (bande C) de la protéine CFTR par western blot dans des cellules sauvages (WT-CFTR) et des cellules delF508-CFTR traitées ou non par **48b** ou traitées par **VX809** (correcteur en phase clinique).

Pour conclure, ces différentes expériences montrent que le composé trivalent **48b** permet d'adresser à la membrane plasmique une protéine delF508-CFTR non mature mais fonctionnelle.

4.3. Mécanisme d'action du cluster de DMJ trivalent

Par la suite, de nouvelles expériences ont été réalisées par cette équipe de biologistes pour tenter d'élucider le mécanisme d'action du correcteur **48b** et comprendre comment ce dernier agit sur les principaux acteurs du système de contrôle-qualité du RE et du processus ERAD. Les résultats préliminaires obtenus par cette équipe ont alors montré que correcteur **48b** n'agissait pas uniquement en inhibant la REManI mais permettrait également de diminuer les interactions entre la protéine delF508-CFTR et les protéines EDEMs, qui sont également impliquées dans sa dégradation (**Figure 46**).

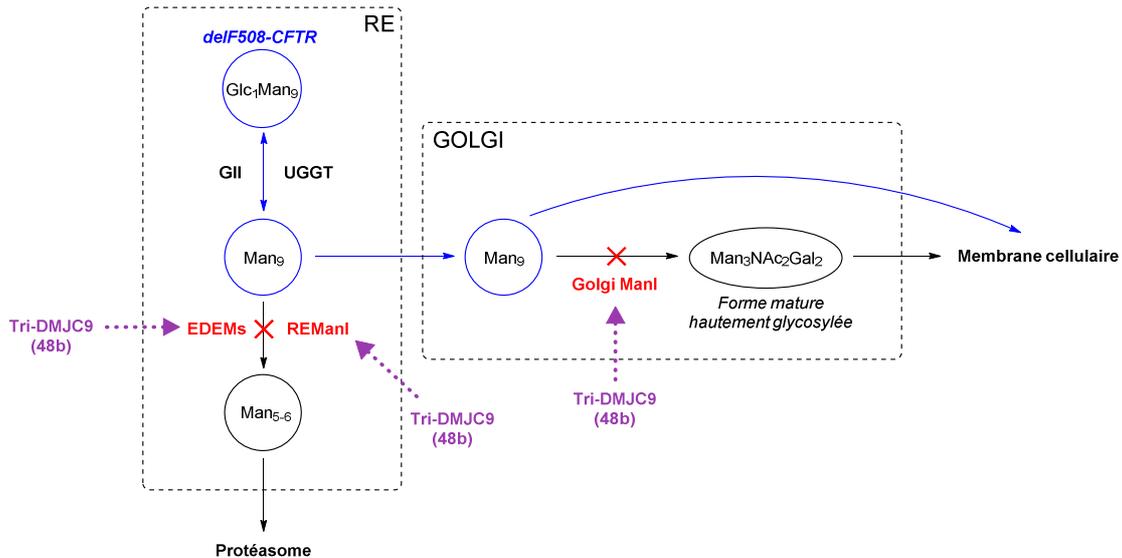


Figure 46. Impact du cluster trivalent de DMJ (**48b**) sur les différents acteurs de la maturation de la protéine delF508-CFTR permettant ainsi son adressage à la membrane cellulaire.

5. SYNTHÈSE D'UNE SONDE FLUORESCENTE

Suite à l'identification d'une nouvelle cible sur laquelle le cluster **48b** agissait, des études biologiques de plus en plus poussées et basées sur des techniques pointues comme les ARN interférents sont actuellement en cours afin de préciser davantage le mode d'action de ce correcteur. Parallèlement, nous avons donc décidé de concevoir une sonde fluorescente en associant le cluster trivalent **48b** avec un fluorophore. En visualisant la pénétration et la biodistribution de ce correcteur dans les cellules de patients malades, cette sonde fluorescente serait un moyen supplémentaire de comprendre les mécanismes à l'origine des puissants effets correcteurs qui ont été précédemment obtenus.

5.1. Conception d'un cluster de DMJ trivalent et fluorescent

Pour pouvoir être efficace, une sonde fluorescente doit être proche structurellement du cluster de DMJ **48b** et agir de la même façon. Nous avons donc pensé tirer profit de la fonction hydroxyle libre présente sur la plateforme de **48b** pour introduire un groupement fluorescent. Une des approches possibles consisterait à substituer la fonction hydroxyle par un azoture puis à introduire par CuAAC un fluorophore, par exemple un dérivé acétylénique du dansyl¹⁹⁰ (Schéma 34).

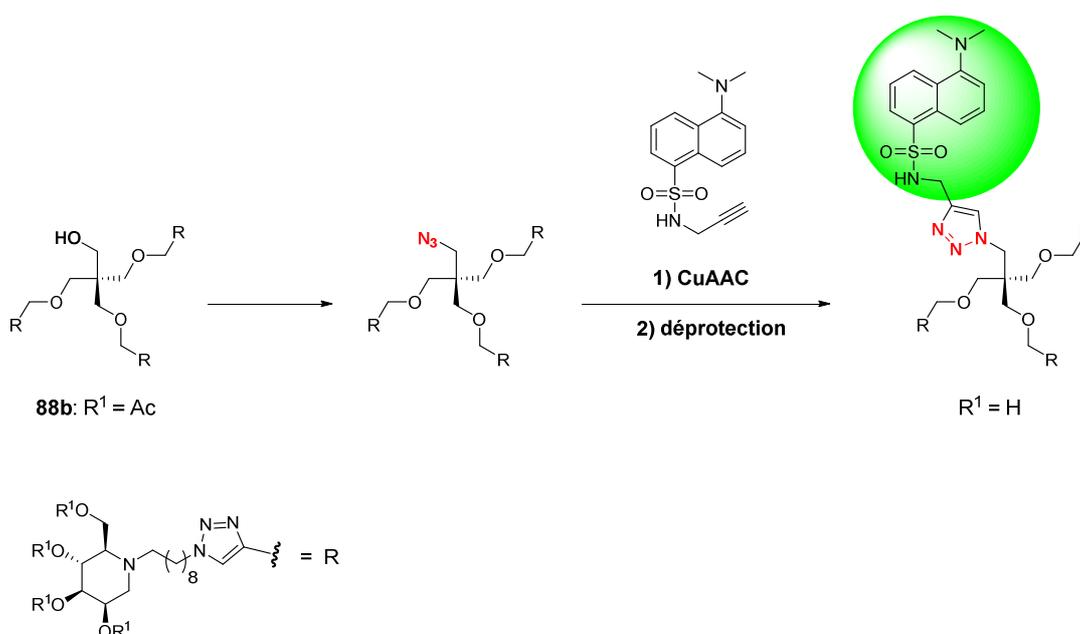


Schéma 34. Stratégie de synthèse possible pour la conception d'une sonde fluorescente basée sur le cluster de DMJ trivalent (**48b**).

Cette stratégie de synthèse nécessite cependant plusieurs étapes à partir d'un intermédiaire **88b** qui possède déjà une grande valeur ajoutée. Nous nous sommes alors orientés vers une nouvelle approche qui venait d'être développée au laboratoire en collaboration avec le Dr R. Ziessel et qui permettait d'accéder de façon convergente à des clusters d'iminosucres (**93**, **94**) dont la plateforme est elle-même fluorescente (Figure 47).¹⁹¹

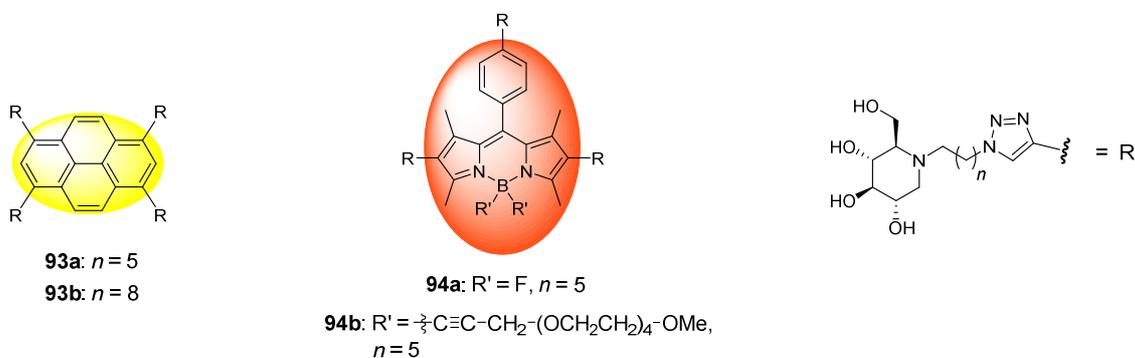


Figure 47. Clusters tri- et tétravalents fluorescents en série DNJ (**93**, **94**).¹⁹¹

Cette approche, qui repose sur le couplage par CuAAC de plateformes polyacétyléniques dérivées du pyrène ou du BODIPY avec des ligands iminosucres, nous est apparue parfaitement adaptée pour la synthèse de clusters de DMJ fluorescents (**Schéma 35**). En ce qui concerne le choix de la plateforme fluorescente, nous nous sommes orientés vers une plateforme F-BODIPY (**95**) car les autres types de plateforme ne remplissaient pas les critères de valence ou étaient trop encombrés (partie oligoéthylène glycol). D'un point de vue photophysique, les structures F-BODIPY sont intéressantes pour développer des sondes fluorescentes car elles possèdent des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques de fluorescence relativement élevés ($\phi = 24\%$ pour **94a**).¹⁹¹ De plus, le noyau F-BODIPY est également stable chimiquement et photochimiquement et peut être facilement tri-fonctionnalisé avec des fonctions alcynes.

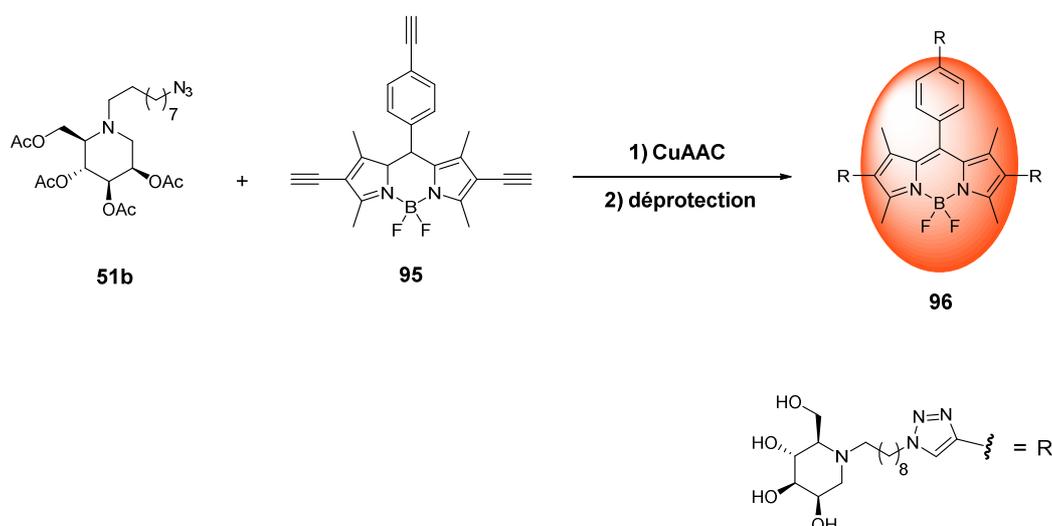
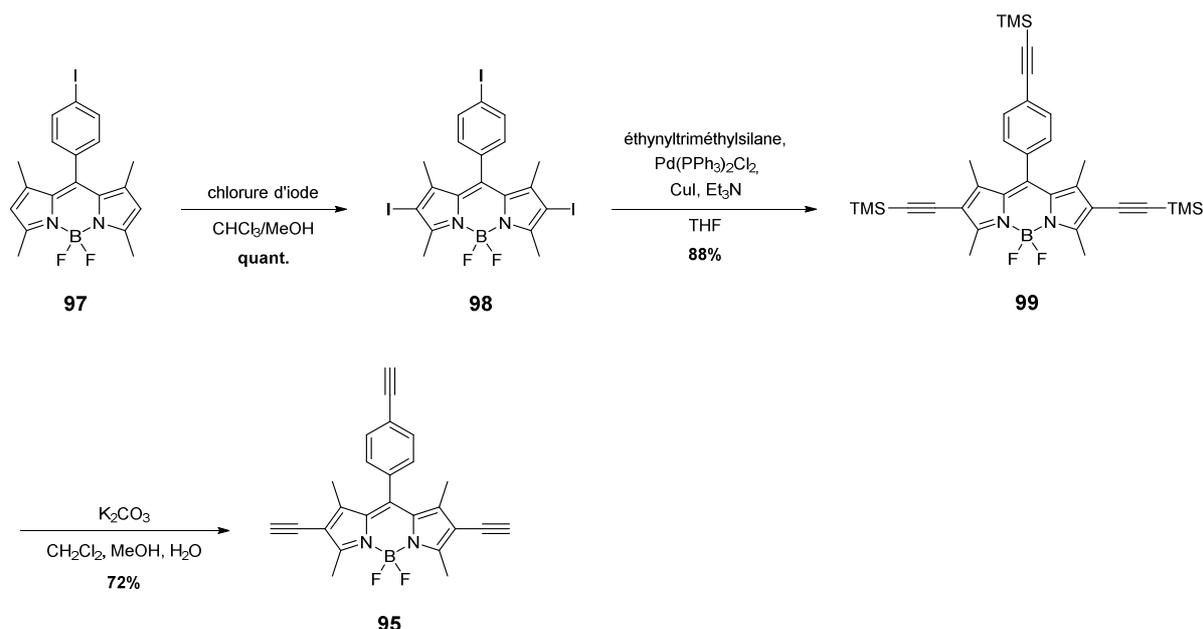


Schéma 35. Stratégie de synthèse d'un cluster trivalent de DMJ marqué par un fluorophore (**96**).

5.2. Synthèse d'un cluster basé sur une plateforme F-BODIPY fluorescente

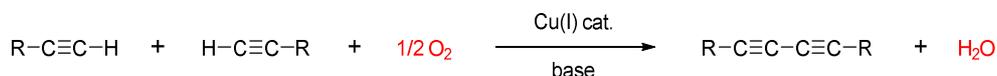
5.2.1. Synthèse de la plateforme

La plateforme triacétylénique dérivée du F-BODIPY (**95**) a été synthétisée par le groupe du Dr Ziessel de l'Université de Strasbourg. Celle-ci a été obtenue en trois étapes à partir d'un intermédiaire **97** dont la synthèse est décrite dans la littérature (**Schéma 36**).¹⁹¹ Pour commencer, l'intermédiaire F-BODIPY (**97**) possédant déjà un iode en position centrale *pseudo meso* a été fonctionnalisé avec deux autres groupements iodures par une réaction d'iodation régiosélective pour donner le composé **98**. Une réaction de Sonogashira-Hagihara entre les iodures d'aryle et le triméthylsilyléthyne a ensuite permis d'obtenir le dérivé acétylénique protégé correspondant (**99**). Une déprotection des alcynes terminaux en conditions basiques a finalement conduit à la plateforme **95** avec un rendement global de 63%.

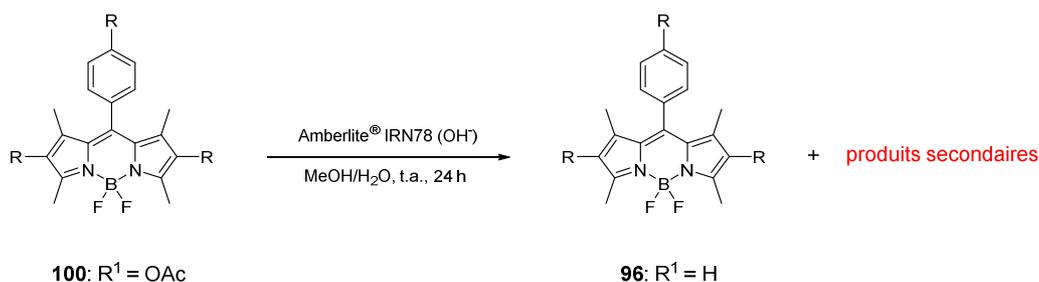
Schéma 36. Synthèse de la plateforme F-BODIPY (95).¹⁹¹

5.2.2. Couplage des ligands à la plateforme et déprotection

Pour le couplage par CuAAC de la plateforme F-BODIPY avec le ligand *N*-(azidononyl)-DMJ, nous nous sommes basés sur les conditions déjà rapportées par notre groupe.¹⁹¹ Il avait été montré que la réaction de CuAAC devait être réalisée en conditions anaérobies sinon il pouvait se former un polymère dont le monomère est la plateforme F-BODIPY au détriment du produit de couplage azoture-alcyne. La formation d'un tel polymère est due à un couplage de type Glaser entre les alcynes terminaux qui a lieu en présence de dioxygène, de cuivre (I) et d'une base (Schéma 37).¹⁹² Bien que le mécanisme de cette réaction ne soit pas totalement connu, on sait toutefois que ce couplage est d'autant plus rapide que l'alcyne est acide. Dans notre cas, la forte acidité des alcynes présents sur le noyau F-BODIPY, due à la conjugaison avec les cycles aromatiques, permet d'expliquer pourquoi le couplage de Glaser est plus rapide que la réaction de CuAAC.

Schéma 37. Couplage de Glaser.¹⁹³

La réaction de CuAAC entre le ligand **51b** et la plateforme **95** a donc été réalisée à température ambiante et sous atmosphère inerte d'argon tout en prenant soin de dégazer les solvants. L'adduit **100** a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 73% (Schéma 38). Pour ce composé, nous avons également confirmé la présence du groupement BF_2 par RMN ^{11}B (triplet) et par RMN ^{19}F (deux doublets).



Hypothèse pour les produits secondaires :

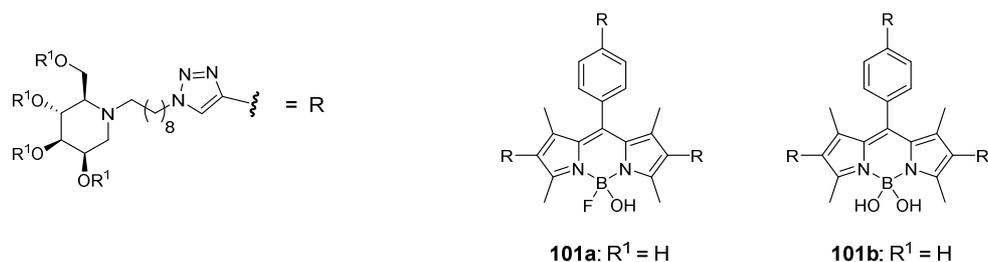


Schéma 39. Premier essai de déprotection du cluster F-BODIPY acétylé (**100**) à l'aide d'une résine Amberlite[®] IRN78 (OH⁻).

Pour résoudre ce problème, nous avons essayé d'identifier les facteurs à l'origine de ce déplacement de groupement fluorure. Si l'on se réfère à l'hydrolyse des clusters F-BODIPY en série DNJ, nos conditions étaient identiques à l'exception de la résine qui était dans notre cas l'Amberlite[®] IRN78 (OH⁻) et dans le cas des clusters de DNJ l'Amberlite[®] IRA400 (OH⁻). À partir de là, nous avons pensé que le type de résine utilisé pouvait être en cause. Nous avons par conséquent préparée fraîchement une nouvelle résine Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) à partir de la forme chlorure et nous avons réalisé l'étape de déprotection dans le méthanol au lieu d'un mélange méthanol/eau afin de réduire au maximum le risque d'hydrolyse. Après réaction et filtration de la résine, le solvant a été évaporé sous pression réduite sans chauffage, encore une fois par mesure de précaution. Au final, ceci nous a permis d'obtenir le produit déacétylé **96** avec un très bon rendement de 95% et sans aucun produit secondaire (**Schéma 40**).

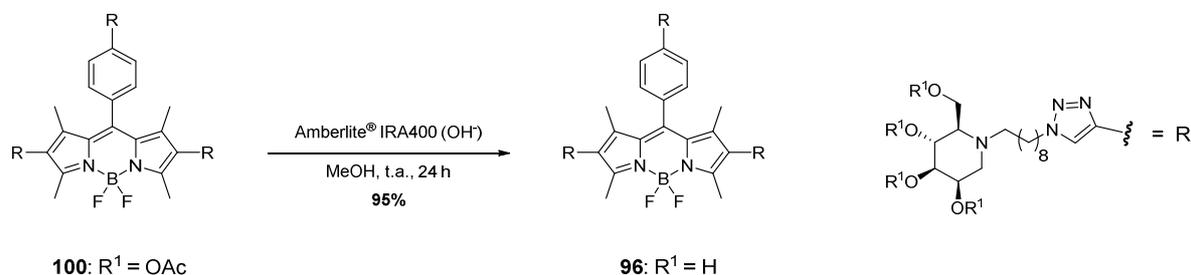


Schéma 40. Synthèse du cluster DMJ trivalent basé sur une plateforme F-BODIPY (**96**) à l'aide d'une résine Amberlite[®] IRA400 (OH⁻).

5.3. Futures évaluations biologiques

Le cluster F-BODIPY en série DMJ (**96**) sera prochainement évalué par le groupe du Pr Beck et du Dr Norez à l'Université de Poitiers. Des résultats préliminaires sur les clusters en série DNJ ont néanmoins déjà montré que le dérivé trivalent F-BODIPY **94a** possédait un EC_{50} de 1,5 μ M, cette valeur est donc très proche de l' EC_{50} mesuré pour l'analogue trivalent **43** ($EC_{50} = 1 \mu$ M) (**Figure 48**).

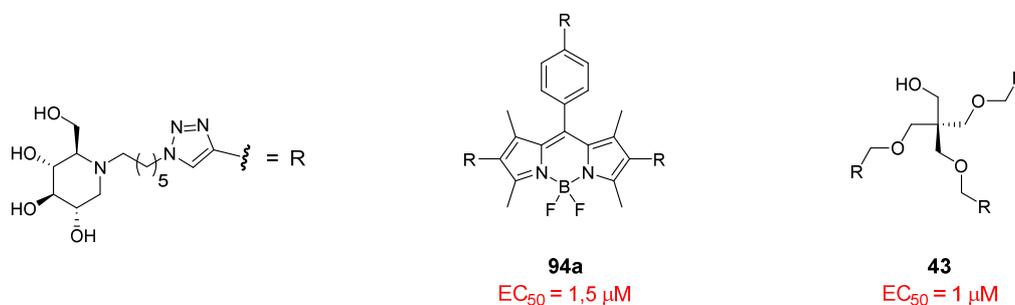


Figure 48. EC_{50} des dérivés trivalents en série DNJ possédant un cœur fluorescent (**94a**) ou non (**43**).

Au final, même si le mode d'action des dérivés multivalents en série DNJ est différent, ce résultat est de bon augure quant à l'efficacité du cluster F-BODIPY en série DMJ (**96**). Une fois son EC_{50} déterminé, cette sonde fluorescente fera l'objet d'expériences d'imagerie dans des cellules delF508-CFTR afin de déterminer la distribution et la cinétique de pénétration cellulaire de ce correcteur par rapport à son analogue monovalent fluorescent.

6. RÉSUMÉ DU CHAPITRE

L'utilisation de molécules appelées correcteurs pour restaurer l'activité canal chlorure de la protéine CFTR mutée semble être aujourd'hui la stratégie thérapeutique la plus prometteuse pour traiter la mucoviscidose. Dans ce projet, nous avons adopté une approche sélective et originale en synthétisant des correcteurs multivalents basés sur des inhibiteurs de la REManI. Une librairie de clusters di- à tétravalents en série DMJ a alors été synthétisée en reliant par CuAAC des ligands *N*-(azidoalkyl)-DMJ à une plateforme polyacétylénique de type pentaérythritol. L'évaluation biologique de ces composés nous a permis d'identifier un correcteur efficace au submicromolaire : le cluster trivalent **48b** (Figure 49). Ce dernier s'est montré 140 fois plus efficace que son analogue monovalent, mettant ainsi en évidence un effet multivalent fort sur la correction de la protéine delF508-CFTR. D'un point de vue biologique, ce correcteur agirait de façon inédite en inhibant d'une part la REManI mais également en diminuant les interactions entre la protéine delF508-CFTR et les protéines EDEMs. Ces résultats nous ont alors poussés à concevoir une sonde fluorescente dans le but d'approfondir les mécanismes à la base de ce puissant effet correcteur. L'analogue fluorescent du cluster trivalent (**96**) a donc été synthétisé *via* une approche originale pour laquelle le système multivalent est généré à partir d'une plateforme elle-même fluorescente basée sur un noyau F-BODIPY.

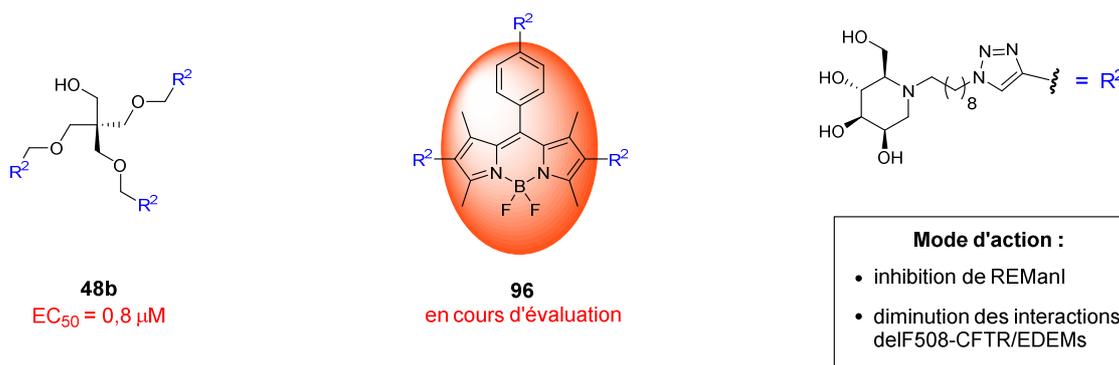


Figure 49. Cluster trivalent en série DMJ (**48b**) et son analogue fluorescent F-BODIPY (**96**).

CHAPITRE 2

**Iminosucres hétérodivalents
comme nouveaux chaperons
pharmacologiques**

1. LA MALADIE DE GAUCHER

La maladie de Gaucher est une maladie rare qui est transmise de façon héréditaire selon le mode autosomique récessif. Il s'agit d'une maladie lysosomale caractérisée par la déficience de la β -glucocérébrosidase (GCCase), une glycosidase contenue dans le lysosome. Cette déficience conduit à une accumulation de substrats non dégradés dans cet organite cellulaire provoquant ainsi un dysfonctionnement plus ou moins sévère des cellules et des organes concernés.

1.1. Épidémiologie

La maladie de Gaucher est la maladie lysosomale la plus fréquente, son incidence se situe entre 1/40 000 et 1/50 000 naissances à travers la population mondiale.¹⁹⁴ Cependant cette maladie est plus répandue dans certaines populations ayant un faible brassage génétique comme la population juive ashkénase où l'incidence est de 1/450 à 1/800 naissances.¹⁹⁵ En France, on recensait 505 patients atteints de cette maladie en 2015.¹⁹⁶

1.2. Causes de la maladie

Principale cause de la maladie, la déficience de la GCCase est due à une ou plusieurs mutations sur le gène *GBA* (*Glucosidase, Beta, Acid*) codant pour cette enzyme. Située dans le lysosome, la GCCase réalise la dernière étape du catabolisme des glycosphingolipides¹⁹⁷ qui sont des composants de la membrane plasmique des cellules eucaryotes. La dégradation des glycosphingolipides fait partie des phénomènes de renouvellement et de digestion des membranes cellulaires. En tant que glycosidase (famille GH30), la GCCase catalyse l'hydrolyse du β -glucosylcéramide (GlcCer) pour former le céramide et le glucose avec rétention de configuration (**Schéma 41**).

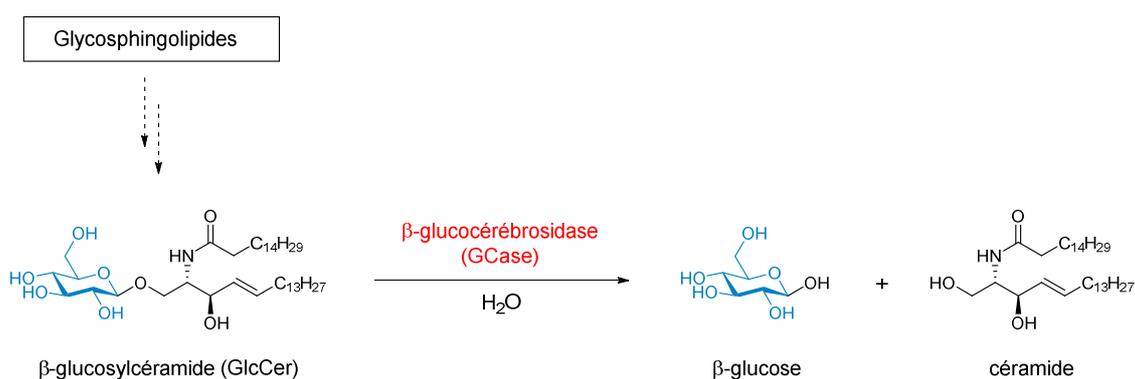


Schéma 41. Dernière étape du catabolisme des glycosphingolipides : hydrolyse du glucosylcéramide par la GCCase.

La défaillance enzymatique de la GCCase provoque donc une accumulation du GlcCer non dégradé dans le lysosome. Cette accumulation de GlcCer touche principalement les macrophages¹⁹⁸ bien que la GCCase soit présente pratiquement dans tous les types de cellules. En effet, en temps normal

les lysosomes du macrophage digèrent les glycosphingolipides provenant des nombreux globules rouges sénescents qu'ils phagocytent. Dans le cas où la GCCase est défaillante, le macrophage continue de phagocyter les globules rouges et le GlcCer qui ne peut être dégradé s'accumule de plus en plus dans ce dernier. Dans certains cas, la maladie de Gaucher peut aussi être due à une déficience en saposine C (SapC), une protéine activatrice qui permet d'exposer le glucosylcéramide à la GCCase.¹⁹⁹

1.3. Historique et découverte de la maladie

Le médecin français Philippe C. E. Gaucher a été le premier, en 1882, à décrire les symptômes de cette maladie qui porte aujourd'hui son nom. À l'époque, il rapporta dans sa thèse de doctorat le cas d'une jeune patiente dont le volume de la rate était disproportionné et montra que les cellules de cet organe étaient elles-mêmes gonflées.²⁰⁰ En 1901, le docteur Nathan E. Brill suggéra le caractère familial de la maladie et rapporta quelques années plus tard des atteintes hépatiques et osseuses en rapport avec celle-ci. Les travaux du docteur allemand H. Lieb dans le domaine ont conduit à l'isolement du glycolipide qui était accumulé dans les cellules de patients malades et à l'origine de leur gonflement.²⁰¹ Par la suite, ce glycolipide fut identifié comme étant le glucosylcéramide par le chimiste français A. Aghion.²⁰² Il faudra ensuite attendre 1965 pour que le groupe de Brady et Shapiro démontre le lien entre l'accumulation du glucosylcéramide et un déficit en β -glucocérébrosidase, une enzyme lysosomale.²⁰³

1.4. Physiopathologie

Dans la maladie de Gaucher, le glucosylcéramide s'accumule dans les macrophages tissulaires, et en particulier ceux présents dans la moelle osseuse, le foie et la rate. Ces macrophages engorgés de GlcCer prennent alors un aspect cytologique particulier dit « en bulbe d'oignon » et sont appelés cellules de Gaucher.²⁰⁴ Ces cellules sont caractérisées par un noyau excentré contre la paroi cellulaire et un cytoplasme avec un aspect froissé visible en microscopie (**Figure 50**).

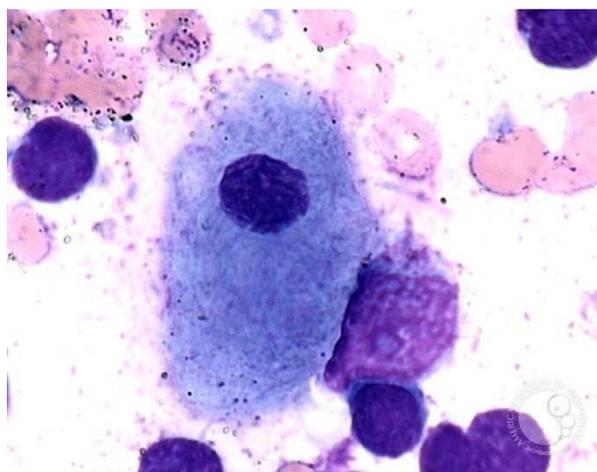


Figure 50. Vue microscopique d'une cellule de Gaucher.²⁰⁵

La présence de ces cellules de Gaucher dans le foie, la rate et la moelle osseuse sont à l'origine d'atteintes viscérales, osseuses et hématologiques (**Figure 51**).²⁰⁶ Les atteintes viscérales se traduisent

principalement par une hépatosplénomégalie (augmentation du volume du foie et de la rate) entraînant des douleurs abdominales intenses et parfois une insuffisance splénique et/ou hépatique. Dans certains cas, des infarctus de la rate et des cirrhoses peuvent également survenir. Les atteintes osseuses sont très variables et entraînent de nombreux problèmes de mobilité. Outre les douleurs chroniques, les lésions osseuses provoquent aussi de l'ostéoporose, des fractures pathologiques, des tassements vertébraux et des ostéonécroses des têtes fémorales et humérales (décomposition et mort des tissus osseux). Les atteintes hématologiques sont représentées le plus fréquemment par une thrombopénie (diminution du nombre de plaquettes dans le sang) et une anémie (carence en globules rouges).

Les mécanismes par lesquels l'atteinte de ces organes est initiée et propagée ne sont cependant pas encore clairement définis. En effet, la présence uniquement physique de cellules de Gaucher gonflées ne permet pas à elle seule d'expliquer le gonflement du foie et de la rate puisque ces cellules de Gaucher représentent moins de 2% de la surcharge tissulaire.¹⁹⁸ Certaines études ont montré que les macrophages touchés (cellules de Gaucher) induisaient une réponse inflammatoire dans les organes affectés.¹⁹⁴ Ce processus inflammatoire, pouvant conduire à la destruction des tissus, pourrait alors expliquer les diverses manifestations cliniques de la maladie. Les mécanismes à l'origine de l'activation des macrophages sont toujours en cours d'investigation, néanmoins il a été envisagé que le glucosylcéramide lui-même pouvait avoir un effet activateur sur les fonctions du macrophage.¹⁹⁴ En effet les sphingolipides sont connus pour être impliqués dans des processus inflammatoires et apoptotiques.¹⁹⁴

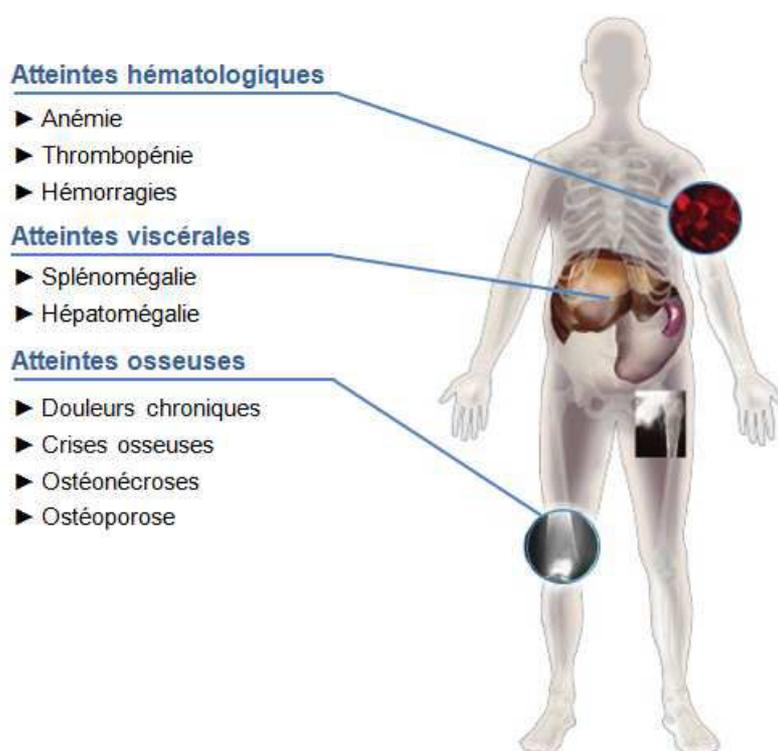


Figure 51. Principales manifestations (non neurologiques) de la maladie de Gaucher.²⁰⁷

Dans la plupart des cas, une asthénie constante (état de faiblesse générale) est aussi associée à la maladie de Gaucher. Celle-ci est indépendante de l'anémie et correspondrait à une anomalie du

métabolisme basal. En ce qui concerne les atteintes d'autres organes tels que le cœur, les reins ou les poumons, celles-ci sont plutôt rares mais toutefois possibles.²⁰⁶

Dans des cas plus rares, la maladie de Gaucher peut être associée à une atteinte neurologique progressive et létale. Les manifestations cliniques pouvant survenir sont une hémiplégié (paralysie affectant en partie ou totalement la moitié du corps), une paraplégie (paralysie des deux membres inférieurs), une ophtalmoplégie (paralysie des muscles moteurs d'un œil ou des deux yeux), des crises d'épilepsie etc.²⁰⁶ Contrairement aux atteintes viscérales, osseuses et hématologiques, les troubles neurologiques ne sont pas dus aux cellules de Gaucher (macrophages), qui ne sont quasiment pas présentes dans le cerveau, mais à des mécanismes sous-jacents qui n'ont pas encore été totalement définis. L'accumulation du GlcCer dans les tissus cérébraux n'est cependant pas critique pour le système nerveux central,¹⁹⁴ par contre il semblerait que ce soit l'accumulation de glucosylsphingosine, un sphingolipide cytotoxique à faible concentration s'accumulant également dans les tissus cérébraux, qui provoque la destruction des neurones.²⁰⁸

1.5. Les différents phénotypes

On décrit classiquement trois types de phénotype qui sont définis suivant les caractéristiques cliniques de la maladie.²⁰⁹

1.5.1. Type 1, sans atteinte neurologique

La maladie de Gaucher de type 1 est définie par l'absence d'atteinte neurologique et concerne environ 95% des patients. Elle est caractérisée par une variabilité importante de son âge d'apparition. Dans certains cas, les premiers symptômes de la maladie peuvent se manifester au cours des premiers mois de la vie, provoquant parfois des complications mortelles pour les nourrissons. *A contrario*, dans le cas de patients paucisymptomatiques (présentant peu de symptômes) ou asymptomatiques, le diagnostic de la maladie peut être réalisé beaucoup plus tard (après 80 ans). Les manifestations cliniques sont aussi très variables d'un patient à l'autre, néanmoins les manifestations principalement observées sont une hépatosplénomégalie, des lésions osseuses de gravité variable et des anomalies hématologiques. L'évolution de la maladie de Gaucher de type 1 dépend des traitements suivis par le patient mais le pronostic vital est rarement engagé.

1.5.2. Type 2, forme neurologique aigüe

Le type 2 est la forme la plus sévère et la plus rare de la maladie de Gaucher, elle touche environ 1% des patients (une naissance sur 500 000). Elle est caractérisée par une atteinte neurologique précoce et d'évolution très rapide. La majorité des cas débutent chez le nourrisson de trois à six mois avec une hépatosplénomégalie et une atteinte très grave du système nerveux central. Le décès survient le plus souvent avant l'âge de deux ans. À l'heure actuelle, aucun traitement n'est efficace pour la maladie de Gaucher de type 2.

1.5.3. Type 3, forme neurologique subaigüe

Le type 3 de la maladie de Gaucher, également appelé type juvénile, est caractérisé par une atteinte neurologique d'apparition plus tardive et d'évolution plus progressive que le type 2. Cette forme est également très rare puisqu'elle concerne environ 5% des patients, soit moins d'une naissance sur 100 000. De façon générale, les symptômes de la maladie apparaissent au début de l'adolescence avec des atteintes comparables au type 1 et une atteinte neurologique qui évoluera lentement et progressivement jusqu'à un stade critique. Comme le type 1, la maladie de Gaucher de type 3 regroupe des malades avec des manifestations très hétérogènes. L'espérance de vie des patients peut atteindre 40 ans, par contre sans traitement spécifique l'évolution de la maladie est fatale en quelques années.

1.6. Les différentes mutations affectant la GCase

1.6.1. Mutations du gène *GBA*

Le gène *GBA* codant pour la GCase est localisé sur le bras long du chromosome 1. Actuellement, plus de 250 mutations sur ce gène ont été identifiées en rapport avec la maladie de Gaucher.²¹⁰ Les deux premières mutations à avoir été décrites sont les mutations non sens N370S et L444P, la première correspond à la substitution d'une asparagine par une sérine sur le codon 370 de la chaîne protéique et la seconde correspond à la substitution d'une leucine par une proline sur le codon 444. Les allèles N370S et L444P sont aujourd'hui les allèles mutés les plus répandus, ils représentent respectivement environ 60% et 20% des allèles mis en évidence dans la maladie de Gaucher. Parmi les mutations les plus fréquentes, on retrouve aussi les mutations 84GG, RecNci1, D409H et IVS2+1 G>A (Figure 52).

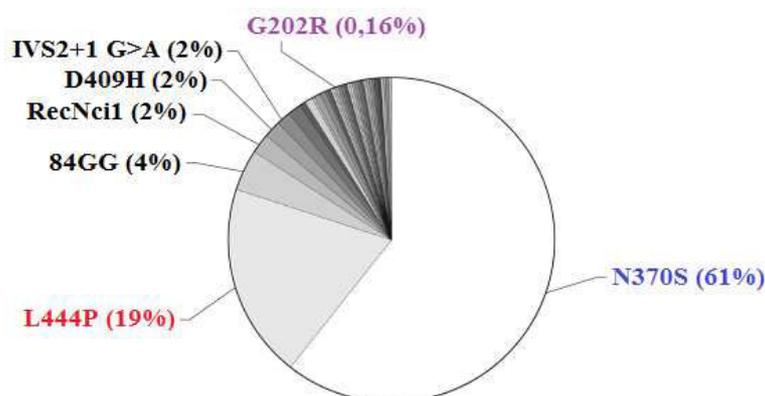


Figure 52. Mutations du gène *GBA* les plus répandues et leurs fréquences alléliques. Données obtenues à partir d'une liste d'allèles (6731 au total) du registre ICGG (*International Collaborative Gaucher Group*).²¹¹

1.6.2. Corrélations génotype-phénotype

Dans le cas de la maladie de Gaucher, les corrélations génotype-phénotype ne sont pas triviales car les phénotypes peuvent dépendre d'autres facteurs génétiques (gènes modificateurs) ou de facteurs environnementaux.²¹² Il est possible par exemple que des patients partageant un même génotype

possèdent des phénotypes très différents, à l'inverse des patients cliniquement similaires peuvent posséder des génotypes différents. Néanmoins, d'importantes généralisations ont pu être réalisées.¹⁹⁴ Il a été montré entre autres que l'allèle le plus fréquent N370S est exclusivement associé à une forme non neurologique de la maladie (type 1) même en étant associé à un autre allèle. Quant à l'homozygotie N370S/N370S, celle-ci est associée à un phénotype peu sévère, c'est ce génotype qui est retrouvé chez la plupart des patients asymptomatiques. Au contraire, les allèles portant la mutation L444P sont le plus souvent associés au développement d'une forme neurologique de la maladie, d'ailleurs l'homozygotie L444P/L444P conduit à un phénotype de type 3. La mutation beaucoup plus rare G202R (substitution d'une glycine par une arginine sur le codon 202) donne également lieu à une atteinte neurologique et conduit pour les patients homozygotes à la forme la plus sévère de la maladie (type 2).²¹¹

1.6.3. Impact des mutations sur l'enzyme

Dans le cas de la maladie de Gaucher, les mutations de type non sens du gène *GBA* altèrent la structure tridimensionnelle de la GCCase et rendent l'enzyme moins stable. La principale cause invoquée pour expliquer l'activité catalytique réduite de l'enzyme est alors un problème de transport vers le lysosome,²¹³ même si ce mécanisme a parfois été débattu.²¹⁴ En effet, à cause d'une stabilité réduite et d'une structure tridimensionnelle altérée, le repliement de l'enzyme dans le réticulum endoplasmique (RE) est plus problématique. Son mauvais état de repliement est alors reconnu par le système de contrôle-qualité ERQC et l'enzyme, bien que toujours catalytiquement active, est dirigée vers le processus de dégradation ERAD et finalement dégradée par le protéasome (**Figure 32**, voir aussi **CHAPITRE 1**).²¹⁵ Cette dégradation prématurée provoque donc une réduction du transport de l'enzyme vers le lysosome²¹³ et la quantité d'enzyme qui est malgré tout acheminée est insuffisante pour hydrolyser correctement le glucosylcéramide.

Chaque mutation influe sur le degré de rétention et de dégradation de la GCCase mutée et détermine par conséquent la sévérité de la maladie.²¹⁵ Les mutations induisant des atteintes neurologiques, par exemple L444P, G202R et D409H, ont souvent un effet dramatique sur le repliement et la stabilité de l'enzyme, provoquant ainsi des phénomènes d'agrégation d'enzyme et un transport quasiment inexistant.²¹³ À titre d'exemple, l'activité enzymatique résiduelle de l'enzyme portant la mutation N370S est d'environ 30% (par rapport à l'enzyme non mutée) alors que celle des enzymes portant la mutation L444P ou G202R est beaucoup plus faible, respectivement 12% et 10%.²¹⁶

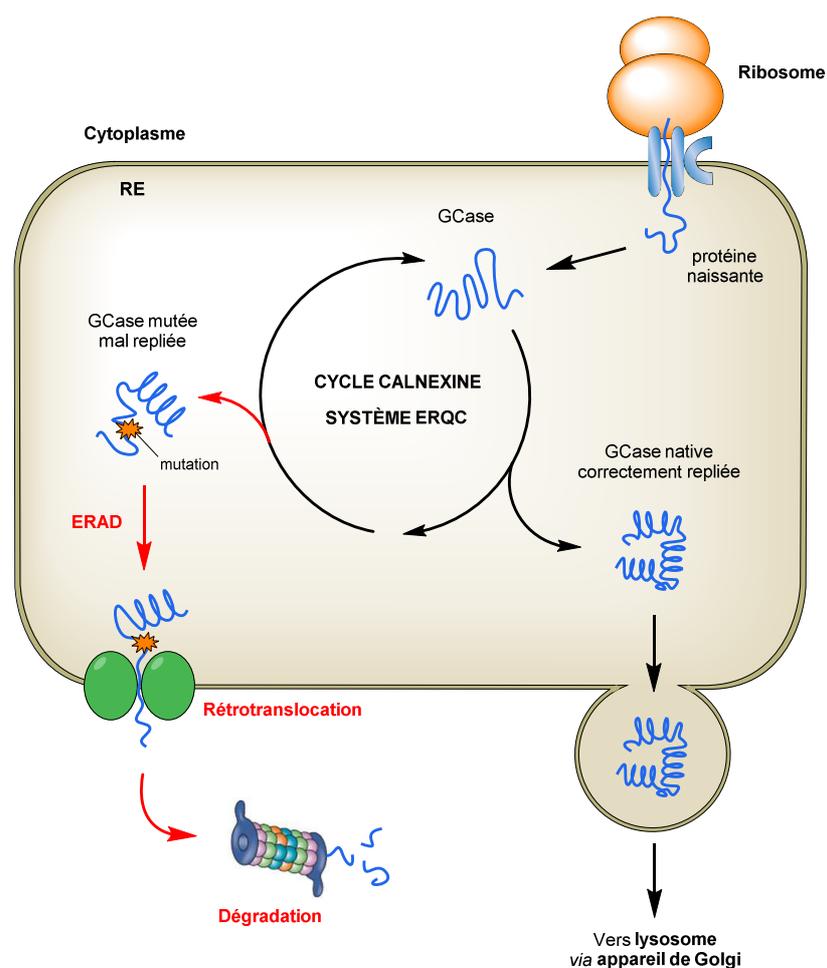


Figure 53. Les différents parcours d'une GCCase mutée et d'une GCCase native (non mutée).

1.7. Traitements existants

La prise en charge des patients a longtemps été basée sur des traitements symptomatiques comme la splénectomie (ablation de la rate) ou encore l'utilisation d'antalgiques pour les douleurs osseuses. La greffe de moelle osseuse a aussi été employée pour traiter des cas très sévères, en apportant au patient des cellules souches saines pour qu'il puisse produire une enzyme non déficiente.²¹⁷ Parallèlement, la thérapie génique a également suscité de gros efforts de recherche dans ce domaine, cependant cette stratégie n'est pas encore une option thérapeutique viable.²¹⁷ Aujourd'hui, les deux seuls traitements efficaces de la maladie de Gaucher sont un traitement enzymatique substitutif (ERT pour *Enzyme Replacement Therapy*) et un traitement par réduction de substrat (SRT pour *Substrate Reduction Therapy*).

1.7.1. Traitement enzymatique substitutif (ERT)

L'enzymothérapie substitutive consiste à injecter aux patients une enzyme de substitution fonctionnelle pour remplacer la GCCase défectueuse.²¹⁸ Elle permet ainsi de rétablir une activité enzymatique suffisante pour hydrolyser le glucosylcéramide qui s'accumule dans le lysosome. Ce traitement existe depuis 1991²¹⁹ et la première enzyme de remplacement à avoir été utilisée est

l'alglucérase (Cérédase[®]), une β -glucocérébrosidase d'origine extractive (placenta humain). Celle-ci a ensuite été remplacée en 1996 par l'imiglucérase (Cérézyme[®]),²²⁰ une β -glucocérébrosidase recombinante produite à partir de cellules d'ovaires de hamster chinois. Les *N*-glycanes de cette enzyme recombinante ont été modifiés pour cibler les récepteurs mannoses présents à la surface des macrophages et donc être mieux internalisés.²²¹

Ce traitement, donné par voie intraveineuse deux fois par mois (perfusion de une à deux heures), permet en quelques mois d'améliorer la qualité de vie des patients en réduisant les atteintes hématologiques et le volume des organes. La réduction des atteintes osseuses est quant à elle observée au bout de quelques années.²²² Au regard de son efficacité et de sa sûreté, l'ERT est donc devenue le traitement standard pour la maladie de Gaucher de type 1. Par contre, étant donné que l'enzyme recombinante est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique, l'ERT ne permet pas de traiter les atteintes neurologiques des types 2 et 3 de la maladie de Gaucher. Elle améliore néanmoins les manifestations viscérales de la maladie de Gaucher de type 3 et a donc reçu à ce titre une extension d'autorisation de mise sur le marché. Deux autres enzymes recombinantes ont également reçu une autorisation de mise sur le marché : la vélaglucérase (VPRIV[®]) et la taliglucérase (Elelyso[®]).²²³ Finalement, même si ce traitement est contraignant (perfusion fréquente) et très coûteux (entre 125 000 € et 260 000 € par an et par patient),²²⁴ il représente un véritable espoir pour les malades.

1.7.2. Traitement par réduction de substrat (SRT)

Le traitement par réduction de substrat est une approche totalement différente qui consiste à limiter la surcharge en glucosylcéramide (GlcCer) à des taux pouvant être éliminés par l'activité enzymatique résiduelle de la GCCase mutée. Le GlcCer étant issu des glycosphingolipides (GSL), cette surcharge peut donc être réduite en inhibant la formation de ces derniers. Une des solutions consiste à inhiber la première étape de biosynthèse des GSL qui n'est autre que la biosynthèse du GlcCer lui-même (**Schéma 42**). L'enzyme visée est par conséquent la glucosylcéramide synthase (GCS) qui produit le GlcCer à partir du céramide et de l'UDP-glucose (Uridine Diphosphate glucose).

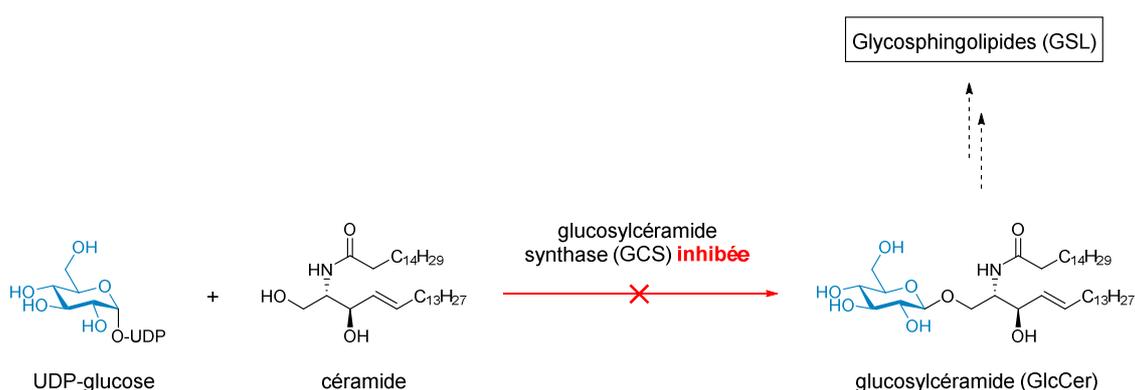


Schéma 42. Traitement par réduction de substrat : inhibition de la biosynthèse du GlcCer, première étape de formation des glycosphingolipides.

En rapportant la synthèse d'inhibiteurs de la GCS, Vunnam et Radin ont été les premiers, en 1980, à évoquer la nécessité de tels inhibiteurs pour traiter la maladie de Gaucher.²²⁵ Quelques années plus tard, le groupe de Platt et Butters a montré que la *N*-butyl-DNJ (**10**, miglustat), un iminosucre

inhibant la GCS, avait la capacité de réduire l'accumulation du GlcCer dans un modèle *in vitro* de la maladie de Gaucher.²²⁶ Après une étude clinique sur 28 patients,²²⁷ la *N*-butyl-DNJ (Zavesca[®]) a obtenu, en 2002, une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la maladie de Gaucher de type 1 (**Figure 37**). Bien que son efficacité soit plus faible que celle du traitement enzymatique, ce traitement par voie orale permet tout de même de réduire le volume du foie et de la rate, d'augmenter les paramètres sanguins (plaquettes, hémoglobine) et de soulager les manifestations osseuses. D'autre part, le miglustat étant capable de traverser la barrière hémato-encéphalique,²²⁸ des études cliniques ont également été réalisées sur des patients atteints de la maladie de Gaucher de type 3, cependant aucune amélioration des manifestations neurologiques n'a été observée.²²⁹ Le principal inconvénient de ce traitement par réduction de substrat est lié aux effets secondaires que provoque le miglustat. En effet, cet iminosucre inhibe de façon non spécifique d'autres glycosidases cellulaires comme les glucosidases du tractus gastro-intestinal et provoque par conséquent des diarrhées chroniques et des douleurs abdominales.²³⁰ En raison de ces effets secondaires et d'une efficacité moindre, le miglustat n'a été indiqué que pour traiter des cas de type 1 d'intensité légère à modérée et pour lesquels l'enzymothérapie n'est pas envisageable.

Récemment, un inhibiteur plus sélectif de la glucosylcéramide synthase (éliglustat) a également reçu une autorisation de mise sur le marché pour traiter la maladie de Gaucher de type 1 (**Figure 37**).²³¹ Commercialisé sous le nom de Cerdelga[®], ce composé est aussi efficace que l'enzymothérapie et représente donc une nette avancée dans le domaine du traitement par réduction de substrat. Le prix moyen de cette médication reste cependant élevé puisqu'il faut compter 275 000 € par an et par patient²³¹ (contre 140 000 € pour le Zavesca[®]).²³²

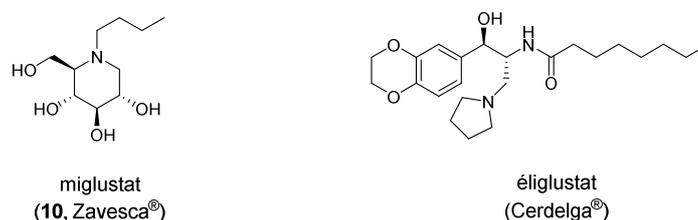


Figure 54. Deux inhibiteurs de la glucosylcéramide synthase utilisés pour le traitement par réduction de substrat.

2. UNE NOUVELLE APPROCHE THÉRAPEUTIQUE : LA THÉRAPIE CHAPERON

Il y a une quinzaine d'années, la thérapie chaperon (PCT pour *Pharmacological Chaperone Therapy*) a émergé en tant que nouvelle approche thérapeutique pour traiter la maladie de Gaucher. Contrairement aux thérapies ERT et SRT, la thérapie chaperon cible directement l'enzyme déficiente à l'origine de la maladie et a pour but de restaurer son activité hydrolytique.

2.1. Une approche contre-intuitive

La thérapie chaperon est basée sur le fait que des inhibiteurs réversibles de la GCCase déficiente (appelés chaperons pharmacologiques) sont capables d'augmenter son activité enzymatique résiduelle à des concentrations sub-inhibitrices. La première preuve de concept de cette approche contre-intuitive a été apportée en 1999 par le groupe de Fan et Asano.³⁶ Ils ont alors montré que la 1-désoxygalactonojirimycine (DGJ), un puissant inhibiteur de l' α -galactosidase A impliquée dans la maladie de Fabry, était capable d'augmenter l'activité résiduelle de cette enzyme mutée d'un facteur huit. De plus amples études de ce phénomène d'effet chaperon pour différentes maladies lysosomales ont conduit à l'explication suivante^{37,233} : les chaperons pharmacologiques, en se liant spécifiquement à l'enzyme mutée dans le RE, aident cette dernière à se replier correctement ou stabilisent une conformation tridimensionnelle correcte, ce qui permet à l'enzyme de ne pas être reconnue par le système ERQC (**Figure 55**). Le complexe chaperon-enzyme est alors transporté jusqu'au lysosome, dans lequel il se dissocie pour libérer une enzyme catalytiquement active. Cette dissociation est d'autant plus facilitée que la concentration en substrat non hydrolysé (GlcCer) est importante dans le lysosome des cellules de Gaucher.

En 2011, Wei *et al.* ont proposé une théorie opposée pour l'effet chaperon en s'appuyant sur des études comparatives (structures cristallines et propriétés biochimiques) entre la GCCase portant la mutation N370S et la GCCase native.²¹⁴ Les résultats de ce groupe ont supporté le fait que la mutation N370S conduirait à une enzyme correctement repliée mais catalytiquement déficiente, qui serait transportée normalement jusqu'au lysosome. À partir de là, il a été suggéré que le rôle des chaperons pharmacologiques n'était pas de prévenir la dégradation de l'enzyme mutée dans le RE mais plutôt d'augmenter la stabilité de l'enzyme mutée dans le lysosome, qui serait par conséquent plus résistante au phénomène de dégradation lysosomale. Depuis, plusieurs études ont été réalisées pour tenter de résoudre ces deux points de vue conflictuels,^{234,235} le débat reste cependant ouvert et de nouvelles recherches sont nécessaires.

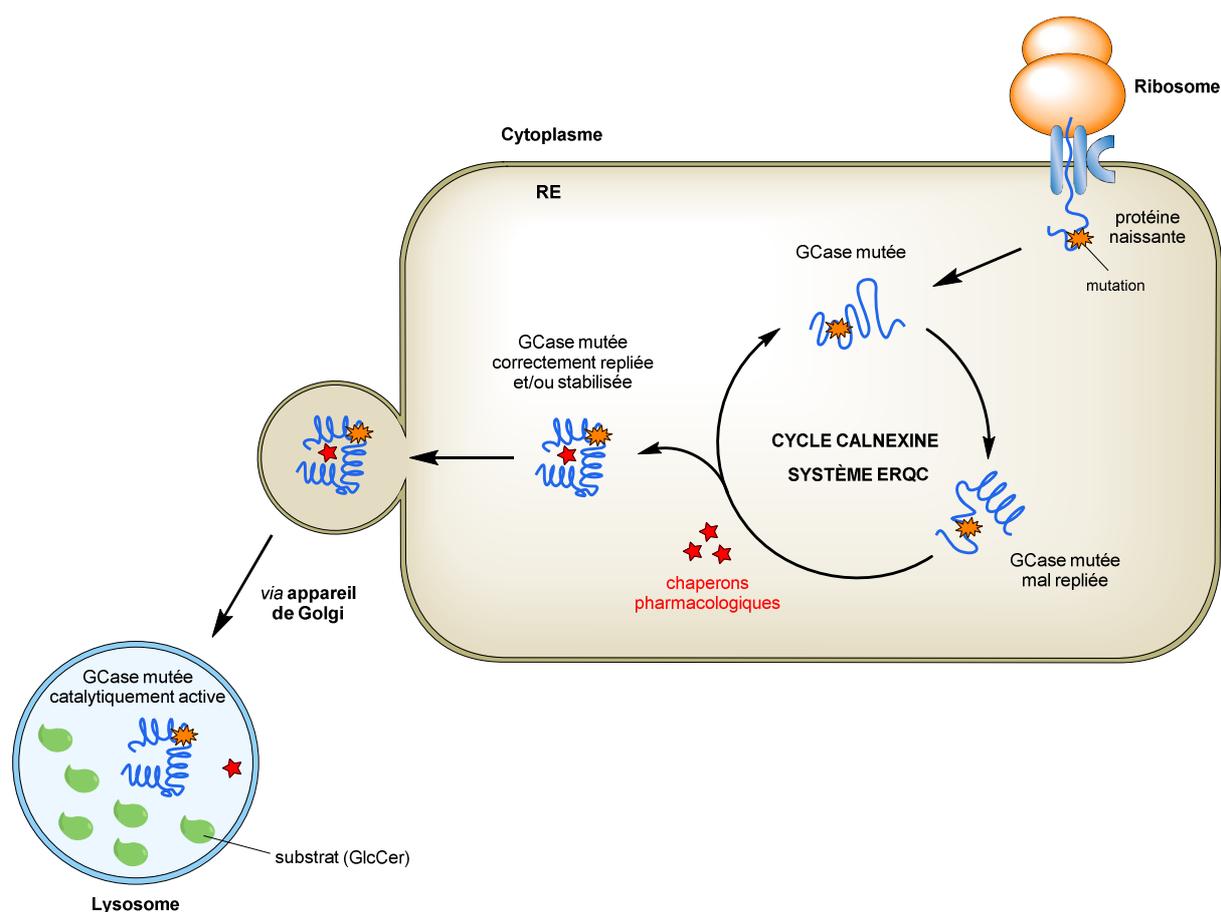


Figure 55. Effet des chaperons pharmacologiques sur la GCCase mutée.

Conceptuellement, la thérapie chaperon est très prometteuse pour le traitement de la maladie de Gaucher. En effet, il est admis que même une faible augmentation de l'activité résiduelle de la GCCase (d'un facteur deux ou trois) pourrait réduire considérablement l'accumulation du GlcCer et par conséquent améliorer les symptômes cliniques.²³⁶ Cette tendance a été vérifiée dans le cas de la maladie de Sandhoff, une autre maladie lysosomale. Il a été montré que pour un patient symptomatique, l'activité résiduelle de la β -hexosaminidase (enzyme lysosomale déficiente) était de 3 à 6% alors que pour un patient asymptomatique celle-ci était de 9 à 10%.²³⁷ Un autre aspect attractif de la thérapie chaperon repose sur le fait que les chaperons pharmacologiques, qui sont par définition de petites molécules, ont l'avantage de pouvoir être donnés par voie orale et peuvent théoriquement traverser la barrière hémato-encéphalique. Finalement, le potentiel que représente la thérapie chaperon pour aboutir à un traitement des maladies lysosomales par voie orale a pu être démontré avec le migalastat (1-désoxygalactonojirimycine) qui a passé avec succès plusieurs phases d'essais cliniques réalisés sur des patients atteints de la maladie de Fabry (phase III terminée en 2015).

Pour la suite, il est important de bien distinguer les chaperons pharmacologiques des chaperons chimiques et des régulateurs de protéostasie³, qui permettent également de favoriser le transport de protéines mal repliées vers le compartiment cellulaire dans lequel elles exercent leur fonction. Contrairement aux chaperons pharmacologiques, les chaperons chimiques sont non spécifiques, ils se lient et stabilisent pratiquement toutes les protéines et n'ont pas de site de liaison spécifique.²³⁹ Parmi les chaperons chimiques, on retrouve le DMSO, le *N*-oxyde de triéthylamine et le glycérol; par exemple, ce dernier augmente la stabilité des protéines en altérant le pouvoir solubilisant de l'eau sur celles-ci.²⁴⁰ Les régulateurs de la protéostasie, quant à eux, ne ciblent pas la protéine mal repliée mais agissent en augmentant le fonctionnement et la disponibilité des protéines chaperonnes du RE et/ou en désactivant partiellement le système ERQC ou le processus ERAD.²⁴¹

2.2. Les iminosucres comme chaperons pharmacologiques

Dans la recherche de chaperons pharmacologiques, les inhibiteurs ciblant spécifiquement le site actif de la GCCase (inhibiteurs compétitifs) ont fait l'objet d'une attention très particulière. Ces molécules remplissent en effet idéalement les critères d'un chaperon pharmacologique efficace, à savoir une forte affinité et spécificité pour l'enzyme et une liaison enzyme-chaperon réversible.²⁴² Utilisés à des concentrations sub-inhibitrices, ces inhibiteurs réversibles peuvent donc être déplacés par le substrat de l'enzyme qui est alors présent en forte concentration dans le lysosome des cellules de Gaucher.²⁴²

Au regard de leur grande affinité avec le site actif des glycosidases, les iminosucres ont donc été les premiers composés à être évalués en tant que chaperons pharmacologiques de la GCCase et sont aujourd'hui encore l'une des principales sources d'investigation pour traiter la maladie de Gaucher par thérapie chaperon. Dans ce paragraphe, nous donnerons des exemples représentatifs de chaperons pharmacologiques basés sur des iminosucres et d'autres glycomimétiques. Ces exemples seront divisés en deux parties, l'une consacrée aux chaperons de la GCCase portant la mutation N370S et l'autre consacrée aux chaperons de la GCCase possédant des mutations plus sévères comme les mutations G202R et L444P.

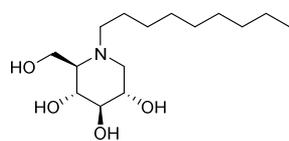
2.2.1. Une attention particulière sur la mutation N370S la plus fréquente

a) Les dérivés *N*-alkylés de la DNJ

Le premier inhibiteur de GCCase à avoir montré une activité chaperon sur cette enzyme est la *N*-nonyl-DNJ (**38**). En 2002, Kelly *et al.* ont démontré que cet inhibiteur compétitif était capable de doubler l'activité résiduelle de la GCCase mutée N370S à une concentration de 10 µM (**Figure 19**).⁹¹ La ressemblance structurale du miglustat (**10**, MB-DNJ) avec ce chaperon a conduit par la suite le groupe de Pocoví à re-évaluer le rôle de ce médicament qui est aujourd'hui utilisé pour le traitement de la

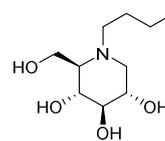
³ La protéostasie, ou homéostasie protéique, se réfère à un ensemble de mécanismes permettant aux cellules de former et de replier correctement les protéines et dans le cas échéant, d'identifier, d'isoler et de détruire les protéines aberrantes. Ce maintien de l'équilibre protéique, indispensable au bon fonctionnement de la cellule et de l'organisme, est accompli à l'aide d'un réseau de plusieurs centaines de protéines incluant les protéines chaperonnes et leurs régulateurs, le système ubiquitine-protéasome etc.²³⁸

maladie de Gaucher par réduction de substrat.²⁴³ Les travaux de ce groupe ont alors montré que le miglustat permettait, en plus de réduire la surcharge en glucosylcéramide, d'augmenter l'activité de la GCCase mutée N370S ($\times 2,3$ à $10 \mu\text{M}$) exprimées dans des fibroblastes de rein de singe (**Figure 19**).

**38**

effet chaperon (N370S) :
 $\times 2$ à $10 \mu\text{M}$ ⁹¹

$K_i = 300 \text{ nM}$ (GCCase)⁹²

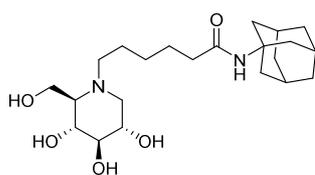
**10**

effet chaperon (N370S, rein de singe) :
 $\times 2,3$ à $10 \mu\text{M}$ ²⁴³

$\text{IC}_{50} = 270 \mu\text{M}$ (GCCase)²⁴⁴

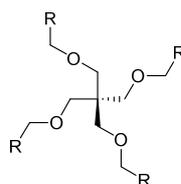
Figure 56. Effet chaperon de la MN-DNJ (**38**)⁹¹ et de la NB-DNJ (**10**)²⁴³ sur la GCCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.^{92,244}

Une seconde étude visant à évaluer de nouveaux dérivés *N*-alkylés de la DNJ a conduit le groupe de Kelly à identifier un composé alkylé avec une chaîne se terminant par un groupement amide adamantyle (**102**) capable d'augmenter l'activité de l'enzyme d'un facteur 1,4 à une concentration de $50 \mu\text{M}$ (**Figure 57**).²¹⁶ Dans le même contexte, notre groupe a exploré le potentiel de la multivalence pour obtenir des chaperons plus efficaces. Pour ce faire, deux études systématiques de l'effet chaperon ont été réalisées sur un panel de dérivés *N*-alkyl-DNJ multivalents (voir **INTRODUCTION**).^{89,94} Parmi ces composés, le meilleur effet chaperon ($\times 3,3$ à $10 \mu\text{M}$) a été obtenu avec le dérivé tétravalent **41** basé sur une plateforme pentaérythritol. Ces études ont également confirmé que l'activité chaperon ne pouvait pas être prédite en se basant simplement sur une forte affinité avec la GCCase, comme cela a pu être démontré par comparaison entre le dérivé tétravalent **41** et le composé heptavalent **32** (**Figure 57**).

**102**

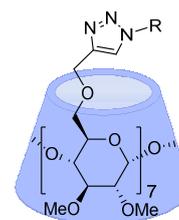
effet chaperon (N370S) :
 $\times 1,4$ à $50 \mu\text{M}$ ²¹⁶

$\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{M}$ (GCCase)²⁴⁵

**41**

effet chaperon (N370S) :
 $\times 3,3$ à $10 \mu\text{M}$ ⁹⁴

$K_i = 0,284 \mu\text{M}$ (GCCase)⁹⁴

**32**

effet chaperon (N370S) :
 $\times 2,4$ à $10 \mu\text{M}$ ⁹⁴

$K_i = 0,055 \mu\text{M}$ (GCCase)⁹⁴

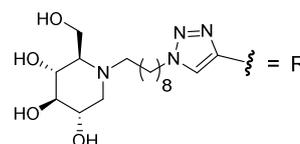


Figure 57. Effet chaperon du composé (adamantylamido)pentyl-DNJ (**102**)²¹⁶ et des systèmes multivalents **32**⁹⁴ et **41**⁹⁴ sur la GCCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.²⁴⁵

b) Les dérivés α -1-C-alkyl-DNJ et α -1-C-alkyl-DIX

Bien que l'efficacité des dérivés *N*-alkyl-DNJ en tant que chaperon ait été clairement démontrée, on peut s'attendre à ce que ces inhibiteurs ne soient pas très sélectifs vis-à-vis de la GCCase et inhibent, à l'instar de la *N*-butyl-DNJ, des glucosidases intestinales. Pour prévenir ces problèmes de sélectivité, des structures iminosucres alternatives, comme les imino-*C*-glycosides, ont été utilisées pour la conception de nouveaux chaperons. Dans ce domaine, Compain, Martin et Asano ont mis en évidence un composé α -1-*C*-nonyl-DNJ (**103**) capable de cibler sélectivement la GCCase par rapport à d'autres α - et β -glucosidases lysosomales et qui présentait un effet chaperon intéressant ($\times 1,7$ à $2,5 \mu\text{M}$) (**Figure 58**).²⁴⁶ Une seconde étude réalisée par les mêmes groupes a conduit à l'identification d'un composé très proche en série DIX (**104**) qui possédait une activité chaperon à une concentration de seulement 10 nM (effet chaperon $\times 1,8$) et était encore plus affiné et sélectif vis-à-vis de la GCCase.⁹²

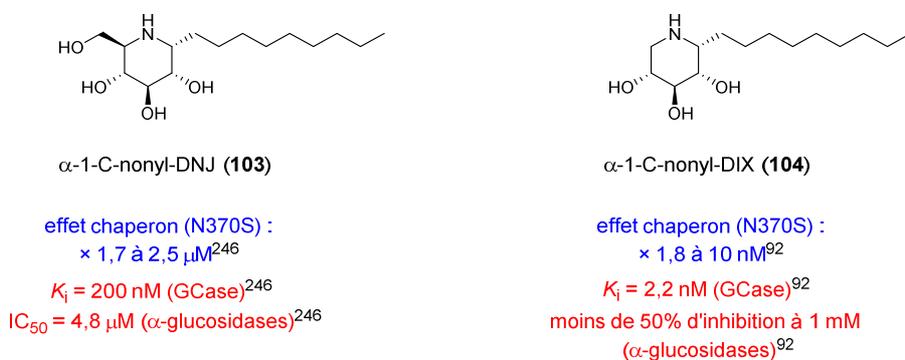


Figure 58. Effet chaperon de l' α -1-*C*-nonyl-DNJ (**103**)²⁴⁶ et l' α -1-*C*-nonyl-DIX (**104**)⁹² sur la GCCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native et diverses α -glucosidases lysosomales et intestinales.

c) L'isofagomine et ses dérivés alkylés

L'isofagomine (**105**) est l'un des chaperons pharmacologiques de la GCCase les plus prometteurs qui ait été rapporté (**Figure 59**). Ce puissant inhibiteur de la GCCase, identifié en 2005 par Fan *et al.*,²⁴⁷ a montré qu'il pouvait quasiment doubler l'activité de l'enzyme mutée N370S dans des tests cellulaires.²⁴⁴ En 2007, l'isofagomine (Plicera[®]) a été engagée dans une étude clinique visant à évaluer son effet sur dix-huit patients atteints de la maladie de Gaucher de type 1. Les résultats des essais cliniques de phase II ont alors rapporté pour chaque patient une augmentation de l'activité enzymatique et aucun effet secondaire sérieux, cependant un seul patient a montré des améliorations cliniques significatives.²⁴⁸ En conséquence, les essais cliniques de phase III n'ont pas été poursuivis.

Les dérivés *C*-alkylés de l'isofagomine (IFG) se sont également révélés être des inhibiteurs très affins de la GCCase²⁴⁷ et des chaperons efficaces.²⁴⁹ Parmi eux, le composé 6-*C*-nonyl-IFG (**106**) a montré une activité chaperon comparable à celle de l'IFG mais à une concentration beaucoup plus faible de 3 nM (**Figure 59**). Ce composé **106** possède par contre un type d'inhibition non-compétitive (voir **6.1.2.c**). De la même façon, le groupe de Kelly a rapporté des composés *N*-alkyl-IFG, comme le composé **107**, capable d'augmenter l'activité de la GCCase d'un facteur 2,5 à une concentration de 75 μM .²⁵⁰

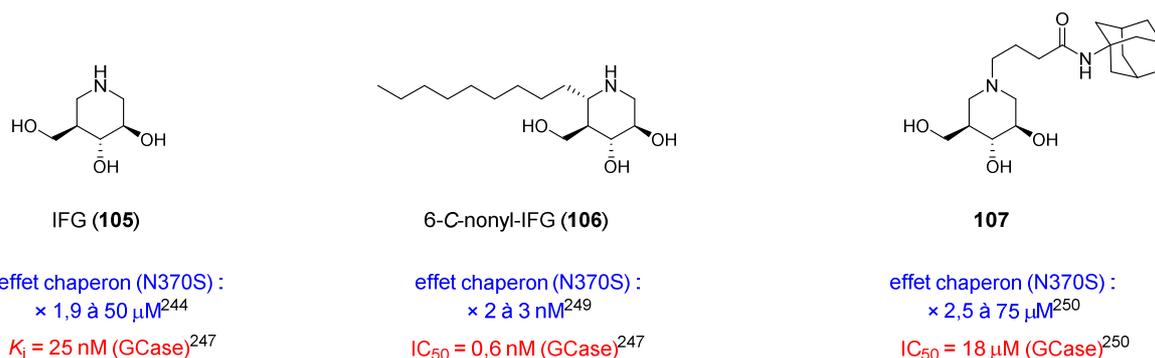


Figure 59. Effet chaperon de l'isofagomine (**105**),²⁴⁴ de la 6-C-nonyl-IFG (**106**)²⁴⁹ et du composé **107**²⁵⁰ sur la GCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.²⁴⁷

d) D'autres iminosucres et glycomimétiques

D'autres structures iminosucres ont également été évaluées comme chaperons pharmacologiques (**Figure 60**). Des structures de type lactame ont notamment été étudiées par les groupes de Ye et Butters dont les travaux ont conduit à l'identification de chaperons très efficaces comme le *N*-hydroxyhexyl- δ -lactame **108** (×4,1 à 50 μM) et le *N*-octyl- δ -lactame **109** (×6,2 à 50 μM).²⁵² L'effet chaperon obtenu avec ce dernier composé représente d'ailleurs l'effet le plus fort qui ait été observé sur la GCase N370S. Pour ce type de composé, les auteurs ont suggéré que la fonction carbonyle permettait de créer une nouvelle liaison hydrogène dans le site actif et stabilisait par conséquent davantage l'enzyme. Le groupe de Fan s'est également intéressé à des iminosucres bicycliques de type glucoimidazole (**Figure 60**).²⁵³ Bien que ces composés (**110** et **111**) se soient révélés être de puissants inhibiteurs de la GCase (jusqu'à la dizaine de picomolaire), les concentrations nécessaires pour observer un effet chaperon restaient très élevées (×2 à 300 μM pour **110**).

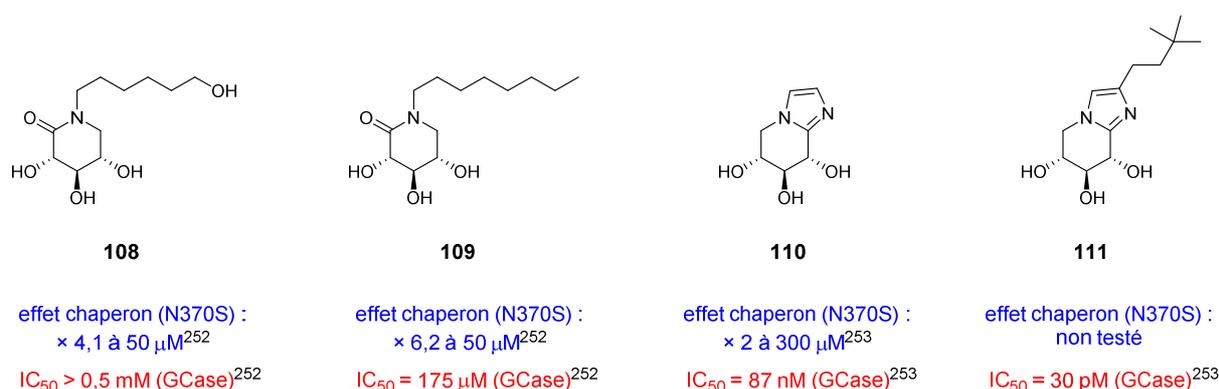
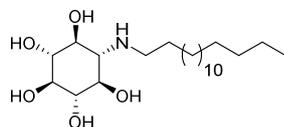


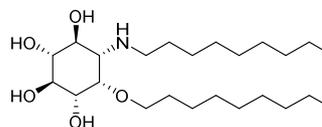
Figure 60. Effet chaperon des composés **108**,²⁵² **109**,²⁵² **110**²⁵³ et **111**²⁵³ sur la GCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.

D'autres glycomimétiques ont également été étudiés dans le cadre de la thérapie chaperon. Les travaux de Delgado dans le domaine ont par exemple permis de mettre en évidence un dérivé

aminocyclitol *N*-alkylé (**112**) capable de stabiliser la GCCase lorsqu'elle est sujette à une dénaturation thermique[§] (**Figure 61**).²⁵⁴ Plus récemment, Llebaria *et al.* ont rapporté un dérivé aminocyclitol dialkylé (**113**), proche structurellement du composé **112**, qui permettait d'augmenter l'activité de la GCCase mutée N370S à des concentrations très faibles de 1 nM.²⁵⁵

**112**

effet chaperon
(dénaturation thermique) :
× 2,5 à 100 μM ²⁵⁴
 $K_i = 400 \text{ nM (GCCase)}$ ²⁵⁴

**113**

effet chaperon (N370S) :
× 1,9 à 1 nM²⁵⁵
 $K_i = 1 \text{ nM (GCCase)}$ ²⁵⁵

Figure 61. Effet chaperon des dérivés aminocyclitols **112**²⁵⁴ et **113**²⁵⁵ sur la GCCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.

2.2.2. Les mutations sévères G202R et L444P

En permettant d'augmenter l'activité de la GCCase exprimant des mutations sévères comme G202R ou L444P, la thérapie chaperon représente un réel espoir pour traiter les formes neurologiques de la maladie de Gaucher (type 2 et 3). Le traitement de la GCCase mutée G202R avec des chaperons pharmacologiques a montré de façon général de bons résultats en termes d'augmentation d'activité. L'exemple le plus fort concerne un dérivé de l'isofagomine possédant un substituant adamantane (**114**) avec lequel il a été observé un gain d'activité d'un facteur 7,2 (**Figure 62**).²⁵⁰ Ce résultat est cependant difficilement transposable à l'échelle thérapeutique à cause de la forte concentration nécessaire pour obtenir ce gain d'activité (150 μM). Récemment, notre groupe a également identifié en collaboration avec l'équipe du Dr Delgado un analogue du DIX possédant un groupement terminal triméthylsilyyle (**115**) qui s'est révélé être un chaperon efficace à faibles concentrations ($\times 3$ à 10 nM et $\times 4,8$ à 100 nM).²⁵⁶

[§] La dénaturation thermique provoque le dépliement partiel d'une enzyme et diminue ainsi son activité enzymatique. Les molécules possédant une activité chaperon sont en principe capables de stabiliser l'enzyme contre la dénaturation thermique et par conséquent sauvegarder leur activité catalytique.

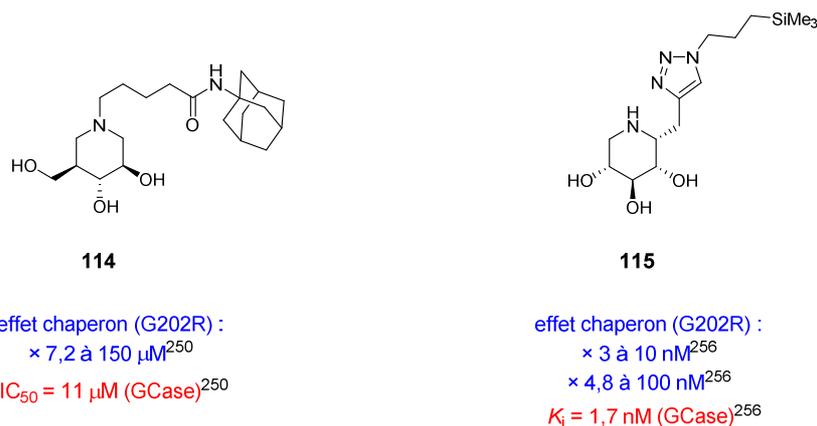


Figure 62. Effet chaperon des composés **114**²⁵⁰ et **115**²⁵⁶ sur la GCCase G202R et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.

La GCCase mutée L444P s'est quant à elle montrée relativement peu sensible à la thérapie chaperon et très peu d'augmentations significatives d'activité ont été observées jusque là. En ce qui concerne cette mutation, l'identification de nouveaux chaperons est d'autant plus difficile que les chaperons efficaces sur les mutations G202R et N370S n'affectent en général pas la GCCase mutée L444P. Ceci peut être rationalisé par le fait que la mutation L444P est, contrairement à N370S et G202R, située dans un domaine éloigné du site actif de l'enzyme.²⁵⁷ Par conséquent, la liaison d'un inhibiteur dans le site actif ne favorisera pas forcément la stabilisation ou le repliement de ce domaine muté.²⁵⁰ Parmi les chaperons les plus efficaces ayant été identifiés pour L444P, on retrouve la calystégine B₂ (**116**), un iminosucre bicyclique naturel capable d'augmenter l'activité de la GCCase d'un facteur 2,3 à 10 μM .²⁵⁸ Le composé **117**, un pseudoglycolipide mimant la partie céramide du substrat naturel de la GCCase, fait également partie des meilleurs chaperons ($\times 2$ à 50 nM).²⁵⁹ L'isofagomine (**106**) est aussi un exemple important car des études *in vivo* réalisées sur des modèles de souris ont démontré que ce composé ($\times 1,7$ à 60 μM) permettait d'augmenter l'activité de l'enzyme mutée dans le foie, la rate et le cerveau,²⁶⁰ démontrant ainsi le potentiel des chaperons pharmacologiques pour viser les atteintes neurologiques de la maladie de Gaucher.

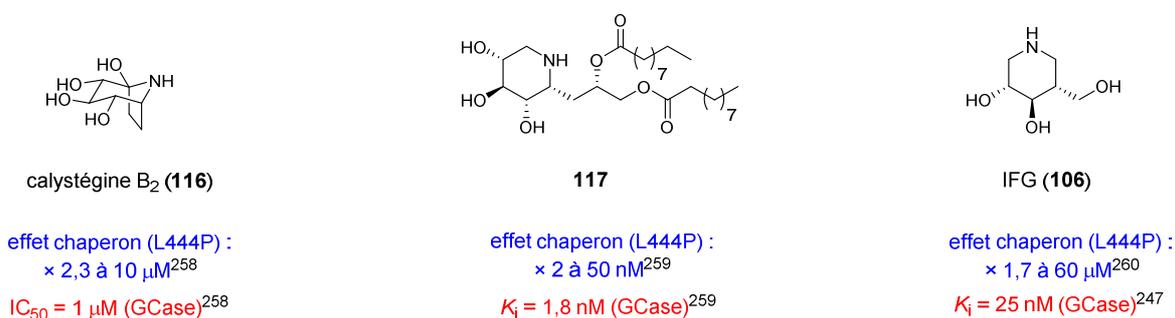


Figure 63. Effet chaperon de la calystégine B₂ (**116**),²⁵⁸ du composé **117**²⁵⁹ et de l'isofagomine (**106**)²⁶⁰ sur la GCCase L444P et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.²⁴⁷

2.3. Les chaperons pharmacologiques basés sur une structure non glycosidique

Même si à ce jour les iminosucres représentent la très grande majorité des chaperons pharmacologiques identifiés,^{261,262} la conception de nouveaux chaperons basés sur ces glycomimétiques fait face à d'importantes limitations. La principale limite provient du fait qu'il est très difficile d'établir des critères rationnels de conception car il n'existe pas de lien systématique entre l'activité chaperon et l'affinité pour l'enzyme. Face à ce problème, les chercheurs ont fait appel à une technique largement employée dans l'industrie pharmaceutique et permettant d'identifier de nouvelles molécules cibles (« hit ») : le criblage à haut débit (HTS). Appliquée à la recherche de chaperon de la GCCase, cette technique a permis d'identifier des structures non glycosidiques possédant des activités chaperon intéressantes. Parmi ces nouveaux chaperons, on retrouve des inhibiteurs de l'enzyme et des composés activateurs purs (non inhibiteurs).

2.3.1. Les composés inhibiteurs de la GCCase

En 2008, le criblage d'une librairie de 50 000 molécules a permis d'identifier deux composés non glycosidiques inhibant la GCCase et ayant montré de bons effets chaperons : le furamide **118** ($\times 1,4$ à $10 \mu\text{M}$) et la quinazoline **119** ($\times 2,4$ à $10 \mu\text{M}$) (**Figure 64**).²⁶³ De façon intéressante, les auteurs ont montré, en se basant sur des expériences de spectrométrie de masse (échange proton/deutérium), que ces deux inhibiteurs non compétitifs (ne se liant pas au site actif) stabilisaient le même domaine que l'isofagomine qui elle se lie au site actif.

De manière similaire, l'approche HTS a permis de mettre en évidence le potentiel de l'ambroxol (**120**) comme chaperon de la GCCase (**Figure 64**).²⁶⁴ Cette molécule, utilisée initialement comme mucolytique, a été identifiée à partir d'une librairie de 1040 médicaments approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*). Des tests cellulaires sur la GCCase mutée N370S ont montré que l'ambroxol permettait d'augmenter l'activité de l'enzyme d'un facteur 1,5 à une concentration de $50 \mu\text{M}$.²⁶⁴ Après des études biologiques concluantes,²⁶⁵ une étude pilote sur douze patients (maladie de Gaucher de type 1)²⁶⁶ a conduit à un recrutement pour des essais cliniques, mais celui-ci a été suspendu pour le moment.

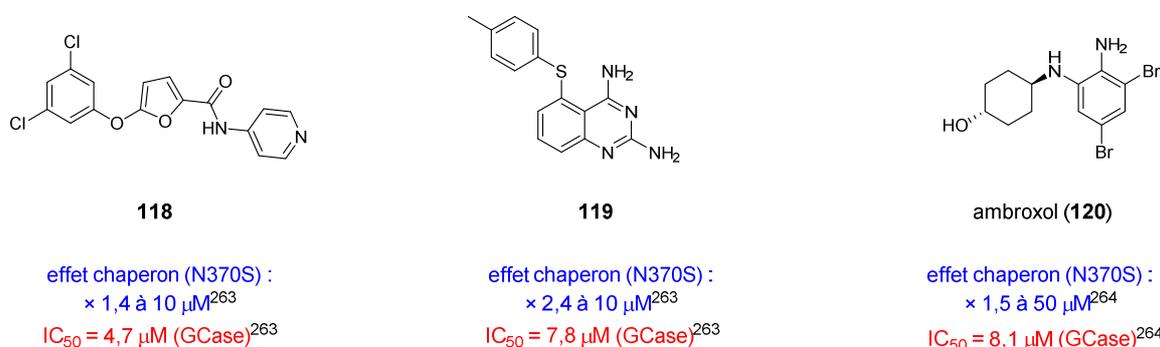
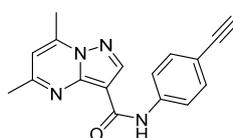


Figure 64. Effet chaperon des composés **118**²⁶³ et **119**²⁶³ et de l'ambroxol (**120**)²⁶⁴ sur la GCCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme native.

2.3.2. Les composés activateurs purs de la GCCase

À partir d'une nouvelle technique de criblage à haut débit basée sur l'analyse de tissus spléniques de patients malades,²⁶⁷ le groupe de Marugan a pu identifier parmi une librairie de 326 770 molécules une série de composés capables d'activer la GCCase sans l'inhiber.²⁶⁸ La découverte de cette série d'activateurs a ensuite été suivie par une phase d'optimisation basée sur des études de type relation structure-activité qui a finalement conduit à l'identification d'un composé « tête de série », le pyrazolopyrimidine **121** (Figure 65). Il a alors montré que le composé **121** ne facilitait pas seulement la translocation de la GCCase mutée vers le lysosome mais activait aussi spécifiquement cette dernière ($AC_{50}^{\Psi} = 6,5 \mu\text{M}$ pour la GCCase mutée N370S et $AC_{50} = 5,2 \mu\text{M}$ pour la GCCase native). D'après les auteurs, le composé **121** possédait une activité chaperon pour la GCCase (N370S et L444P) proche de celle observée pour l'isofagomine.



121

effet chaperon (N370S) :
non publié à ce jour

$AC_{50} = 6,5 \mu\text{M}$ (GCCase N370S)²⁶⁸

Figure 65. Activation de l'activité catalytique de la GCCase N370S par le composé **121**.²⁶⁸

3. VERS DE NOUVEAUX CHAPERONS PHARMACOLOGIQUES CIBLANT UN SITE SECONDAIRE DE LA GCASE

Depuis la première preuve de concept rapportée par Fan et Asano, la thérapie chaperon a connu un intérêt sans précédent et d'importants efforts de recherche ont été réalisés en vue de traiter la maladie de Gaucher. Cependant, malgré les centaines de chaperons de la GCCase qui ont été identifiés,^{195,261,262} très peu d'entre eux sont arrivés jusqu'à des essais cliniques et aucun n'a conduit à ce jour à un traitement thérapeutique. Jusque là, le composé le plus prometteur a été l'isofagomine (Plicera®). Ce composé capable de doubler l'activité résiduelle de l'enzyme dans les tests *in vitro* n'a toutefois pas été en mesure d'améliorer l'état clinique des patients (type 1) lors des essais cliniques de phase II. Face à ces difficultés, l'enjeu actuel consiste à identifier de nouveaux chaperons encore plus efficaces en explorant de nouvelles structures ou de nouveaux types de chaperons comme l'a fait par exemple notre groupe en exploitant le concept de multivalence.^{89,94} Dans ce contexte, nous nous sommes alors intéressés à une classe de chaperons pharmacologiques encore peu étudiée : les

^Ψ L' AC_{50} représente la concentration nécessaire pour obtenir une activation de l'activité catalytique de l'enzyme de 50%.

inhibiteurs se liant à un (aux) site(s) secondaire(s) de la GCCase (non compétitifs). En se liant à l'enzyme, ces molécules peuvent, tout comme les chaperons traditionnels, augmenter la rigidité structurale de l'enzyme et stabiliser celle-ci.

3.1. Conception d'un système hétérodivalent pour cibler et identifier un site secondaire de la GCCase

Notre approche a été initialement basée sur un résultat expérimental obtenu par le groupe d'Asano (**Figure 66**) : alors que la D-IFG est un inhibiteur compétitif et un chaperon reconnu de la GCCase ($\times 2$ à $10 \mu\text{M}$), il a été montré que son énantiomère, la L-IFG (**122**), était un inhibiteur non compétitif possédant également une activité chaperon vis-à-vis de la GCCase même si une concentration plus importante est nécessaire ($\times 1,6$ à $500 \mu\text{M}$).²⁶⁹ Par la suite, le groupe de Martin, Compain *et al.* a démontré que les deux énantiomères du 2-*O*-hexyl-DIX étaient des inhibiteurs compétitifs (**123**) et non compétitifs (**124**) de la GCCase et que le dextrogyre possédait une activité chaperon à une concentration 1000 fois plus faible que la D-IFG ($\times 1,6$ à 10 nM).²⁷⁰ Bien que l'activité chaperon du lévogyre n'ait pas été évaluée, nous avons fait l'hypothèse en s'appuyant sur le résultat d'Asano que ce dernier pouvait aussi avoir un effet chaperon significatif sur la GCCase. D'autre part, à notre demande, le groupe d'Asano avait évalué le K_i de **124** à la centaine de nanomolaire et confirmé un mode d'inhibition non compétitif (résultats non publiés).

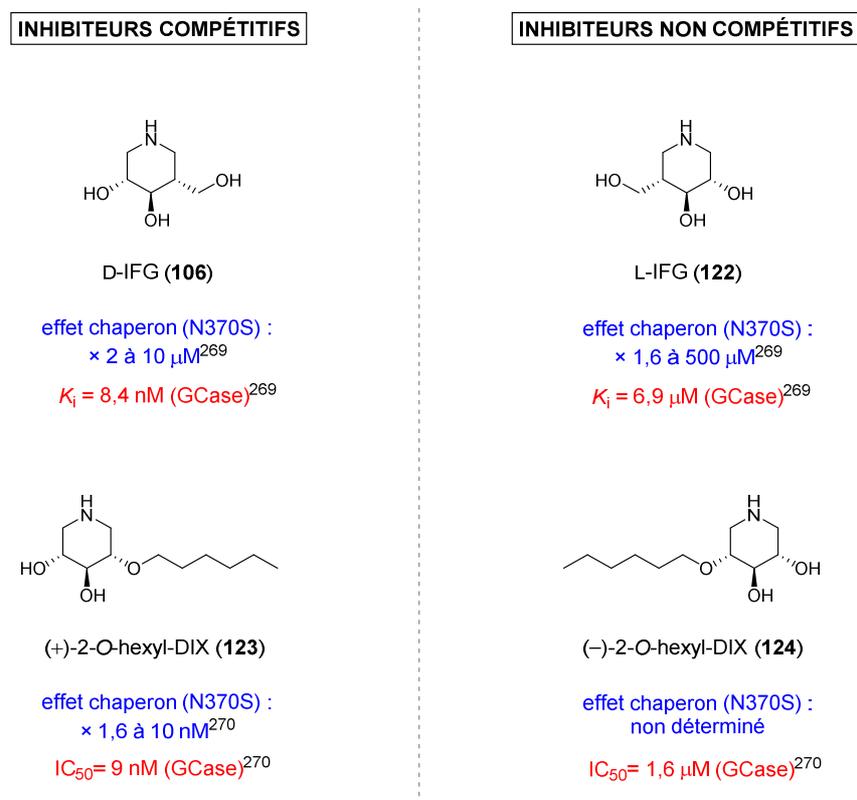


Figure 66. Effet chaperon des deux énantiomères de l'IFG (**106**, **122**)²⁶⁹ et du 2-*O*-hexyl-DIX (**123**, **124**)²⁷⁰ sur la GCCase N370S et leurs activités inhibitrices sur l'enzyme.

Sur la base de ces résultats, nous avons alors conçu un système hétérodivalent possédant à ses extrémités un motif (+)-2-*O*-alkyl-DIX (inhibiteur compétitif) et un motif (-)-2-*O*-alkyl-DIX (inhibiteur non compétitif) reliés entre eux par un bras espaceur de longueur variable. En adaptant la longueur de ce bras espaceur, ce système pourrait donc se lier à la fois au site actif de la GCCase et à un site secondaire (**Figure 67**). Le but d'un tel composé hétérodivalent était double, premièrement celui-ci a été conçu comme un outil moléculaire afin d'identifier le site de fixation non-compétitif de la GCCase. En effet, étant donné que la structure de la GCCase est connue, les données de longueur de bras couplées aux activités inhibitrices/chaperon pourraient permettre dans un premier temps d'évaluer à quelle distance du site actif le site secondaire se situe, puis sa position pourrait dans un second temps être déterminée par modélisation moléculaire. Enfin, des expériences de co-cristallisation enzyme-inhibiteur pourraient être envisagées pour apporter une preuve définitive de sa localisation et connaître les interactions entre le motif (-)-2-*O*-alkyl-DIX et ce dernier. Une fois ce site et les interactions identifiés, il serait alors possible de concevoir de façon rationnelle des composés encore plus affins pour ce site, si possible activateurs purs, en utilisant différentes techniques de « *docking* » et criblage virtuel. Deuxièmement, ces systèmes hétérodivalents pourraient constituer une nouvelle classe de chaperons pharmacologiques très efficaces dans le cas où la liaison simultanée à ces deux sites donnait lieu à un phénomène d'effet chélate et à de puissants effets chaperons.

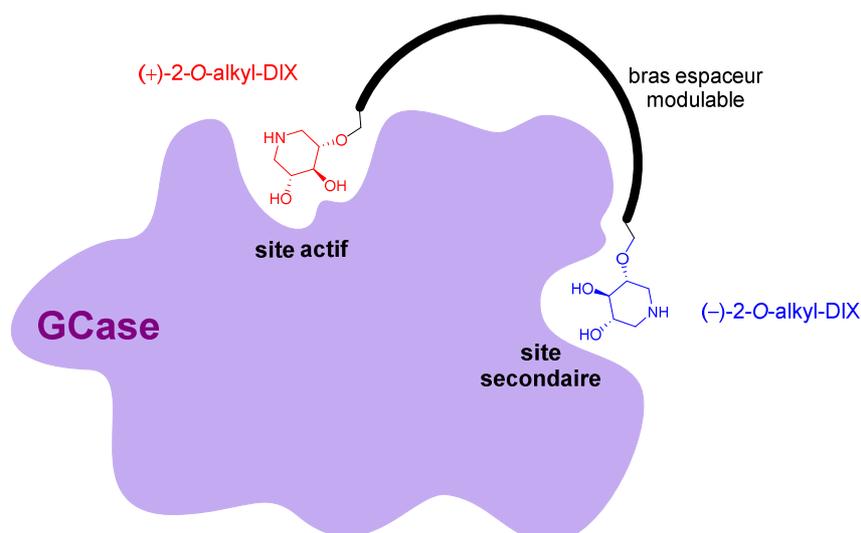


Figure 67. Représentation schématique de la liaison du système hétérodivalent (+/-) au site actif et au site secondaire de la GCCase.

3.2. Exemples de systèmes (hétéro)divalents : le cas de l'acétylcholinestérase et de l'anhydrase carbonique I

Bien qu'aucun composé ciblant simultanément le site actif et un site secondaire d'une glycosidase n'ait été rapporté, ce concept a déjà été appliqué pour d'autres enzymes et l'effet chélate produit a permis d'obtenir une très grande affinité et sélectivité vis-à-vis de l'enzyme visée. Ce concept a notamment été étudié par le groupe de Pang pour l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), une cible prometteuse pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.²⁷¹ Après avoir identifié un site secondaire de l'AChE par modélisation, cette équipe a développé des systèmes bifonctionnels

pour cibler simultanément le site actif cette enzyme et ce site secondaire. Ces systèmes étaient composés de deux motifs THA (**125**, 9-amino-1,2,3,4-tétrahydroacridine), un médicament déjà approuvé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, reliés entre eux par une chaîne alkyle (**Figure 68**). Finalement, le composé possédant une longueur de chaîne alkyle optimale (**126**) a démontré que la liaison au site secondaire donnait lieu à une augmentation d'affinité d'un facteur 1000 par rapport au composé **125** ainsi qu'un gain de sélectivité d'un facteur 10 000 vis-à-vis de la butyrylcholinestérase (BuChE).

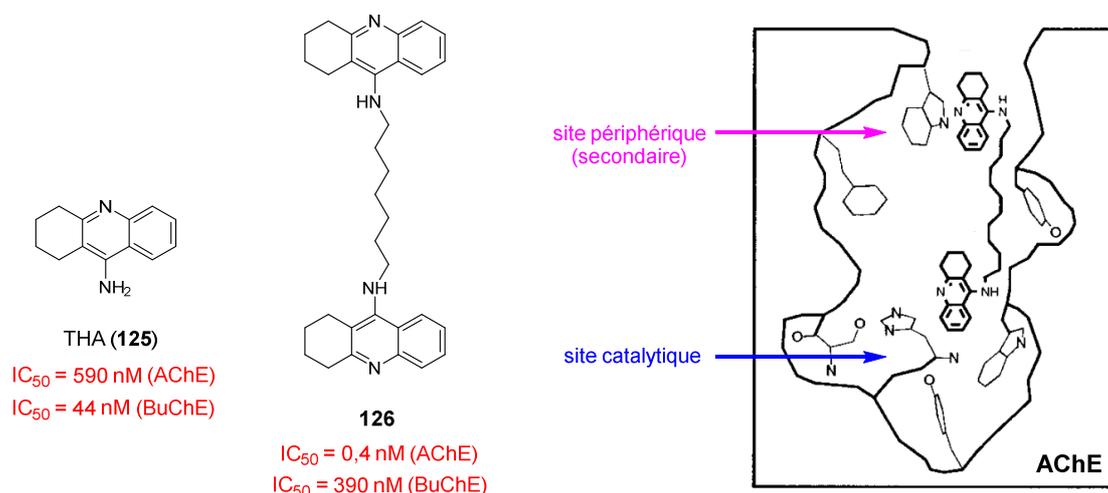


Figure 68. Affinité du composé THA (**125**) et du composé divalent **126** vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BuChE).²⁷¹

Le groupe de Srivastava et Mallik a également rapporté en 2005 la synthèse de systèmes hétérodivalents capables de cibler deux sites de liaison différents de l'anhydrase carbonique humaine I (hCA-I).²⁷² Ces systèmes à deux « têtes » (**127** et **128**) ont été construits à partir du benzènesulfonamide (**129**), un inhibiteur compétitif de l'enzyme, et de l'imino-diacétate de cuivre (II) (IDA-Cu²⁺) qui quant à lui cible un site périphérique de l'enzyme (**Figure 69**). Les mesures d'inhibition de ces deux composés ont démontré que la longueur du bras espaceur devait être optimale pour que le motif IDA-Cu²⁺ interagisse correctement avec le site secondaire. En effet, le composé **127** qui possédait le plus long bras espaceur (29 Å) a montré une affinité pour l'enzyme ($K_i = 1,2 \mu\text{M}$) comparable à celle du benzènesulfonamide ($K_i = 3,3 \mu\text{M}$). Par contre, le composé **128** dont la distance entre le cation Cu²⁺ et le groupement NH₂ était plus optimale (22 Å) s'est montré cent fois plus affiné ($K_i = 0,0027 \mu\text{M}$) que le composé monovalent **129**.

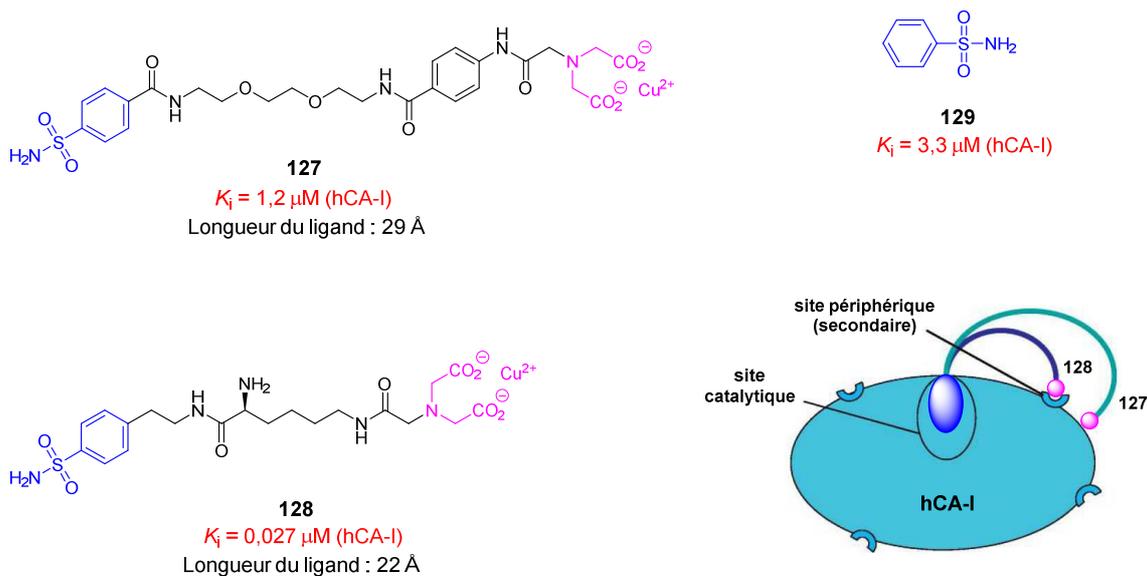


Figure 69. Affinité du composé **129** et des composés hétérodivalents **127** et **128** vis-à-vis de l'anhydrase carbonique humaine I (hCA-I).²⁷²

3.3. Stratégie de synthèse du système hétérodivalent

L'activité du système hétérodivalent que nous avons conçu dépendra *a priori* fortement de la longueur du bras espaceur; en effet, si celle-ci est trop courte, la tête non compétitive (–) n'atteindra pas le site secondaire, au contraire si celle-ci est trop longue, des facteurs entropiques et stériques pourraient défavoriser la liaison avec le site secondaire. Par conséquent, ce paramètre doit pouvoir être facilement modulé afin de trouver rapidement la distance optimale entre les deux têtes de notre système. Dans cette optique, nous avons imaginé une stratégie de synthèse basée sur la chimie click pour laquelle le bras espaceur de longueur variable serait relié successivement à la tête compétitive (+) et à la tête non compétitive (–) (**Schéma 43**). Pour ce faire, une première tête composée d'une fonction alcyne serait reliée au bras espaceur par CuAAC puis l'autre extrémité du bras espaceur serait activée par substitution d'un groupement partant par un azoture. Enfin, une seconde réaction de CuAAC permettrait de greffer la deuxième tête acétylénique et une déprotection des groupements protecteurs conduirait au système hétérodivalent souhaité. Cette stratégie de synthèse a été choisie d'une part pour son efficacité liée à la réaction de CuAAC et d'autre part pour sa convergence car elle permet d'accéder rapidement à un panel de systèmes hétérodivalents de différentes longueurs.

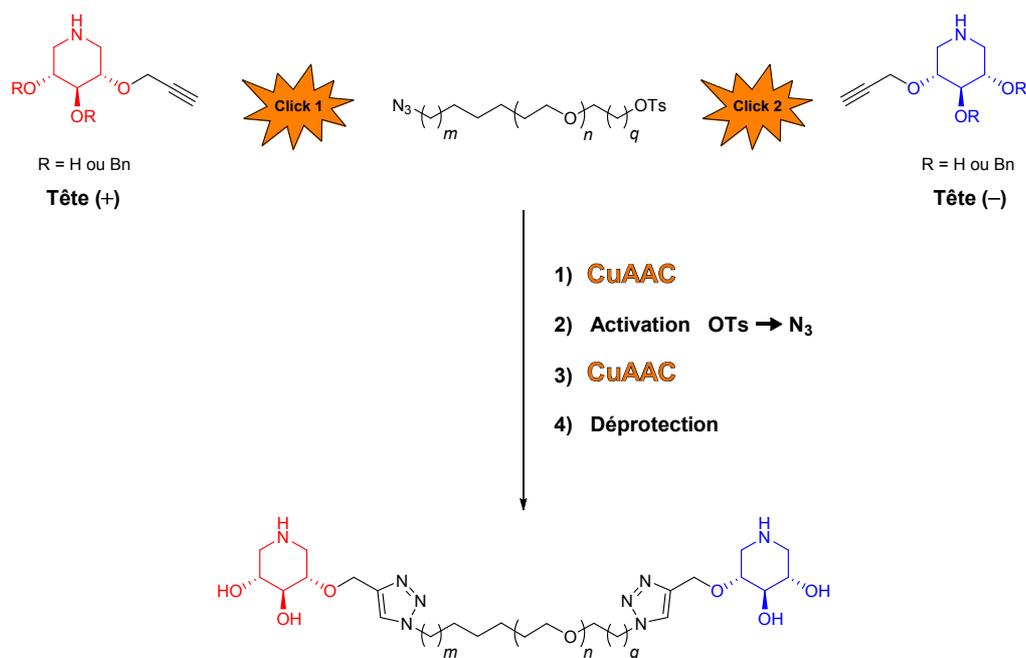


Schéma 43. Stratégie de synthèse de systèmes hétérodivalents basée sur deux réactions successives de CuAAC.

Dans le but de trouver la distance adéquate entre les deux sites de liaisons, nous avons choisi cinq bras espaceurs de longueurs différentes. Dans un premier temps, nous avons envisagé deux bras de type alkyle ($m, q \neq 0$ et $n = 0$) et un bras de type éther ($m, q \neq 0$ et $n = 1$) d'une longueur respectivement de six, dix et treize chaînons; le nombre de chaînons représente ici le nombre d'atomes de carbone et d'oxygène présents entre les deux extrémités du bras. Nous avons également envisagé deux bras espaceurs mixtes composés d'une partie alkyle et d'une partie polyéthylène glycol ($m, n \neq 0$ et $q = 1$) possédant une longueur de 15 et 22 chaînons. Pour ce type de bras, la partie PEG du côté de la tête (-) a été choisie pour prévenir d'éventuels problèmes de solubilité liés à une longueur plus importante, par contre nous avons conservé une partie alkyle lipophile du côté de la tête (+) car il a été démontré que cette dernière était importante pour l'activité inhibitrice et chaperon.²⁶²

Étant donné que cette stratégie de synthèse introduit un lien triazole proche de l'iminosucre, nous avons vérifié dans la littérature que ce dernier n'aurait pas d'influence négative sur l'activité ni sur le mode d'inhibition. En ce qui concerne la liaison au site actif de la GCCase, une étude réalisée par Delgado *et al.* a au contraire montré qu'un dérivé aminocyclitol portant un triazole (**130**) était plus affiné que son analogue sans triazole **131** (**Figure 70**).²⁷³ Les auteurs ont alors suggéré que le triazole interagissait avec un résidu du site actif de la GCCase pour former une liaison hydrogène supplémentaire. Le triazole ne semble pas non plus changer le type d'inhibition car les composés **130** et **131** sont tous deux des inhibiteurs compétitifs. Par ailleurs, au moment de la conception de ces systèmes hétérodivalents, des résultats préliminaires²⁷⁴ dans notre groupe avaient également montré qu'un composé 1- α -C-alkyl-DIX (**132**) comportant un triazole possédait une activité inhibitrice du même ordre de grandeur que son analogue sans triazole (**133**) (**Figure 70**). Le mode d'inhibition de **132** n'avait cependant pas encore été déterminé à ce moment là. En ce qui concerne la liaison au site secondaire, aucune hypothèse n'a pu être avancée étant donné l'absence d'information sur sa structure.

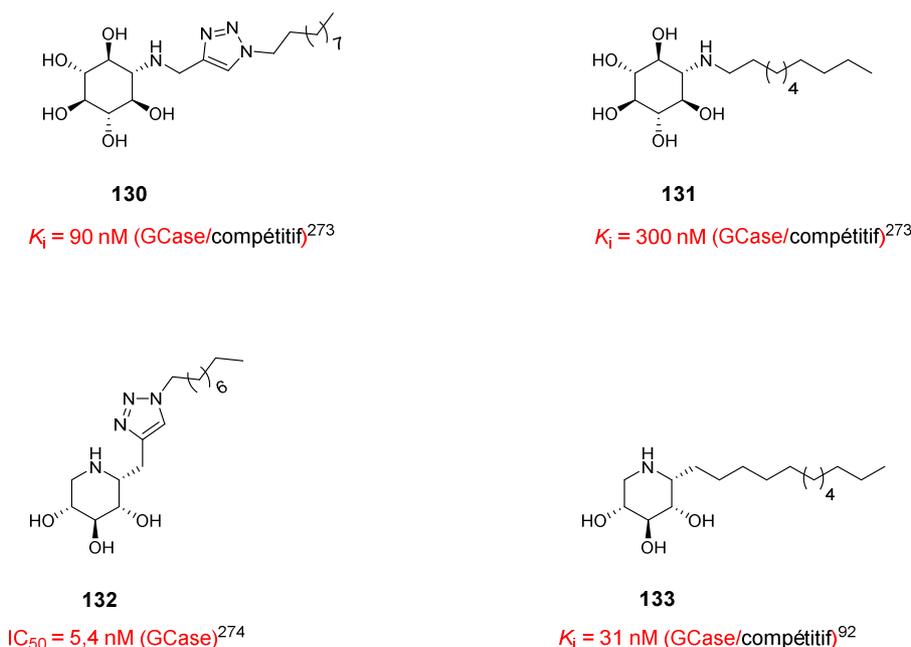


Figure 70. Activités inhibitrices des composés comportant un triazole **130**²⁷³ et **132**²⁷⁴ et de leurs analogues sans triazole **131**²⁷³ et **133**⁹² sur la GCCase.

3.4. Analogues homodivalents et monovalents

Parallèlement, nous avons envisagé de synthétiser des systèmes homodivalents composés de deux têtes identiques [(+/+) ou (-/-)] dans le but de prouver la validité de notre concept si l'un des systèmes hétérodivalents (+/-) possédait une puissante activité inhibitrice/chaperon vis-à-vis de la GCCase (**Figure 71**). Par simple comparaison, nous pourrions en effet vérifier si l'effet observé est dû à une combinaison des deux têtes énantiomères ou à un seul type de tête.

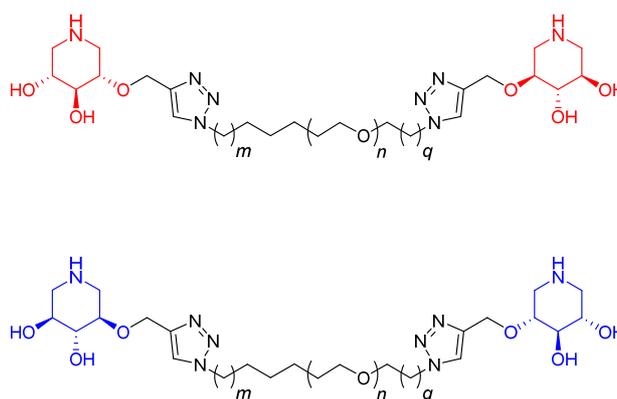


Figure 71. Systèmes homodivalents composés de deux têtes identiques (+/+) ou (-/-).

Pour cette étude, nous avons également envisagé de synthétiser des composés monovalents (+) et (-) afin de vérifier le mode d'inhibition de chaque tête (compétitive ou non-compétitive) et de déterminer la contribution de la partie aglycone sur l'activité inhibitrice/chaperon (**Figure 72**). De plus, si ces composés monovalents se révélaient être des chaperons efficaces, nous pourrions envisager

de nous affranchir de la présence du bras espaceur en utilisant directement un mélange contenant un chaperon monovalent (+) et un chaperon monovalent (-).



Figure 72. Analogues monovalents composés d'une tête (+) ou d'une tête (-).

4. SYNTHÈSE DES DEUX TÊTES ÉNANTIOMÈRES ACÉTYLÉNIQUES

4.1. Une approche synthétique stéréodivergente

Dans un souhait d'efficacité et afin d'obtenir les deux têtes énantiomères acétyléniques **134**, nous avons choisi une stratégie de synthèse énantiodivergente dans laquelle ces deux énantiomères pouvaient être obtenus à partir d'un même intermédiaire : le lactame **135** (Schéma 44). En effet, notre idée consistait à alkyler de façon non sélective les fonctions hydroxyles du lactame **135** pour former deux isomères de position (alkylés en C-2 ou C-4) qui, après séparation, pourraient être réduits pour donner indépendamment les énantiomères (+)-**134** et (-)-**134**. Le D-xylono- δ -lactame **135** pouvait quant à lui être obtenu à partir d'un dérivé commercial du D-glucose, le diacétone-D-glucose, en isolant dans un premier temps les fonctions hydroxyles en position C-2 et C-4 pour former l'intermédiaire **136** puis en introduisant la fonction amide.

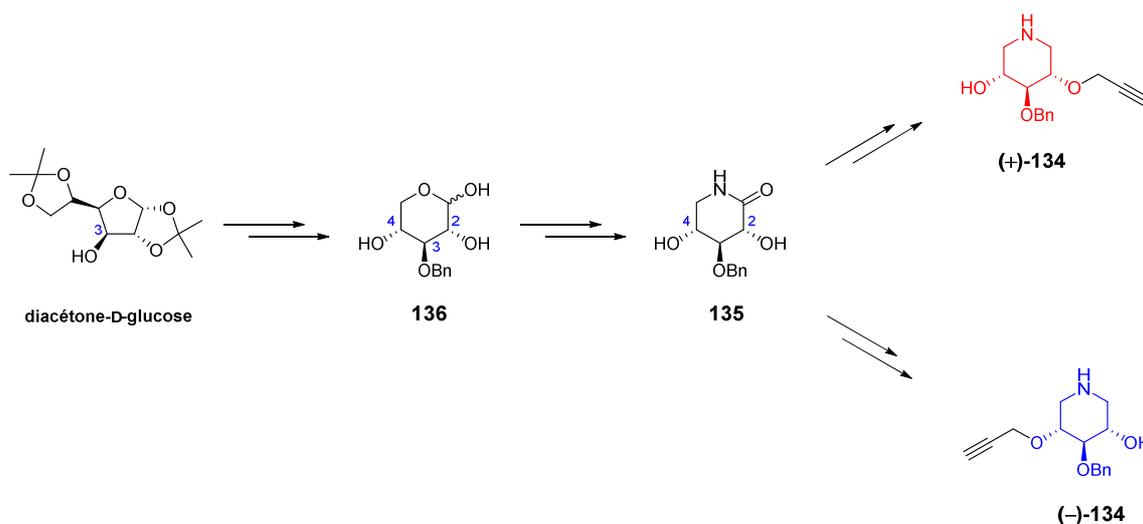


Schéma 44. Stratégie de synthèse des deux têtes énantiomères acétyléniques (+)-**134** et (-)-**134**.

4.2. Synthèse du D-xylose protégé en position C-3

Conformément à la littérature,^{275,276} le D-xylose benzylé **136** a été préparé en cinq étapes à partir du diacétone D-glucose (**Schéma 45**). Dans un premier temps, l'alcool libre du diacétone D-glucose a été protégé avec un groupement benzyle pour donner quantitativement le D-glucofuranose entièrement protégé (**137**). L'acétal terminal du composé **137** a ensuite été déprotégé sélectivement en milieu aqueux acide à une température de 45 °C pour former le diol **138** avec un rendement de 85%. Lors de cette étape, le contrôle de la température est important car le deuxième acétal se clive à une température de 100 °C.²⁷⁷ Le diol a ensuite été engagé dans une réaction de coupure oxydante en présence de NaIO₄ puis, après un traitement rapide, l'aldéhyde intermédiairement formé (**139**) a été réduit avec NaBH₄ pour donner l'alcool primaire **140** avec un rendement quasi-quantitatif. Finalement, le groupement isopropylidène restant a été hydrolysé à l'aide d'une résine acide échangeuse d'ions (Dowex® 50WX8) pour conduire au 3-*O*-benzyl-D-xylopyranose (**136**). Ce dernier a été isolé sous forme d'un mélange d'anomères α et β (30:70) avec un rendement de 91%.

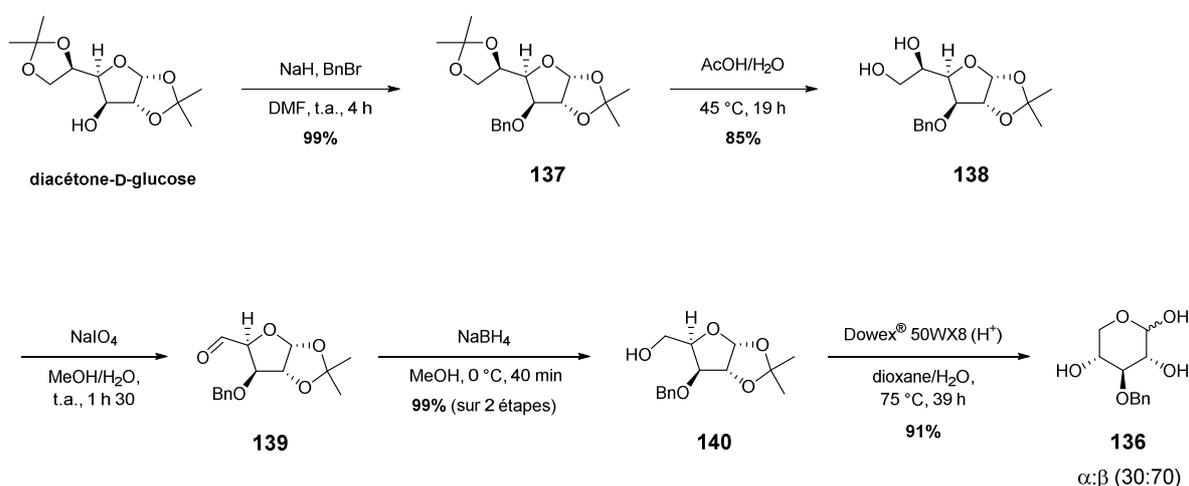
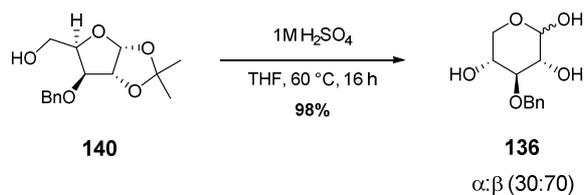


Schéma 45. Synthèse du D-xylose protégé en position C-3 (**136**).

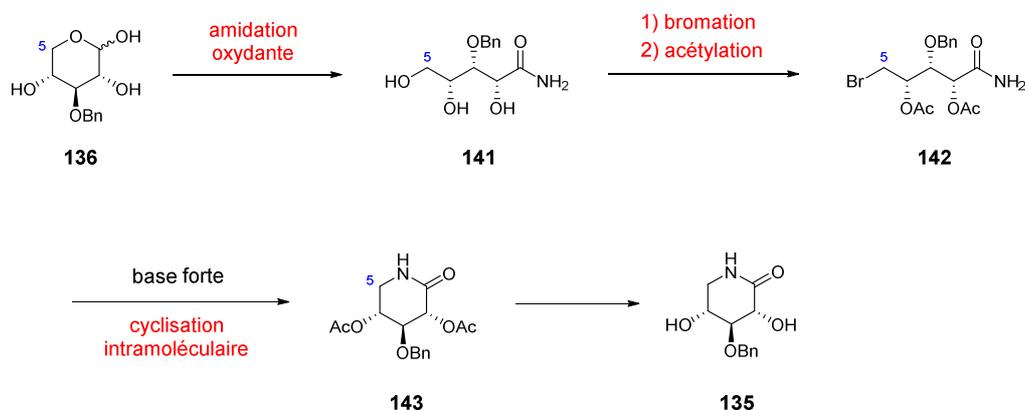
En ce qui concerne la dernière étape d'hydrolyse, nous avons choisi dans un premier temps l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions pour des questions de praticité, car le traitement de la réaction consistait simplement à filtrer le milieu réactionnel hétérogène. Cette méthode est devenue cependant contraignante dès lors que nous avons voulu augmenter l'échelle de la réaction (jusqu'à 60 g de produit de départ). En effet, les grandes quantités de résine requises (> 200 g) devenaient relativement coûteuses et ne permettaient plus une agitation correcte du milieu réactionnel. Par conséquent, nous avons choisi d'optimiser cette étape d'hydrolyse en nous appuyant sur une méthode de déprotection d'acétal décrite dans la littérature.²⁷⁸ Pour ce faire, le D-xylofuranose **140** a été traité avec une solution aqueuse d'acide sulfurique dans le THF et le produit **136** pur a été obtenu avec un rendement de 98% après un simple traitement du milieu réactionnel (**Schéma 46**). Avec cette méthode, le rendement global de la synthèse du 3-*O*-benzyl-D-xylose (**136**) est de 82% pour cinq étapes dont trois sans purification.

Schéma 46. Optimisation de la dernière étape de formation du D-xylose **136**.

4.3. Synthèse du précurseur commun D-xylo- δ -lactame

4.3.1. Première stratégie : amidation oxydante et cyclisation intramoléculaire

Pour ensuite obtenir le D-xylo- δ -lactame **135**, nous nous sommes dans un premier temps appuyés sur une approche développée par Stasik *et al.* où le lactame pouvait être formé par substitution intramoléculaire d'un groupement partant par un amide.²⁷⁹ Pour cela, une étape d'amidation oxydante permettrait d'obtenir tout d'abord l'amide **141** et l'alcool primaire libéré serait ensuite transformé sélectivement en groupement partant par bromation (**142**) (Schéma 47). Finalement, une étape de cyclisation intramoléculaire en présence d'une base forte conduirait au δ -lactame **143**, précurseur acétylé de **135**.

Schéma 47. Stratégie de synthèse du D-xylo- δ -lactame **135** via amidation oxydante et cyclisation intramoléculaire.

a) Étape d'amidation oxydante

Dans la littérature, des réactions d'amidation oxydante ont déjà été rapportées sur des sucres entièrement déprotégés (comme le D-xylose).¹⁷⁸ En nous appuyant sur les conditions décrites, le 3-*O*-benzyl-D-xylose (**136**) a été traité avec du diiode et de l'ammoniaque pour former l'hydroxyamide **141** avec un rendement de 66% (Schéma 48).

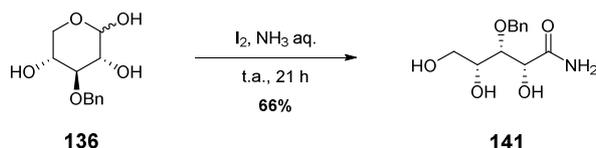


Schéma 48. Réaction d'amidation oxydante pour former l'hydroxyamide **141**.

Deux mécanismes sont possibles pour l'amidation oxydante des aldoses protégés et peuvent être transposés à notre cas pour expliquer la formation de l'hydroxyamide **141** (**Schéma 49**).¹⁷⁷ Le premier mécanisme possible (voie A) fait intervenir une glycosylamine (**E**) formée après condensation de l'ammoniaque sur l'aldose (forme ouverte). Ensuite, l'oxydation de cet intermédiaire par le diiode forme l'imidate **F** correspondant qui, en présence d'eau, conduit à l'hémiorthoamide **G**. Finalement, la rupture de la liaison C₁-O_{endo} permet de former l'amide. Dans l'autre voie possible (voie B), l'aldose est directement oxydé en une δ -lactone **H** et donne, après attaque nucléophile de l'ammoniaque, l'hémiorthoamide **G**. Les travaux de Martin, Compain *et al.* ont pu en partie vérifier ce dernier mécanisme en démontrant que le D-glucopyranose (sous forme tétra-*O*-benzylé) était effectivement oxydé en présence de diiode et de K₂CO₃ pour former la δ -lactone correspondante.¹⁷⁷

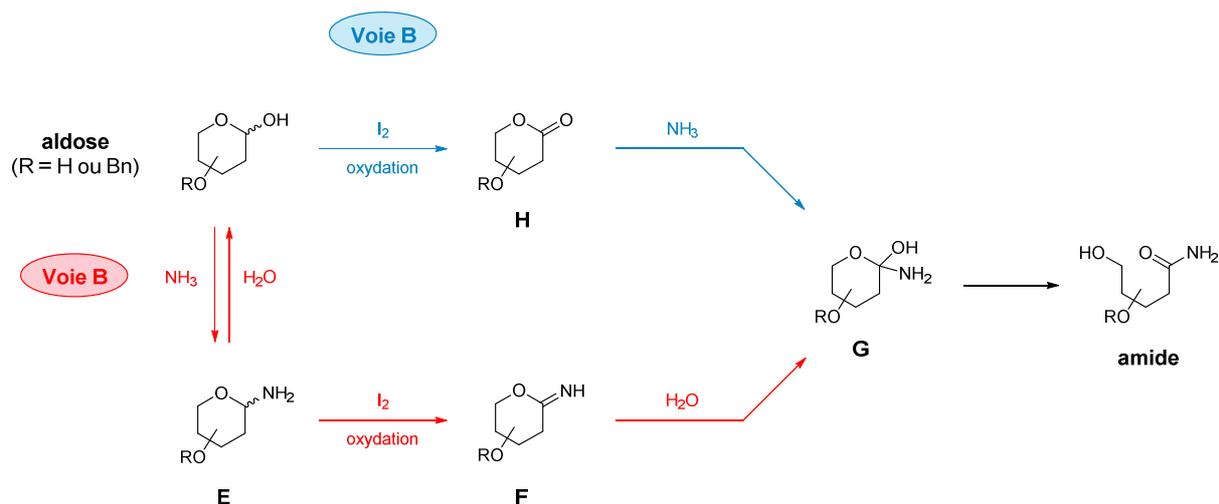


Schéma 49. Mécanismes proposés pour l'amidation oxydante des aldoses.¹⁷⁷

b) Tentatives d'introduction d'un groupement partant (bromure ou tosylo)

Une fois l'hydroxyamide **141** en main, nous avons pu tester des conditions de bromation permettant d'introduire régiosélectivement un bromure sur un diol 1,2.²⁷⁹ Le composé **141** a donc été traité avec du bromure d'acétyle dans le dioxane, cependant malgré plusieurs essais (augmentation du nombre d'équivalents, de la température et du temps de réaction) nous n'avons pas pu former le produit **144** souhaité, précurseur de l'intermédiaire totalement acétylé **142** (**Schéma 50**).

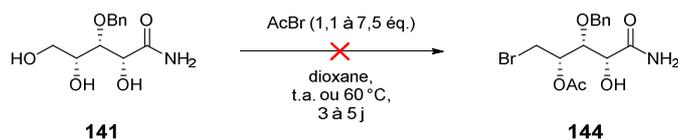


Schéma 50. Tentative de formation du composé bromé **144** par réaction avec AcBr.

Au final, nous ne savions pas si le problème se situait au niveau de la formation de l'intermédiaire acétoxonium **I** ou de l'attaque nucléophile de l'ion bromure (**Schéma 51**). Par conséquent, nous avons choisi de décomposer cette réaction de bromation en deux étapes. Dans un premier temps, la réaction du composé **141** avec le triméthyle orthoacétate nous permettrait de former un intermédiaire dioxolane **I'**. Le traitement de ce dernier avec AcBr donnerait alors l'intermédiaire acétoxonium **I** et l'attaque nucléophile de l'ion bromure libéré sur le carbone électrophile en C-5 permettrait de former le bromoamide **144** souhaité.

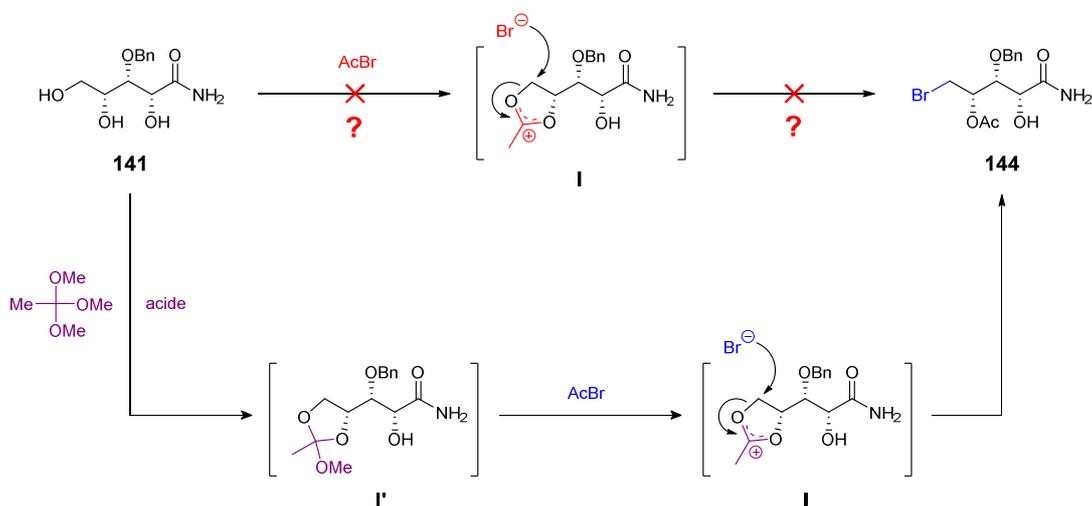


Schéma 51. Stratégie alternative pour obtenir le bromoamide **144**.

En nous appuyant sur des conditions décrites dans la littérature,²⁸⁰ le 1,2-diol **141** a été traité avec le triméthyle orthoacétate en présence d'une quantité catalytique de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ puis, après un traitement rapide, le bromure d'acétyle a été additionné (**Schéma 52**). Ce premier essai n'a pas été concluant et aucun produit bromé n'a pu être isolé après purification. La formation de l'intermédiaire dioxolane pouvant être catalysée soit par un acide de Lewis soit par un acide de Brønsted, nous avons réalisé un nouvel essai en présence d'acide acétique (**Schéma 52**). À l'instar des réactions précédentes, aucun produit de bromation n'a pu être obtenu.

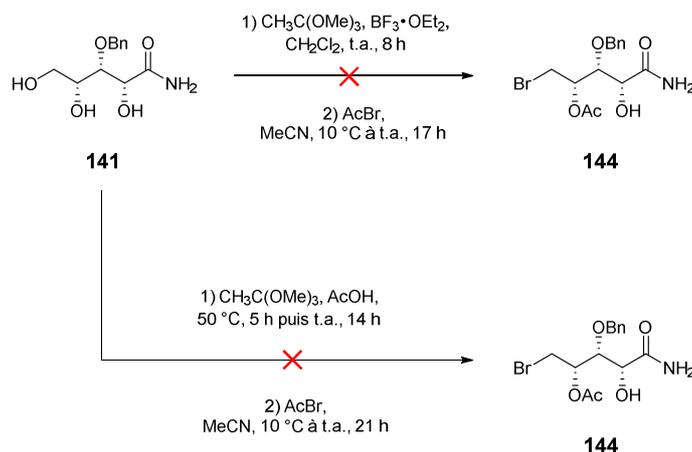


Schéma 52. Tentatives de formation du bromoamide **144** par réaction avec le triméthyle orthoacétate puis AcBr .

Suite aux difficultés rencontrées pour introduire un groupement bromure, nous avons essayé d'introduire sélectivement un autre groupement partant en position C-5. Pour cela, nous avons choisi de tosyler sélectivement l'alcool primaire en présence de TsCl et de pyridine. Les résultats peu concluants obtenus pour cette réaction (mélange de plusieurs produits) nous ont conduits à ne pas approfondir davantage cette étape de tosylation. Finalement, au regard des résultats peu encourageants obtenus pour l'étape d'introduction d'un groupement partant, cette stratégie de synthèse basée des étapes d'amidation oxydante et cyclisation intramoléculaire a été abandonnée afin de concentrer nos efforts sur une nouvelle stratégie plus prometteuse.

4.3.2. Deuxième stratégie : ouverture d'une γ -lactone par l'ammoniaque et cyclisation intramoléculaire

La nouvelle stratégie que nous avons envisagée s'appuie sur les travaux de Lundt *et al.* dans lesquels il a été montré que la réaction entre une ribono- γ -lactone possédant un groupement partant en C-5 et l'ammoniaque permettait de former le ribono- δ -lactame correspondant.²⁸¹ Notre approche consistait donc à former la γ -lactone **145** par oxydation puis à introduire sélectivement un groupement partant en position C-5 pour donner l'intermédiaire **146** (Schéma 53). Après protection de l'alcool secondaire en position C-2, le traitement de l'intermédiaire **147** avec l'ammoniaque permettrait ainsi d'obtenir, après ouverture de la γ -lactone et cyclisation intramoléculaire, le δ -lactame **148** souhaité.

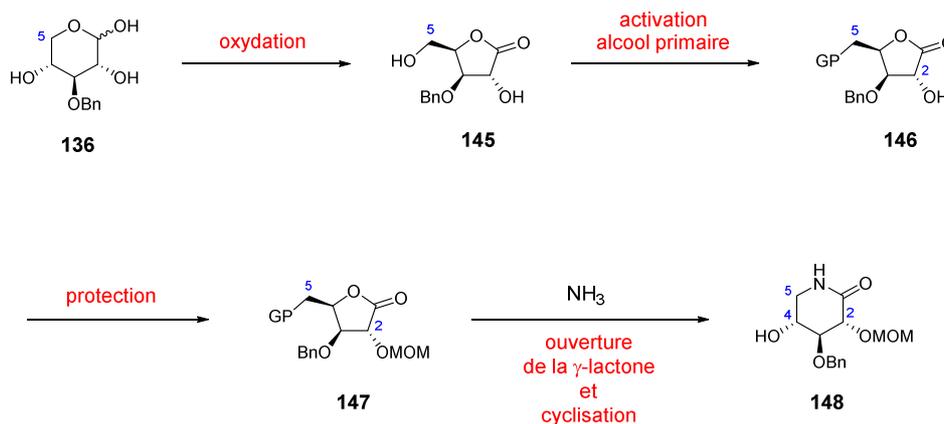


Schéma 53. Stratégie de synthèse du D-xylono- δ -lactame **148** via ouverture d'une γ -lactone par l'ammoniaque et cyclisation intramoléculaire.

a) Essai avec le groupement partant mésitylène sulfonyle

Pour débiter cette synthèse, le D-xylose **136** a été oxydé en présence de dibrome et K_2CO_3 en suivant les conditions décrites dans la littérature²⁸² pour donner la γ -lactone **145** avec un rendement de 78% (**Schéma 54**). Pour activer l'alcool en C-5 en groupement partant, nous avons choisi d'utiliser un groupement mésitylène sulfonyle (Mts), connu pour pouvoir être introduit sélectivement sur les alcools primaires.²⁸³ Après traitement de l'alcool **145** avec MtsCl dans la pyridine pendant plusieurs jours, nous n'avons cependant observé qu'une très faible conversion et le produit **146a** n'a été isolé qu'avec un rendement de 26%. Il est probable que cette faible réactivité soit la conséquence d'une gêne stérique entre le groupement mésitylène sulfonyle et le groupement benzyle.

Avant de tester l'étape de formation du lactame, l'alcool secondaire a été protégé avec un groupement méthoxyméthyle (MOM) en présence de P_4O_{10} et de diméthoxyméthane. Le but de cette protection est d'éviter que l'alcool secondaire ne déplace le groupement partant après ouverture de la lactone et forme un produit secondaire de type oxolane. Finalement, après réaction de la lactone **147a** avec un excès d'ammoniaque dans le THF, nous avons obtenu le D-xylono- δ -lactame protégé **148** avec un rendement de 37%. L'autre produit que nous avons isolé au terme de cette réaction est un 4,5-époxyamide (**149**). Ce composé, connu pour être un intermédiaire de cette réaction,²⁸¹ est formé à la suite de l'ouverture de la lactone par l'ammoniaque et de la substitution du groupement mésitylène sulfonyle par l'alcool libéré en position C-4. Ce résultat suggèrait que la réaction avait été arrêtée trop tôt et qu'il était par conséquent nécessaire d'augmenter le temps de réaction. À cause de l'efficacité limitée de l'étape de sulfonation, la quantité de lactone **147a** était cependant insuffisante pour réaliser un nouvel essai. Ainsi, dans le but d'obtenir l'intermédiaire **147** en plus grande quantité et de façon plus efficace, nous avons choisi d'introduire un autre groupement partant en position C-5.

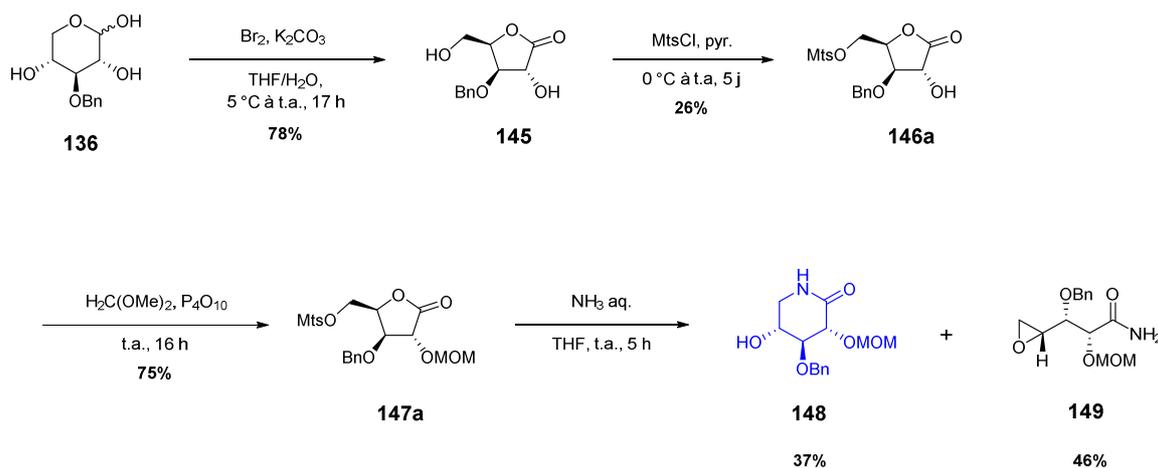


Schéma 54. Synthèse du D-xylono- δ -lactame protégé **148** et du 4,5-époxyamide **149** en utilisant le groupement partant mésitylène sulfonyle.

b) Changement de groupement partant pour un groupement iodure

Pour transformer efficacement l'alcool en C-5 en bon groupement partant, nous avons choisi de réaliser une réaction d'iodation sélective en présence de diiode, triphénylphosphine et pyridine. Un premier essai réalisé avec le composé **145** nous a permis d'obtenir le produit mono-iodé souhaité (**146b**) avec un rendement de 43% accompagné d'un produit secondaire qui ne correspondait cependant pas au produit di-iodé (**Schéma 55**). Après élucidation de sa structure par RMN et HRMS, il s'est avéré que le produit **150** correspondait au produit de désoxygénation de l'alcool secondaire en position C-2.

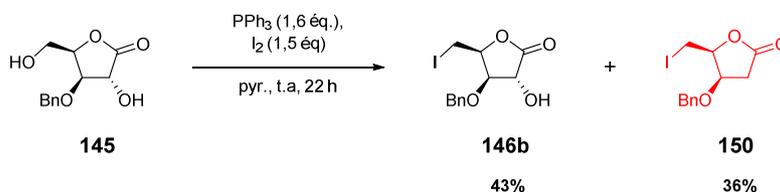


Schéma 55. Premier essai d'iodation du composé **145**.

La formation de ce produit secondaire peut être expliquée de la façon suivante : après iodation des deux alcools, il est possible qu'un ion iodure présent en solution réagisse avec le composé di-iodé **J** pour former un intermédiaire énolate **K** (**Schéma 56**). Cet intermédiaire peut alors se protoner en captant un proton des espèces présentes en solution (ion pyridinium ou acide iodhydrique) et donner le produit désoxygéné **150**. Si l'on admet ce mécanisme, cette réaction de désoxygénation est par conséquent spécifique des alcools en α -position d'un groupement carbonyle. Dans la littérature, Rauter *et al.* ont été le seul groupe à rapporter une telle réaction de désoxygénation et à étudier son champ d'application sur plusieurs composés α -hydroxy-carbonylés (α -hydroxy-ester, -lactone et -cétone). Les conditions utilisées par ce groupe impliquaient notamment un large excès de I_2 , de PPh_3 et d'imidazole (3 éq./4 éq./4 éq.).

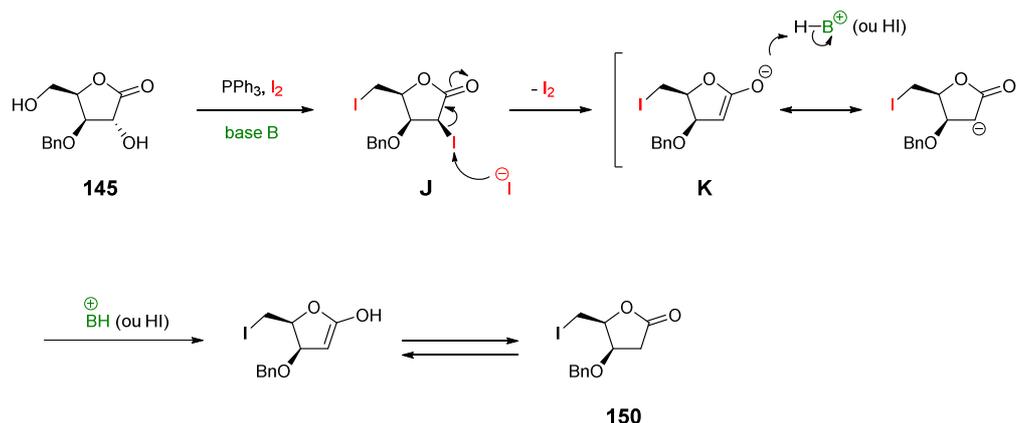


Schéma 56. Mécanisme proposé pour la formation du produit secondaire **150**.

Pour optimiser la réaction d'iodation de l'alcool primaire et limiter la formation du produit désoxygéné **150**, nous avons dans un premier temps réduit les quantités de réactifs; I_2 et PPh_3 ont donc été utilisés en quantités équimolaires. En ce qui concerne la base, nous avons opté pour un système imidazole (1,5 éq.) dans le THF à la place de la pyridine qui était en large excès en tant que solvant. Après 19 heures de réaction dans ces conditions, nous n'avons observé aucune formation du produit secondaire **150**. La conversion de la réaction n'était cependant pas totale puisque le produit **146b** a été isolé avec un rendement de seulement 58% (Schéma 57). Afin d'augmenter la conversion, nous avons décidé de chauffer le milieu réactionnel. Après 4 heures de réaction à 60 °C, la conversion n'étant toujours pas complète, nous avons augmenté les quantités de réactifs en additionnant 0,2 éq. de I_2 et 0,2 éq. de PPh_3 et chauffé le milieu réactionnel pendant deux heures supplémentaires. Finalement, ceci nous a permis d'isoler le composé iodé **146b** avec un rendement de 90% sans aucune trace de produit de secondaire.

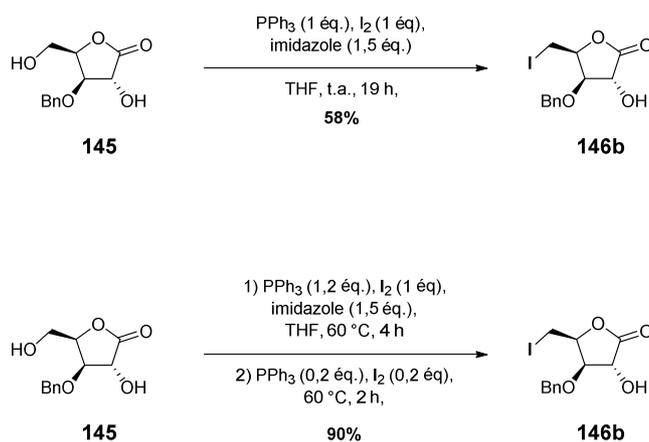


Schéma 57. Optimisation de la réaction d'iodation du composé **145**.

c) Optimisation de l'étape de formation du lactame

Après avoir protégé l'alcool secondaire du composé **146b** par un groupement MOM et obtenu l'intermédiaire **147b** avec un rendement de 85% (Schéma 58), nous avons donc voulu tester l'influence d'un temps de réaction plus long sur la formation du lactame. Pour ce nouvel essai, la

réaction a cependant été arrêtée au bout de seulement 1 h 30 car nous avons observé en CCM la formation d'un produit qui ne correspondait ni au lactame **148** ni à l'époxyamide **149**. Ce nouveau produit, identifié comme étant le 4-hydroxy-5-iodoamide **151**, est le produit d'ouverture de la lactone par l'ammoniaque qui peut conduire à l'époxyamide **149**. Après purification, les intermédiaires **151**, **149** et le lactame **148** ont été isolés respectivement avec un rendement de 68%, 16% et 8%. Ce résultat démontrait clairement que le temps de réaction est un facteur déterminant pour la formation du lactame.

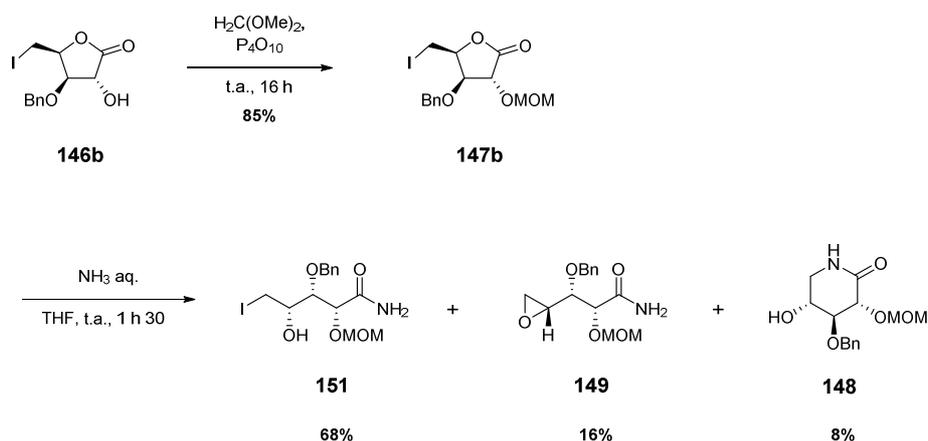


Schéma 58. Synthèse du δ -lactame **148**, du 4,5-époxyamide **149** et du 4-hydroxy-5-iodoamide **151** en utilisant le groupement partant iodure.

Par la suite, nous avons traité la lactone **147b** avec l'ammoniaque pendant 26 heures (**Schéma 59**). Ceci nous a permis d'isoler 56% de lactame et 33% d'hydroxyiodoamide. Dans ce cas là, nous n'avons pas observé la formation de l'époxyamide. En vue d'une nouvelle optimisation, le temps de réaction a été augmenté jusqu'à 44 heures et le THF a été remplacé par un solvant plus polaire, le DMF. Dans ces conditions, nous avons observé la formation de 86% de lactame et d'une petite quantité d'hydroxyiodoamide (6%). Au regard du rendement relativement satisfaisant obtenu pour le lactame, nous avons choisi de ne pas optimiser davantage cette réaction.

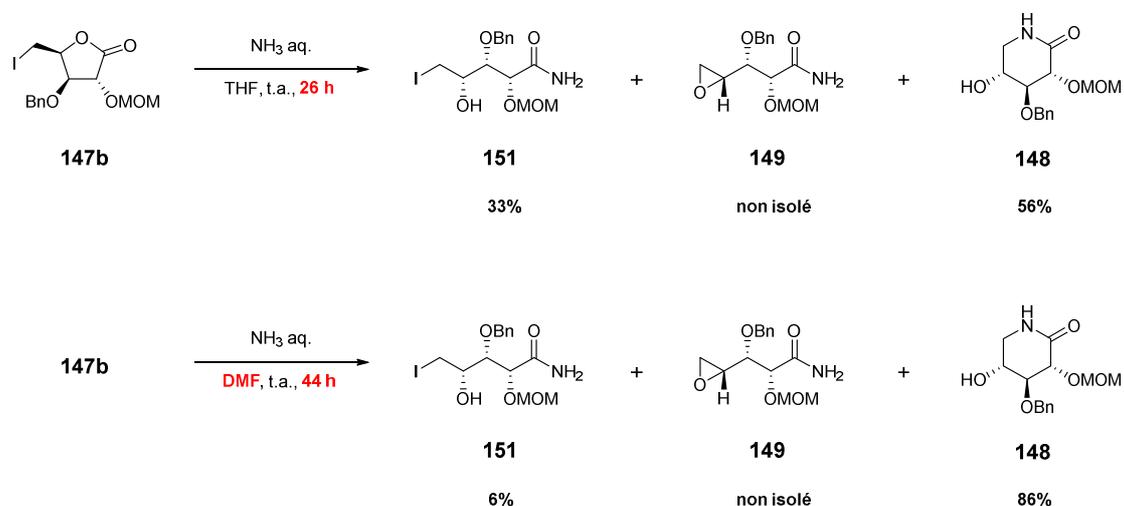


Schéma 59. Optimisation de la formation du δ -lactame **148**.

d) Aspect mécanistique

Une fois la formation du lactame optimisée, nous avons voulu vérifier que les deux intermédiaires isolés (**149** et **151**) permettaient effectivement de conduire au lactame **148**. Dans un premier temps, nous avons traité l'hydroxyiodoamide **151** avec K_2CO_3 car cela permettait de reproduire les conditions basiques faibles du milieu ammoniacal tout en évitant la formation du lactame **148** (Schéma 60). Nous avons alors isolé, comme nous l'attendions, l'époxyamide **149** avec un rendement de 91%. L'époxyamide a ensuite été placé dans les conditions optimisées décrites précédemment (NH_3 aq./DMF), ce qui a permis de former le lactame **148** avec 77% de rendement.

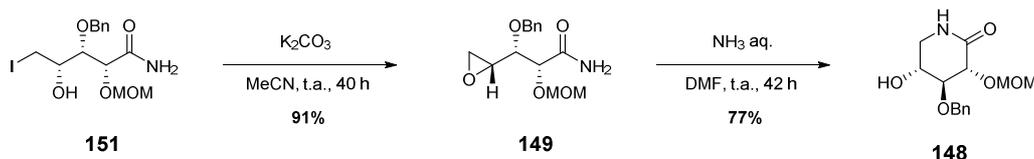


Schéma 60. Formation du lactame **148** à partir de l'époxyamide **149**, lui-même formé à partir de l'hydroxyiodoamide **151**.

Couplés aux différents travaux de la littérature,^{281,284,285} ces résultats nous ont permis de déterminer quelles étaient les différentes étapes de formation du lactame en présence d'ammoniaque. Dans un premier temps, l'ammoniaque vient donc ouvrir la lactone en s'additionnant sur le carbonyle et former l'intermédiaire hydroxyiodoamide **151** (Schéma 61). Dans un deuxième temps, la substitution nucléophile du groupement iode par l'alcool permet de pour former un second intermédiaire, l'époxyamide **149**. Cet époxyde est ensuite ouvert par l'ammoniaque au niveau du carbone le moins encombré pour donner le 5-aminoamide **L**, puis le lactame **148** est finalement formé par transamidation.

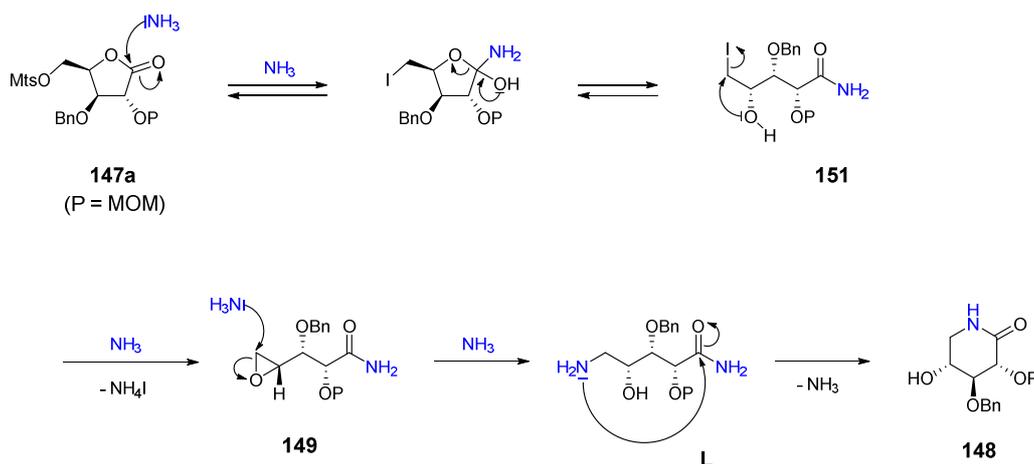


Schéma 61. Mécanisme proposé pour la formation du lactame **148** dans le cas de l'utilisation du groupement partant iode.

4.4. Synthèse divergente des deux têtes acétyléniques

Alors que la stratégie initiale reposait sur une alkylation non régiosélective pour synthétiser les deux têtes acétyléniques, nous avons finalement décidé de tirer profit du fait que le lactame **148** était orthogonalement protégé à l'issue de sa formation et possédait déjà une fonction hydroxyle isolée en C-4. Cette nouvelle approche débiterait donc par la réduction du lactame en un précurseur clé imino-D-xylitol (**152**) qui nous permettait d'obtenir de façon divergente les deux dérivés *O*-propargyl-DIX **153** et **154** *via* trois étapes de protection/déprotection/propargylation (**Schéma 62**).

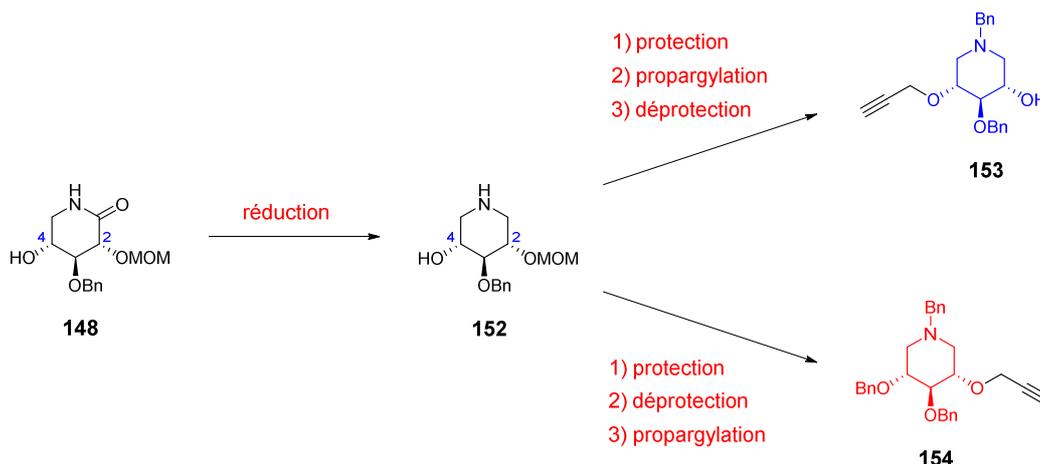


Schéma 62. Stratégie de synthèse divergente pour obtenir les deux têtes acétyléniques **153** et **154**.

La réduction du lactame **148** en iminoxylitol **152** a donc été réalisée à l'aide de LiAlH_4 puis, afin d'isoler la fonction hydroxyle en C-4, la fonction amine a été protégée sélectivement avec un groupement benzyle en présence de BnBr et K_2CO_3 (**Schéma 63**). Le composé **155** a ensuite été propargylé en présence de NaH et de bromure de propargyle pour donner le produit **156** avec un rendement de 87%. Finalement, l'hydrolyse acide du groupement MOM a permis d'obtenir la première tête possédant une fonction alcyne vrai (**153**) avec un rendement global de 62% (à partir du lactame **148**).

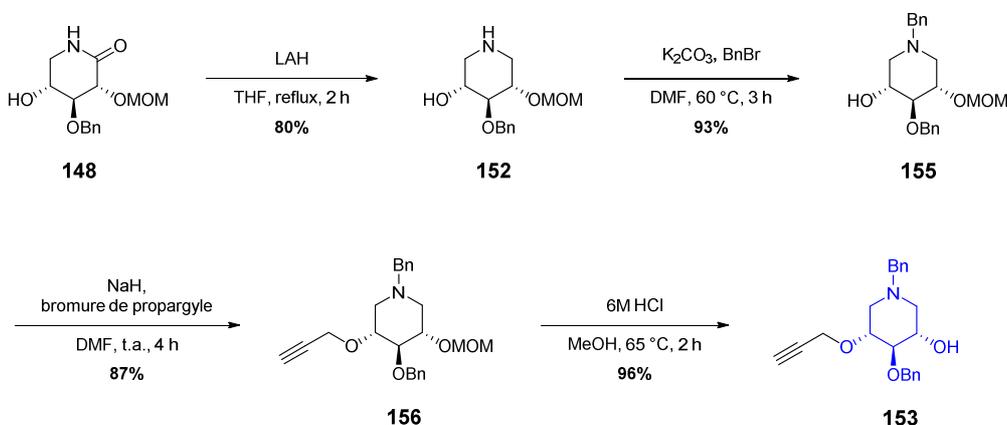


Schéma 63. Synthèse du dérivé 4-*O*-propargyl-DIX (**153**).

Pour obtenir la seconde tête activée **154** (Schéma 64), la fonction hydroxyle en C-2 du composé **152** a été isolée en benzylant les fonctions hydroxyle et amine (**157**) puis en hydrolysant le groupement protecteur MOM pour donner le composé **158**. L'alcool libéré a ensuite été propargylé pour donner le dérivé 2-*O*-propargyl-DIX (**154**) avec un rendement global de 51% (à partir du lactame **148**).

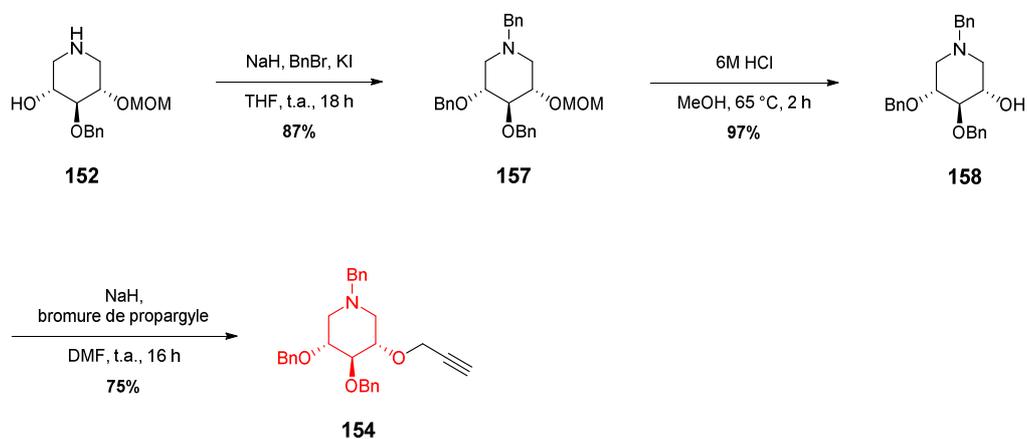


Schéma 64. Synthèse du dérivé 2-*O*-propargyl-DIX (**154**).

5. SYNTHÈSE DES SYSTÈMES HÉTÉRODIVALENTS, HOMODIVALENTS ET MONOVALENTS

5.1. Systèmes hétérodivalents avec un bras espaceur à 6 ou 10 chaînons (type alkyle)

Les deux bras espaceurs de type alkyle à six ou dix chaînons ont été synthétisés en suivant les conditions décrites dans la littérature.^{286,287} Pour cela, le 6-chlorohexanol et le 10-bromodécanol ont été traités avec NaN₃ pour obtenir les azotures correspondants **159** et **160** (Schéma 65). L'alcool terminal a ensuite été tosylé en présence de Et₃N et de TsCl pour donner les bras espaceurs en C₆ et C₁₀ (**161** et **162**) respectivement avec un rendement de 80% et 68% sur deux étapes.

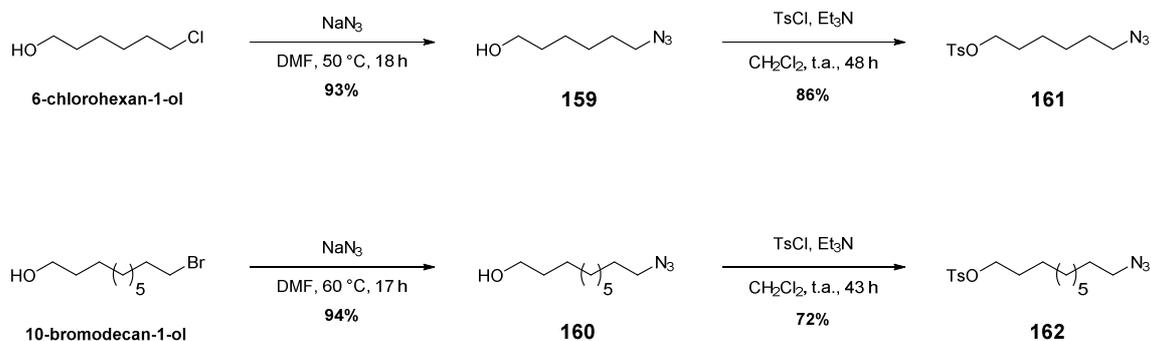


Schéma 65. Synthèse des bras espaceurs de type alkyle **161** et **162**.

Une première réaction de CuAAC a ensuite permis de relier les bras espaceurs **161** et **162** avec la première tête activée **153** (Schéma 66). Les tosylates **163a** et **163b** formés ont ensuite été traités avec NaN₃ pour introduire un groupement azoture à l'extrémité du bras espaceur et former les intermédiaires activés **164a** et **164b**. Enfin, la deuxième tête possédant une fonction alcyne vrai (**154**) a été greffée au bras espaceur *via* une seconde réaction de CuAAC pour donner les composés hétérodivalents protégés **165a** et **165b** avec un même rendement global de 47%.

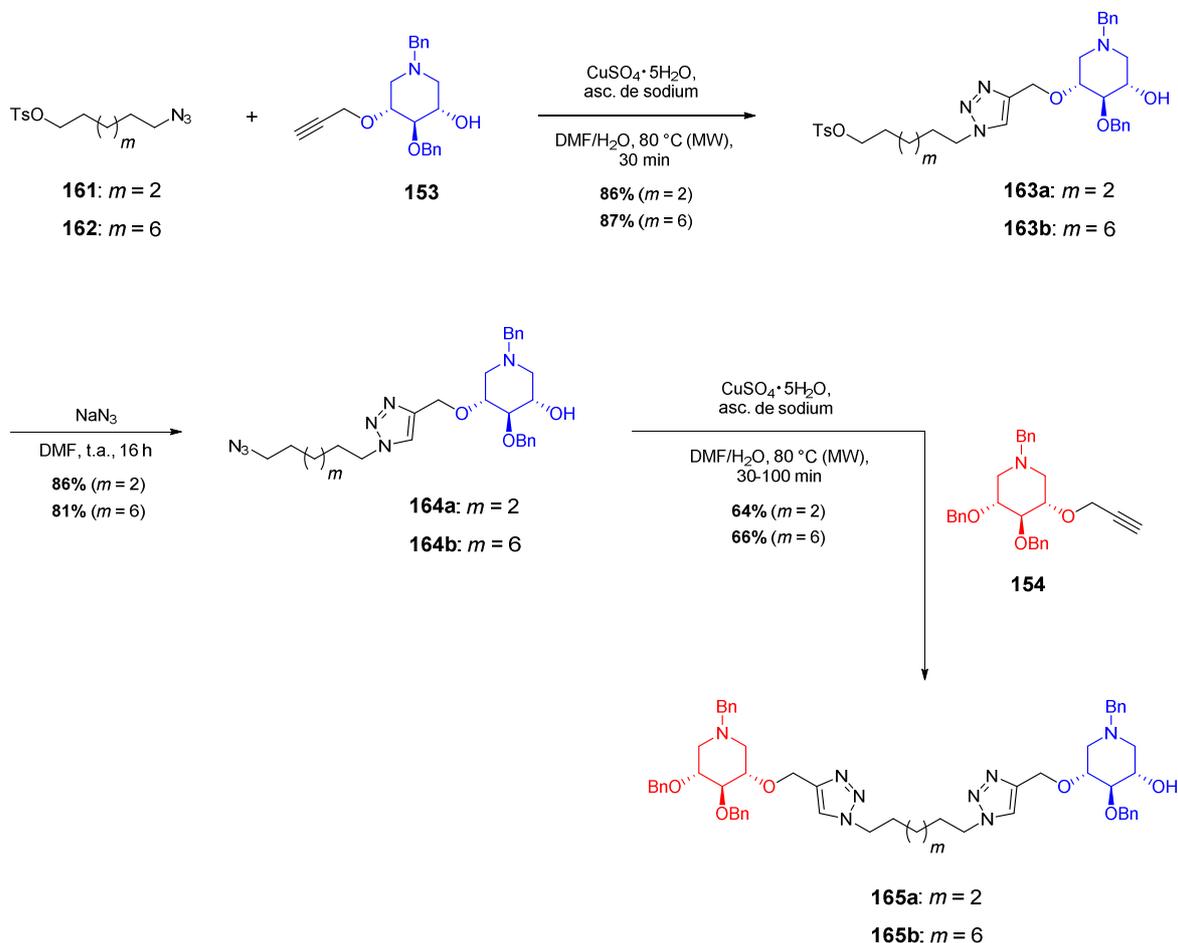


Schéma 66. Synthèse des systèmes hétérodivalents protégés **165a** et **165b** par CuAAC.

Pour obtenir le produit entièrement déprotégé **166a** possédant un bras en C₆, nous avons ensuite procédé en deux temps. Les groupements *O*-benzyles ont tout d'abord été déprotégés à l'aide de BCl₃ dans des conditions classiques,²⁵⁶ puis les groupements *N*-benzyles ont été déprotégés *via* une réaction d'hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon²⁷⁰ pour donner le premier système hétérodivalent **166a** avec un rendement de 70% sur deux étapes (Schéma 67). Le choix de l'isopropanol comme solvant pour l'hydrogénolyse a été fait dans le but de prévenir la formation de produit secondaire *N*-méthylé qui pourrait avoir lieu avec l'utilisation du méthanol.²⁸⁸ Finalement, après purification, le produit a été traité avec une résine basique échangeuse d'ions (Amberlite® IRA400) afin de neutraliser le sel de chlorhydrate formé avec l'acide.

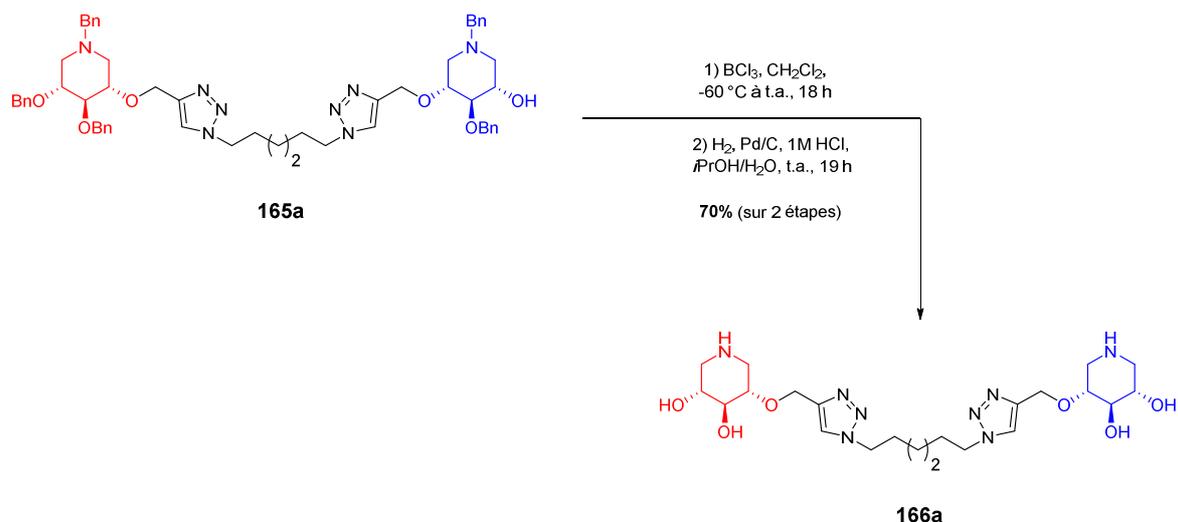


Schéma 67. Synthèse du composé **166a** déprotégé.

Cette méthode de déprotection a ensuite été appliquée au composé **165b** qui possédait un bras espaceur en C_{10} . Après réaction avec BCl_3 , nous nous sommes cependant aperçus en analysant le brut réactionnel en RMN ^1H que la réaction était incomplète et qu'il restait un groupement *O*-benzyle non déprotégé (Schéma 68). Étant donné que BCl_3 avait déjà été utilisé en grand excès (8 éq.), nous n'avons pas réalisé de nouvel essai avec ce réactif. De plus, il existe des cas où des groupements *O*-benzyles présents sur des iminosucres ne peuvent pas être déprotégés avec BCl_3 .²⁸⁹

Le composé partiellement benzylé **167** a donc été traité dans des conditions classiques d'hydrogénolyse en présence de Pd/C (Schéma 68). Après plusieurs jours de réaction, la déprotection s'est révélée être difficile et les analyses RMN montraient toujours la présence d'un groupement *O*-benzyle; les fonctions amines avaient quant à elles été correctement déprotégées. Pour forcer la *O*-débenzylation de **168**, nous avons alors la possibilité de réaliser la réaction à une plus haute pression de dihydrogène ou changer de catalyseur. Tout bien considéré, nous avons choisi d'utiliser le catalyseur de Pearlman (hydroxyde de palladium sur charbon) qui est aussi largement utilisé pour l'hydrogénolyse des groupements benzyles. Ces nouvelles conditions nous ont finalement permis d'obtenir le composé entièrement déprotégé **166b** avec un rendement de 39% sur trois étapes. Ce faible rendement est sans doute dû à une perte de produit au cours des différentes étapes de déprotection.

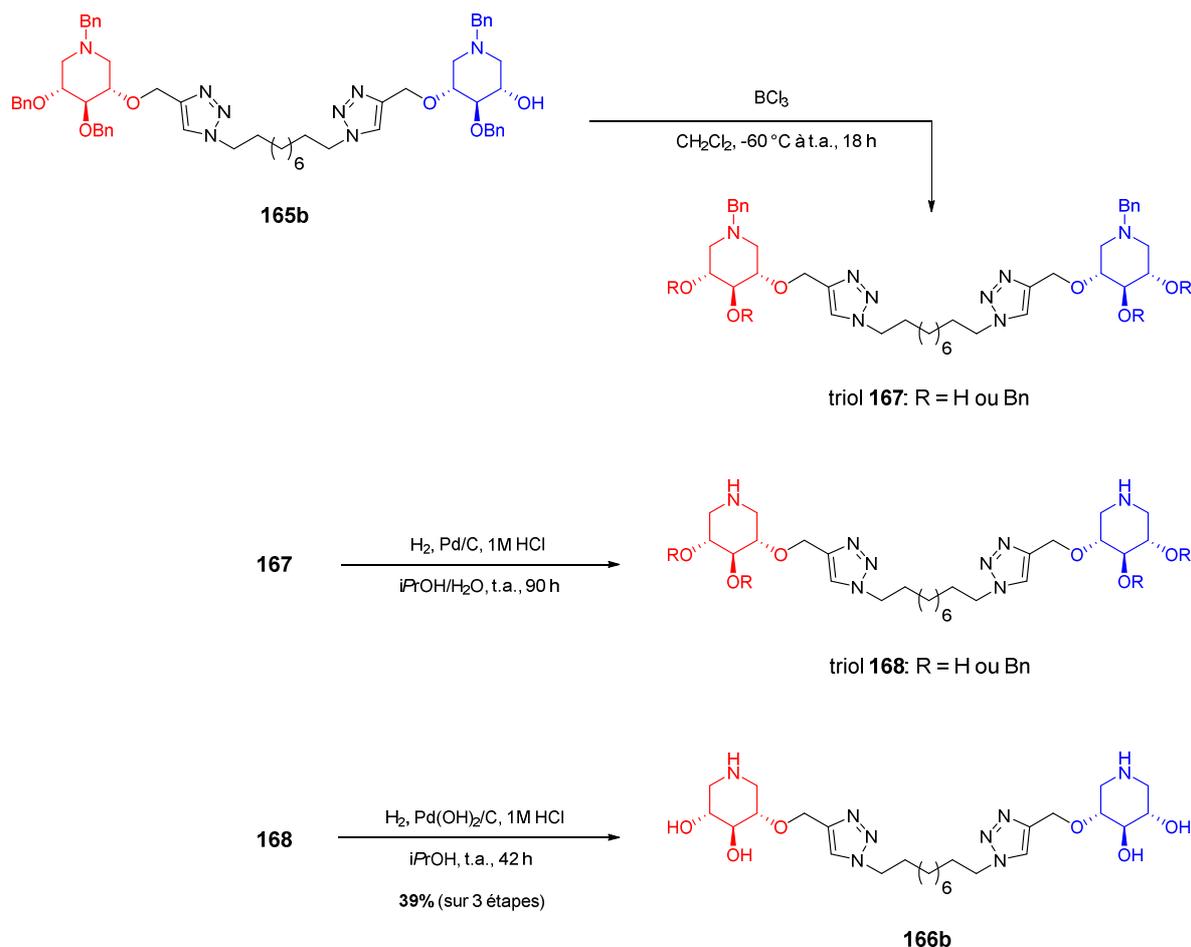
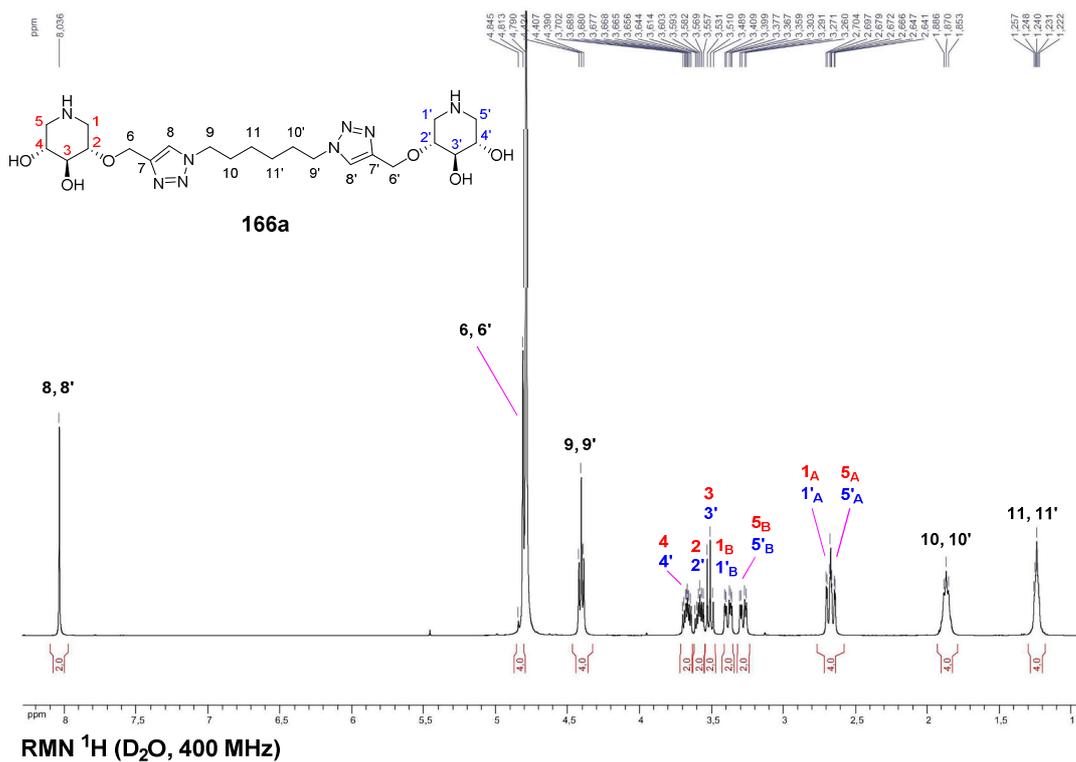
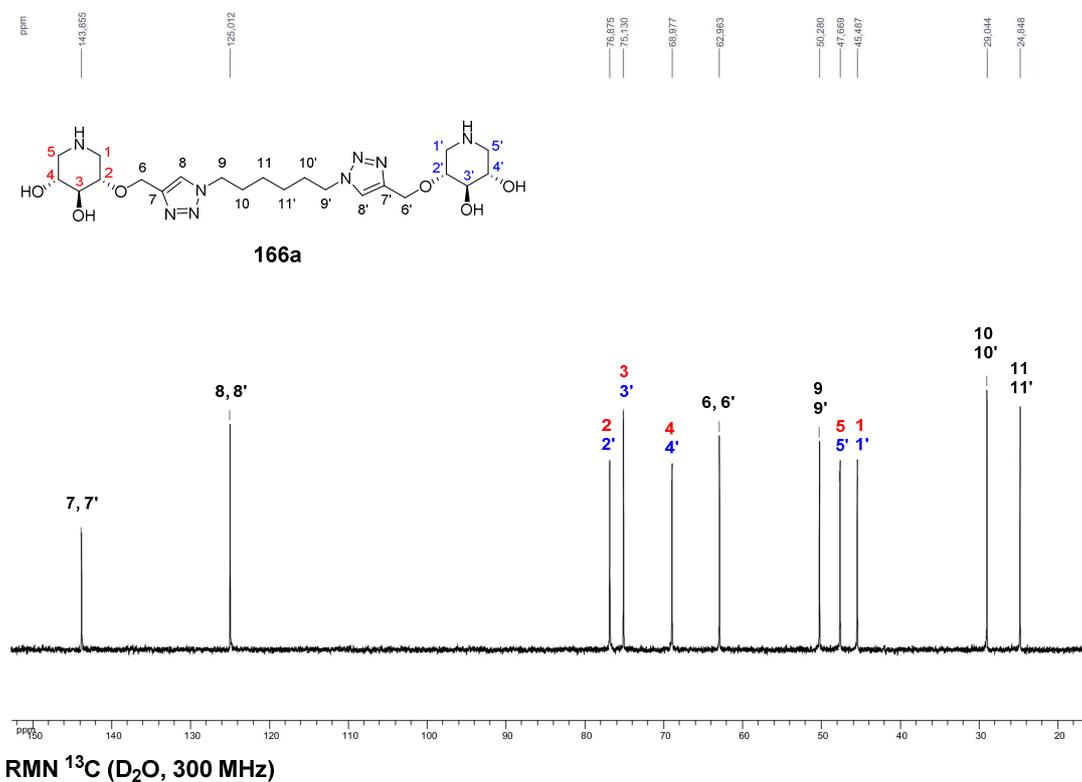


Schéma 68. Formation du composé déprotégé **166b** après plusieurs essais de déprotection des groupements benzyles.

Pour confirmer la structure des deux premiers composés hétérodivalents **166a** et **166b**, nous avons réalisé des analyses RMN ^1H , RMN ^{13}C et RMN 2D. L'attribution des signaux en RMN ^1H et RMN ^{13}C a été facilitée par le fait que ces molécules possèdent un plan de symétrie perpendiculaire au bras espaceur et passant par son milieu, ce qui fait que les protons et carbones de part et d'autre de ce plan sont équivalents. Pour illustrer ceci, les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **166a** sont présentés en **Figure 73**. En raison de ce plan de symétrie, les molécules **166a** et **166b** sont également achirales. L'absence d'activité optique a été confirmée pour chacun de ces composés avec la mesure d'un pouvoir rotatoire nul.



RMN ^1H (D_2O , 400 MHz)



RMN ^{13}C (D_2O , 300 MHz)

Figure 73. Spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé hétérodivalent **166a** dans le D_2O .

5.2. Système hétérodivalent avec un bras espaceur à 13 chaînons (type éther)

Pour obtenir le système hétérodivalent possédant un bras espaceur à treize chaînons, notre approche consistait à relier deux bras espaceurs à six chaînons (**159** et **161**) qui avaient précédemment été synthétisés. Dans un premier temps, nous avons donc relié l'azidoalcool **159** à la tête acétylénique **154** pour former un intermédiaire (**169**) possédant une fonction hydroxyle à l'extrémité du bras (Schéma 69). L'étape suivante consistait à introduire par substitution nucléophile la seconde partie du bras espaceur qui était déjà activée. Pour cela, l'alcool **169** a été traité avec NaH puis le tosylate **161** a été additionné. Au bout de plusieurs heures de réaction à température ambiante puis à reflux, nous n'avons observé qu'une très faible conversion et le produit composé d'un bras espaceur de type éther (**170**) n'a été isolé qu'avec un rendement de 4%. Lors d'un second essai, l'utilisation du DMF comme solvant et un chauffage à 80°C nous ont permis d'augmenter le rendement jusqu'à 18%. Malgré cela, cette réaction n'était pas viable étant donné la grande valeur ajoutée du produit de départ **169**.

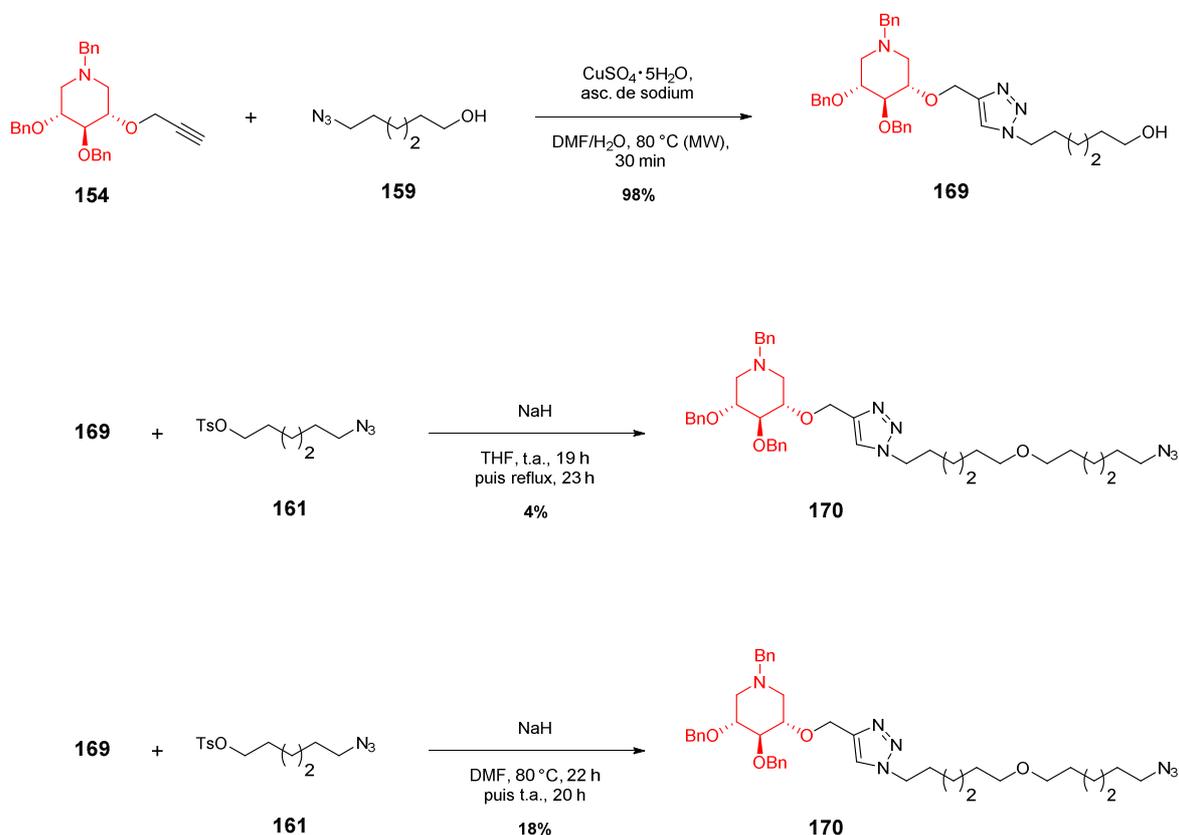


Schéma 69. Approche synthétique visant à introduire le bras espaceur de type éther en deux temps sur la tête **154**.

Suite aux problèmes rencontrés avec l'approche précédente, nous avons décidé de d'abord former le bras espaceur à treize chaînons puis de relier ce dernier à la tête acétylénique *via* la même approche utilisée pour obtenir **166a** et **166b**. En nous appuyant sur la littérature,^{290,291} le bras espaceur à treize chaînons (**171**) a été obtenu en réalisant la mono-substitution nucléophile d'un groupement tosylé du composé **172** par l'alcool **159** en présence d'une base forte (Schéma 70). Le faible

rendement obtenu pour le produit mono-substitué **171** (20%) pourrait s'expliquer par la formation de produit di-substitué (non isolé) car l'alcool de départ avait été totalement consommé d'après le suivi par CCM.

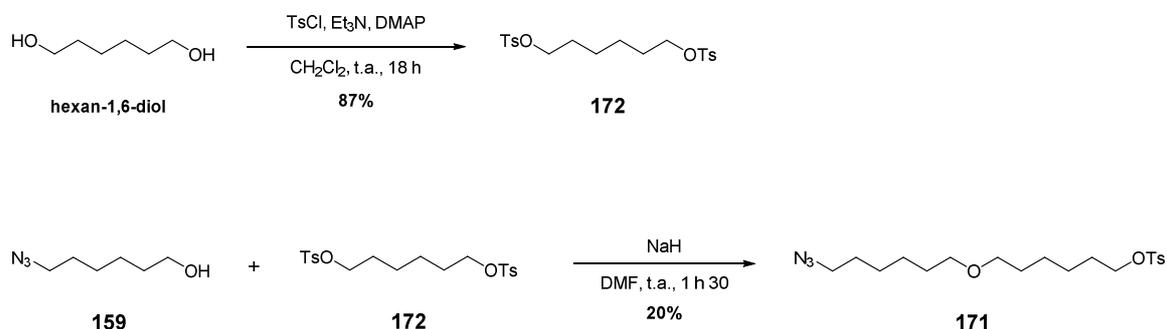


Schéma 70. Synthèse du bras espaceur bifonctionnel de type éther (**171**).

Une fois le bras espaceur à treize chaînons en main, nous avons pu le relier à la première tête **154**, substituer le tosyloxy par un azoture et enfin greffer la seconde tête acétylénique (**Schéma 71**). De cette façon, le composé hétérodivalent protégé **165c** a été obtenu avec un rendement de 41% sur trois étapes. Les groupements benzyles ont ensuite été déprotégés par réaction avec BCl₃ et hydrogénolyse pour donner le composé **166c** avec un rendement de 47% sur deux étapes. Pour expliquer ce rendement moyen, nous avons supposé que le réactif BCl₃ avait pu réaliser la coupure de l'éther au niveau du bras espaceur pour former l'alcool et le chlorure d'alkyle correspondant. D'un point de vue structural, le composé **166c** possède également un plan de symétrie et donc des protons et carbones équivalents. Les spectres RMN ¹H et RMN ¹³C que nous avons obtenus étaient donc très proches de ceux obtenus pour les systèmes **166a** et **166b**. D'autre part, nous avons aussi mesuré un pouvoir rotatoire nul pour **166c**.

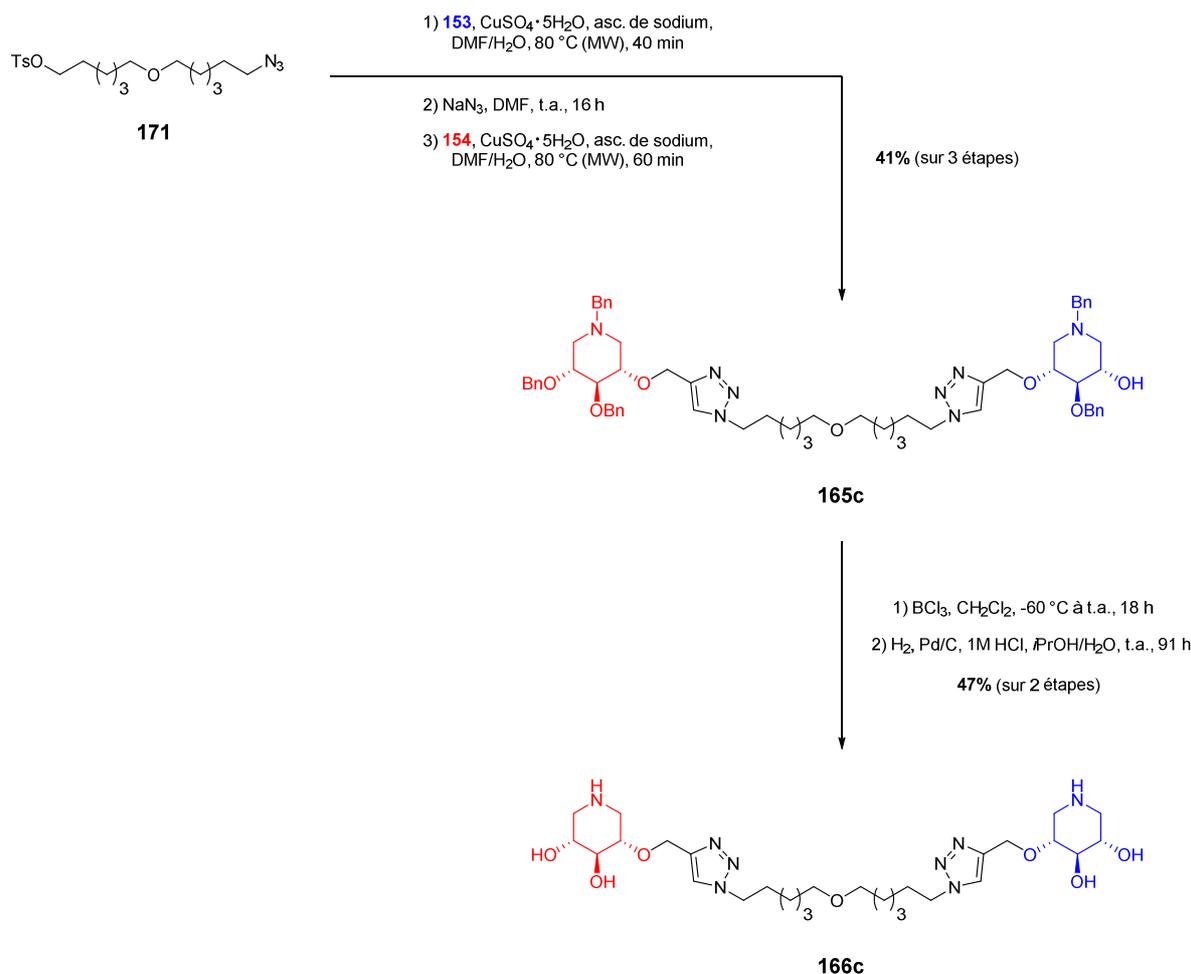


Schéma 71. Synthèse du système hétérodivalent **166c** à partir du bras espaceur bifonctionnel de type éther.

5.3. Systèmes hétérodivalents avec un bras espaceur mixte à 15 ou 22 chaînons (type alkyle/PEG)

Pour la synthèse des systèmes hétérodivalents à 15 ou 22 chaînons, nous avons choisi la même approche que pour le composé **166c** en préparant d'abord les bras espaceurs mixtes de type alkyle/PEG *via* substitution nucléophile. Ainsi, le tri- et le tétraéthylène glycol ont été di-tosylés en suivant des conditions décrites²⁹² pour donner les produits **173** et **174** (**Schéma 72**). Ces derniers ont ensuite été traités avec les alcools **159** et **160** en présence de NaH pour donner les produits monosubstitués **175** et **176** respectivement avec un rendement de 38% et 39%. On remarque que ces rendements, même s'ils sont peu élevés, sont tout de même supérieurs à celui obtenu pour le bras de type éther. Ceci pourrait être rationalisé par le fait que le carbone portant le tosyle est plus électrophile à cause de l'oxygène de la partie PEG qui est en position β .

CHAPITRE 2

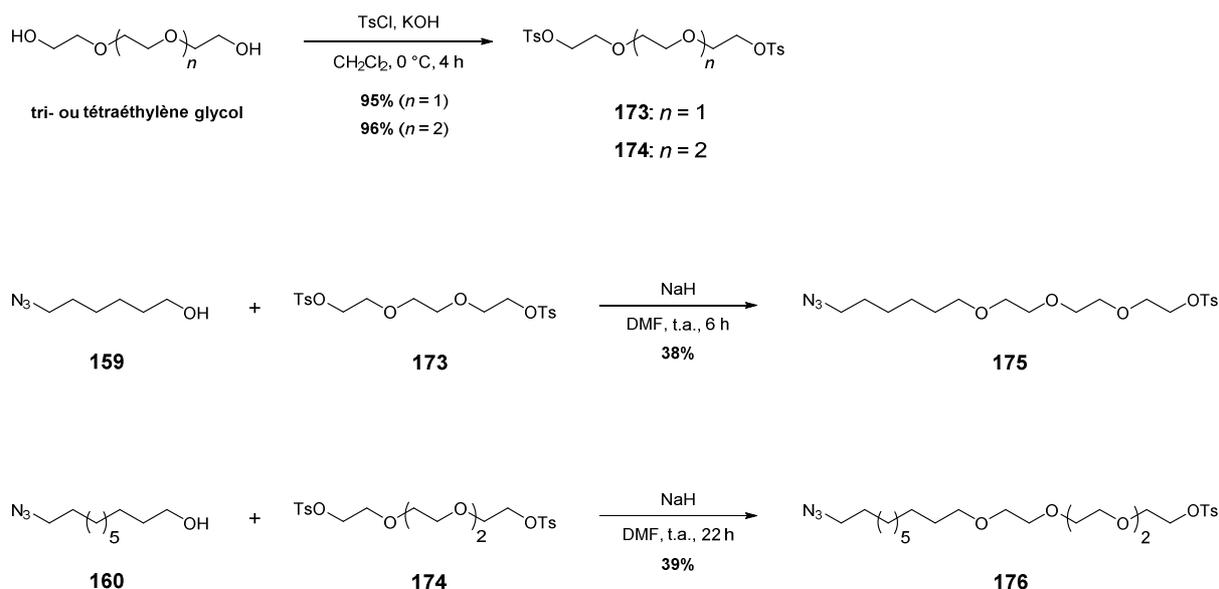


Schéma 72. Synthèse des bras espaceurs mixtes de type alkyle/PEG (175 et 176).

Contrairement au couplage avec les bras espaceurs symétriques, le couplage des têtes acétyléniques avec les bras espaceurs de type alkyle/PEG devait être réalisé dans un ordre précis pour conserver une partie aglycone alkyle du côté de la tête visant le site actif de la GCCase. C'est donc la tête **154** qui a été reliée en premier au bras espaceur puis la tête **153** a été introduite à son tour après activation. De cette façon, les composés hétérodivalents protégés **165d** et **165e** ont été obtenus respectivement avec un rendement de 64% et 61% sur trois étapes (Schéma 73).

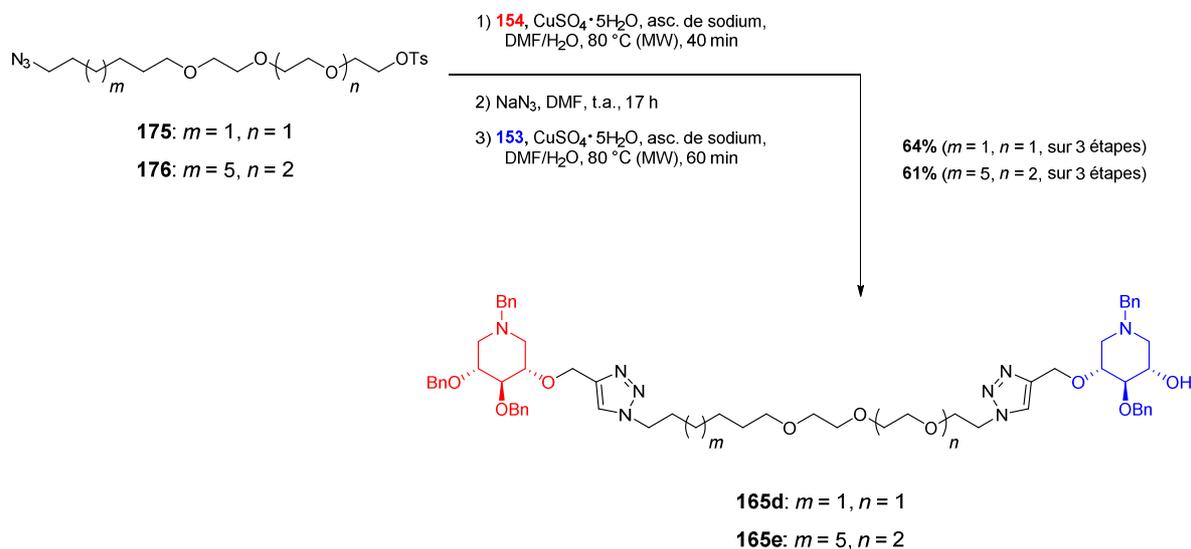


Schéma 73. Synthèse des composés hétérodivalents protégés **165d** et **165e** à partir des bras espaceurs mixtes de type alkyle/PEG.

Après avoir déprotégé les systèmes possédant des bras espaceurs de type alkyle ou éther (**166a-c**), nous avons réalisé que l'étape de *O*-déprotection avec BCl_3 n'était pas adaptée et peu efficace, et qu'une étape d'hydrogénolyse bien choisie (avec $\text{Pd}(\text{OH})_2$ et non Pd/C) permettrait de déprotéger en

une seule fois tous les groupements benzyles. Les composés **165d** et **165e** ont donc été directement hydrogénolysés en présence de Pd(OH)₂ sur charbon pour donner les composés déprotégés **166d** et **166e** avec respectivement 93% et 90% de rendement (**Schéma 74**). Contrairement aux autres systèmes hétérodivalents, les composés **166d** et **166e** ne possèdent pas de plan de symétrie; en RMN, ceci s'est traduit par l'obtention de deux signaux bien distincts pour les protons des triazoles (H-8, H-8') ainsi que pour les carbones (C-8, C-8' et C-7, C-7'). En ce qui concerne la partie iminosucre, les signaux des carbones ont pu être distingués contrairement aux signaux des protons qui étaient quant à eux superposés. Pour finir, nous avons trouvé que ces molécules, bien qu'étant chirales, ne possédaient aucune activité optique puisque les pouvoirs rotatoires mesurés étaient égaux à zéro.

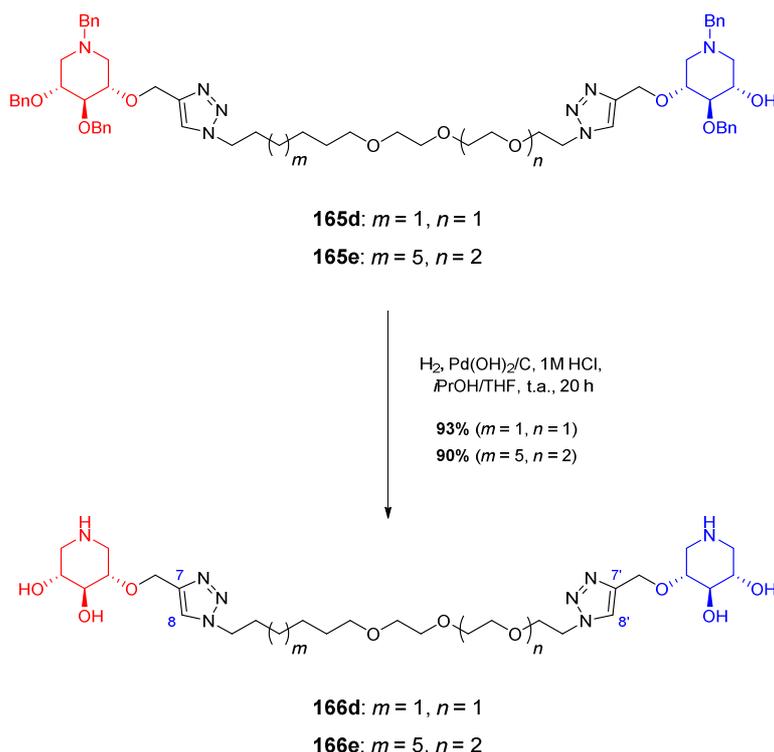


Schéma 74. Formation des systèmes hétérodivalents déprotégés **166d** et **166e** après déprotection des groupements *O*- et *N*-benzyles par hydrogénolyse.

5.4. Analogues homodivalents

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les systèmes homodivalents nous permettront de comparer l'influence de chaque tête toutes choses étant égales par ailleurs et prouver la validité de notre concept dans le cas d'activités inhibitrice et chaperon très fortes. Idéalement, pour chacun des cinq systèmes hétérodivalents précédemment synthétisés (deux alkyles, un éther et deux alkyle/PEG), il nous faudrait synthétiser un dimère (+/+) et un dimère (-/-), ce qui représente au total dix composés supplémentaires à préparer. Pour économiser nos efforts de synthèse, nous nous sommes focalisés sur l'hétérodimère **166e** qui, de par la longueur de son bras espaceur, nous semblait être le plus prometteur. Les analogues homodivalents de **166e** ont été synthétisés en suivant la même stratégie que pour les systèmes hétérodivalents excepté qu'au lieu de relier deux têtes énantiomères au bras espaceur, nous avons relié deux têtes identiques. Les composés **177** et **178** ont donc été obtenus en

quatre étapes à partir du bras espaceur **176** et respectivement avec un rendement de 61% et 51% (**Schéma 75**). Les composés **177** et **178** étant énantiomères l'un de l'autre, nous avons donc obtenu des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C identiques. Ces molécules possèdent également le même pouvoir rotatoire en valeur absolue, nous avons en effet obtenu $[\alpha]_D^{20} = +7$ (c 1,0; MeOH) pour **177** et $[\alpha]_D^{20} = -7$ (c 1,0; MeOH) pour **178**.

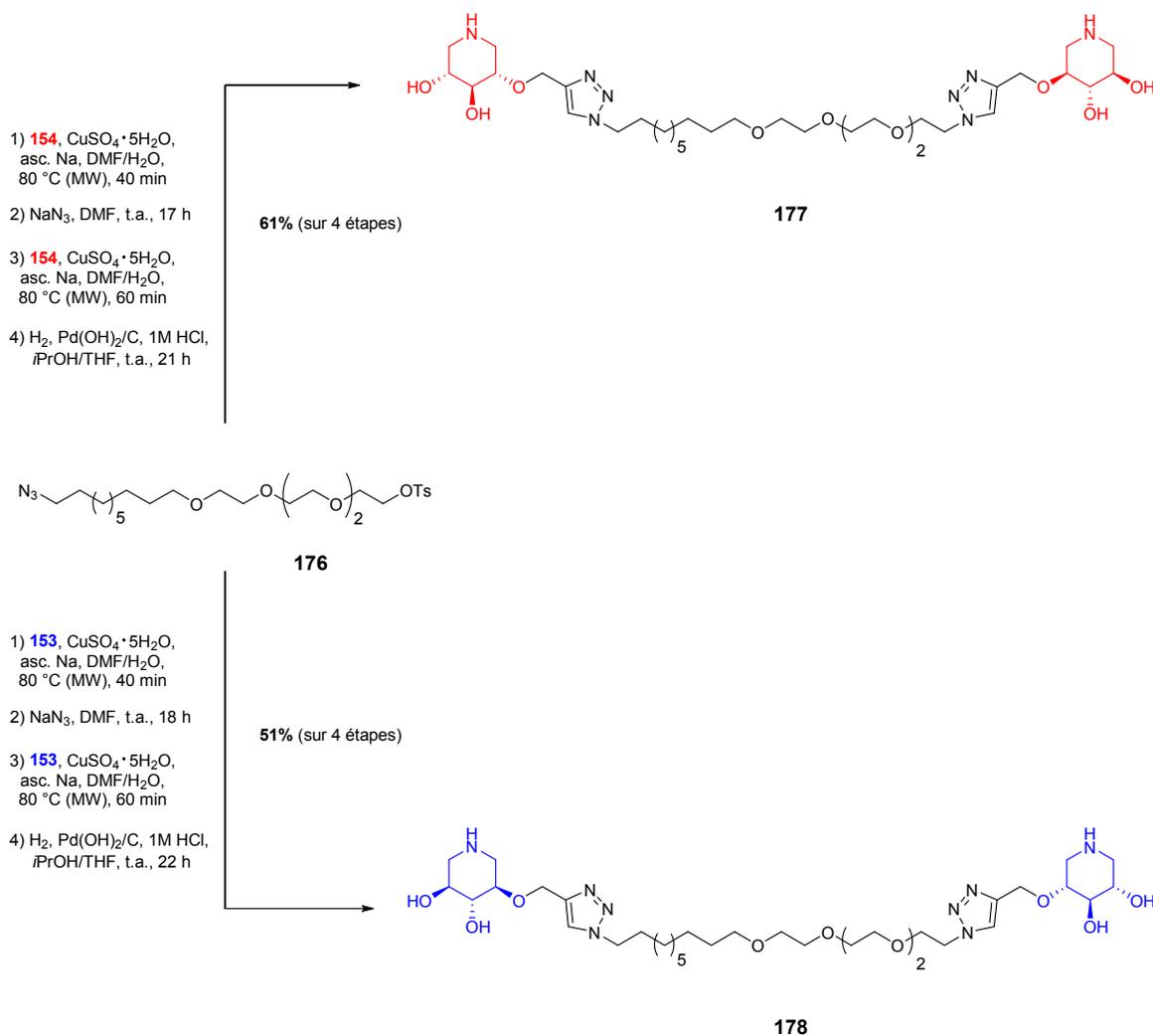


Schéma 75. Synthèse des systèmes homodivalents énantiomères **177** et **178**.

5.5. Analogues monovalents

Afin de déterminer l'activité inhibitrice et l'effet chaperon de chacune des têtes des systèmes hétérodivalents, nous avons donc décidé de synthétiser des analogues monovalents. Nécessairement, la partie aglycone de ces analogues devait être la plus proche possible des bras espaceurs utilisés précédemment. Nous avons par conséquent choisi deux types de bras pour le composé monovalent lévogyre (-) : un bras de type alkyle et un bras de type PEG. Le bras de type alkyle **179** a été préparé à partir du 1-bromononane d'après les conditions décrites dans la littérature (**Schéma 76**).²⁹³ Ce bras a ensuite été relié par CuAAC à la tête acétylénique **153** pour donner le composé monovalent **180** après déprotection.

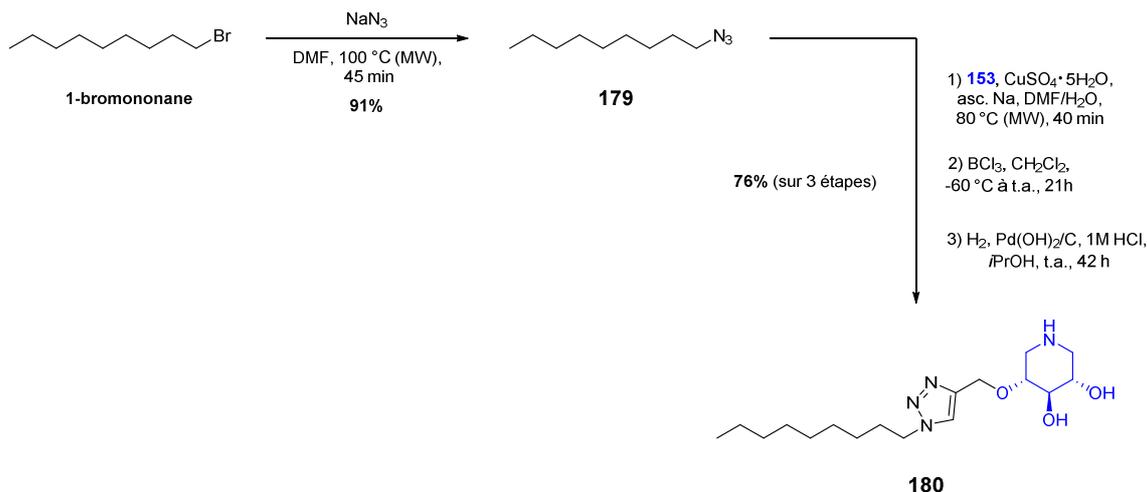


Schéma 76. Synthèse du composé monovalent **180** avec un bras de type alkyle.

Le bras de type PEG prêt à être cliqué a été synthétisé en trois étapes d'après des conditions décrites.²⁹⁴ Dans un premier temps, le tétraéthylène glycol mono-tosylé (**181**) a été obtenu en traitant un large excès de tétraéthylène glycol (10 éq.) avec TsCl et NaOH à 0 °C puis le groupement tosyle formé a été déplacé par un groupement azoture pour donner l'intermédiaire **182** (**Schéma 77**). Enfin, une réaction de méthylation de l'alcool a permis d'introduire un groupement méthoxy en bout de chaîne pour donner le composé **183**. Le composé monovalent **184** a alors été obtenu classiquement après réaction de CuAAC et déprotection avec un rendement de 59% sur trois étapes.

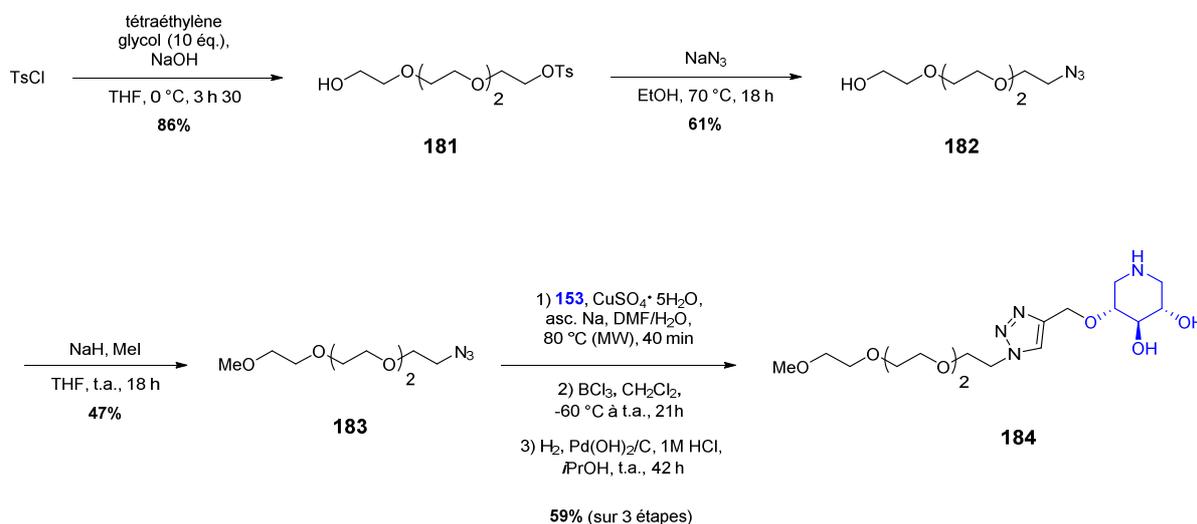


Schéma 77. Synthèse du composé monovalent **184** avec un bras de type PEG.

Pour les composés monovalents dextrogyres (+), nous avons envisagé de relier un bras alkyle ou un bras hydroxyalkyle en C₆ et C₁₀. Les composés monovalents **185**, **186** et **187** ont donc été synthétisés en reliant respectivement les bras précédemment synthétisés **179**, **159** et **160** à la tête acétylénique **154** et en déprotégeant les groupements benzyles.

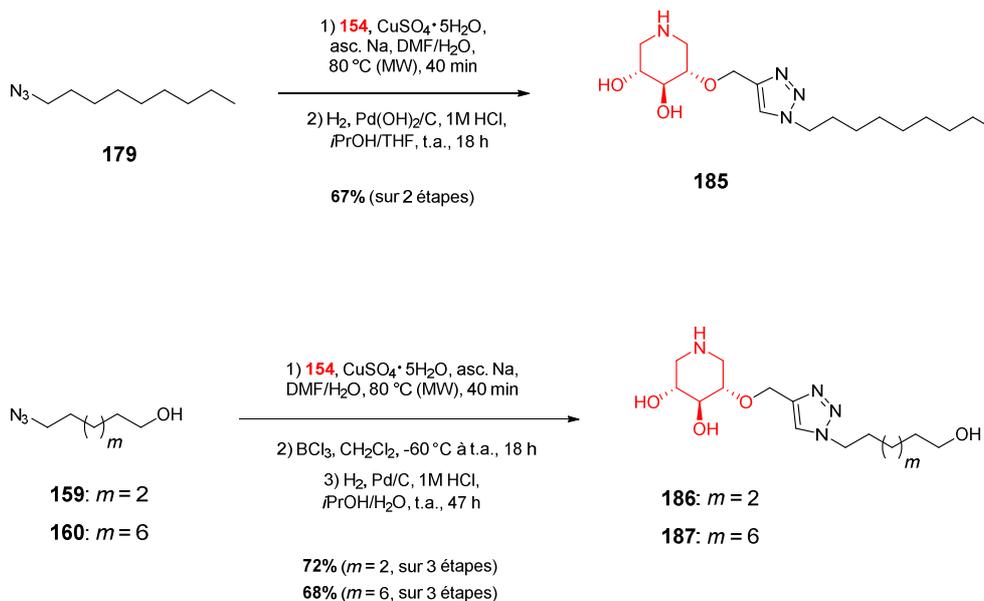


Schéma 78. Synthèse des composés monovalents **185**, **186** et **187** avec des bras de type alkyle.

Pour finir, nous avons synthétisé deux composés monovalents supplémentaires sans triazole : le (+)-2-*O*-nonyl-DIX et son énantiomère (-)-2-*O*-nonyl-DIX. En comparant ces composés aux composés **180** et **185**, nous pourrions ainsi déterminer précisément la contribution du groupement triazole sur l'activité inhibitrice et l'effet chaperon. Pour obtenir le composé **189**, nous avons utilisé l'intermédiaire précédemment synthétisé **158** pour lequel l'alcool en position C-2 était déjà isolé. L'alkylation de ce dernier en présence de NaH et de 1-bromononane a permis de former le composé **188** avec 88% de rendement. Le (+)-2-*O*-nonyl-DIX (**189**) a ensuite été isolé quantitativement après hydrogénéolyse.

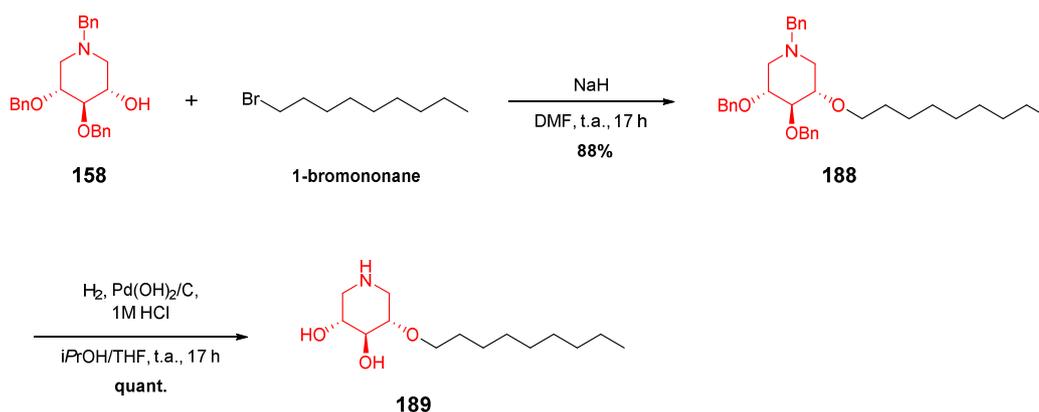


Schéma 79. Synthèse du (+)-2-*O*-nonyl-DIX (**189**).

Pour la synthèse du composé (-), nous avons fait appel à un autre intermédiaire adéquatement protégé, le composé **155**. Après alkylation, le composé **190** a été déprotégé en deux étapes : le groupement MOM a d'abord été hydrolysé pour donner l'alcool **191** puis l'hydrogénéolyse des groupements benzyles a permis de former le (-)-2-*O*-nonyl-DIX (**192**).

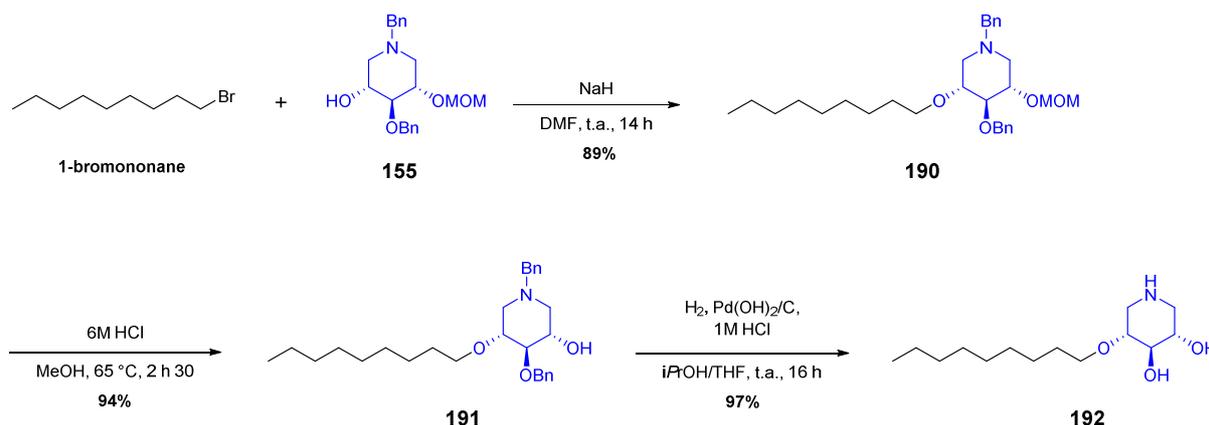


Schéma 80. Synthèse du (-)-2-O-nonyl-DIX (192).

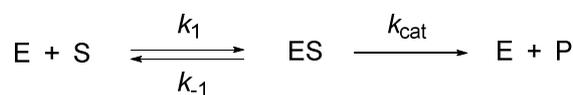
6. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES SYSTÈMES HÉTÉRODIVALENTS, HOMODIVALENTS ET MONOVALENTS

6.1. Rappels de notions d'enzymologie

Dans ce paragraphe, nous rappellerons quelques définitions liées à la cinétique enzymatique et à l'inhibition enzymatique. C'est sur ces notions que reposent les tests d'inhibitions qui ont été réalisés sur la β -glucocérébrosidase.

6.1.1. La cinétique enzymatique²⁹⁵

Dans le cas d'une réaction enzymatique où un seul substrat donne un seul produit, on peut considérer que la réaction globale est composée de deux réactions élémentaires : 1) un équilibre rapide où le substrat forme avec l'enzyme un complexe enzyme-substrat; 2) une réaction irréversible limitante où ce complexe se décompose pour former le produit de réaction et libérer l'enzyme (Schéma 81). Dans ces conditions, la vitesse globale de réaction est alors définie comme étant le produit de la concentration en complexe [ES] et de la constante de vitesse k_{cat} .



$$V = k_{cat}[ES] \quad (\text{vitesse globale de la réaction})$$

Schéma 81. Modèle cinétique d'une réaction enzymatique donnant un seul produit P à partir d'un seul substrat S. E désigne l'enzyme et ES le complexe enzyme-substrat.

En supposant que le système enzymatique est dans un état stationnaire et que la première étape de la réaction est toujours en équilibre rapide, Michaelis et Menten ont démontré que la vitesse de

réaction V pouvait aussi s'exprimer sous la forme de l'**Équation 1**, dans laquelle K_M représente la constante de Michaelis, propre à chaque couple enzyme-substrat, et V_{\max} la vitesse maximale atteinte lorsque tous les sites enzymatiques sont saturés en substrats. On remarque que la vitesse de réaction tend vers la vitesse maximale pour de fortes concentrations en substrat ($[S] \gg K_M$).

Équation 1. Équation de Michaelis-Menten.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{avec} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1}$$

et $V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$

Pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme K_M et V_{\max} , la méthode graphique la plus utilisée est la méthode de Lineweaver-Burk. En effet, d'après la réciproque de l'équation de Michaelis-Menten, lorsque l'on trace la courbe de $1/V$ en fonction de $1/[S]$ on obtient une droite dont la pente est K_M/V_{\max} et l'ordonnée à l'origine est $1/V_{\max}$ (**Figure 74**).

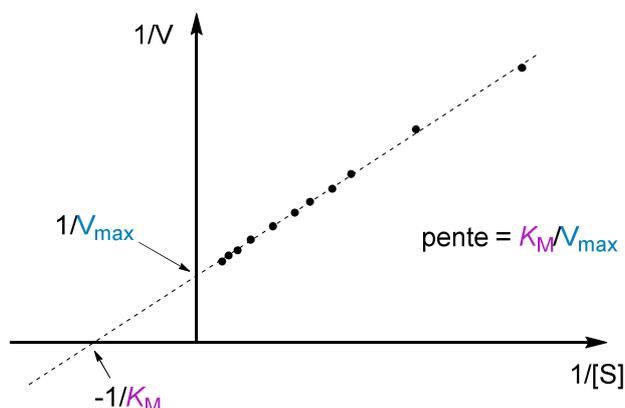


Figure 74. Représentation graphique de Lineweaver-Burk.

6.1.2. L'inhibition enzymatique^{296,297}

Les inhibiteurs d'enzymes sont définis comme des espèces capables de diminuer la vitesse des réactions enzymatiques. De manière générale, ces composés interagissent avec l'enzyme elle-même et forment ainsi des complexes enzyme-inhibiteur. Dans le cas où l'inhibiteur forme une liaison covalente avec l'enzyme et inactive cette dernière, on parle d'inhibition irréversible. Au contraire, lorsque les inhibiteurs forment un complexe réversible avec l'enzyme, on parle d'inhibiteurs réversibles : ces derniers s'associent aux enzymes *via* des liaisons non-covalentes de type électrostatiques, hydrophobes ou liaisons hydrogène et agissent en modifiant la cinétique de la réaction. On peut distinguer trois types d'inhibiteurs réversibles : les inhibiteurs compétitifs, incompétitifs et non compétitifs.

a) Les inhibiteurs réversibles compétitifs

On dit que l'inhibition est compétitive lorsque l'inhibiteur est en compétition avec le substrat pour se lier à l'enzyme. Lorsque l'inhibiteur compétitif possède une ressemblance structurale avec le substrat, il y a une compétition directe pour le site actif de l'enzyme (**Figure 75A**). Cependant, l'inhibiteur peut aussi empêcher la liaison du substrat par encombrement stérique (**Figure 75B**) ou en induisant un changement de conformation de l'enzyme (**Figure 75C**).

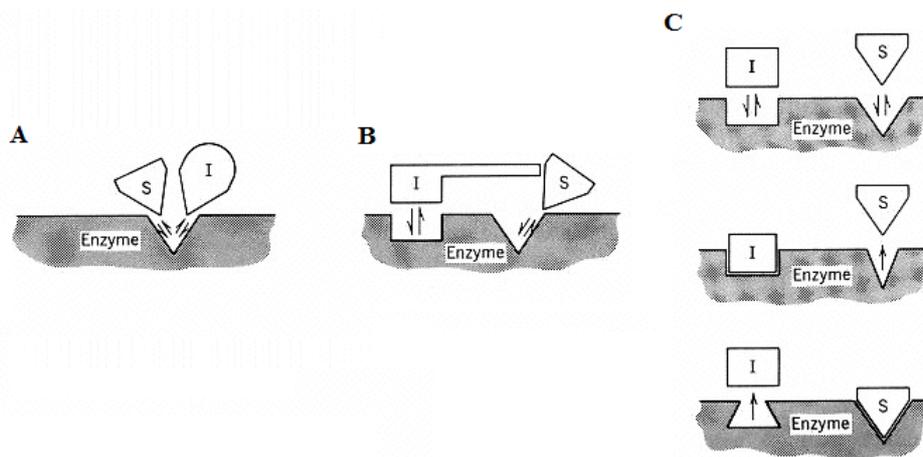


Figure 75. Représentation schématique de l'inhibition compétitive.²⁹⁶

D'un point de vue cinétique, l'inhibition compétitive est représentée par un équilibre supplémentaire qui rend compte de la formation du complexe enzyme-inhibiteur (EI) (**Schéma 82**). Dans la nouvelle équation de vitesse de réaction, on remarque que les inhibiteurs compétitifs n'ont pas d'effet sur la V_{max} de l'enzyme mais augmentent le K_M d'un facteur $(1 + [I]/K_i)$, ce qui se traduit par une diminution de la vitesse de réaction enzymatique. L'effet de l'inhibiteur peut cependant être surmonté en augmentant la concentration du substrat car la V_{max} ne change pas. Cette équation fait apparaître un nouveau terme K_i qui correspond à la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur. Le K_i est appelée constante d'inhibition car il permet de déterminer le pouvoir inhibiteur d'un composé sur l'enzyme, en effet plus le K_i est faible (formation de EI favorable) plus le terme K_M^{app} est grand et plus la vitesse de réaction est réduite. Un inhibiteur est donc d'autant plus puissant que son K_i est faible.

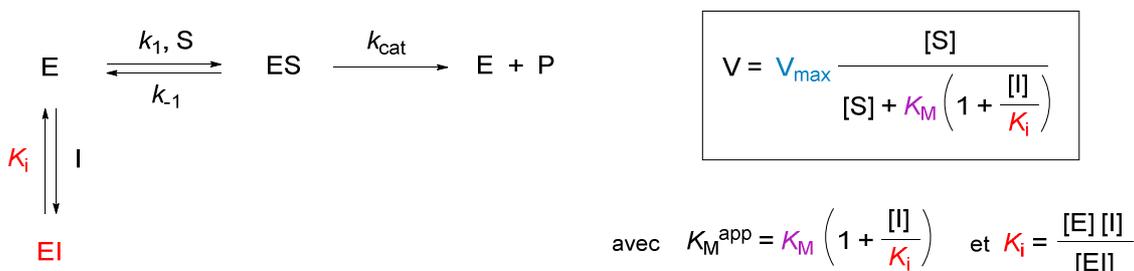


Schéma 82. Modèle cinétique de l'inhibition compétitive d'une réaction enzymatique.

Pour déterminer si un inhibiteur est compétitif, il suffit de vérifier que seulement la valeur de K_M et non la valeur de V_{max} varie en fonction de la concentration en inhibiteur. Cela peut être évalué très rapidement avec la représentation graphique de Lineweaver-Burk puisque les droites se couperont en un même point sur l'axe des ordonnées ($1/V_{max}$) (**Figure 76**). À partir des données obtenues avec le graphique précédent, la constante d'inhibition peut être facilement déterminée en traçant la droite $K_M^{app}/V_{max} = f([I])$ pour laquelle l'abscisse à l'origine est égale à $-K_i$.

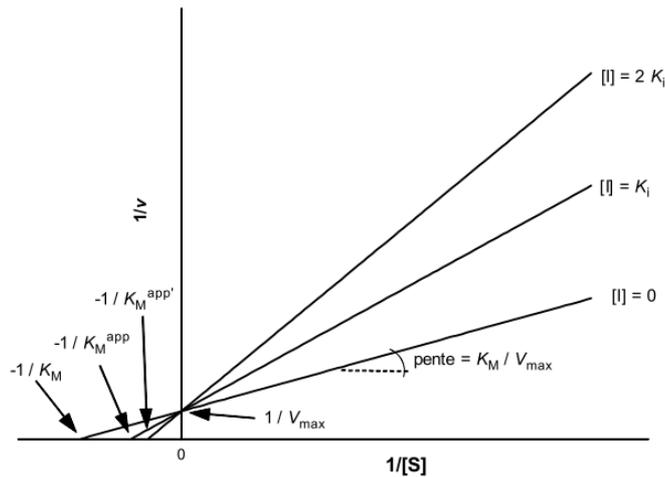


Figure 76. Représentation graphique de Lineweaver-Burk pour une inhibition compétitive.²⁹⁷

b) Les inhibiteurs réversibles incompétitifs

Un inhibiteur incompétitif ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement au complexe enzyme-substrat (ES). Généralement, la fixation du substrat à l'enzyme provoque un changement de conformation de celle-ci qui va permettre la fixation de l'inhibiteur. Une fois fixé, l'inhibiteur modifie la conformation du site actif et empêche la réaction enzymatique (**Figure 77**). Le complexe ternaire formé (ESI) est donc inactif et réduit par conséquent la vitesse de formation du produit.

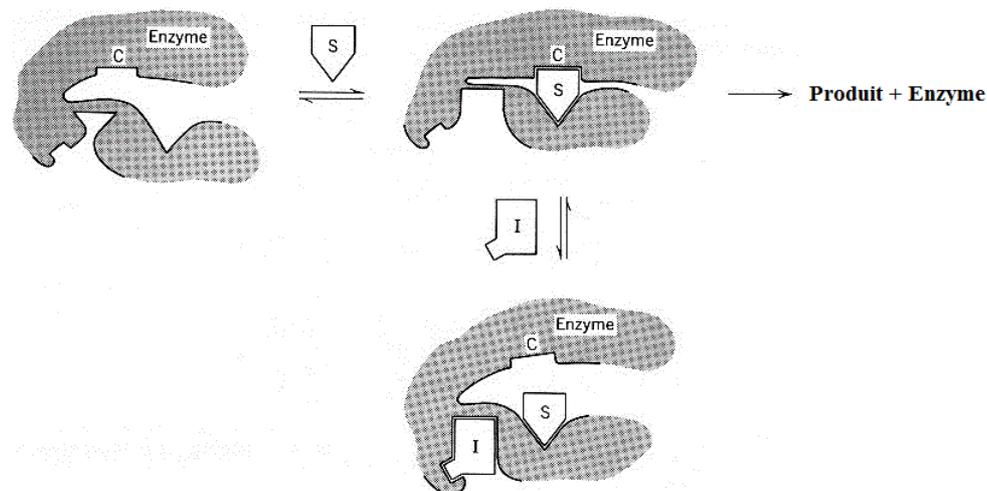


Figure 77. Représentation schématique de l'inhibition incompétitive (C représente le centre catalytique de l'enzyme).²⁹⁶

Comme précédemment, l'inhibition incompétitive est représentée par un équilibre additionnel qui modifie l'expression de la vitesse de réaction (**Schéma 83**). On s'aperçoit dans ce cas que les paramètres K_M et V_{max} sont tous les deux divisés par un même facteur $(1 + [I]/K_i)$. La vitesse de la réaction va donc diminuer car V_{max} diminue. Par contre, l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat augmente ($K_M^{app} < K_M$). D'autre part, contrairement à l'inhibition compétitive, l'effet des inhibiteurs incompétitifs augmente avec la concentration en substrat étant donné que ceux-ci ne se fixent qu'au complexe ES.

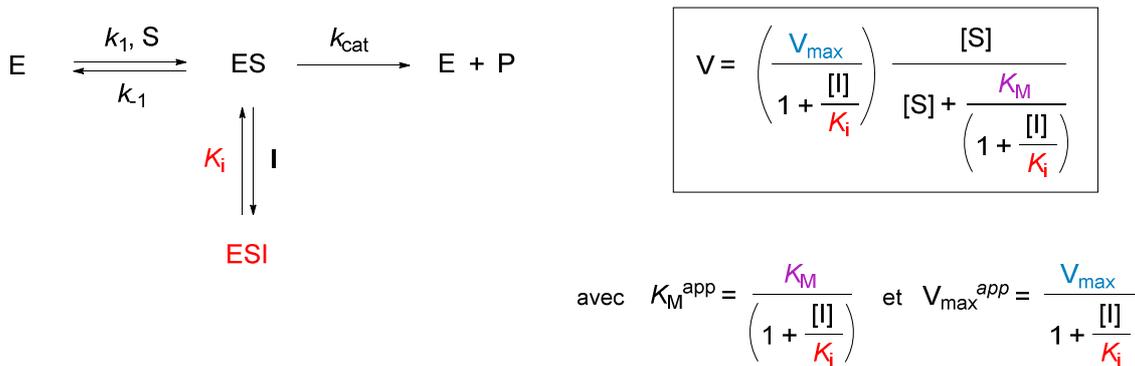


Schéma 83. Modèle cinétique de l'inhibition incompétitive d'une réaction enzymatique.

Puisque les paramètres K_M et V_{max} changent de façon équivalente, il en résulte des droites de pentes identiques dans le graphique de Lineweaver-Burk (**Figure 78**). La constante d'inhibition K_i peut quant à elle être obtenue en traçant la droite $1/V_{max}^{app} = f([I])$ ou la droite $1/K_M^{app} = f([I])$ et en relevant l'abscisse à l'origine ($-K_i$).

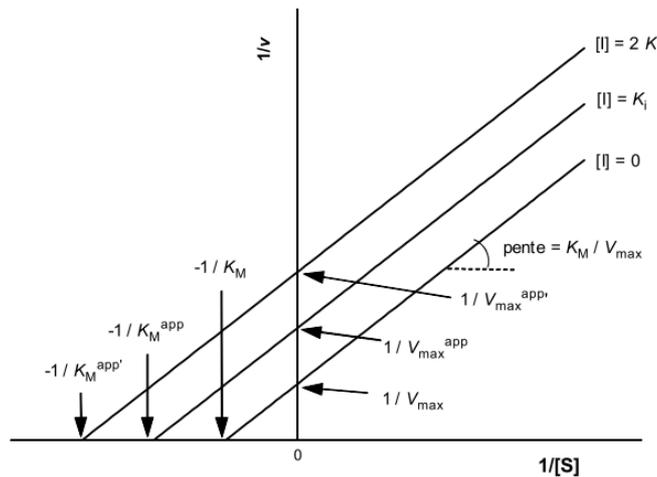


Figure 78. Représentation graphique de Lineweaver-Burk pour une inhibition incompétitive.²⁹⁷

c) Les inhibiteurs réversibles non compétitifs

Dans le cas d'une inhibition non compétitive, l'inhibiteur peut se lier aussi bien à l'enzyme libre qu'au complexe enzyme-substrat. Dans ce cas là, le substrat et l'inhibiteur se lient à des sites

différents : le substrat se lie au site actif et l'inhibiteur à un autre site de fixation. La fixation de l'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat (**Figure 79**). Étant catalytiquement inactif, le complexe ternaire formé (ESI) réduit donc la vitesse de formation du produit.

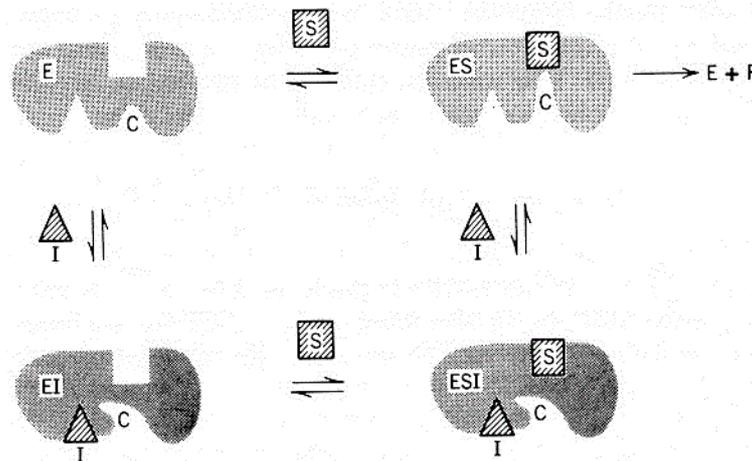


Figure 79. Représentation schématique de l'inhibition non compétitive. Le centre catalytique C de l'enzyme doit être aligné pour transformer le substrat en produit.²⁹⁶

En prenant en compte dans le schéma cinétique les trois équilibres supplémentaires relatifs à ce type d'inhibition (**Schéma 84**), on arrive à une équation de la vitesse de réaction qui est une combinaison de l'inhibition compétitive et incompétitive où K_i et K_i' représentent les constantes de dissociation des complexes (EI) et (ESI). Le principal effet d'un inhibiteur non compétitif est de réduire la V_{max} d'un facteur $(1 + [I]/K_i')$. Son effet sur K_M dépend par contre des forces relatives des deux modes inhibitions (compétitive et incompétitive), c'est à dire de la valeur relative de K_i par rapport à K_i' .

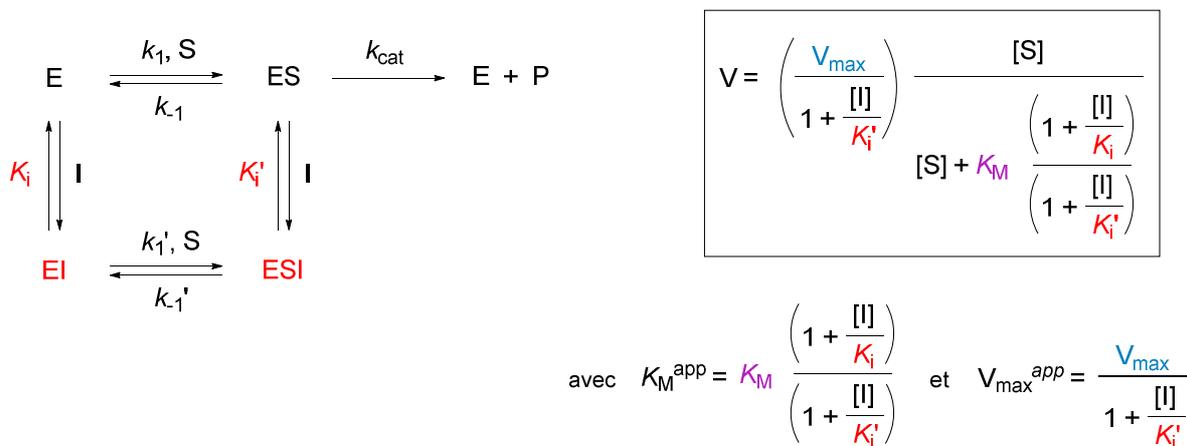


Schéma 84. Modèle cinétique de l'inhibition non compétitive d'une réaction enzymatique.

Dans le cas où l'inhibiteur a autant d'affinité pour le complexe enzyme-substrat que pour l'enzyme seule ($K_i' = K_i$), le K_M n'est pas modifié par la présence de l'inhibiteur. Dans le graphique de Lineweaver-Burk, les courbes se coupent donc en un même point sur l'axe des abscisses ($1/K_M$) (**Figure 80A**). On dit que l'inhibition est **non compétitive simple**. Maintenant dans le cas où $K_i' \neq K_i$, l'inhibition est qualifiée de **mixte** et la valeur apparente de K_M peut soit augmenter ($K_i' > K_i$) soit diminuer ($K_i' < K_i$) avec l'augmentation de $[I]$. Dans les deux cas, les profils d'inhibition se croisent à gauche de l'ordonnée (**Figure 80B**). Au final, ces deux constantes d'inhibition peuvent être déterminées de la même façon que pour les inhibitions compétitives et incompétitives.

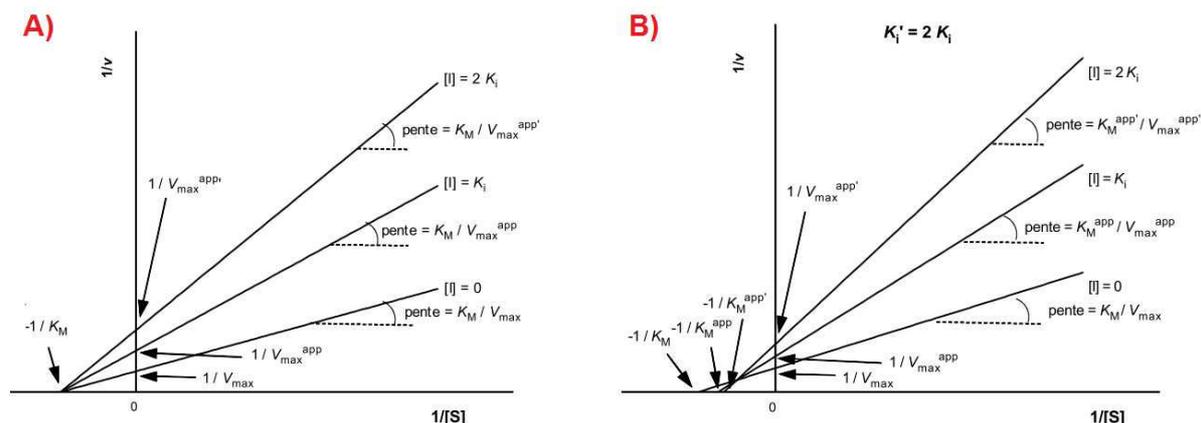


Figure 80. Représentation graphique de Lineweaver-Burk pour (A) une inhibition non compétitive simple et (B) une inhibition non compétitive mixte avec $K_i' > K_i$.²⁹⁷

d) La concentration inhibitrice médiane IC_{50}

On utilise couramment deux valeurs pour mesurer le degré d'inhibition d'une enzyme par un inhibiteur, le K_i comme nous l'avons vu précédemment mais aussi la concentration inhibitrice médiane IC_{50} .²⁹⁸ La valeur d' IC_{50} correspond à la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse de la réaction enzymatique de 50% par rapport à sa valeur maximale non inhibée. L' IC_{50} peut être utilisée pour comparer l'efficacité d'inhibition de plusieurs inhibiteurs à condition que les tests soient effectués dans les mêmes conditions car cette dernière varie en fonction de la concentration en substrat. Il est important de noter aussi que l' IC_{50} et le K_i ne sont pas liés par une simple relation linéaire et que cette relation dépend du type d'inhibition.²⁹⁹ Le cas d'une inhibition non compétitive simple est cependant exceptionnel car dans ce cas l' IC_{50} est égale au K_i .

6.2. Résultats et discussion

6.2.1. Activités inhibitrices vis-à-vis de la GCase

Les systèmes hétérodivalents, homodivalents et monovalents synthétisés précédemment (**Figure 81**) ont été évalués dans le cadre de la maladie de Gaucher en collaboration avec le laboratoire du Dr Delgado de l'Université de Barcelone.

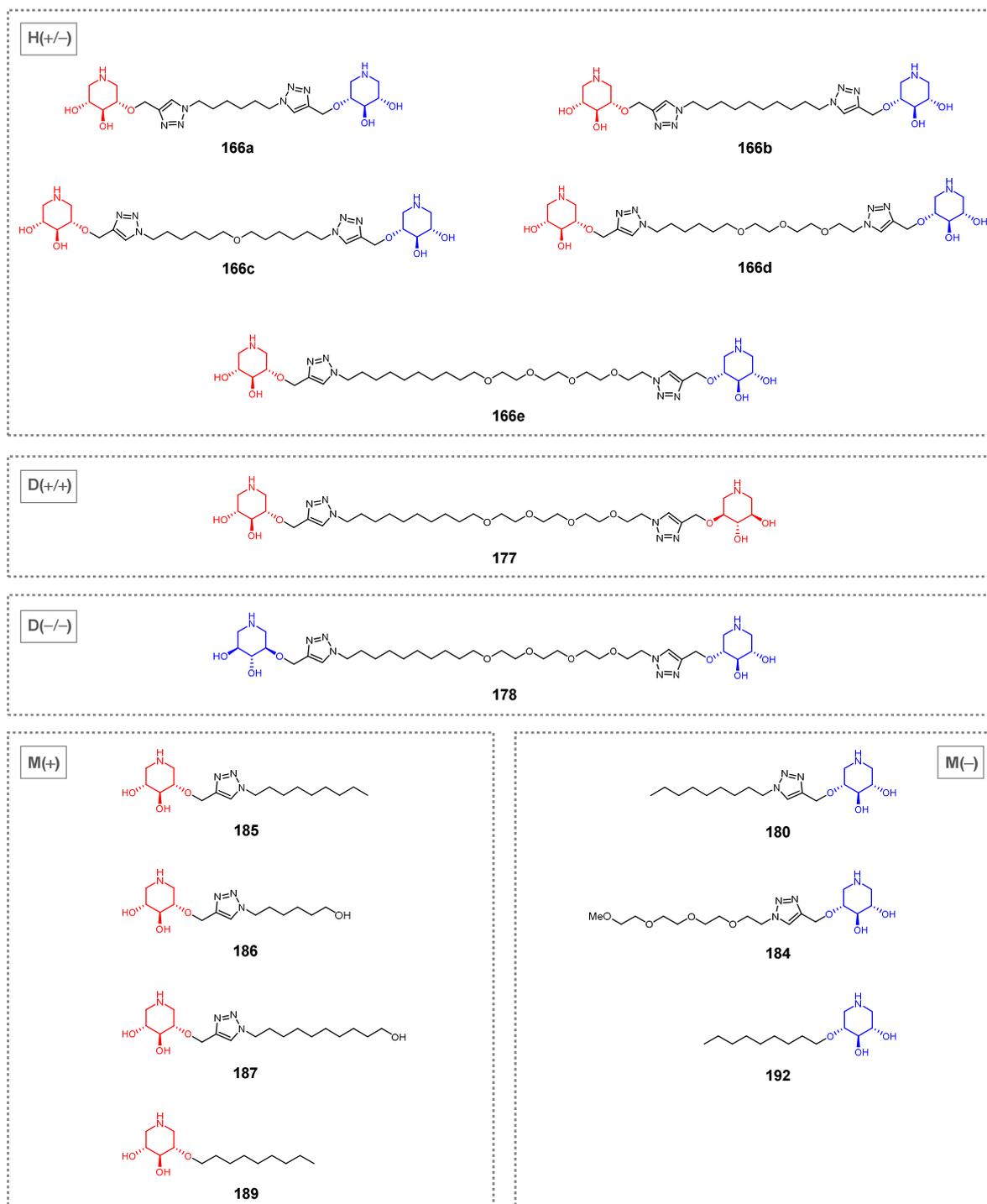


Figure 81. Systèmes hétérodivalents, homodivalents et monovalents synthétisés.

Dans un premier temps, des tests d'inhibitions ont été réalisés en présence de l'imiglucérase, la β -glucocérébrosidase recombinante commercialisée par Genzyme, et ont permis de déterminer les constantes d'inhibition des composés ci-dessus. Ces mesures ont été effectuées à pH neutre et à pH acide afin de se placer respectivement dans des conditions proches de celles du réticulum endoplasmique et du lysosome. Les résultats obtenus ont été collectés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4. Activités inhibitrices des systèmes hétérodivalents, homodivalents et monovalents vis-à-vis de l'imiglucérase (Genzyme).

Composés	Type de structure ^[a]	Type de bras ^[b]	K_i (nM) pH 5	K_i (nM) pH 7	Type d'inhibition
180	M(-)	C ₉	71000	14900	non compétitive
184		(EG) ₄ -Me	144000	59400	non compétitive
192		C ₉ (sans triazole)	69200	42300	non compétitive
185	M(+)	C ₉	2,1	6,7	non compétitive
186		C ₆ -OH	341	160	non compétitive
187		C ₁₀ -OH	14,5	7,9	compétitive
189		C ₉ (sans triazole)	1,7	2,3	compétitive
166a	H(+/-)	C ₆	3140	164	non compétitive
166b		C ₁₀	20	22	non compétitive
166c		C ₆ -O-C ₆	29	28	non compétitive
166d		C ₆ -(EG) ₃	391	260	non compétitive
166e		C ₁₀ -(EG) ₄	25	7	non compétitive
177	D(+/+)	C ₁₀ -(EG) ₄	1,6	2,1	non compétitive
178	D(-/-)	C ₁₀ -(EG) ₄	225000	137000	non compétitive

^[a] M(-) et M(+): analogues monovalents possédant respectivement une tête énantiomère (-) et (+); H(+/-): système hétérodivalent possédant deux têtes énantiomères (+) et (-); D(+/+) et D(-/-): systèmes homodivalents possédant deux têtes identiques. ^[b] (EG): éthylène glycol

De façon générale, on remarque que pour la plupart des composés le K_i mesuré à pH 5 est supérieur ou égal à celui mesuré à pH 7. Cette indication est intéressante car elle signifie qu'une fois dans le lysosome ces composés pourront se libérer plus facilement de l'enzyme. C'est ce que l'on attend d'un chaperon potentiel.

Dans un premier temps, les données cinétiques ont permis de confirmer que les analogues monovalents M(-) (**180** et **184**) étaient effectivement des inhibiteurs non compétitifs et ciblaient donc un site secondaire de la GCCase. Cependant, l'affinité de ces composés vis-à-vis de l'enzyme est relativement faible avec des K_i de l'ordre de la dizaine de micromolaire. Ces tests ont montré par ailleurs que la présence d'oxygène au niveau de la partie aglycone de M(-) (bras hydrophile) n'était pas favorable en termes d'affinité (**184**). On s'aperçoit également que le triazole n'a pas d'influence significative sur l'inhibition puisque l'analogue sans triazole **192** est aussi un inhibiteur non compétitif à la dizaine de micromolaire.

Dans le cas des analogues monovalents M(+), l'effet du triazole est plus difficile à déterminer; en effet, si l'on compare le composé 2-O-alkylé **189** avec le composé **185** qui est très proche mais

possède un triazole, on remarque que même si ces deux composés sont des inhibiteurs puissants de l'ordre du nanomolaire, ils possèdent néanmoins des modes d'inhibition différents : compétitive pour le premier et non compétitive pour le second. Le triazole pourrait donc être ici la cause de ce changement de type d'inhibition. Cette supposition n'est cependant pas en accord avec le composé **187** qui possède également un groupement triazole et inhibe l'enzyme de façon compétitive. Quoiqu'il en soit, les mesures de K_i ont montré que les analogues M(+) compétitifs ou non compétitifs possédaient tous une forte affinité pour la GCCase. On se rend compte néanmoins qu'une chaîne alkyle trop courte comme la chaîne hydroxyhexyle (**186**) donne de moins bons résultats en termes d'inhibition.

En ce qui concerne les systèmes hétérodivalents H(+/-), les profils d'inhibition ont montré que ces composés se comportaient tous comme des inhibiteurs non compétitifs. Ce résultat confirme donc que la tête (+) ne cible pas le site actif de l'enzyme mais plutôt un site secondaire comme cela a pu être montré avec les analogues monovalents M(+) **185** et **186** et l'analogue homodivalent D(+/-) (**177**). En analysant les valeurs des constantes d'inhibition, on se rend compte que la présence de la tête (-)-2-O-DIX est soit défavorable en termes d'affinité (**185** vs **166b**) soit sans influence (**187** vs **166e**). Le seul gain d'affinité qui a été observé par rapport à un analogue monovalent (**166c** vs **186**) peut sans doute être expliqué par une partie aglycone plus longue et plus lipophile (C₆-O-C₆), nécessaire à l'affinité de la tête (+). En effet, dans le cas où cette partie aglycone est beaucoup moins lipophile (C₆-(EG)₃), on observe au contraire une perte d'activité (**186** vs **166d**). Les tests réalisés sur les analogues homodivalents D(+/-) et D(-/-) ont en fin de compte permis de confirmer que l'affinité des systèmes hétérodivalents était uniquement due à la présence de la tête (+) (**166e** vs **177-178**).

Finalement, en montrant que les cinq systèmes hétérodivalents synthétisés possèdent deux têtes non compétitives, ces tests d'inhibition remettent en cause notre stratégie initiale qui était basée sur des composés capables de cibler simultanément le site actif et un site secondaire de l'enzyme. Cette première étude a malgré tout permis de mettre en évidence de puissants inhibiteurs non compétitifs de la GCCase à la dizaine de nanomolaire.

6.2.2. Effet chaperon sur la GCCase

L'activité chaperon des systèmes hétérodivalents, homodivalents et monovalents a ensuite été évaluée sur des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Gaucher présentant différents génotypes : N370S/N370S, L444P/L444P et G202R/G202R. Les résultats des effets chaperons obtenus sont résumés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Effet chaperon des systèmes hétérodivalents, homodivalents et monovalents vis-à-vis de la GCCase mutée N370S/N370S, L444P/L444P ou G202R/G202R.

Composés	Type de structure	Type de bras	Effet chaperon ^[a]	Effet chaperon ^[a]	Effet chaperon ^[a]
			N370S/N370S	L444P/L444P	G202R/G202R
180	M(-)	C ₉	-	-	-
184		(EG) ₄ -Me	-	-	-
192		C ₉ (sans triazole)	n.d.	n.d.	-
185	M(+)	C ₉	-	1,1 à 2 nM	2,2 à 10 nM
186		C ₆ -OH	-	-	1,6 à 2 µM
187		C ₁₀ -OH	-	-	3,6 à 100 nM
189		C ₉ (sans triazole)	-	-	1,8 à 1 nM
166a	H(+/-)	C ₆	-	-	1,5 à 2 µM
166b		C ₁₀	-	1,1 à 100 nM	1,7 à 2 µM
166c		C ₆ -O-C ₆	1,1 à 300 nM	1,1 à 300 nM	2,2 à 2 µM
166d		C ₆ -(EG) ₃	-	-	1,6 à 2 µM
166e		C ₁₀ -(EG) ₄	-	1,1 à 10 nM	2,2 à 300 nM
177	D(+/+)	C ₁₀ -(EG) ₄	-	-	2,5 à 300 nM
178	D(-/-)	C ₁₀ -(EG) ₄	-	-	-

^[a] Facteur d'augmentation de l'activité de la GCCase mutée déterminée après traitement de fibroblastes de patients malades pendant 6 jours avec les différents composés à différentes concentrations (0,01 nM à 2 µM) par rapport à l'activité de la GCCase sans traitement (valeur de 1). Les valeurs d'effet chaperon indiquées sont une moyenne obtenue à partir de 3 à 7 expériences réalisées en triplicatas. L'activité de la GCCase est mesurée à l'aide d'un substrat non naturel, le 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucoside, qui est hydrolysé par l'enzyme pour former le β-glucose et la 4-méthylumbellifénone, un composé à fluorescence bleue dont la quantité est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. (-) : augmentation d'activité de la GCCase inférieure à 10% jusqu'à une concentration de 2 µM. (n.d.) : non déterminé.

Les tests effectués sur les fibroblastes N370S/N370S n'ont montré aucune augmentation significative de l'activité de la GCCase pour douze des treize composés testés. Seul le composé hétérodivalent **166c** a permis d'augmenter l'activité de l'enzyme d'un facteur 1,1 à une concentration de 300 nM. Parmi ces résultats, nous avons été surpris de ne pas observer d'effet chaperon pour le composé **189** qui est pourtant très proche structurellement du (+)-2-O-hexyl-DIX dont l'effet chaperon a été rapporté dans la littérature (×1,6 à 10 nM sur N370S, **Figure 66**). En ce qui concerne la mutation L444P/L444P, seuls le composé monovalent **185** et trois composés hétérodivalents (**166b**, **166c** et **166e**) ont montré de faibles activités chaperon (×1,1 pour 2 à 300 nM). Ces effets chaperons démontrent que les GCcases mutées L444P/L444P et N370S/N370S sont très peu sensibles vis-à-vis de nos composés.

A contrario, les tests réalisés sur les fibroblastes G202R/G202R ont montré que les systèmes hétérodivalents H(+/-) et monovalents M(+) permettaient tous d'augmenter l'activité de l'enzyme d'au moins un facteur 1,5. On remarque par contre que les analogues M(-) et D(-/-) sont, comme pour les autres mutations, totalement dépourvus d'activité chaperon. Dans cette série, l'effet chaperon le plus fort a été observé pour le composé monovalent **185** (×3,6 à 100 nM); ce résultat est très intéressant car ce composé fait partie des quelques chaperons connus dans la littérature ayant induits une augmentation d'activité supérieure à trois pour cette mutation G202R.^{256,261,262} Parmi les chaperons

identifiés, on remarque également que les composés monovalents **185** et **189** sont efficaces à très faibles concentrations (respectivement $\times 2,2$ à 10 nM et $\times 1,8$ à 1 nM). Même si ces augmentations d'activité sont deux à quatre fois moins fortes comparées au meilleur chaperon connu pour cette mutation (**114**, $\times 7,2$ à 150 μM),²⁵⁰ ces composés présentent l'avantage d'être actifs à des concentrations 1500 à 150 000 fois plus faibles.

L'analyse des résultats obtenus pour les différents composés M(+) et H(+/-) nous a aussi permis de déterminer quels paramètres pouvaient influencer l'activité chaperon pour la mutation G202R. En ce qui concerne les inhibiteurs non compétitifs monovalents, on remarque que le composé **185** possédant une chaîne nonyle est actif à une concentration 200 fois plus faible que le composé **186** avec une chaîne hydroxyhexyle. Il serait possible dans ce cas là d'expliquer cette différence en termes d'affinité pour le site secondaire de l'enzyme car on remarque que deux ordres de grandeur séparent également le K_i obtenu pour **185** (6,7 nM) et celui obtenu pour **186** (160 nM). La différence significative d'effet chaperon obtenue entre les inhibiteurs compétitifs monovalents **187** et **189** est en revanche plus difficile à rationaliser car ces deux composés possèdent une affinité comparable et plusieurs paramètres structuraux les différencient. Dans le cas des systèmes hétérodivalents, il semblerait que la présence de la tête (-)-2-O-DIX n'apporte rien de supplémentaire voire soit délétère en termes d'effet chaperon (**185** vs **166b** et **166e**). Ceci a notamment pu être confirmé avec l'analogue homodivalent D(+/-) (**177**) qui s'est révélé être un chaperon équivalent au système hétérodivalent H(+/-) correspondant (**166e**). D'une façon plus générale, nous pouvons penser que l'activité chaperon de ces composés est uniquement due à la tête (+)-2-O-DIX et à une partie aglycone lipophile. Ces caractéristiques correspondent en fin de compte à celles du meilleur chaperon identifié, le composé monovalent **187**.

Finalement, ces deux premières études biologiques nous ont permis d'identifier plusieurs chaperons efficaces de la GCCase mutée G202R/G202R qui agissent soit en ciblant le site actif de l'enzyme (**187** et **189**) soit en ciblant un site secondaire (**166a-e**, **177**, **185** et **186**). Consécutivement à ces résultats, nous avons initiée une nouvelle collaboration avec l'équipe de Raquel Lieberman dans le but d'obtenir la structure cristalline de la GCCase complexée avec l'un de ces composés chaperons/inhibiteurs non compétitifs. En cas de succès, cela pourrait finalement nous permettre d'identifier le site secondaire de la GCCase pour lequel la fixation de ces composés conduit à stabiliser l'enzyme mutée G202R/G202R.

6.2.3. Recherche d'un effet de synergie

Les systèmes hétérodivalents n'ayant pas donné les résultats escomptés à cause du changement de mode d'inhibition d'une des têtes utilisées, nous avons tout de même voulu savoir si l'association d'un chaperon ciblant le site actif de la GCCase et d'un chaperon ciblant un site secondaire pouvait conduire à un effet de synergie et donc à un effet chaperon très fort. Bien qu'il n'existe aucun exemple de ce type pour la maladie de Gaucher, une telle synergie a déjà été observée dans le cas de la maladie de Fabry par les groupes de Fleet et Kato.³⁰⁰ Il a été montré que l'association de la D-DGJ et de la L-DGJ, deux chaperons et inhibiteurs respectivement compétitif et non compétitif de l' α -galactosidase A, permettait d'augmenter de façon synergique l'activité de cette enzyme défectueuse. Dans notre cas, nous avons sélectionné parmi les composés précédemment testés, le composé monovalent **189**, inhibiteur compétitif ($K_i = 2,3$ nM) et chaperon ($\times 1,8$ à 1 nM), et le composé **185**, inhibiteur non compétitif ($K_i = 6,7$ nM) et chaperon ($\times 2,2$ à 10 nM). Ces composés ont ensuite été administrés

simultanément et en différentes proportions sur des fibroblastes G202R/G202R et l'effet chaperon a été évalué. Les résultats obtenus n'ont finalement montré aucun effet de synergie, par contre il a été montré pour certains *ratios* de concentration que l'effet chaperon des deux composés était supérieur aux deux effets individuels, par exemple en administrant 1 nM de **185** et 0,1 nM de **189** (**Figure 82**).

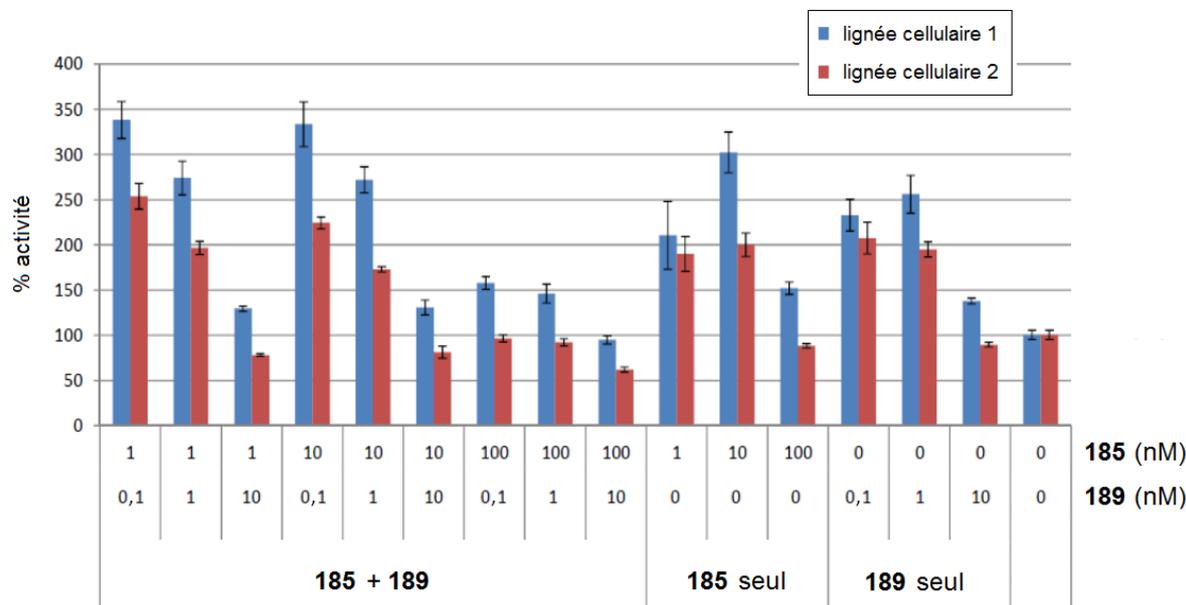


Figure 82. Évaluation de l'effet chaperon du composé **185** (non compétitif) en combinaison avec le composé **189** (compétitif) sur la GCase mutée G202R/G202R. Pour cette étude, deux lignées cellulaires ont été utilisées.

6.2.4. Réduction du taux de GlcCer dans les fibroblastes

Dans le but de confirmer l'effet chaperon obtenu sur la GCase mutée G202R/G202R, les meilleurs composés (**166b**, **166c**, **166e**, **177**, **185**, **187** et **189**) ont été sélectionnés pour des études d'analyse lipidomique sur le substrat naturel de l'enzyme (GlcCer). Dans une première étude, des fibroblastes de patients présentant le génotype G202R/G202R ont été traités avec les composés ci-dessus puis la quantité de GlcCer présente dans les cellules a été mesurée par UPLC-MS. On remarque dans un premier temps que la quantité de GlcCer présente dans les fibroblastes G202R/G202R non traités est quasiment quatre fois plus importante que dans les fibroblastes sauvages (**Figure 83**), ce qui est cohérent avec le fait que la GCase mutée possède une activité catalytique très réduite. En ce qui concerne les fibroblastes traités avec les différents chaperons, le résultat le plus intéressant a été obtenu avec le composé monovalent **185** qui a permis de réduire d'environ 40% la quantité de GlcCer à une concentration de seulement 10 nM. On remarque également que trois autres composés (**166e**, **177** et **189**) ont permis de diminuer de façon significative le taux de GlcCer.

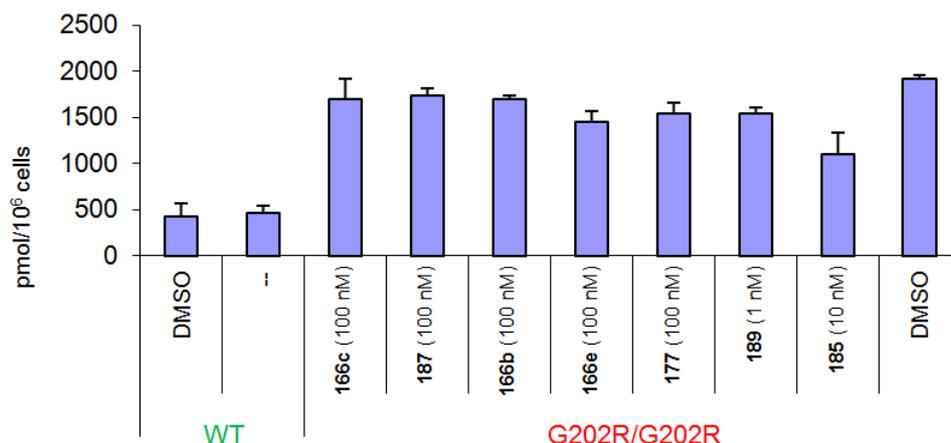


Figure 83. Quantité de GlcCer après traitement de fibroblastes de patients présentant la mutation G202R/G202R pendant 6 jours avec les composés sélectionnés.

Par la suite, une seconde étude a été menée afin de déterminer plus précisément la variation temporelle du taux de GlcCer en présence des différents chaperons. La méthodologie utilisée consiste à traiter pendant six jours les fibroblastes avec les composés chaperons, puis à incuber ces fibroblastes avec un sphingolipide particulier marqué par un azoture ($\omega\text{N}_3\text{Sph}$) qui peut être utilisé et métabolisé par la cellule pour former le glucosylcéramide correspondant ($\omega\text{N}_3\text{GlcCer}$) (**Figure 84**).³⁰¹ Ce sphingolipide $\omega\text{N}_3\text{Sph}$ est en réalité utilisé comme une sonde car, grâce au groupement azoture, une analyse UPLC-MS permet de déterminer avec précision la quantité de $\omega\text{N}_3\text{GlcCer}$ présente dans les cellules incubées comme cela a pu être démontré dans une étude précédente.³⁰¹ De cette façon, il est possible de visualiser la réduction de GlcCer qui intervient une fois que l'activité de l'enzyme est optimale (après six jours de traitement avec les chaperons). Dans notre cas, les résultats obtenus ont dans un premier temps montré que le sphingolipide $\omega\text{N}_3\text{Sph}$ était effectivement métabolisé en $\omega\text{N}_3\text{GlcCer}$ et que ce dernier était, comme nous l'attendions, présent en plus grande quantité dans les cellules G202R/G202R que dans les cellules sauvages (**Figure 84**). Cette étude a également démontré que le taux de $\omega\text{N}_3\text{GlcCer}$ était réduit en présence de chacun des composés testés, les réductions les plus significatives étant observées pour les composés **177**, **185** et **189** (réduction d'environ 50% du $\omega\text{N}_3\text{GlcCer}$ formé).

Au final, ces deux résultats d'analyse lipidomique démontrant la réduction du GlcCer accumulé et nouvellement formé sont très encourageants étant donné que l'objectif ultime de la restauration d'activité de la GCase est en fin de compte de diminuer la quantité de ce sphingolipide.

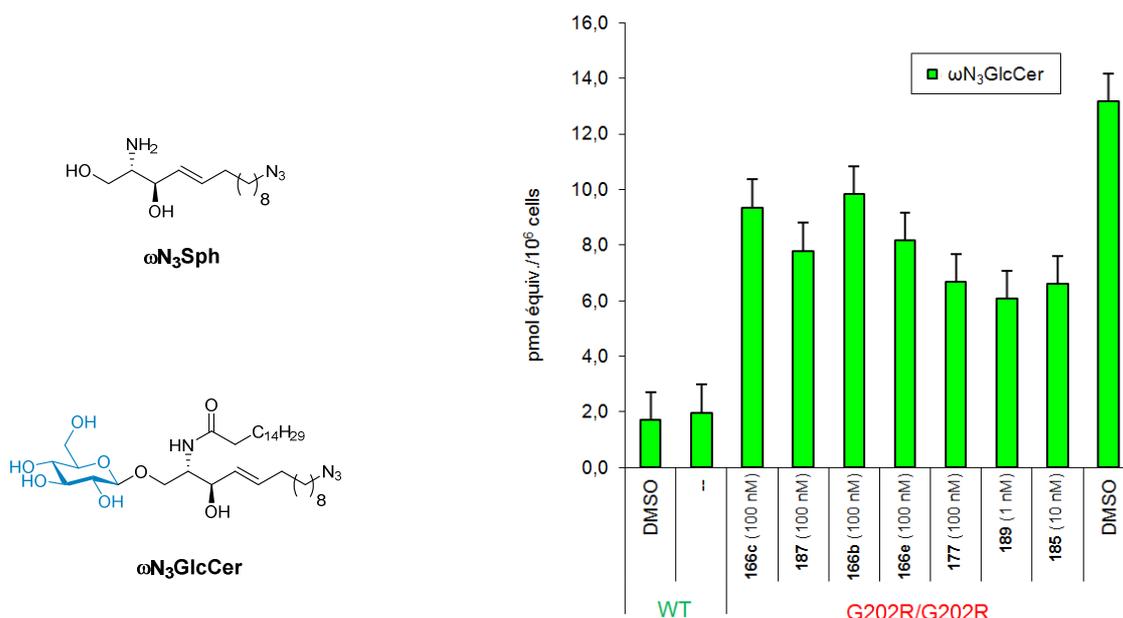


Figure 84. Quantité relative de $\omega\text{N}_3\text{GlcCer}$ après traitement de fibroblastes de patients présentant la mutation G202R/G202R avec les composés sélectionnés pendant 6 jours suivi de l'incubation de $\omega\text{N}_3\text{Sph}$ pendant 24 h.

6.2.5. Sélectivité vis-à-vis d'autres glycosidases

L'effet des composés sélectionnés sur l'activité d'autres glycosidases lysosomales a également été évalué par l'équipe du Dr Delgado (**Tableau 6**). Les composés **187**, **189** et **166b-c** se sont alors révélés être des inhibiteurs sélectifs de la GCCase puisqu'ils affectent très peu les autres glycosidases. On remarque seulement une inhibition de 10% de l'activité de la β -hexosaminidase. Il est aussi intéressant de noter que le composé **166b** active la β -galactosidase à une concentration de 1 μM , ce qui montre que ce chaperon n'est pas seulement spécifique de la GCCase. En ce qui concerne le composé **185**, on remarque que celui-ci inhibe également la β -galactosidase d'environ 10% à 100 nM. Les composés hétérodivalents **166e** et **177** sont quant à eux beaucoup moins sélectifs puisqu'ils inhibent de façon significative la plupart des glycosidases de cette étude (toutes pour **177**).

Tableau 6. Activités normalisées des composés sélectionnés vis-à-vis d'autres glycosidases lysosomales.^[a]

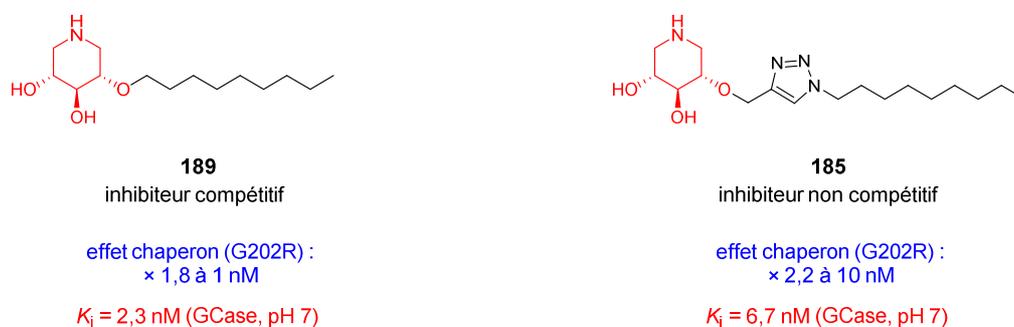
Composés	Type de chaperon	[μ M]	α -Gal ^[a]	β -Gal ^[a]	α -Glu ^[a]	β -Hex ^[a]
185	M(+)/C ₉	0,1	95 \pm 4	88 \pm 7	87 \pm 1	87 \pm 4
		1	100 \pm 4	43 \pm 14	99 \pm 13	91 \pm 1
187	M(+)/C ₁₀ -OH	0,1	100 \pm 6	103 \pm 0	102 \pm 6	90 \pm 4
		1	107 \pm 20	103 \pm 6	101 \pm 17	89 \pm 11
189	M(+)/C ₉ (sans triazole)	0,1	97 \pm 1	105 \pm 1	100 \pm 10	90 \pm 7
		1	94 \pm 8	96 \pm 2	92 \pm 12	92 \pm 11
166b	H(+/-)/C ₁₀	0,1	108 \pm 11	96 \pm 21	111 \pm 11	96 \pm 1
		1	104 \pm 5	116 \pm 12	103 \pm 4	96 \pm 5
166c	H(+/-)/C ₆ -O-C ₆	0,1	89 \pm 8	94 \pm 11	112 \pm 18	89 \pm 1
		1	102 \pm 7	100 \pm 11	110 \pm 10	80 \pm 10
166e	H(+/-)/C ₁₀ -(EG) ₄	0,1	96 \pm 5	87 \pm 2	80 \pm 1	77 \pm 2
		1	90 \pm 10	93 \pm 3	71 \pm 14	78 \pm 6
177	D(+)/C ₁₀ -(EG) ₄	0,1	85 \pm 2	78 \pm 3	73 \pm 9	82 \pm 4
		1	81 \pm 5	69 \pm 10	66 \pm 4	69 \pm 3

^[a] Après traitement de fibroblastes sauvages pendant 6 jours avec les composés sélectionnés, l'activité des différentes glycosidases a été normalisée par rapport aux cellules non traitées (0,1% DMSO): une activité de 100% correspond par conséquent à l'activité de l'enzyme dans les cellules non traitées. Les valeurs indiquées sont une moyenne \pm un intervalle de confiance obtenue à partir de 3 expériences. Les données statistiquement significatives ($p < 0,05$) ont été marquées en rouge pour une inhibition et en vert pour une activation. (α -Gal) : α -galactosidase. (β -Gal) : β -galactosidase. (α -Glu) : α -glucosidase. (β -Hex) : β -hexosaminidase.

7. RÉSUMÉ DU CHAPITRE

Depuis la découverte du concept de thérapie chaperon et du potentiel de cette stratégie pour traiter la maladie de Gaucher, de très nombreux chaperons pharmacologiques de la β -glucocérébrosidase ont été identifiés. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à un type de chaperon encore peu exploité jusque là, les inhibiteurs non compétitifs de l'enzyme. Étant donné que la localisation du (des) site(s) secondaire(s) de la GCCase n'est pas connue, nous avons conçu un système composé de deux têtes énantiomères (+) et (-) ayant pour objectif de cibler simultanément le site actif et un site secondaire de l'enzyme (**Figure 85**). Le but d'un tel système était double : identifier le site secondaire et obtenir un effet chaperon très fort. Plusieurs systèmes hétérodivalents ont alors été synthétisés afin de trouver l'espacement optimal entre les deux têtes. Pour ce faire, nous avons synthétisé deux têtes énantiomères acétyléniques *via* une approche stéréodivergente puis celles-ci ont été reliées successivement à un bras espaceur de longueur variable par deux réactions de CuAAC successives. Parallèlement, des analogues homodivalents possédant deux têtes identiques et des analogues monovalents ont aussi été synthétisés. Notre objectif de départ n'a malheureusement pas été atteint; les tests biologiques ont en effet montré que les systèmes hétérodivalents ciblaient en réalité *via* leur tête (+) un site secondaire de la GCCase et que la tête (-) n'avait aucune influence voire une influence négative sur l'inhibition de l'enzyme et l'effet chaperon. Par ailleurs, aucun effet chaperon

vraiment significatif n'a pu être observé sur la GCCase portant la mutation N370S ou L444P. Des résultats très intéressants ont cependant été obtenus pour la mutation G202R; en effet, nous avons identifié des chaperons qui agissaient en ciblant soit le site actif de la GCCase soit un site secondaire et permettaient de doubler jusqu'à quasiment quadrupler son activité à des concentrations faibles (1 à 300 nM). Les plus efficaces d'entre eux ont aussi montré qu'ils étaient capables de réduire de façon significative l'accumulation du substrat naturel GlcCer dans le lysosome. Parmi eux, le chaperon non compétitif **185** semble être le composé le plus prometteur de cette série et pourrait constituer l'amorce de nouveaux projets comme des études de type relation structure-activité ou des études de cristallisation avec la GCCase. Nous prévoyons également de revoir notre approche initiale visant à cibler simultanément les deux sites de l'enzyme en tirant profit des résultats obtenus lors de cette étude, à savoir l'identification des composés **189** et **185**, deux puissants inhibiteurs compétitif et non compétitif de la GCCase et chaperons de l'enzyme mutée G202R. Nous avons pour cela envisagé la synthèse de systèmes hétérodivalents de seconde génération en reliant les composés **189** et **185** avec une partie PEG de longueur variable (**Figure 85**).



Systèmes de 2nd génération envisagés:

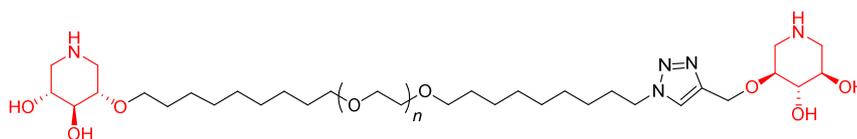


Figure 85. Systèmes de 2nd génération basés sur les composés monovalents **189** et **185**, inhibiteurs compétitif et non compétitif de la GCCase et chaperons de l'enzyme mutée G202R.

CHAPITRE 3

***C*-Glycosides multivalents
comme
sondes mécanistiques**

1. LES C-GLYCOSIDES

Les C-glycosides sont une classe de glycomimétiques pour lesquels l'oxygène impliqué dans la liaison glycosidique a été substitué par un atome de carbone. Comparé aux sucres, cette modification change totalement la réactivité du centre anomérique qui passe d'un acétal à un éther. Ces analogues de sucres deviennent par conséquent résistants aux hydrolyses enzymatiques et acides. À l'origine, l'intérêt porté aux C-glycosides n'était que purement académique, comme pour les iminosucres. D'ailleurs, le premier C-glycoside synthétique a été obtenu en 1945 *via* un réactif de Grignard.³⁰² Cet intérêt s'est grandement développé dans les années 1970-1980 après que des propriétés biologiques et pharmacologiques de C-glycosides d'origine naturelle aient été mises en évidence.³⁰³ Ce fut le cas de la palytoxine,³⁰⁴ une molécule complexe basée sur plusieurs C-glycosides,³⁰⁵ qui est l'une des substances non peptidiques les plus toxiques connues (**Figure 86**).³⁰⁶ Le champ d'application des C-glycosides s'est ensuite étendu grâce aux progrès faits dans le domaine de la glycobiologie et ces analogues stables de sucre ont alors eu un grand intérêt en chimie médicinale.^{303,307} Parallèlement, les C-glycosides ont également beaucoup été étudiés en synthèse organique et de très nombreuses stratégies synthétiques ont été développées pour accéder à ces structures particulières.^{307,308}

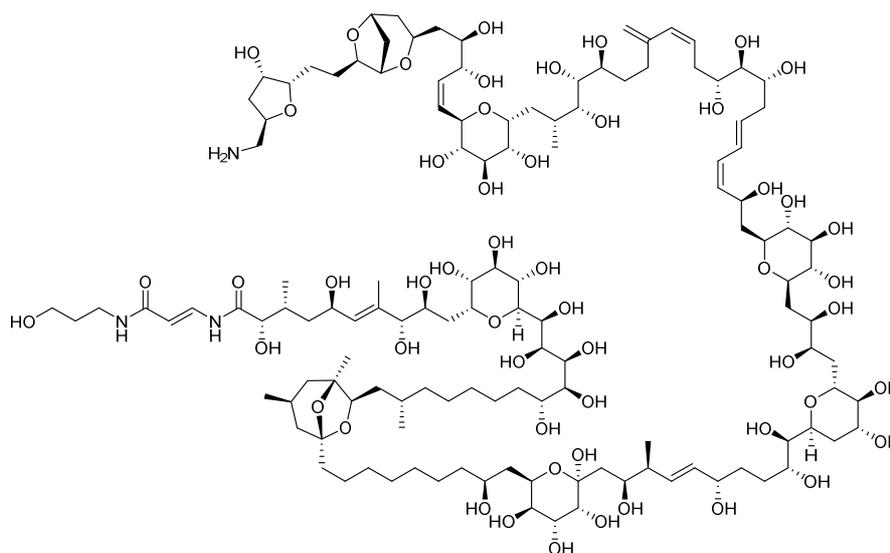


Figure 86. La palytoxine, une substance naturelle dont la structure est basée sur plusieurs C-glycosides.

Le développement spectaculaire des glycoclusters et leurs applications ont ensuite conduit les chimistes à synthétiser des C-glycosides multivalents. Les exemples de cette classe de composés sont néanmoins peu nombreux dans la littérature et se résument à des clusters basés sur moins d'une dizaine de plateformes différentes. On retrouve parmi ces plateformes des calix[4]arènes,^{309,310} des dérivés du pentaérythritol³¹¹ ou du trometamol,³¹² des nanoparticules d'or³¹³ ou encore des plateformes peptidiques.³¹⁴ Dans ce domaine, Dondoni et Marra ont été un des seuls groupes à avoir fait appel à une stratégie de chimie « click » pour préparer des clusters de C-glycosides tri- et tétravalents.³⁰⁹ Leur approche consistait à coupler par CuAAC des ligands (azidométhyl)-C-glycosides avec des plateformes polyacétyléniques dérivées du calix[4]arène, de l'adamantane et du benzène (**193-195**,

Figure 7). À l'inverse, des ligands éthynyl-*C*-glycosides ont aussi pu être couplés avec les mêmes plateformes fonctionnalisées avec des azotures. La seconde stratégie de chimie « click » qui a été rapportée pour obtenir des *C*-glycosides multivalents mettait en jeu une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un oxyde de nitrile et permettait de former un lien isoxazole.³¹¹

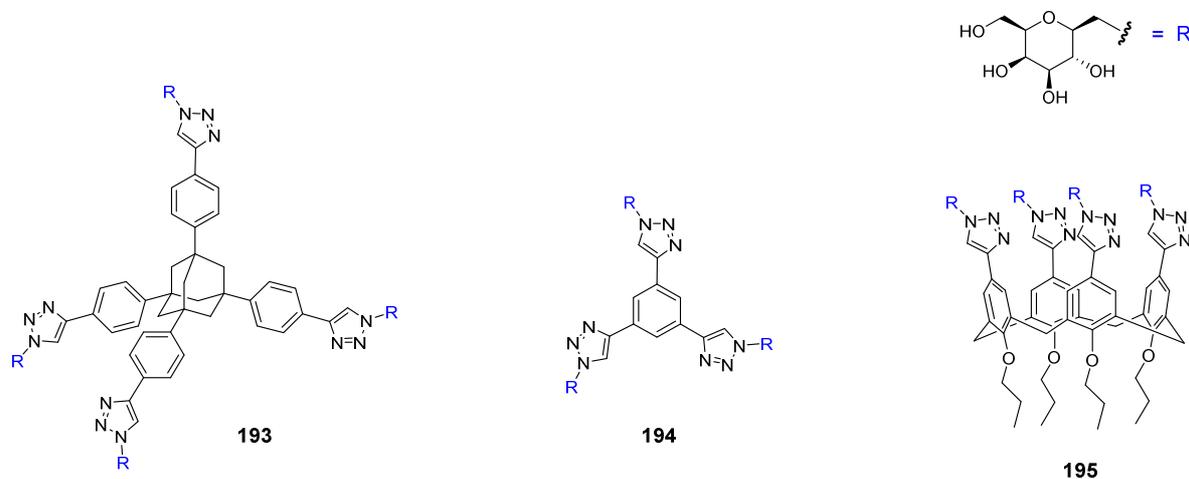


Figure 87. Clusters de *C*-glycosides (**193-195**) préparés en couplant une plateforme acétylénique aux ligands azidométhyl-*C*-glycosides par CuAAC.³⁰⁹

Au final, l'application des *C*-glycosides multivalents reste assez limitée pour le moment puisque la plupart des études dans ce domaine ne rapportaient que leur synthèse.

2. C-GLYCOSIDES MULTIVALENTS ET INTERACTIONS NON SPÉCIFIQUES

L'idée de concevoir des *C*-glycosides multivalents fait suite à une étude réalisée par les groupes d'Ortiz Mellet, Fernández et Nierengarten dont le but était d'approfondir les mécanismes de la multivalence appliquée à l'inhibition des glycosidases (voir **INTRODUCTION**).⁷⁸ Dans cette étude, les auteurs ont suggéré que le site actif n'était pas le seul site à être impliqué dans la formation des complexes enzyme-iminosucres multivalents et qu'il fallait aussi considérer des interactions non spécifiques à la surface de l'enzyme. Ces interactions non spécifiques s'apparenteraient à des interactions de type lectine-sucre et impliqueraient la structure polyol des iminosucres principalement *via* des liaisons hydrogènes. À partir de là, il a été avancé que les puissants effets multivalents observés avec les clusters d'iminosucres sur l' α -mannosidase de Jack Bean seraient dus à une combinaison d'interactions spécifiques (avec le site actif de l'enzyme) et non spécifiques qui pourrait faire penser à un *pseudo* effet chélate (**Figure 88**).

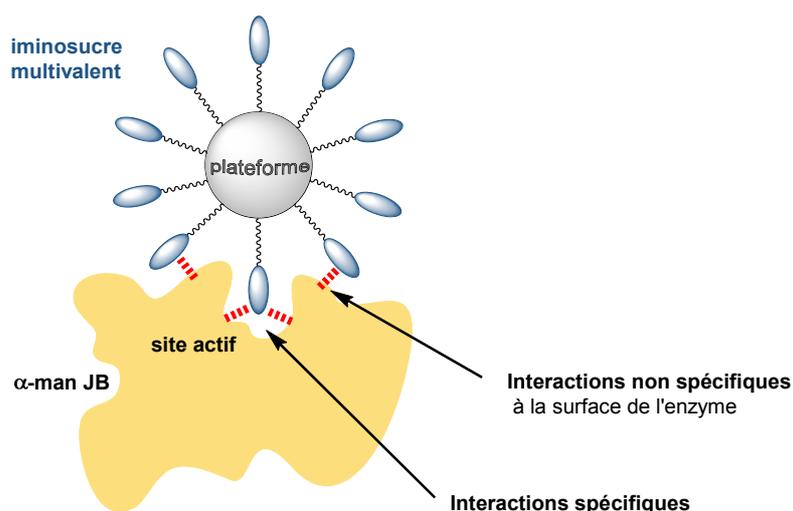


Figure 88. Représentation schématique des interactions spécifiques et non spécifiques entre un iminosucre multivalent et l' α -mannosidase de Jack Bean (α -man JB).

À la lumière de cette étude, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'évaluer la contribution de ces interactions non spécifiques sur les effets multivalents obtenus avec l' α -mannosidase de Jack Bean. Dans ce contexte, nous avons envisagé de présenter sur une plateforme multivalente un ligand C-glycoside qui, de par l'absence d'une fonction amine, ne permet plus de former des interactions électrostatiques fortes avec les fonctions carboxylates du site actif mais conserve une structure polyol identique à celle des iminosucres. Ces C-glycosides multivalents ne devraient par conséquent former que des liaisons non spécifiques à la surface de l'enzyme étant attendu qu'ils soient peu affins avec son site actif. Conçus comme des sondes mécanistiques, ces systèmes nous permettraient par conséquent de déterminer si l' α -mannosidase de Jack Bean peut être uniquement inhibée *via* des interactions non spécifiques multivalentes et si cela peut conduire à un effet multivalent.

Pour la conception de ces systèmes multivalents, nous avons choisi un dérivé hexyl- α -C-glucoside pour sa ressemblance structurale avec le ligand iminosucre *N*-hexyl-DNJ qui avait donné de fortes augmentations d'affinité vis-à-vis de cette enzyme.^{74,75} En ce qui concerne la plateforme, notre choix s'est tourné vers des charpentes β -cyclodextrine et fullerène C₆₀, nous permettant d'accéder à des systèmes tétradéca- et dodécavalent (**196** et **197**) (**Figure 17**). Ces plateformes ont également été choisies pour les effets multivalents forts qu'elles avaient permis d'obtenir en série *N*-hexyl-DNJ; en effet, les clusters dérivés d'une β -cyclodextrine (**34**) et d'un fullerène (**23**) avaient montré un gain d'affinité respectivement d'un facteur 650 et 2150 par rapport à leur analogue monovalent (**24a**).⁷⁵ En optant pour deux plateformes de taille, valence et orientation de ligands différentes, il nous sera également possible d'évaluer l'influence de ces paramètres structuraux sur les interactions non spécifiques.

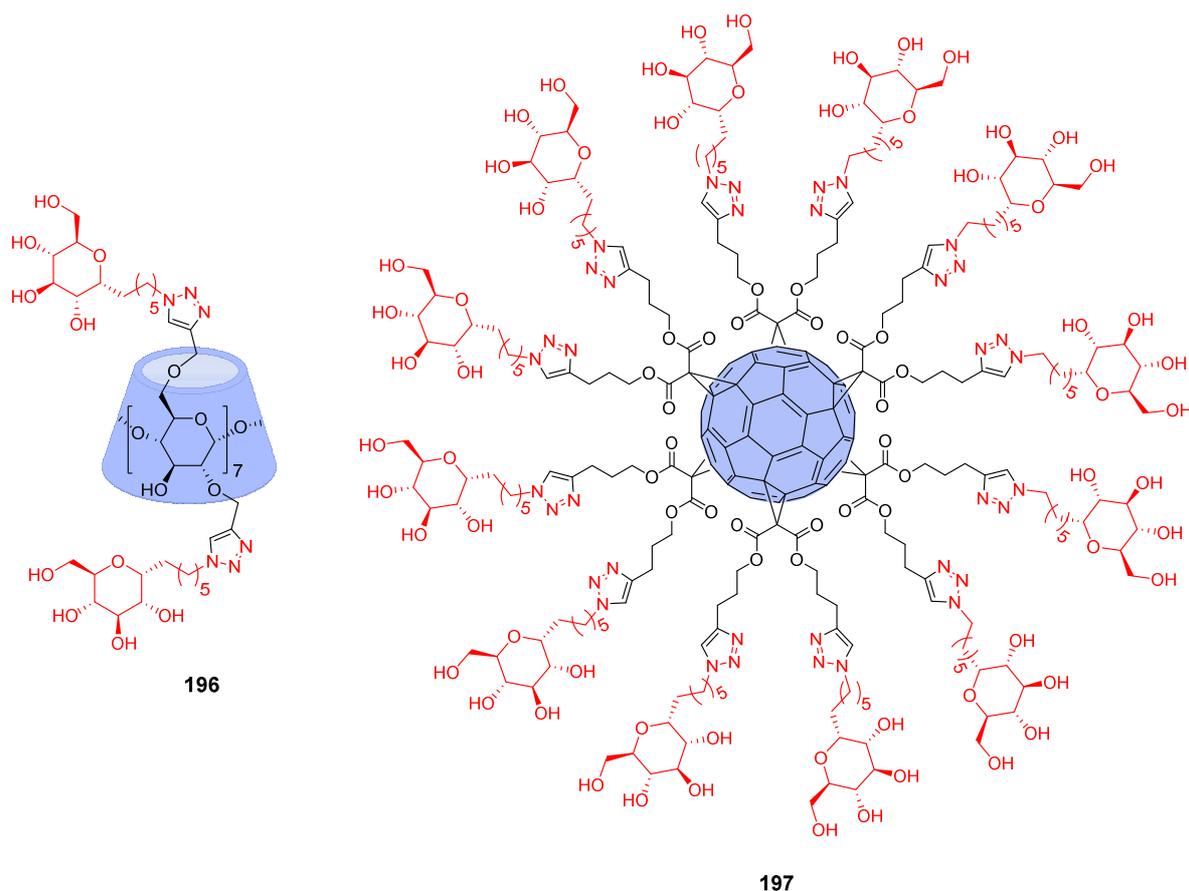


Figure 89. Clusters de *C*-glucosides basés sur une plateforme β -cyclodextrine (**196**) et fullerène C₆₀ (**197**) conçus comme des sondes mécanistiques.

3. APPROCHE SYNTHÉTIQUE POUR LES C-GLUCOSIDES MULTIVALENTS

Pour obtenir le cluster **196** basé sur la β -cyclodextrine, les ligands *C*-hexyl-glucosides fonctionnalisés avec un azoture (**198**) seraient reliés classiquement par CuAAC à la plateforme polyacétylénique **199**, puis déprotégés dans des conditions classiques (**Schéma 41**). En ce qui concerne le cluster **197**, celui-ci serait formé par fonctionnalisation d'une plateforme fullerène hexa-adduit C₆₀ comportant douze fonctions alcynes (**200**) développée par le groupe du Dr J.-F. Nierengarten.³¹⁵ Contrairement à la β -cyclodextrine, ce type de plateforme doit être fonctionnalisé avec des ligands *C*-glucosides entièrement déprotégés (**201**) car les fonctions malonates présentes sur le fullerène ne sont pas compatibles avec une déprotection en milieu basique.

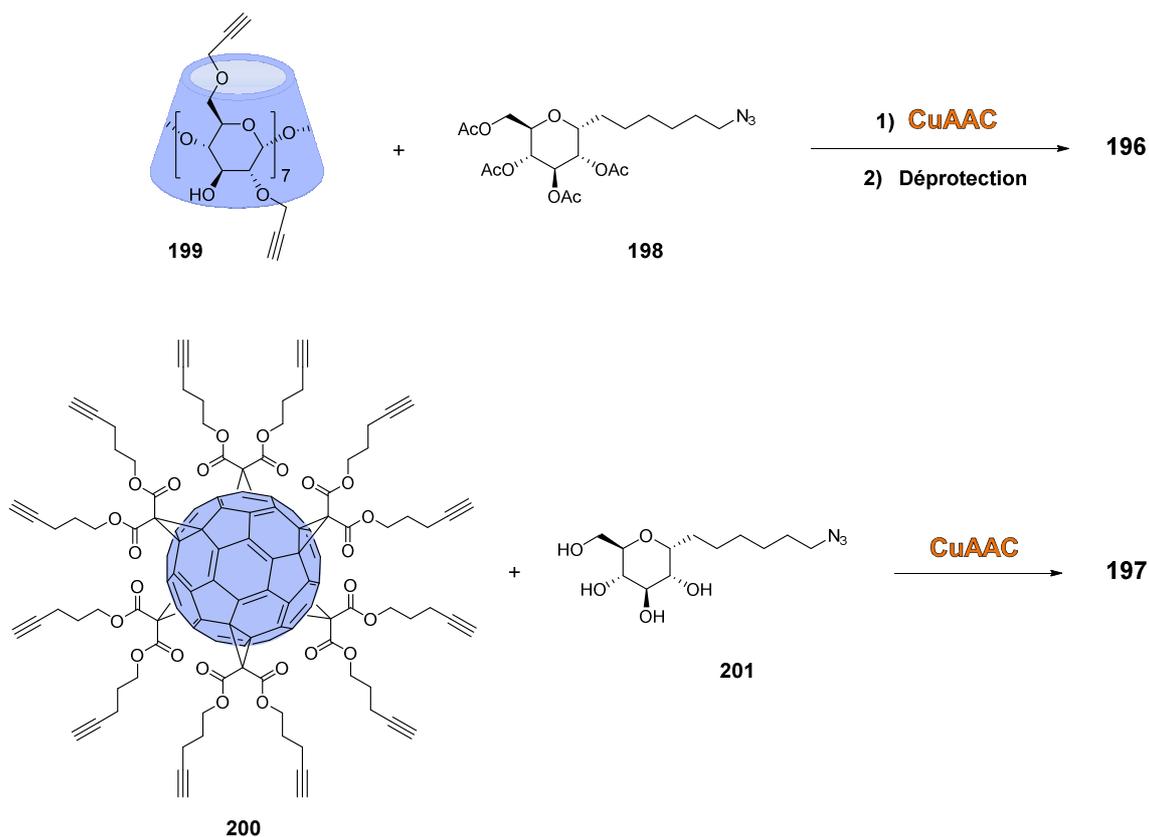


Schéma 85. Approche synthétique pour obtenir les deux clusters de C-glucosides **196** et **197**.

Pour obtenir les ligands (azidohexyl)-C-glucosides **198** et **201**, nous avons envisagé une stratégie de synthèse basée sur une étape clé de métathèse croisée (**Schéma 86**). Cette même stratégie avait déjà été utilisée au laboratoire pour obtenir des ligands 1-C-alkyl-imino-D-xylitol fonctionnalisés avec un azoture.³¹⁶ Dans un premier temps, l'intermédiaire allylé **202a** pourrait donc être obtenu classiquement à partir du méthyl-D-glucopyranoside,³¹⁷ puis être couplé à l'alcène tosylé **203** pour former le produit de métathèse **204**. Le ligand **198** serait finalement obtenu après hydrogénation, acétylation et substitution du groupement tosylé par un azoture. Une étape supplémentaire de déprotection serait ensuite nécessaire pour obtenir le ligand **201**. Cette stratégie de synthèse a été choisie pour sa flexibilité, la réaction de métathèse croisée nous permettant d'introduire une chaîne alkyle de longueur différente dans le cas où d'autres systèmes auraient été nécessaires.

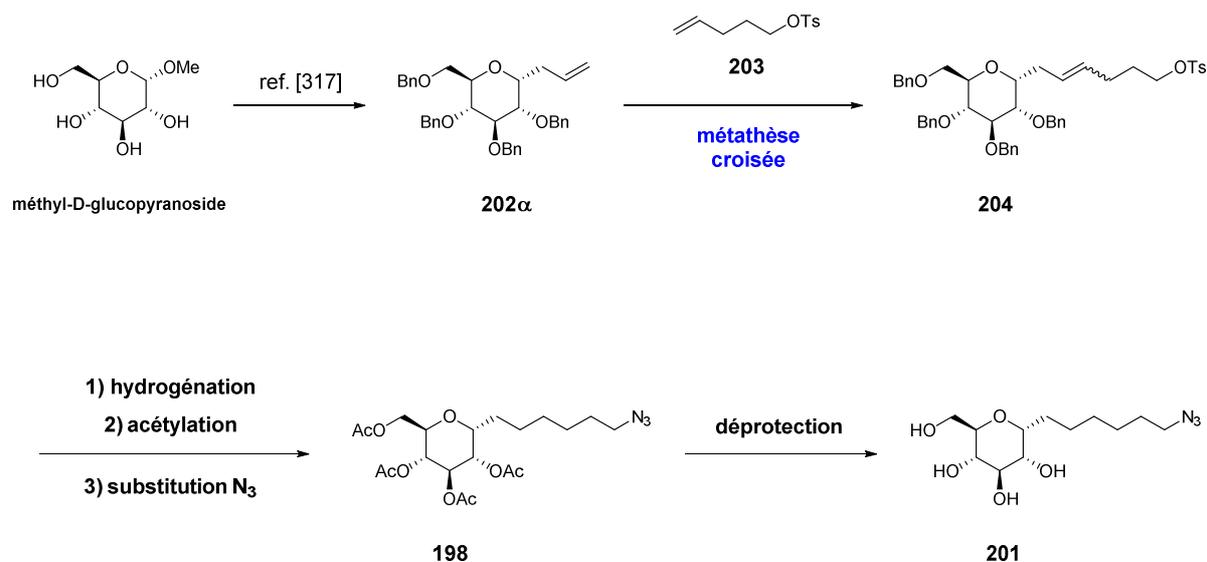


Schéma 86. Stratégie de synthèse des ligands (azidohexyl)-C-glucosides **198** et **201**.

4. SYNTHÈSE DES LIGANDS (AZIDOHXYL)-C-GLUCOSIDES

4.1. Synthèse des deux partenaires de métathèse

Le premier partenaire de métathèse, l'alcène **203**, a facilement pu être obtenu d'après les conditions décrites dans la littérature en tosylant le 4-pentèn-1-ol (Schéma 87).³¹⁸

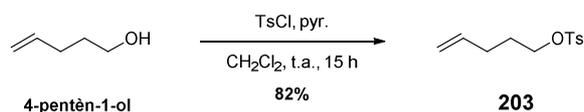
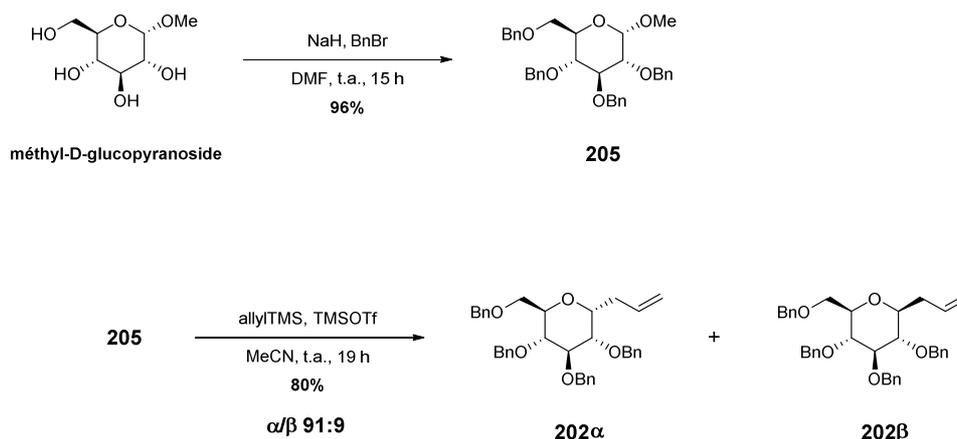


Schéma 87. Synthèse de l'alcène tosylé **203**.

Pour obtenir le C-glucoside allylé **202 α** , nous avons exploité le caractère électrophile du carbone anomérique du méthyl-D-glucopyranoside pour introduire de façon stéréosélective un groupement allyle. Avant cette réaction de C-allylation, les fonctions hydroxyles du méthyl-D-glucopyranoside ont été protégées avec des groupements benzyles (Schéma 88).³¹² Le composé **205** a ensuite été traité avec l'allyltriméthylsilane et le TMSOTf dans les conditions décrites dans la littérature³¹⁹ pour donner l' α -C-glucoside allylé **202 α** avec une très bonne diastéréosélectivité. La structure des anomères α et β a pu être facilement attribuée par comparaison avec les données spectroscopiques RMN ^1H fournies dans la littérature.^{320,321} Lors de cette réaction, l'acide de Lewis TMSOTf active l'oxygène glycosidique et permet la formation d'un intermédiaire oxocarbénium qui adopte principalement une forme demi-chaîse $^4\text{C}_3$ pour laquelle tous les substituants sont en position pseudo-équatoriale. La stéréosélectivité en faveur de l'anomère α s'explique ensuite l'attaque du nucléophile allylTMS selon une trajectoire axiale qui est favorisée par des effets stéréoélectroniques.

Schéma 88. Synthèse du C-glucoside allylé **202α**.

4.2. Réaction de métathèse croisée

Les alcènes **202α** et **203** étant des alcènes de type I (homodimérisation rapide),³²² la réaction de métathèse entre ces deux composés conduit normalement à un mélange statistique de trois produits : le produit souhaité **204**, l'homodimère de **202α** et l'homodimère de **203**. Pour augmenter la sélectivité de la réaction, il est par conséquent nécessaire que l'un des alcènes soit en large excès par rapport à l'autre.³²² Dans notre cas, nous avons utilisé un excès de l'alcène tosylé **203** pour favoriser l'obtention du produit **204** par rapport à l'homodimère de **202α**.

Pour ce premier essai de métathèse croisée, nous nous sommes appuyés sur les conditions (catalyseur, solvant, température) qui avaient été utilisées au laboratoire pour obtenir le ligand 1-C-alkyl-imino-D-xylitol.³¹⁶ Les alcènes **202α** et **203** en solution dans le dichlorométhane ont par conséquent été chauffés à reflux en présence de 20 mol% de catalyseur d'Hoveyda-Grubbs II (Schéma 89). Au bout de 18 heures de réaction et après purification, nous avons pu isoler un produit dont le spectre RMN ¹H correspondait au produit de métathèse souhaité **204**. En analysant le spectre RMN ¹³C puis le spectre HRMS, nous nous sommes cependant rendu compte que nous avons obtenu, en plus du produit **204** ($n = 2$), un mélange de produits inséparables dont la masse correspondait à des produits d'homologation avec un groupement méthylène en moins ($n = 1$) ou en plus ($n = 3$) (Schéma 89). Ces produits secondaires d'homologation n'ont finalement pas pu être éliminés par purification sur gel de silice car leur structure est trop proche du produit **204**.

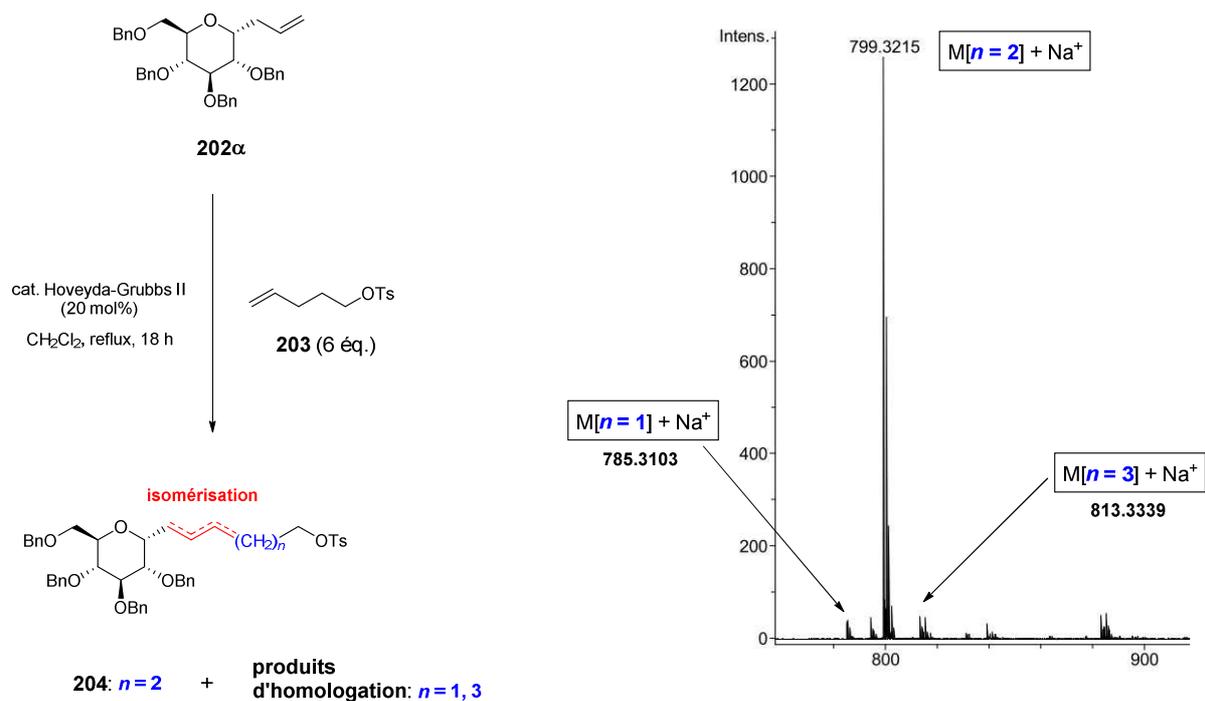


Schéma 89. Premier essai de métathèse croisée : obtention du produit majoritaire de métathèse ($n = 2$) plus au moins deux produits d'homologation ($n = 1, 3$) observés en ESI-MS (spectre ci-dessus).

Les travaux de Schroeder³²³ dans le domaine ont montré que la formation de tels produits d'homologation avec réduction et accroissement de chaîne carbonée était due à l'isomérisation de la double liaison des alcènes, l'une des réactions secondaires les plus fréquentes de métathèse croisée (**Schéma 90A**). En effet, cette isomérisation conduit à la formation d'alcènes disubstitués (**M** et **N**) qui peuvent également réagir avec les alcènes de départ non isomérisés et former un produit de métathèse avec un groupement méthylène en moins (**Schéma 90B**). D'un autre côté, la métathèse entre les alcènes isomérisés et non isomérisés peut aussi conduire à la formation d'un nouvel alcène disubstitué **O**, homologue de **203**. Après isomérisation de ce dernier, l'alcène terminal **P** formé peut alors réagir avec **202α** et conduire au produit d'homologation possédant un groupement méthylène en plus (**Schéma 90C**). Il existe bien entendu d'autres possibilités conduisant à la formation de ces produits d'homologation que celles qui ont été décrites ci-dessus.

A. Isomérisation des produits de départ

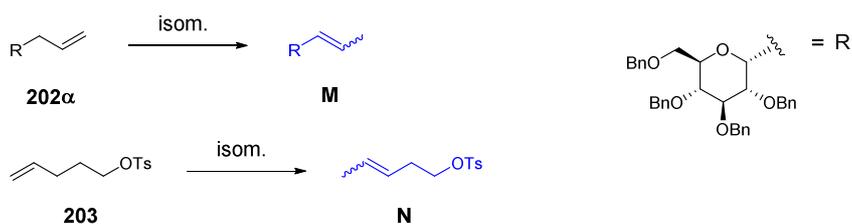
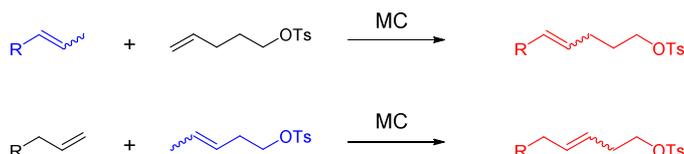
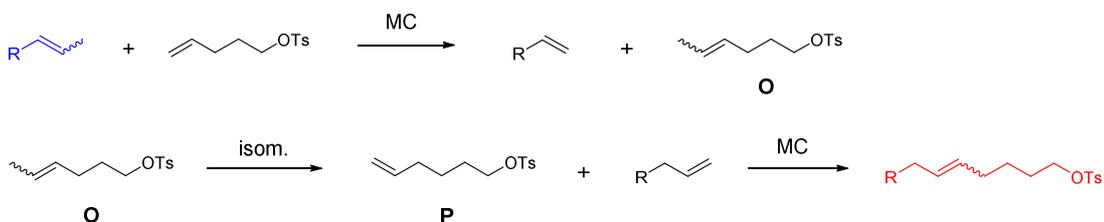
B. Formation des produits d'homologation avec un CH₂ en moins ($n = 1$)C. Formation des produits d'homologation avec un CH₂ en plus ($n = 3$)

Schéma 90. Exemples de formation des produits d'homologation *via* isomérisation (isom.) et métathèse croisée (MC).

La migration de la double liaison des alcènes pendant la réaction de métathèse a été attribuée à la formation *in situ* de complexes d'hydrure de ruthénium.³²⁴ Grubbs *et al.* ont en effet démontré que les complexes carbène-ruthénium, comme **206**, pouvaient se décomposer et former un complexe d'hydrure de ruthénium (**207**) qui, dans les conditions de métathèse, catalyse effectivement l'isomérisation des oléfines (**Schéma 91**).³²⁵ Dans ce cas, l'isomérisation se fait *via* un mécanisme d'addition/élimination du complexe métal-hydrure qui est le mécanisme le plus communément proposé pour l'isomérisation des oléfines catalysée par les métaux de transition (**Schéma 91**).³²⁶ Le cycle catalytique débute alors par la coordination de l'oléfine avec le complexe métal-hydrure pour donner le complexe π correspondant (**Q**). Une étape d'hydroméallation permet ensuite de former le complexe σ métal-alkyle (**R**) qui, après β -élimination, conduit à un nouveau complexe π (**S**). Finalement, la dissociation de l'oléfine isomérisée permet de régénérer le complexe actif de métal-hydrure.

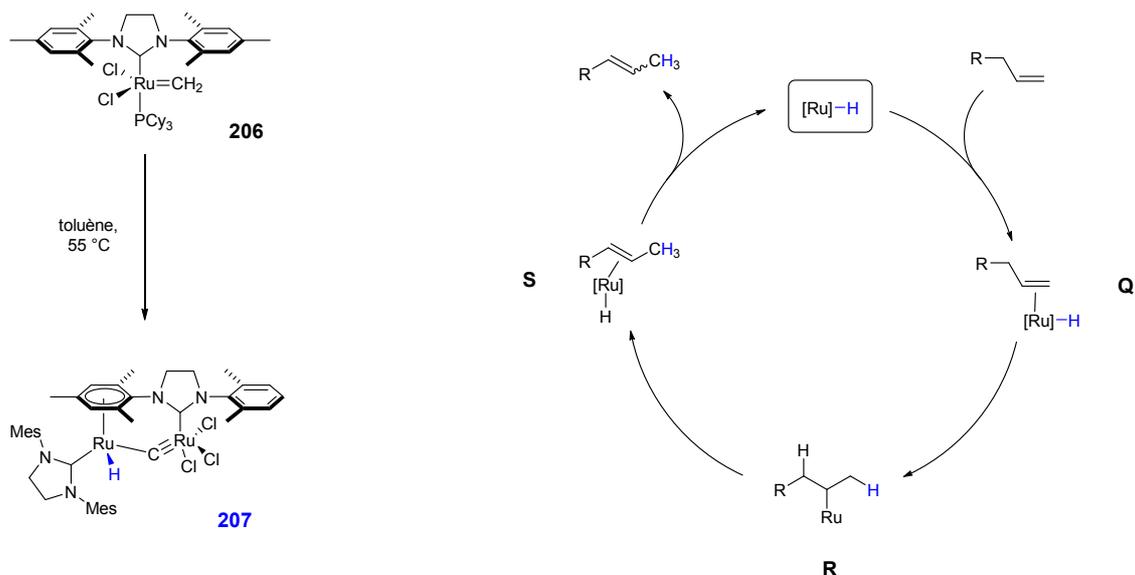


Schéma 91. Formation du complexe hydrure de ruthénium **207** et cycle catalytique conduisant à l'isomérisation des alcènes.

Face à ce problème, Grubbs *et al.* ont montré que cette réaction secondaire d'isomérisation pouvait être supprimée par l'addition de pièges à hydrure, comme la 1,4-benzoquinone (1,4-BQ).³²⁷ En effet, il a été montré que la 1,4-BQ était réduite par les complexes d'hydrure de ruthénium pour former l'hydroquinone.³²⁸ Dans leur cas, le groupe de Schroeder a montré que l'addition de 1,4-BQ ne suffisait cependant pas à prévenir l'isomérisation des alcènes (et donc la formation de produits d'homologation) lorsque les catalyseurs d'Hoveyda-Grubbs II et Grubbs II étaient utilisés.³²³ La solution rapportée par ce groupe consistait alors à utiliser, conjointement à la 1,4-BQ, un catalyseur de métathèse moins actif comme le catalyseur de Grubbs I.

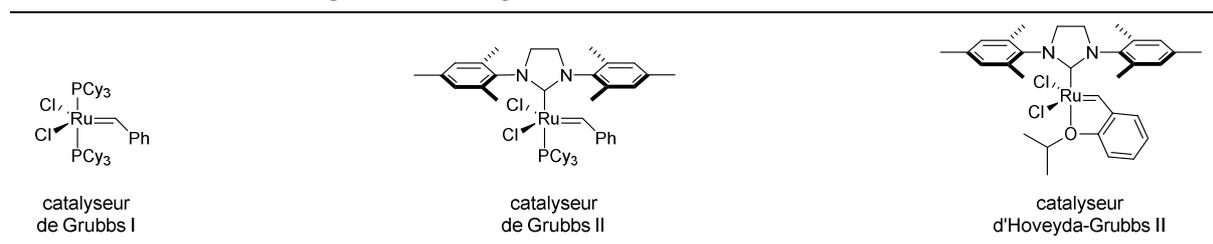
En nous appuyant sur cette étude, nous avons donc réalisé un nouvel essai de métathèse croisée en présence de 1,4-BQ (0,2 éq.) et de catalyseur de Grubbs I, pour lequel la charge avait également été diminuée (10 mol%). Au bout de 26 heures de réaction à 40 °C, nous avons pu isoler le produit de métathèse **204** avec un rendement de 35% et les analyses RMN ¹³C et HRMS nous ont confirmé qu'aucun produit d'homologation ne s'était formé (entrée **2**, **Tableau 7**).

Par la suite, nous avons envisagé d'utiliser le catalyseur de Grubbs II qui est un catalyseur plus actif et qui nous permettrait par conséquent d'augmenter le rendement de la réaction. Étant donné que le groupe de Schroeder avait observé des isomérisations avec ce catalyseur, nous avons décidé contrairement à eux d'effectuer la réaction de métathèse à température ambiante car il semblerait que la formation du complexe hydrure de ruthénium soit favorisée à haute température (**Schéma 91**). Ce nouvel essai nous a permis d'obtenir le composé **204** pur sans produit d'homologation avec un rendement amélioré de 55% (entrée **3**). Consécutivement à cela et puisque la conversion de la réaction précédente n'était pas complète, un essai supplémentaire a été effectué en augmentant uniquement le temps de réaction (entrée **4**). Finalement, après 70 h de réaction, le produit de métathèse pur a pu être isolé avec un rendement de 68% et suite à ce résultat, nous n'avons pas optimisé davantage la réaction de métathèse croisée. Il est à noter que le produit **204** a été obtenu pour chaque réaction de métathèse sous forme d'un mélange d'isomères *E* et *Z*, cette stéréoisomérisation n'a cependant pas d'importance puisque la double liaison était destinée à être réduite.

Tableau 7. Optimisation de la réaction de métathèse croisée par rapport au premier essai réalisé (entrée 1).

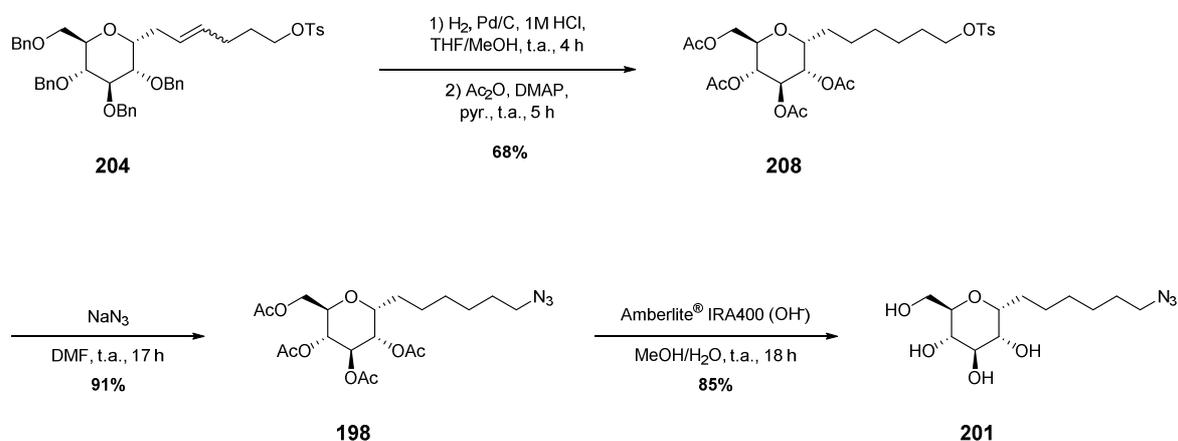
Entrée	Catalyseur	Température ^[a]	Temps	Additif	Produit de métathèse (204)
1	Hoveyda-Grubbs II (20 mol%)	40 °C	18 h	-	~ 42% ^[b]
2	Grubbs I (10 mol%)	40 °C	26 h	1,4-BQ (0,2 éq)	35% ^[c]
3	Grubbs II (15 mol%)	t.a.	23 h	1,4-BQ (0,2 éq)	55% ^[c]
4	Grubbs II (15 mol%)	t.a.	70 h	1,4-BQ (0,2 éq)	68% ^[c]

^[a] Réactions réalisées dans le dichlorométhane sous atmosphère d'argon. ^[b] Présence de produits d'homologation observée en ESI-MS. ^[c] Aucun produit d'homologation observé en ESI-MS.



4.3. Hydrogénation et introduction de l'azoture

Une fois les conditions de métathèse optimisées et le composé **204** en main, la prochaine étape consistait à réduire la double liaison C=C et déprotéger les groupements benzyles. Pour cela, le composé **204** a été hydrogéné en présence de palladium sur charbon (10%) puis après avoir vérifié que la réaction était complète en RMN ¹H, le brut réactionnel a été engagé sans purification préalable dans une réaction d'acétylation en présence d'anhydride acétique, de pyridine et d'une quantité catalytique de DMAP (**Schéma 92**). Après purification, le produit acétylé **208** a été isolé avec un rendement de 68% sur deux étapes. Le groupement tosyle a finalement été substitué par un groupement azoture pour donner le ligand (azidohexyl)-C-glucoside acétylé **198** avec un rendement de 91%. Le ligand (azidohexyl)-C-glucoside entièrement déprotégé **201** a quant à lui été obtenu après la déprotection des groupements acétates à l'aide d'une résine basique échangeuse d'ions (Amberlite® IRA400).

**Schéma 92.** Synthèse des ligands C-glucosides **198** et **201**.

5. SYNTHÈSE DES CLUSTERS DE C-GLUCOSIDES ET DE LEUR ANALOGUE MONOVALENT

5.1. C-Glucoside monovalent de référence

Pour évaluer l'influence de la présentation multivalente des ligands C-glucosides et quantifier un effet multivalent potentiel, nous avons également dû synthétiser l'analogue monovalent de nos dérivés. Suite aux problèmes rencontrés lors de la synthèse des ligands monovalents *N*-alkyl-DMJ, à savoir la formation d'un produit secondaire de type α -céto-triazole (voir **CHAPITRE 1**), nous avons décidé de changer les conditions habituellement utilisées pour la réaction de CuAAC. La quantité de 1-pentyne a donc été diminuée de 10 à 5 équivalents et la réaction a été réalisée à température ambiante dans un mélange THF/H₂O au lieu d'un chauffage à 80 °C sous irradiation micro-onde. Finalement, après 18 h de réaction, la conversion était très faible et nous avons isolé un mélange 1:1 de produit souhaité **209** et de produit secondaire α -céto-triazole **210** (**Schéma 93**). Suite à cela, des recherches ont été menées au laboratoire afin de comprendre comment se formait ce produit d'oxydation (voir **CHAPITRE 1**).

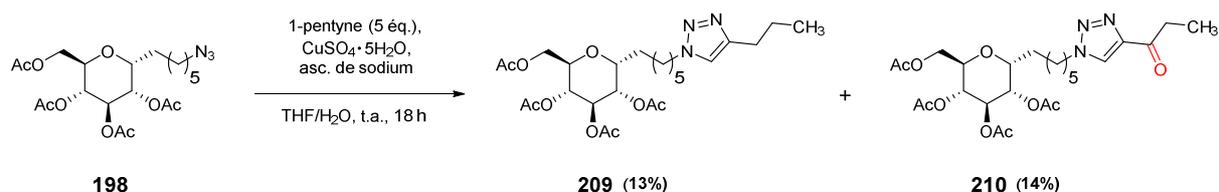
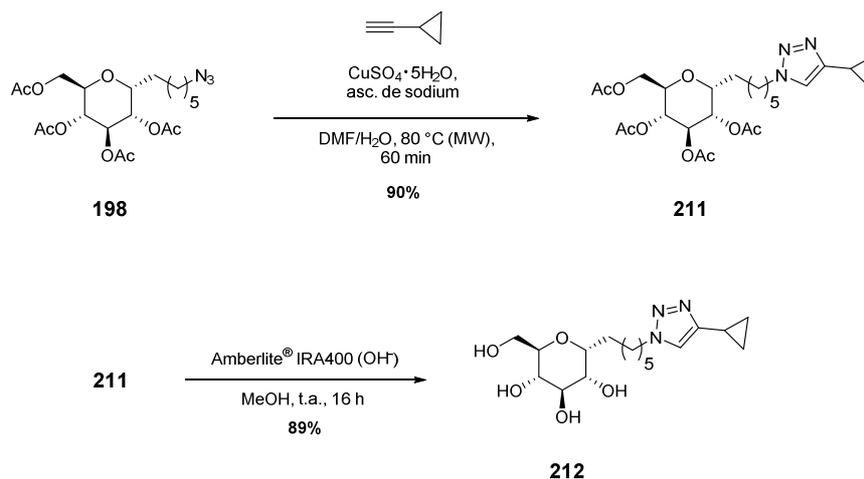


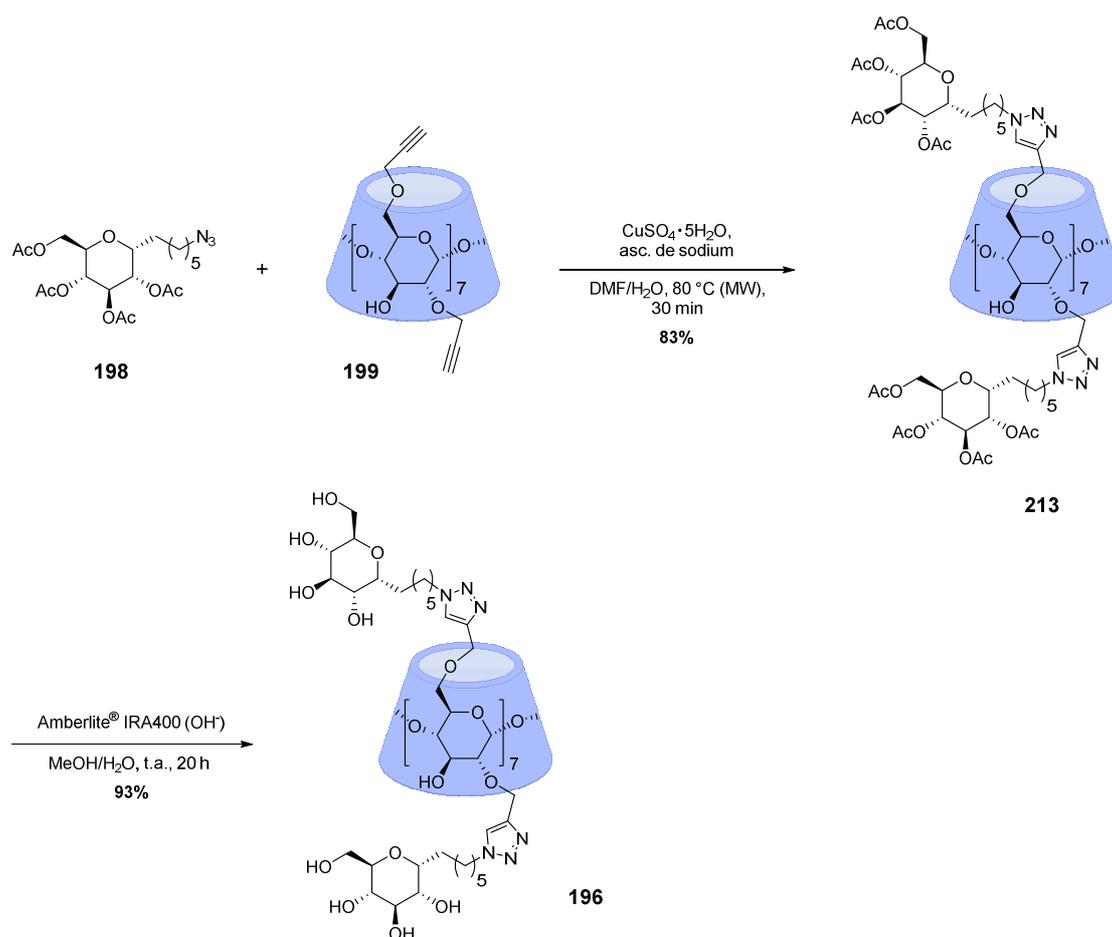
Schéma 93. Formation du composé monovalent acétylé **209** et d'un produit secondaire α -céto-triazole **210** par CuAAC.

Pour contourner ce problème d'oxydation en attendant les résultats de cette étude, nous avons choisi d'utiliser un analogue du 1-pentyne pour lequel la position en α de l'alcyne ne peut pas être oxydée : l'éthynylcyclopropane. Ce choix s'est révélé concluant car la réaction entre cet alcyne et l'azoture **198** dans les conditions classiques de CuAAC nous a permis d'obtenir le composé **211** avec un rendement de 90% (**Schéma 94**). Ce dernier a ensuite pu être déprotégé dans les conditions classiques pour donner le modèle monovalent **212** avec 89% de rendement. L'éthynylcyclopropane représente par conséquent une bonne alternative pour former des modèles monovalents par rapport au 1-pentyne qui peut poser des problèmes de réaction secondaire. De plus, l'activité de ces composés devrait être très peu impactée par ce changement puisque les groupements cyclopropane et propyle possèdent un nombre de carbones identique.

Schéma 94. Synthèse du modèle monovalent **212**.

5.2. Clusters de C-glucosides dodéca- et tétradécavalents

Pour la synthèse du premier cluster de C-glucosides, nous avons utilisé une plateforme β -cyclodextrine fonctionnalisée avec quatorze fonctions alcynes (**199**) qui avait été précédemment synthétisée au laboratoire.⁷⁵ Les ligands (azidohexyl)-C-glucosides acétylés **198** ont été reliés à cette plateforme par réaction de CuAAC et le produit **213** a pu être isolé avec un rendement de 83% (Schéma 95). Pour cette réaction, les résidus de cuivre ont été classiquement éliminés par filtration du brut réactionnel sur une colonne de gel de silice avec un éluant ternaire MeCN/H₂O/NH₄OH (15:0,5:0,5). Les fonctions hydroxyles ont finalement été déprotégées en présence d'une résine basique pour donner le cluster de C-glucosides entièrement déprotégé **196** avec un rendement de 93%. Ce composé, qui est soluble dans l'eau, a pu être caractérisé par RMN et sa masse a été confirmée par analyse HRMS.

Schéma 95. Synthèse du cluster de C-glucosides tétradécavalent **196**.

Le cluster de C-glucosides basé sur une plateforme fullerène C_{60} a été synthétisé par le groupe du Dr J.-F. Nierengarten de l'Université de Strasbourg avec lequel nous avons déjà collaboré pour la synthèse d'un iminosucre dodécavalent en série *N*-hexyl-DNJ.⁷⁴ Les ligands (azidohexyl)-C-glucosides déprotégés (**201**) ont donc été reliés par CuAAC à la plateforme fullerène polyactétylénique **200** suivant une procédure déjà établie³²⁹ (Schéma 96). Pour cette réaction, un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ a été utilisé afin de pouvoir solubiliser les deux réactifs. Le produit de cycloaddition formé (**197**) a ensuite été purifié par précipitation dans le méthanol pour éliminer l'excès de ligands (azidohexyl)-C-glucosides (13 éq. utilisés), puis par chromatographie d'exclusion stérique pour éliminer les sels formés au cours de la réaction. Sachant que les résidus de cuivre ne pouvaient être éliminés par purification avec un éluant ternaire ammoniacal, le produit a donc été traité avec des polymères fonctionnalisés pour piéger les métaux (QuadraSil™ Mercaptopropyl). L'élimination des traces résiduelles de cuivre dans les composés formés par CuAAC est très importante car ce métal est capable de diminuer l'activité de l' α -mannosidase de Jack Bean³³⁰ et par conséquent de fausser les mesures de constantes d'inhibition. Finalement, des analyses de spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) ont montré que cette dernière purification avait permis de diminuer la teneur en cuivre dans le produit **197** de 19 000 ppm à 994 ppm. Même si cette quantité de cuivre reste relativement élevée, en particulier à cause de la complexation du métal aux nombreuses liaisons doubles, il a été montré par le groupe de Marra qu'une telle quantité de cuivre n'impactait pas l'activité de l' α -

mannosidase de Jack Bean sur des incubations de dix minutes.³³¹ En définitive, on remarque cependant que l'élimination des traces de cuivre se fait au détriment du rendement du composé **197** (34%).

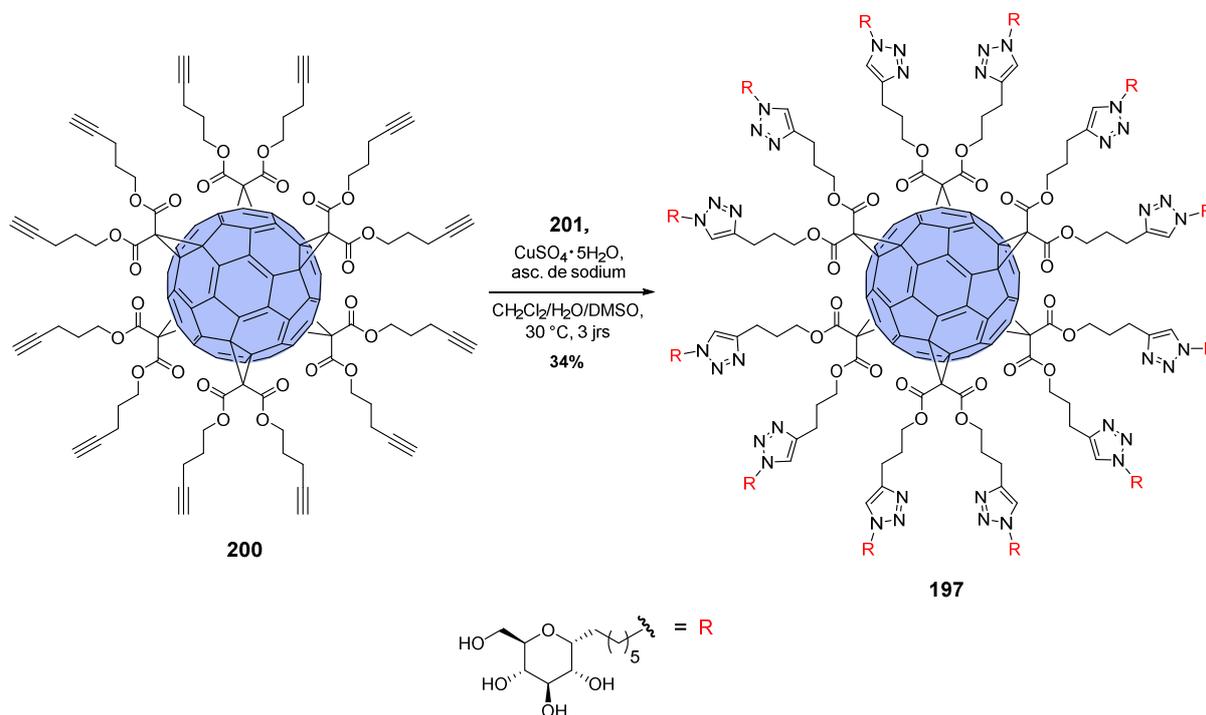


Schéma 96. Synthèse du cluster de C-glucosides dodécavalent **197**.

La détermination des constantes d'inhibition des clusters de C-glycosides (**196** et **197**) et de leur analogue monovalent (**212**) sur l' α -mannosidase de Jack Bean sera prochainement effectuée en collaboration avec le groupe du Pr Carmen Ortiz Mellet de l'Université de Séville. Dans le cas où l'enzyme serait inhibée, les valeurs de K_i obtenus nous permettraient de conclure quant à la force des interactions non spécifiques multivalentes. Dans le cas contraire, ceci montrerait que les interactions non spécifiques ont relativement peu d'influence sur les effets multivalents puissants obtenus avec les clusters d'iminosucres.

6. RÉSUMÉ DU CHAPITRE

Les clusters d'iminosucres et les effets multivalents qu'ils induisent sur l'inhibition des glycosidases ont déjà fait l'objet de plusieurs études mécanistiques. L'une de ces études a alors suggéré que ces augmentations d'affinité étaient dues à une combinaison d'interactions spécifiques dans le site actif de l'enzyme et d'interactions non spécifiques à la surface de l'enzyme. Suite à cela, nous avons donc imaginé une sonde mécanistique basée sur un C-glucoside multivalent qui, de par sa nature, ne formerait que des interactions non spécifiques (**Figure 90**). Basée sur la chimie click, notre approche synthétique a d'abord consisté à former un ligand (azidohexyl)-C-glucoside. Ce dernier a pu être obtenu en cinq étapes à partir du méthyl-D-glucopyranose *via* une étape optimisée de métathèse croisée. Ces ligands azotures ont ensuite pu être reliés à des plateformes polyacétyléniques de type β -cyclodextrine ou fullerène C_{60} par réaction de CuAAC. L'activité inhibitrice des clusters de C-glucosides (**196** et **197**) sera prochainement évaluée sur l' α -mannosidase de Jack Bean et nous permettra de déterminer la contribution des interactions non spécifiques sur les effets multivalents précédemment obtenus avec les clusters d'iminosucres.

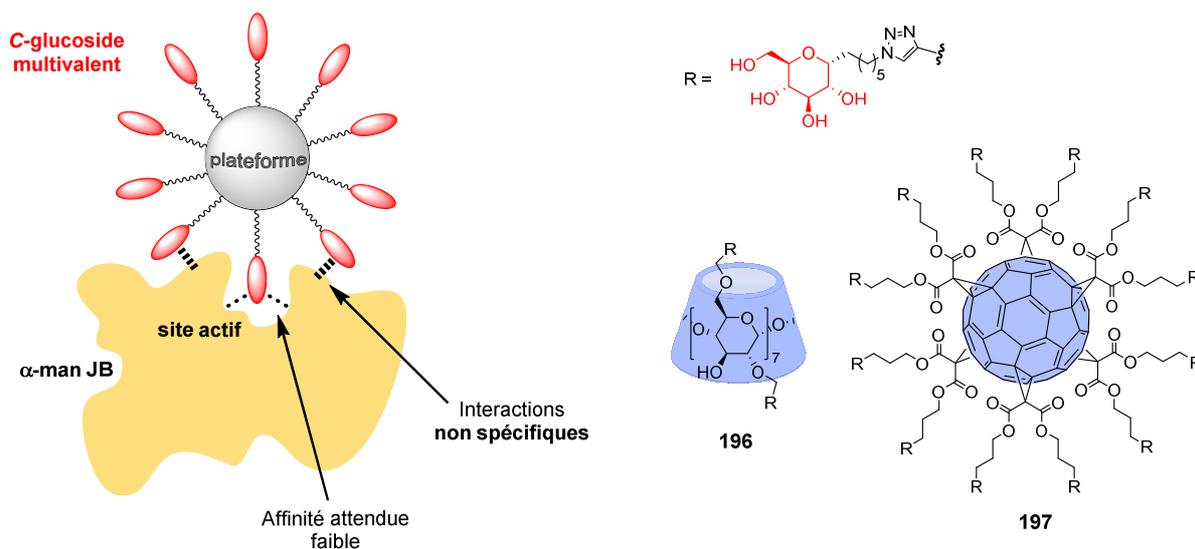


Figure 90. C-glucosides multivalents conçus pour ne former que des interactions non spécifiques avec l' α -mannosidase de Jack Bean.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif général de cette thèse consistait à appliquer le concept de multivalence à l'inhibition de glycosidases d'intérêt thérapeutique. Dans un premier temps, nous avons évalué le potentiel d'iminosucres di- à tétravalents en série 1-déoxymannojirimycine pour viser l' α 1,2-mannosidase I du réticulum endoplasmique, une nouvelle cible thérapeutique pour bloquer la dégradation de la protéine delF508-CFTR. Un effet multivalent fort sur la correction de cette protéine mutée a alors été mis en évidence avec un cluster trivalent basé sur le pentaérythritol. Ce correcteur actif à des concentrations submicromolaires s'est en effet montré 140 fois plus efficace que le modèle monovalent correspondant. D'un point de vue mécanistique, la première hypothèse logique envisagée pour expliquer cette augmentation d'activité correctrice est un effet multivalent sur l'inhibition de la REManI. Cette hypothèse demande cependant à être confirmée par des mesures d'inhibition sur l'enzyme purifiée. Dans le but de préciser également ces mécanismes de la multivalence, nous avons synthétisé lors de ce projet un composé trivalent basé sur une plateforme BODIPY. Cette sonde fluorescente pourra en effet permettre de déterminer si l'augmentation d'activité correctrice est également liée à une meilleure pénétration cellulaire. D'un point de vue biologique, le mode d'action du cluster trivalent de DMJ, qui agirait en inhibant la REManI et en diminuant les interactions entre la protéine delF508-CFTR et les EDEMs, est totalement inédit; ce composé pourrait alors constituer l'amorce d'une nouvelle option thérapeutique pour le traitement de la mucoviscidose. Des tests *in vivo* ont d'ailleurs été envisagés pour évaluer l'efficacité de ce correcteur sur des modèles murins de la maladie. Pour obtenir les quantités nécessaires à ces tests, nous pourrions tirer profit de la synthèse robuste et réalisable à l'échelle du gramme de la DMJ que nous avons développée au laboratoire. Finalement, dans le but d'optimiser cette stratégie ciblant l' α 1,2-mannosidase I du RE, notre équipe travaille actuellement à la préparation de nouveaux systèmes multivalents basés sur des ligands mannoamidines³³² qui possèdent, comparé à la 1-déoxymannojirimycine, une affinité beaucoup plus forte pour les mannosidases. Nous espérons dans ce cas obtenir des correcteurs de la protéine CFTR encore plus efficaces.

En parallèle, un autre projet visait à identifier de nouveaux chaperons pharmacologiques de la β -glucocérébrosidase en ciblant simultanément le site actif et un site secondaire de cette enzyme. Nous avons pour cela synthétisé des iminosucres hétérodivalents possédant deux têtes énantiomères (chacune étant conçue pour cibler un site spécifique) reliées entre elles par un bras espaceur de longueur variable. Au terme de cette étude, nous nous sommes cependant aperçus que le groupement triazole utilisé pour relier les têtes énantiomères au bras espaceur ne constituait pas un lien inerte mais pouvait modifier dans certain cas le mode d'inhibition. En effet, contrairement à notre hypothèse de départ, les iminosucres hétérodivalents ont montré qu'ils ciblaient uniquement un ou des site(s) secondaire(s) de l'enzyme et aucune augmentation d'affinité significative n'a pu être observée sur la GCase portant la mutation N370S la plus commune ou la mutation L444P. En ce qui concerne la GCase portant la mutation G202R, nous avons pu identifier parmi les composés synthétisés des chaperons capables de quasiment quadrupler l'activité de l'enzyme à des concentrations de 1 à 100 nM. Même si ces effets chaperons sont plus faibles par rapport au meilleur chaperon connu pour cette mutation ($\times 7,2$ à 150 μ M),²⁵⁰ ces composés présentent l'avantage d'être efficaces à des concentrations 1500 à 150 000 fois plus faibles. Des études complémentaires sont d'ailleurs en cours pour tenter de cristalliser la GCase complexée avec l'un de ces chaperons ciblant un site secondaire, ce qui permettrait de localiser et déterminer la structure de ce site. Nous envisageons également de revoir notre approche initiale visant à cibler simultanément les deux sites de l'enzyme en synthétisant des

CONCLUSION GÉNÉRALE

systèmes hétérodivalents de seconde génération basés sur deux inhibiteurs puissants compétitif et non compétitif de la GCase que nous avons identifiés lors de cette étude.

En marge de ces deux projets dédiés à l'identification de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement de maladies rares, nous avons également réalisé la synthèse de *C*-glycosides multivalents dans le but de préciser les mécanismes moléculaires à l'origine des effets multivalents sur l'inhibition des glycosidases. Évaluées sur l' α -mannosidase de Jack Bean, ces sondes mécanistiques nous permettront de déterminer la contribution des interactions non spécifiques multivalentes qui ont lieu à la surface de l'enzyme ou dans les sous-poches de reconnaissance des glycanes. Pour obtenir ces systèmes multivalents, nous avons donc mis au point une synthèse flexible et efficace d'un ligand (azidohexyl)-*C*-glucoside. Au cours de l'étape clé de métathèse croisée, nous avons dû faire face à des réactions secondaires d'isomérisation et d'homologation qui ont pu être supprimées à l'aide du bon choix des conditions réactionnelles (température, catalyseur) et de l'utilisation de la 1,4-benzoquinone, un additif piégeant les complexes de type ruthénium-hydrure à l'origine de ces réactions. Par la suite, si ces interactions non spécifiques se montrent décisives pour l'effet multivalent, nous pourrions imaginer préparer avec ces ligands des systèmes hétéromultivalents composés de ligands *C*-glycosides et de ligands iminosucres. Ces composés pourraient alors constituer une nouvelle classe d'inhibiteurs de glycosidases. Parallèlement à ce projet, une étude visant à cristalliser l' α -mannosidase de Jack Bean avec un iminosucre multivalent vient également d'être initiée par notre laboratoire afin d'explorer davantage les caractéristiques de l'effet multivalent. Nous espérons que ces deux études fondamentales permettront d'apporter de nombreuses réponses sur ce sujet passionnant mais aussi des éléments clés pour la conception rationnelle de nouveaux glycomimétiques multivalents d'intérêt thérapeutique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

General methods

Reaction and purification

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co., Alfa Aesar GmbH & Co, Acros Organics, Fisher Scientific UK, Carbosynth Limited, Carlo Erba Reagents or PROLABO France and used without further purification. Solvents were reagent grade and were further dried when necessary. Dichloromethane was distilled over CaH₂ under argon. Tetrahydrofuran was distilled over sodium/benzophenone under argon or dried by passage through an activated alumina column under argon. *N,N*-dimethylformamide and acetonitrile were purchased anhydrous over molecular sieves. Triethylamine and pyridine were distilled over KOH under reduced pressure and stored over KOH under argon.

All reactions were performed in standard glassware and microwave reactions were carried out using Biotage microwave reactor vials and Initiator[®] microwave synthesizer. The reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) on aluminium sheets coated with silica gel 60 F₂₅₄ purchased from Merck KGaA. Visualization was accomplished with UV light (at 254 nm or 366 nm) and exposure to TLC stains, phosphomolybdic acid (PMA) or potassium permanganate (KMnO₄), followed by heating. Phosphomolybdic acid stain was prepared by dissolving 12MoO₃·H₃PO₄ · xH₂O (9.6 g) in absolute EtOH (200 mL). Potassium permanganate stain was prepared by dissolving KMnO₄ (2 g), Na₂CO₃ (13.3 g) in water (200 mL) and a 5% NaOH aqueous solution (33 mL). For reaction work-up, “sat. NaHCO₃” means a saturated aqueous solution of sodium hydrogen carbonate, “sat. NH₄Cl” means a saturated aqueous solution of ammonium chloride, “sat. Na₂CO₃” means a saturated aqueous solution of sodium carbonate and “brine” means a saturated aqueous solution of sodium chloride. Flash column chromatographies were carried out on silica gel 60 (230-400 mesh, 40-63 μm) purchased from Merck KGaA.

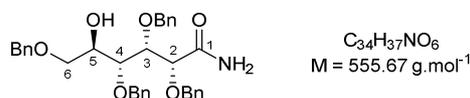
Characterization

Proton (¹H), carbon (¹³C), boron (¹¹B) and fluorine (¹⁹F) nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were carried out at 298K on either a Bruker Avance 300 MHz or a Bruker Avance III HD 400 MHz spectrometer. The chemical shifts are reported as δ values in parts per million (ppm) relative to residual solvent signals used as an internal reference [CDCl₃: 7.26 ppm (¹H NMR) and 77.16 ppm (¹³C NMR); CD₃OD: 3.31 ppm (¹H NMR) and 49.00 ppm (¹³C NMR); acetone-*d*₆: 2.05 ppm (¹H NMR) and 29.84 ppm (¹³C NMR); D₂O: 4.79 ppm (¹H NMR)].³³³ Coupling constants (*J*) are expressed in Hertz and multiplicities are given as singlet (s), broad singlet (br s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), doublet of doublets (dd), triplet of doublets (td), doublet of triplets (dt), triplet of triplets (tt), doublet of doublet of doublets (ddd), doublet of doublet of triplets (ddt), triplet of doublet of doublets (tdd), doublet of doublet of doublet of doublets (dddd), multiplet (m) or broad multiplet (br m). The exponents “A” or “B” will be used for diastereotopic protons, “A” is assigned to the proton with the lowest chemical shift and “B” to the proton with the highest chemical shift. Assignments of ¹H and ¹³C signals were made by DEPT, ¹H-¹H COSY, HSQC and HMBC experiments.

Optical rotations were measured at 589 nm (sodium lamp) and 20 °C on either a Perkin-Elmer 341 polarimeter or an Anton Paar MCP 200 polarimeter with a path length of 1 dm. The concentration (*c*) is indicated in gram per deciliter. Infrared (IR) spectra were recorded neat on a Perkin-Elmer Spectrum Two FT-IR spectrometer. High-resolution (HRMS) electrospray ionization-time-of-flight (ESI-TOF) mass spectra were recorded on a Bruker micrOTOF[®] mass spectrometer.

Synthesis and analytical data

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-gluconamide (**77**)

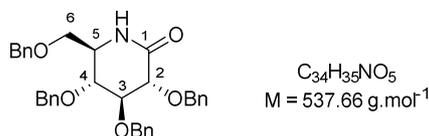


To a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose (9.96 g, 18.42 mmol) in THF (40 mL) were successively added a 30% NH_3 aqueous solution (200 mL) and iodine (1.4 eq., 6.47 g, 25.51 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 21 h. The reaction mixture was quenched with a 5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aqueous solution (10 mL) and extracted with Et_2O (3 \times). The combined organic extracts were washed with brine, dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 60:40 to 70:30) to afford **77** (8.21 g, 80%) as a colorless oil. The analytical data of **77** were in complete agreement with those reported in the literature.¹⁷⁷

R_f 0.32 (AcOEt/Petroleum ether 60:40, PMA).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.82 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H; OH), 3.59 (dd, $J = 9.8, 5.2$ Hz, 1H; H^A -6), 3.65 (dd, $J = 9.8, 3.0$ Hz, 1H; H^B -6), 3.85-3.94 (m, 2H; H-4 and H-5), 4.08 (dd, $J = 5.4, 3.3$ Hz, 1H; H-3), 4.25 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H; H-2), 4.48-4.74 (m, 8H; $4\times\text{OCH}_2\text{Ph}$), 5.46 (br s, 1H; NH), 6.60 (br s, 1H; NH), 7.20-7.36 ppm (m, 20H; H_{arom}).

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-glucono-1,5-lactam (**74a**)



To a solution of **77** (8.21 g, 14.78 mmol) in DMSO (55 mL) was added Ac_2O (35 mL) and the solution was stirred at room temperature for 15 h. The reaction was quenched with water (250 mL) and further stirred for 15 min. The mixture was extracted with Et_2O (3 \times). The combined organic extracts were washed with water and brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was used for the next step without further purification.

To a solution of the oxidized product in MeCN (115 mL) were successively added HCO_2H (55 mL) and NaBH_3CN (3.1 eq., 2.90 g, 46.22 mmol). The mixture was heated under reflux for 3 h. The mixture was then cooled to 0 °C and a 0.2M HCl aqueous solution (200 mL) was added. The resulting mixture was stirred for 15 min, then poured into stirred mixture of CH_2Cl_2 (150 mL) and sat. NaHCO_3 (100 mL) at 0 °C, and further stirred for 15 min. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Recrystallization of the crude from hot Et_2O and purification of the mother liquor by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 40:60) gave **74a** (4.79 g, 60%) as a white solid. The analytical data of **74a** were in complete agreement with those reported in the literature.¹⁷⁵

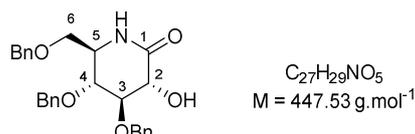
R_f 0.37 (AcOEt/Petroleum ether 50:50, PMA).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.25 (ddd, $J = 8.8, 8.4$ and 1.1 Hz, 1H; H^A -6), 3.49-3.63 (m, 3H; H-4, H-5 and H^B -6), 3.91 (dd, $J = 8.3, 8.0$ Hz, 1H; H-3), 4.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H; H-2), 4.43 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; OCH_2Ph),

4.47 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.49 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.73 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.77 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.84 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.86 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.18 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.89 (br s, 1H; NH), 7.16-7.44 ppm (m, 20H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 53.9 (C-5), 70.2 (C-6), 73.5, 74.8, 74.9 (4×OCH₂Ph), 77.3 (C-4), 78.9 (C-2), 82.5 (C-3), 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.55, 128.61, 128.7 (20×CH_{arom}), 137.4, 137.7, 138.0, 138.2 (4×C_{arom}), 170.5 ppm (C-1).

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-D-glucono-1,5-lactam (**79**)



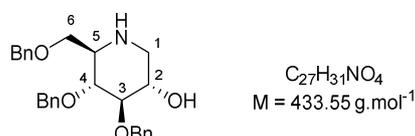
To a solution of **74a** (676 mg, 1.257 mmol) and TBAB (1.5 eq., 608 mg, 1.886 mmol) in dry CH₂Cl₂ (40 mL) at -78 °C was added dropwise a 1M BCl₃ solution in CH₂Cl₂ (2.2 eq., 2.7 mL, 2.7 mmol). The reaction mixture was allowed to reach 0 °C within 5 h then stirred at room temperature for 3 h. The solution was treated with sat. Na₂CO₃, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3×). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 60:40) to afford **79** (517 mg, 92%) as a white solid. The analytical data of **79** were in complete agreement with those reported in the literature.¹⁷⁴

R_f 0.31 (AcOEt/Petroleum ether 60:40, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.34 (dd, $J = 8.6, 7.1$ Hz, 1H; H^A-6), 3.55-3.71 (m, 3H; H-4, H-5 and H^B-6), 3.88 (dd, $J = 9.2, 9.0$ Hz, 1H; H-3), 3.72-4.05 (m, 1H; OH), 4.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H; H-2), 4.48 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.52 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.59 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.88 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.97 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.11 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 6.69 (br s, 1H; NH), 7.23-7.49 ppm (m, 15H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 55.1 (C-5), 70.6 (C-6), 72.2 (C-2), 73.5, 74.7, 75.1 (3×OCH₂Ph), 76.1 (C-4), 82.5 (C-3), 127.9, 128.0, 128.16, 128.17, 128.25, 128.33, 128.5, 128.6, 128.7 (15×CH_{arom}), 137.4, 137.7, 138.5 (3×C_{arom}), 170.8 ppm (C-1).

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**80**)



To a suspension of LiAlH₄ (7.8 eq., 76 mg, 2.0024 mmol) in dry THF (3 mL) at 0 °C under argon was added dropwise a solution of **79** (115 mg, 0.2570 mmol) in dry THF (3 mL). The reaction mixture was heated under reflux for 2 h 30. The reaction mixture was cooled and water (0.08 mL) was cautiously added, then a 10% NaOH aqueous solution (0.16 mL) and water (0.24 mL) were successively added and the mixture was stirred for 30 min. The insoluble material was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 96:4) to afford **80** (98 mg, 88%) as a white solid.

R_f 0.20 (CH₂Cl₂/MeOH 96:4, PMA).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +63$ (*c* 1.0, CHCl₃).

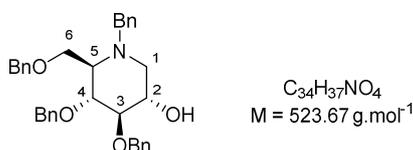
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.37 (br s, 2H; OH and NH), 2.54 (dd, *J* = 12.4, 10.5 Hz, 1H; H^A-1), 2.76-2.82 (m, 1H; H-5), 3.19 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H; H^B-1), 3.38-3.48 (m, 2H; H-3 and H-4), 3.53-3.67 (m, 2H, H-2 and H^A-6), 3.73 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H; H^B-6), 4.50 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.56 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.58 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.82 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.89 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.01 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.25-7.44 ppm (m, 15H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 49.6 (C-1), 60.1 (C-5), 70.1 (C-6), 72.2 (C-2), 73.6, 75.1, 75.4 (3×OCH₂Ph), 80.4 (C-4), 88.1 (C-3), 127.9, 128.0, 128.1, 128.6, 128.8 (15×CH_{arom}), 138.1, 138.3, 138.8 ppm (3×C_{arom}).

IR (neat) 3315 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₇H₃₂NO₄ : 434.2326 [M + H]⁺ ; found 434.2330.

N-Benzyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**75**)



To a solution of **80** (98 mg, 0.2260 mmol) in dry DMF (2.5 mL) was added K₂CO₃ (0.7 eq., 22 mg, 0.1592 mmol) and BnBr (1.1 eq., 0.03 mL, 0.2508 mmol). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 3 h. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in AcOEt and washed with water (3×). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) to afford **75** (105 mg, 89%) as a pale yellow oil.

R_f 0.29 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1, PMA).

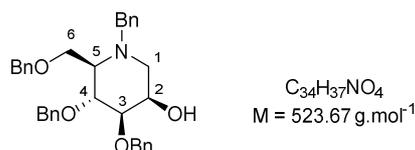
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +4$ (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.23 (dd, *J* = 11.5, 8.3 Hz, 1H; H^A-1), 2.64 (br s, 1H; OH), 2.74 (ddd, *J* = 7.4, 3.8 and 3.4 Hz, 1H; H-5), 3.05 (dd, *J* = 11.5, 4.0 Hz, 1H; H^B-1), 3.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H; H-3), 3.57 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.70-3.78 (m, 1H; H-2), 3.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H; H-4), 3.86 (dd, *J* = 10.5, 3.4 Hz, 1H; H^A-6), 3.90 (dd, *J* = 10.5, 3.8 Hz, 1H; H^B-6), 4.07 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H; NCH₂Ph), 4.50-4.57 (m, 2H; OCH₂Ph), 4.60 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.74 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.84 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.88 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.27-7.42 ppm (m, 20H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 54.1 (C-1), 57.5 (NCH₂Ph), 63.7 (C-5), 66.2 (C-6), 69.2 (C-2), 73.4, 74.1, 74.3 (3×OCH₂Ph), 78.0 (C-4), 84.7 (C-3), 127.2, 127.77, 127.80, 127.85, 127.90, 128.1, 128.4, 128.52, 128.54, 128.7, 129.2 (20×CH_{arom}), 138.2, 138.4, 138.7 ppm (4×C_{arom}).

IR (neat) 3431 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₄H₃₈NO₄ : 524.2795 [M + H]⁺ ; found 524.2745.

N-Benzyl-3,4,6-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannocitol (76)

Under an argon atmosphere, DMSO (4.7 eq., 3.2 mL, 45.05 mmol) was added to a solution of (COCl)₂ (2.5 eq., 2.1 mL, 24.45 mmol) in dry CH₂Cl₂ (100 mL) at -78 °C. The solution was stirred at -78 °C for 45 min, then a solution of **75** (5.05 g, 9.64 mmol) in dry CH₂Cl₂ (200 mL) was added. After 3 h 30 at -78 °C, Et₃N (10 eq., 13.4 mL, 96.44 mmol) was added and the reaction mixture was kept stirring at -78 °C for 2 h. The reaction mixture was washed with water (2×) and the organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure.

The crude residue was dissolved in dry THF (200 mL) and a 1M L-Selectride[®] solution in THF (1.6 eq., 15.3 mL, 15.3 mmol) was added dropwise at -78 °C. The reaction mixture was stirred at -78 °C for 3 h then MeOH (3 mL) and a 1M NaOH aqueous solution (100 mL) were added. The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ (2×) and the combined organic extracts were washed with sat. NH₄Cl and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 20:80 to 30:70) to afford **76** (3.73 g, 74%) as a pale yellow oil.

R_f 0.33 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, PMA).

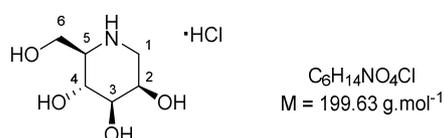
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -25$ (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.07-2.14 (m, 1H; H^A-1), 2.36-2.46 (m, 1H; H-5), 2.51 (br s, 1H; OH), 2.82 (dd, *J* = 12.3, 4.5 Hz, 1H; H^B-1), 3.32 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.38 (dd, *J* = 8.4, 3.1 Hz, 1H; H-3), 3.67-3.76 (m, 2H; CH₂-6), 3.78-3.86 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.07 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H; NCH₂Ph), 4.32-4.39 (m, 2H; OCH₂Ph), 4.44 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.55 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.61 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.82 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.11-7.29 ppm (m, 20H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 54.3 (C-1), 57.1 (NCH₂Ph), 64.7 (C-5), 65.2 (C-2), 67.1 (C-6), 71.6, 73.2, 75.0 (3×OCH₂Ph), 75.9 (C-4), 83.4 (C-3), 127.2, 127.7, 127.76, 127.82, 127.9, 128.0, 128.1, 128.46, 128.52, 129.1 (20×CH_{arom}), 138.2, 138.3, 138.7 ppm (4×C_{arom}).

IR (neat) 3444 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₄H₃₈NO₄ : 524.2795 [M + H]⁺ ; found 524.2823.

1,5-Dideoxy-1,5-imino-D-mannocitol hydrochloride (3·HCl)

Compound **76** (3.72 g, 7.10 mmol) was dissolved in *i*PrOH (80 mL) and THF (80 mL), then a 1M HCl aqueous solution (56 mL) and Pd(OH)₂/C (0.1 eq., 1 g, 0.71 mmol, 20% Pd on carbon, nominally 50% water) were added. The flask was evacuated under vacuum and backfilled with argon (four cycles) and then evacuated under vacuum and backfilled with H₂ (four cycles). The reaction mixture was stirred under an atmosphere of H₂ (1 atm) at room temperature for 23 h. The reaction mixture was then filtered through a pad of celite (previously rinsed with at least 250 mL of a 1M HCl aqueous solution and then water) and rinsed with MeOH and water. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **3·HCl** (1.41 g, 99%) as a colorless glassy solid.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

R_f 0.20 (MeCN/H₂O/NH₄OH 5:1:1, KMnO₄).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -23$ (c 1.0, H₂O).

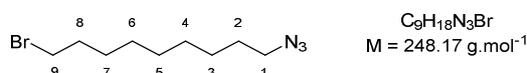
¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.18 (ddd, $J = 10.6, 6.7$ and 3.2 Hz, 1H; H-5), 3.27 (dd, $J = 13.6, 1.2$ Hz, 1H; H^A-1), 3.44 (dd, $J = 13.6, 3.1$ Hz, 1H; H^B-1), 3.71 (dd, $J = 9.5, 3.0$ Hz, 1H; H-3), 3.87 (dd, $J = 12.7, 6.7$ Hz, 1H; H^A-6), 3.89 (dd, $J = 10.6, 9.5$ Hz, 1H; H-4), 4.02 (dd, $J = 12.7, 3.2$ Hz, 1H; H^B-6), 4.27 ppm (ddd, $J = 3.1, 3.0$ and 1.2 Hz, 1H; H-2).

¹³C-NMR (D₂O, 100 MHz) δ 47.5 (C-1), 58.1 (C-6), 60.4 (C-5), 65.7 (C-4), 65.9 (C-2), 72.4 ppm (C-3).

IR (neat) 3208, 3141, 3013 (O-H, N-H), 1591 cm⁻¹ (NH₂⁺).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₆H₁₄NO₄: 164.0917 [M + H]⁺; found 164.0920.

1-Azido-9-bromononane (52b)

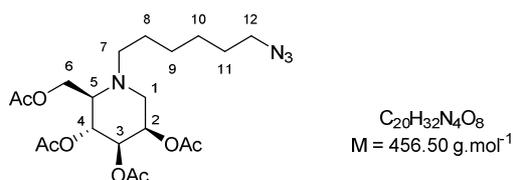


To a solution of 1,9-dibromononane (9.15 g, 6.5 mL, 32 mmol) in DMSO (130 mL) was added NaN₃ (0.5 eq., 1.04 g, 16 mmol) and the mixture was stirred overnight at room temperature. Water was then added and the reaction mixture was extracted with Et₂O (3 \times). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified twice by flash column chromatography (CH₂Cl₂/Petroleum ether 5:95) to afford **52b** (2.90 g, 37%) as a colorless oil. The analytical data of **52b** were in complete agreement with those reported in the literature.⁷⁵

R_f 0.24 (CH₂Cl₂/Petroleum ether 5:95, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.27-1.47 (m, 10H; CH₂-3, CH₂-4, CH₂-5, CH₂-6 and CH₂-7), 1.60 (m, $J = 6.9$ Hz, 2H; CH₂-2), 1.85 (m, $J = 6.9$ Hz, 2H; CH₂-8), 3.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H; CH₂-1), 3.41 ppm (t, $J = 6.9$ Hz, 2H; CH₂-9).

N-(6-Azidohexyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannocitol (51a)



To a solution of **3**·HCl (91 mg, 0.4558 mmol) in dry DMF (3.8 mL) were added K₂CO₃ (4 eq., 253 mg, 1.8306 mmol) and 1-azido-6-bromohexane **52a** (2 eq., 189 mg, 0.9171 mmol). The suspension was heated at 90 °C for 4 h. Insoluble material was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure.

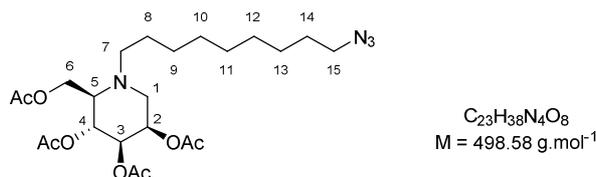
The crude residue was dissolved in a mixture of dry pyridine and Ac₂O (1:1, 10 mL) and DMAP (0.1 eq., 8 mg, 0.0655 mmol) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 7 h. Water (9 mL) was slowly added to the reaction mixture at 0 °C. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 \times). The combined organic extracts were successively washed with a 2M HCl aqueous solution, sat. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) to afford **51a** (125 mg, 60%) as an orange oil. The analytical data of **51a** were in complete agreement with those reported in the literature.⁷⁶

R_f 0.16 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1, KMnO₄).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.15-1.41 (m, 6H; CH_2 -8, CH_2 -9 and CH_2 -10), 1.47-1.56 (m, 2H; CH_2 -11), 1.94 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.97 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.01 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.50-2.60 (m, 2H; H^{A} -1 and H^{A} -7), 2.61-2.70 (m, 2H; H^{B} -5 and H^{B} -7), 2.98 (dd, $J = 13.1, 5.0$ Hz, 1H; H^{B} -1), 3.19 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H; CH_2 -12), 4.10-4.20 (m, 2H; CH_2 -6), 4.89 (dd, $J = 8.5, 3.5$ Hz, 1H; H -3), 5.13-5.23 ppm (m, 2H; H -2 and H -4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.6, 20.7, 20.8, 21.0 ($4 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 25.0, 26.5, 26.6 (C-8, C-9, C-10), 28.8 (C-11), 50.7 (C-1), 51.3 (C-12), 52.5 (C-7), 59.9 (C-6), 61.1 (C-5), 67.1 (C-2), 67.9 (C-4), 71.5 (C-3), 169.6, 169.9, 170.4, 170.8 ppm ($4 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

N-(9-Azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannocitol (**51b**)



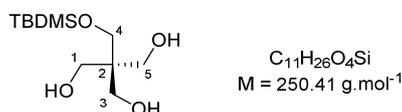
To a solution of **3**·HCl (350 mg, 1.753 mmol) in dry DMF (13 mL) were added K_2CO_3 (4 eq., 968 mg, 7.004 mmol) and 1-azido-9-bromononane **52b** (2 eq., 879 mg, 3.542 mmol). The suspension was heated at 90 °C for 4 h. The solvent was evaporated under reduced pressure.

The crude residue was dissolved in a mixture of dry pyridine and Ac_2O (1:1, 40 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with CH_2Cl_2 and washed with water. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 30:70) to afford **51b** (645 mg, 74%) as a pale yellow oil. The analytical data of **51b** were in complete agreement with those reported in the literature.⁷⁶

R_f 0.26 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, KMnO_4).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.20-1.45 (m, 12H; CH_2 -8, CH_2 -9, CH_2 -10, CH_2 -11, CH_2 -12 and CH_2 -13), 1.54-1.63 (m, 2H; CH_2 -14), 2.02 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.05 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.09 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.12 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.57-2.78 (m, 4H; H^{A} -1, H -5 and CH_2 -7), 3.06 (dd, $J = 13.2, 5.0$ Hz, 1H; H^{B} -1), 3.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H; CH_2 -15), 4.17-4.29 (m, 2H; CH_2 -6), 4.97 (dd, $J = 8.6, 3.6$ Hz, 1H; H -3), 5.22-5.31 ppm (m, 2H; H -2 and H -4).

2,2-Bis-hydroxymethyl-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-propanol (**83**)



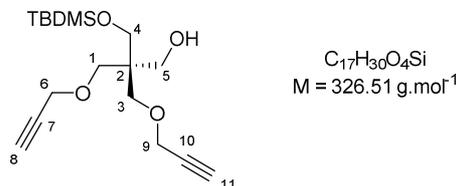
To a solution of pentaerythritol (1.9 eq., 5 g, 36.73 mmol) and imidazole (2 eq., 2.63 g, 38.65 mmol) in dry DMF (125 mL) was added dropwise (slowly) a solution of TBDMSCl (1 eq., 2.95 g, 19.55 mmol) in dry DMF (8 mL). The solution was then stirred at room temperature for 26 h under argon. The reaction mixture was partially concentrated under reduced pressure, poured in water, and extracted with EtOAc (3 \times). The combined organic extracts were washed with water (3 \times) and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 50:50) to afford **83** (3.2 g, 65%) as a white solid. The analytical data of **83** were in complete agreement with those reported in the literature.¹⁸⁴

R_f 0.30 (AcOEt/Petroleum ether 80:20, PMA).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.08 (s, 6H; 2×CH₃Si), 0.90 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 2.66 (br m, 3H; 3×OH), 3.66 (s, 2H; CH₂-4), 2.66 ppm (br m, 6H; CH₂-1, CH₂-3 and CH₂-5).

2,2-Bis[(2-propyn-1-yloxy)methyl]-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-propanol (**85**)



To a solution of **83** (3.2 g, 12.78 mmol) in dry THF (280 mL) at 0 °C was added portion-wise NaH (4 eq., 2.05 g, 51.25 mmol, 60% on mineral oil). The suspension was stirred at room temperature for 30 min then propargyl bromide (6 eq., 8.6 mL, 77.21 mmol, 80% in toluene) was added dropwise over 45 min and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. After quenching the excess of NaH with sat. NH₄Cl, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with Et₂O and washed with water. The aqueous layer was extracted with Et₂O (2×) and the combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 0:100 to 20:80) to afford **85** (2.92 g, 70%) and **84** (0.90 g, 19%) both as yellow oils.

R_f 0.50 (AcOEt/Petroleum ether 5:95, PMA).

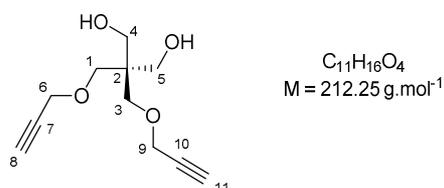
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.03 (s, 6H; 2×SiCH₃), 0.86 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 2.40 (t, $J = 2.5$ Hz, 2H, H-8 and H-11), 2.68 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H; OH), 3.47-3.54 (m, 4H; CH₂-1 and CH₂-3), 3.61 (s, 2H; CH₂-4), 3.67 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H; CH₂-5), 4.10 ppm (d, $J = 2.5$ Hz, 4H; CH₂-6 and CH₂-9).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ -5.6, 18.3, 25.9, 45.2, 58.8, 63.5, 65.5, 70.1, 74.5, 79.8 ppm.

IR (neat) 3372 cm⁻¹.

HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₇H₃₀O₄SiNa : 349.181 [M + Na]⁺ ; found 349.180.

2,2-Bis[(2-propyn-1-yloxy)methyl]-1,3-propanediol (**87**) (reaction performed by Dr A. Joosten)



To a solution of **85** (105 mg, 0.322 mmol) in dry THF (10 mL) at 0 °C was added was added dropwise a 1M solution of TBAF in THF (5.3 eq., 1.7 mL, 1.7 mmol) over a period of 30 min. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h under argon. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with Et₂O and washed with water (2×10 mL) and then brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 20:80) to afford **87** (48 mg, 71%) as a pale yellow oil.

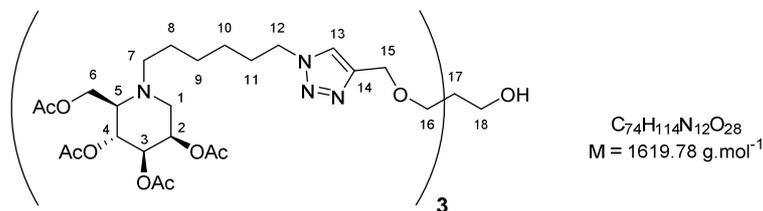
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.45 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-8 and H-11), 2.57 (br s, 2H; 2×OH), 3.57 (s, 4H; CH₂-1 and CH₂-3), 3.66 (s, 4H; CH₂-4 and CH₂-5), 4.13 ppm (d, $J = 2.4$ Hz, 4H; CH₂-6 and CH₂-9).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 45.0, 58.9, 64.3, 71.0, 74.9, 79.6 ppm.

IR (neat) 3373 cm^{-1} .

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$: 235.0941 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 235.0969.

Compound 88a



To a solution of **51a** (3.4 eq., 50 mg, 0.1095 mmol) and 3-(2-propyn-1-yloxy)-2,2-bis[(2-propyn-1-yloxy)methyl]-1-propanol **86** (8 mg, 0.032 mmol) in DMF (3 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.4 eq., 3 mg, 0.0120 mmol) and sodium ascorbate (0.8 eq., 5 mg, 0.0252 mmol) in water (0.75 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 40 min. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/ H_2O / NH_4OH (9:1:1) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 90:10) to afford **88a** (34 mg, 66%) as a pale yellow oil.

R_f 0.25 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, KMnO_4).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -37$ (c 1.0, CHCl_3).

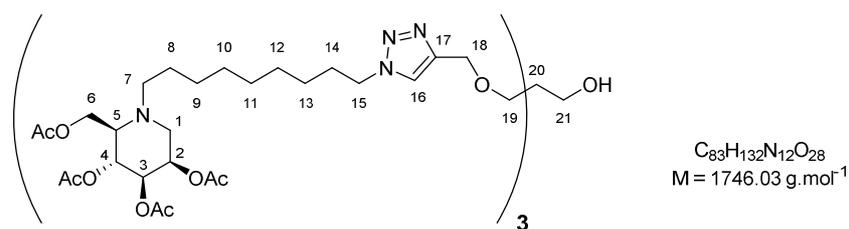
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.21-1.46 (m, 18H; CH_2 -8, CH_2 -9 and CH_2 -10), 1.81-1.94 (m, 6H; CH_2 -11), 2.00 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.03 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.06 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.09 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.55-2.75 (m, 12H; H^{A} -1, H-5 and CH_2 -7), 3.02 (dd, $J = 13.1, 5.0$ Hz, 3H; H^{B} -1), 3.03-3.11 (br s, 1H; OH), 3.51 (s, 6H; CH_2 -16), 3.62 (s, 2H; CH_2 -18), 4.15-4.25 (m, 6H; CH_2 -6), 4.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H; CH_2 -12), 4.60 (s, 6H; CH_2 -15), 4.95 (dd, $J = 8.5, 3.5$ Hz, 3H; H-3), 5.19-5.27 (m, 6H; H-2 and H-4), 7.52 ppm (s, 3H; H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.8, 20.9, 21.0, 21.2 ($12 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 25.1, 26.5, 26.7 (C-8, C-9, C-10), 30.4 (C-11), 45.3 (C-17), 50.3 (C-12), 50.8 (C-1), 52.7 (C-7), 60.0 (C-6), 61.2 (C-5), 64.8 (C-18), 65.2 (C-15), 67.2 (C-2), 68.1 (C-4), 70.5 (C-16), 71.6 (C-3), 122.3 (C-13), 145.2 (C-14), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 ppm ($12 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat) 1737 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{74}\text{H}_{115}\text{N}_{12}\text{O}_{28}$: 1619.7938 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 1619.8051.

Compound 88b



To a solution of **51b** (3.3 eq., 254 mg, 0.5095 mmol) and 3-(2-propyn-1-yloxy)-2,2-bis[(2-propyn-1-yloxy)methyl]-1-propanol **86** (39 mg, 0.1558 mmol) in DMF (7.5 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.4 eq., 15 mg, 0.0601 mmol) and sodium ascorbate (0.8 eq., 25 mg, 0.1262 mmol) in water (2 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 40 min. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt (3×). The combined organic extracts were washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/ H_2O / NH_4OH (10:1:1) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 96:4) to afford **88b** (239 mg, 88%) as a colorless oil.

R_f 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, KMnO_4).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -36$ (c 2.0, CHCl_3).

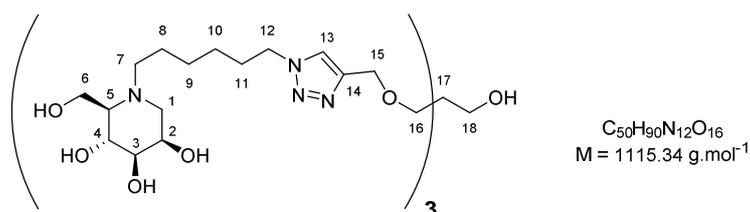
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.15-1.43 (m, 36H; CH_2 -8, CH_2 -9, CH_2 -10, CH_2 -11, CH_2 -12 and CH_2 -13), 1.81-1.91 (m, 6H; CH_2 -14), 1.98 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.01 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.07 (s, 9H; $3 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.55-2.74 (m, 12H; H^A -1, H-5 and CH_2 -7), 3.02 (dd, $J = 13.1, 4.9$ Hz, 3H; H^B -1), 3.20 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H; OH), 3.48 (s, 6H; CH_2 -19), 3.59 (d, $J = 3.4$ Hz, 2H; CH_2 -21), 4.17 (dd, $J = 12.6, 3.4$ Hz, 3H; H^A -6), 4.21 (dd, $J = 12.6, 4.2$ Hz, 3H; H^B -6), 4.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H; CH_2 -15), 4.55 (s, 6H; CH_2 -18), 4.93 (dd, $J = 8.6, 3.6$ Hz, 3H; H-3), 5.18-5.26 (m, 6H; H-2 and H-4), 7.54 ppm (s, 3H; H-16).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.5, 20.6, 20.7, 20.9 ($12 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 24.6, 26.2, 26.8, 28.7, 29.06, 29.11 (C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 30.0 (C-14), 45.0 (C-20), 50.0 (C-15), 50.6 (C-1), 52.4 (C-7), 59.7 (C-6), 60.8 (C-5), 64.0 (C-21), 64.8 (C-18), 67.0 (C-2), 67.7 (C-4), 69.9 (C-19), 71.4 (C-3), 122.0 (C-16), 144.8 (C-17), 169.4, 169.7, 170.2, 170.6 ppm ($12 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat) 1738 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{83}\text{H}_{132}\text{N}_{12}\text{O}_{28}\text{Na}$: 1767.9166 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; found 1767.9332.

Compound 88a



To a solution of **88a** (33 mg, 0.0204 mmol) in a mixture of MeOH (3 mL) and water (1 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH^-) resin (600 mg). The mixture was rotated at room temperature for 14 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was

purified by flash column chromatography (MeCN/H₂O/NH₄OH 6:1:1) to afford **48a** (17 mg, 75%) as a colorless glassy solid.

R_f 0.17 (MeCN/H₂O/NH₄OH 6:1:1, KMnO₄).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -42$ (*c* 0.5, MeOH).

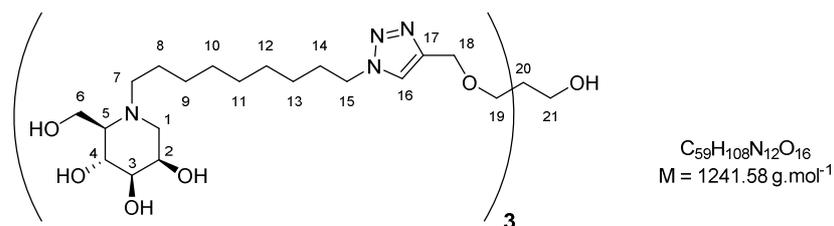
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.26-1.39 (m, 12H; CH₂-9 and CH₂-10), 1.41-1.51 (m, 6H; CH₂-8), 1.86-1.96 (m, 6H; CH₂-11), 2.10 (dt, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 3H; H-5), 2.44 (dd, *J* = 12.2, 1.4 Hz, 3H; H^A-1), 2.50-2.60 (m, 3H; H^A-7), 2.69-2.79 (m, 3H; H^B-7), 2.96 (dd, *J* = 12.2, 3.9 Hz, 3H; H^B-1), 3.27-3.31 (m, 3H; H-3), 3.45 (s, 6H; CH₂-16), 3.53 (s, 2H; CH₂-18), 3.65 (dd, *J* = 9.2, 9.0 Hz, 3H; H-4), 3.79-3.84 (m, 3H; H-2), 3.82-3.90 (m, 6H; CH₂-6), 4.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H; CH₂-12), 4.53 (s, 6H; CH₂-15), 7.93 ppm (s, 3H; H-13).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 25.3 (C-8), 27.4, 27.9 (C-9, C-10), 31.2 (C-11), 46.7 (C-17), 51.3 (C-12), 53.7 (C-7), 56.5 (C-1), 59.3 (C-6), 62.4 (C-18), 65.4 (C-15), 67.1 (C-5), 69.6 (C-2), 69.7 (C-4), 70.2 (C-16), 76.6 (C-3), 124.8 (C-13), 146.2 ppm (C-14).

IR (neat) 3371 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₅₀H₉₀N₁₂O₁₆Na : 1137.6490 [M + Na]⁺ ; found 1137.6536.

Compound 48b



To a solution of **88b** (237 mg, 0.1357 mmol) in a mixture of MeOH (10 mL) and water (10 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) resin (10.7 g). The mixture was rotated at room temperature for 14 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **48b** (166 mg, 99%) as a colorless glassy solid.

R_f 0.19 (MeCN/H₂O/NH₄OH 6:1:1, KMnO₄).

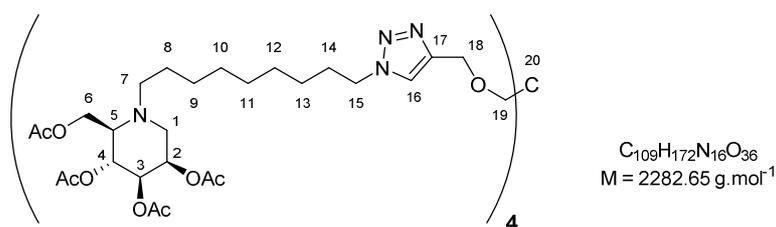
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -35$ (*c* 1.0, MeOH).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.18-1.34 (m, 30H; CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.36-1.47 (m, 6H; CH₂-8), 1.80-1.90 (m, 6H; CH₂-14), 2.07 (dt, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 3H; H-5), 2.43 (dd, *J* = 12.2, 1.4 Hz, 3H; H^A-1), 2.48-2.58 (m, 3H; H^A-7), 2.64-2.75 (m, 3H; H^B-7), 2.93 (dd, *J* = 12.2, 3.5 Hz, 3H; H^B-1), 3.27 (dd, *J* = 8.9, 3.4 Hz, 3H; H-3), 3.41 (s, 6H; CH₂-19), 3.50 (s, 2H; CH₂-21), 3.63 (dd, *J* = 9.2, 8.9 Hz, 3H; H-4), 3.77-3.81 (m, 3H; H-2), 3.79-3.88 (m, 6H; CH₂-6), 4.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H; CH₂-15), 4.49 (s, 6H; CH₂-18), 7.90 ppm (s, 3H; H-16).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 25.3 (C-8), 27.4, 28.5, 30.0, 30.47, 30.48 (C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 31.3 (C-14), 46.7 (C-20), 51.3 (C-15), 53.8 (C-7), 56.5 (C-1), 59.2 (C-6), 62.3 (C-21), 65.4 (C-18), 66.9 (C-5), 69.55 (C-2), 69.60 (C-4), 70.1 (C-19), 76.6 (C-3), 124.8 (C-16), 146.1 ppm (C-17).

IR (neat) 3368 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₅₉H₁₀₉N₁₂O₁₆ : 1241.8079 [M + H]⁺ ; found 1241.8050.

Compound **88c**

To a solution of **51b** (4.3 eq., 49 mg, 0.0983 mmol) and tetrakis(2-propynyloxymethyl)methane **82** (6.6 mg, 0.0229 mmol) in DMF (2 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.5 eq., 3 mg, 0.0120 mmol) and sodium ascorbate (0.9 eq., 4 mg, 0.0202 mmol) in water (0.5 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 30 min. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt (3×). The combined organic extracts were washed with water and brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/ H_2O / NH_4OH (10:1:1) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 97:3) to afford **88c** (30 mg, 57%) as a colorless oil.

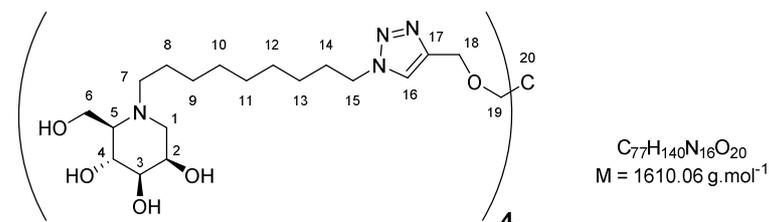
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -42$ (c 1.0, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.16-1.44 (m, 48H; CH_2 -8, CH_2 -9, CH_2 -10, CH_2 -11, CH_2 -12 and CH_2 -13), 1.82-1.92 (m, 8H; CH_2 -14), 2.00 (s, 12H; $4 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.03 (s, 12H; $4 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.07 (s, 12H; $4 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.10 (s, 12H; $4 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.57-2.77 (m, 16H; H^A -1, H-5 and CH_2 -7), 3.03 (dd, $J = 13.1, 4.9$ Hz, 4H; H^B -1), 3.45 (s, 8H; CH_2 -19), 4.18 (dd, $J = 12.6, 3.4$ Hz, 4H; H^A -6), 4.23 (dd, $J = 12.5, 4.1$ Hz, 4H; H^B -6), 4.30 (t, $J = 7.3$ Hz, 8H; CH_2 -15), 4.54 (s, 8H; CH_2 -18), 4.95 (dd, $J = 8.7, 3.5$ Hz, 4H; H-3), 5.21-5.28 (m, 8H; H-2 and H-4), 7.53 ppm (s, 4H; H-16).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.8, 20.9, 21.0, 21.3 ($16 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 24.9, 26.6, 27.2, 29.1, 29.52, 29.54 (C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 30.5 (C-14), 45.4 (C-20), 50.4 (C-15), 51.1 (C-1), 52.9 (C-7), 60.0 (C-6), 61.2 (C-5), 65.2 (C-18), 67.3 (C-2), 68.0 (C-4), 69.3 (C-19), 71.8 (C-3), 122.4 (C-16), 145.4 (C-17), 169.8, 170.1, 170.7, 171.0 ppm ($16 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat) 1738 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{109}\text{H}_{173}\text{N}_{16}\text{O}_{36}$: 2283.2224 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 2283.1981.

Compound **49b**

To a solution of **88c** (28 mg, 0.0123 mmol) in a mixture of MeOH (2 mL) and water (0.5 mL) was added Amberlite® IRA400 (OH⁻) resin (1 g). The mixture was rotated at room temperature for 16 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was

purified by flash column chromatography (MeCN/H₂O/NH₄OH 3:1:1) to afford **49b** (18 mg, 91%) as a pale yellow glassy solid.

R_f 0.16 (MeCN/H₂O/NH₄OH 3:1:1, KMnO₄).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -34$ (*c* 0.5, MeOH).

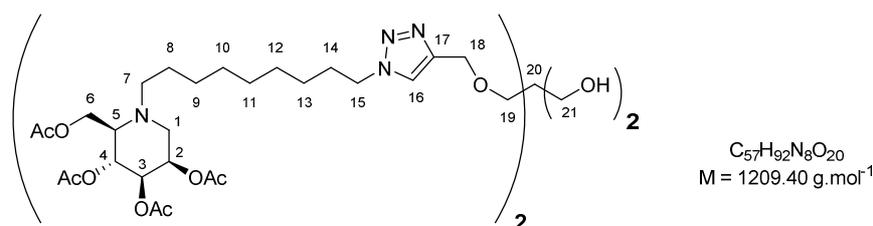
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.22-1.39 (m, 40H; CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.44-1.54 (m, 8H; CH₂-8), 1.84-1.94 (m, 8H; CH₂-14), 2.22-2.28 (m, 4H; H-5), 2.59 (dd, *J* = 12.3, 1.4 Hz, 4H; H^A-1), 2.62-2.72 (m, 4H; H^A-7), 2.76-2.87 (m, 4H; H^B-7), 2.93 (dd, *J* = 12.3, 3.3 Hz, 4H; H^B-1), 3.35 (dd, *J* = 9.1, 3.3 Hz, 4H; H-3), 3.43 (s, 8H; CH₂-19), 3.71 (dd, *J* = 9.1, 9.0 Hz, 4H; H-4), 3.84-3.94 (m, 12H; H-2 and CH₂-6), 4.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 8H; CH₂-15), 4.50 (s, 8H; CH₂-18), 7.92 ppm (s, 4H; H-16).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 25.1 (C-8), 27.5, 28.4, 30.0, 30.46, 30.47 (C-9, C-10, C-11, C-12, C-13), 31.3 (C-14), 46.4 (C-20), 51.3 (C-15), 53.9 (C-7), 56.3 (C-1), 58.8 (C-6), 65.4 (C-18), 67.1 (C-5), 69.25 (C-2), 69.29 (C-4), 69.9 (C-19), 76.2 (C-3), 124.9 (C-16), 146.1 ppm (C-17).

IR (neat) 3367 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₇₇H₁₄₀N₁₆O₂₀Na : 1632.0322 [M + Na]⁺ ; found 1632.0331.

Compound 88d (reaction performed by Dr A. Joosten)



To a solution of **51b** (2.2 eq., 30 mg, 0.060 mmol) and 2,2-bis[(2-propyn-1-yloxy)methyl]-1,3-propanediol **87** (5.8 mg, 0.027 mmol) in DMF (4 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of CuSO₄·5H₂O (0.2 eq., 1.4 mg, 0.005 mmol) and sodium ascorbate (0.4 eq., 2.2 mg, 0.011 mmol) in water (1 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 30 min. The reaction mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with AcOEt (3×12 mL). The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/H₂O/NH₄OH (15:0.5:0.5) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 99:1 to 94:6) to afford **88d** (29 mg, 89%) as a pale yellow oil.

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -34$ (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.20-1.44 (m, 24H; CH₂-8, CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.83-1.94 (m, 4H; CH₂-14), 2.01 (s, 6H; 2×C(O)CH₃), 2.04 (s, 6H; 2×C(O)CH₃), 2.08 (s, 6H; 2×C(O)CH₃), 2.11 (s, 6H; 2×C(O)CH₃), 2.56-2.76 (m, 8H; H^A-1, H-5 and CH₂-7), 3.04 (dd, *J* = 13.1, 4.9 Hz, 2H; H^B-1), 3.16 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H; OH), 3.58 (s, 4H; CH₂-19), 3.64 (d, *J* = 5.6 Hz, 4H; CH₂-21), 4.15-4.27 (m, 4H; CH₂-6), 4.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H; CH₂-15), 4.62 (s, 4H; CH₂-18), 4.95 (dd, *J* = 8.6, 3.7 Hz, 2H; H-3), 5.20-5.30 (m, 4H; H-2 and H-4), 7.49 ppm (s, 2H; H-16).

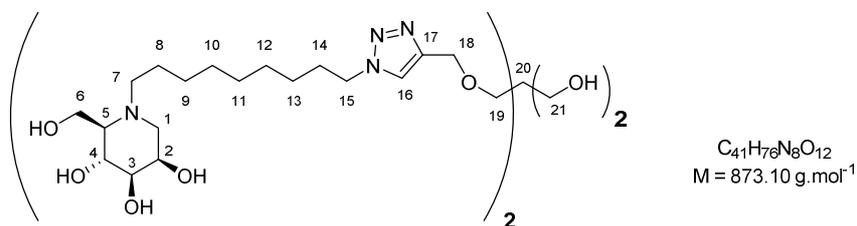
¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 20.9, 21.0, 21.1, 21.3 (8×C(O)CH₃), 25.0, 26.6, 27.2, 29.1, 29.48, 29.50, 30.4 (C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14), 45.4 (C-20), 50.5 (C-15), 51.0 (C-1), 52.9 (C-7), 60.1 (C-6), 61.2 (C-5), 64.6 (C-21), 65.0 (C-18), 67.4 (C-2), 68.1 (C-4), 71.5 (C-19), 71.8 (C-3), 122.3 (C-16), 145.0 (C-17), 169.9, 170.1, 170.7, 171.1 ppm (8×C(O)CH₃).

IR (neat) 1742 cm⁻¹ (C=O).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{57}H_{92}N_8O_{20}Na$: 1231.6320 $[M + Na]^+$; found 1231.6357.

Compound 47b (reaction performed by Dr A. Joosten)



To a solution of **88d** (30 mg, 0.025 mmol) in a mixture of MeOH (5 mL) and water (5 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) resin (1.2 g). The mixture was rotated at room temperature for 4 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **47b** (21 mg, 96%) as a colorless glassy solid.

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -25$ (c 1.0, MeOH).

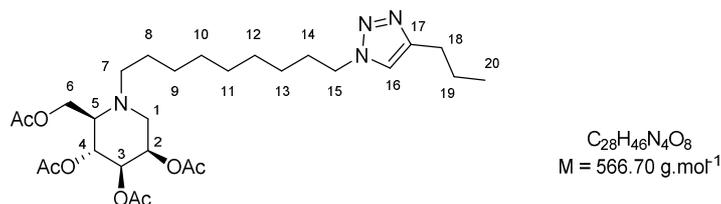
¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 1.28-1.39 (m, 20H; CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.41-1.53 (m, 4H; CH₂-8), 1.85-1.95 (m, 4H; CH₂-14), 2.07-2.14 (m, 2H; H-5), 2.43-2.51 (m, 2H; H^A-1), 2.52-2.63 (m, 2H; H^A-7), 2.68-2.80 (m, 2H; H^B-7), 2.96 (dd, $J = 12.4, 3.8$ Hz, 2H; H^B-1), 3.28-3.32 (m, 2H; H-3), 3.47 (s, 4H; CH₂-19), 3.56 (s, 4H; CH₂-21), 3.62-3.70 (m, 2H; H-4), 3.80-3.96 (m, 6H; H-2 and CH₂-6), 4.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H; CH₂-15), 4.56 (s, 4H; CH₂-18), 7.95 ppm (s, 2H; H-16).

¹³C-NMR (CD₃OD, 75.5 MHz) δ 25.3, 27.4, 28.5, 30.0, 30.48, 30.50, 31.3 (C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14), 46.9 (C-20), 51.3 (C-15), 53.9 (C-7), 56.5 (C-1), 59.2 (C-6), 62.7 (C-21), 65.4 (C-18), 67.0 (C-5), 69.6 (C-2), 69.7 (C-4), 70.5 (C-19), 76.6 (C-3), 124.8 (C-16), 146.1 ppm (C-17).

IR (neat) 3361 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{41}H_{77}N_8O_{12}$: 873.5655 $[M + H]^+$; found 873.5644.

Compound 89

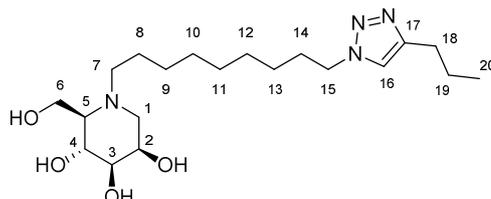


To a solution of **51b** (48 mg, 0.0963 mmol) and 1-pentyne (10.5 eq., 0.1 mL, 1.0130 mmol) in DMF (2.5 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 eq., 3 mg, 0.0120 mmol) and sodium ascorbate (0.3 eq., 5 mg, 0.0252 mmol) in water (0.65 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 30 min. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt (3 \times). The combined organic extracts were washed with water (2 \times) and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/H₂O/NH₄OH (9:1:1) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) to afford **89** (29 mg, 53%) as a pale yellow oil. The analytical data of **89** were in complete agreement with those reported in the literature.⁷⁶

R_f 0.18 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1, KMnO₄).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 3H; CH₃-20), 1.17-1.44 (m, 12H; CH₂-8, CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.62-1.72 (m, 2H; CH₂-19), 1.81-1.90 (m, 2H; CH₂-14), 2.00 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.03 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.07 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.10 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.57-2.73 (m, 6H; H^A-1, H-5, CH₂-7 and CH₂-18), 3.03 (dd, J = 13.1, 4.9 Hz, 1H; H^B-1), 4.18 (dd, J = 12.5, 3.4 Hz, 1H; H^A-6), 4.23 (dd, J = 12.5, 4.2 Hz, 1H; H^B-6), 4.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H; CH₂-15), 4.95 (dd, J = 8.6, 3.6 Hz, 1H; H-3), 5.21-5.29 (m, 2H; H-2 and H-4), 7.23 ppm (s, 1H; H-16).

Compound 50b



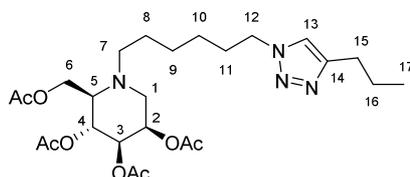
C₂₀H₃₈N₄O₄
M = 398.55 g.mol⁻¹

To a solution of **89** (29 mg, 0.0512 mmol) in MeOH (3 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) resin (500 mg). The mixture was rotated at room temperature for 5 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 85:15) to afford **50b** (16.5 mg, 81%) as a colorless glassy solid. The analytical data of **50b** were in complete agreement with those reported in the literature.⁷⁶

R_f 0.16 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10, KMnO₄).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H; CH₃-20), 1.21-1.39 (m, 10H; CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.41-1.52 (m, 2H; CH₂-8), 1.63-1.74 (m, 2H; CH₂-19), 1.83-1.93 (m, 2H; CH₂-14), 2.12 (dt, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H; H-5), 2.48 (dd, J = 12.3, 1.4 Hz, 1H; H^A-1), 2.54-2.63 (m, 1H; H^A-7), 2.66 (t, J = 7.5 Hz, 2H; CH₂-18), 2.70-2.79 (m, 1H; H^B-7), 2.98 (dd, J = 12.3, 3.9 Hz, 1H; H^B-1), 3.28-3.31 (m, 1H; H-3), 3.66 (dd, J = 9.3, 9.0 Hz, 1H; H-4), 3.81-3.84 (m, 1H; H-2), 3.85 (dd, J = 11.8, 2.9 Hz, 1H; H^A-6), 3.89 (dd, J = 11.8, 2.5 Hz, 1H; H^B-6), 4.35 (t, J = 7.1 Hz, 2H; CH₂-15), 7.73 ppm (s, 1H; H-16).

Compound 92



C₂₅H₄₀N₄O₈
M = 524.62 g.mol⁻¹

To a solution of **51b** (25 mg, 0.0548 mmol) and 1-pentyne (10 eq., 0.055 mL, 0.5571 mmol) in DMF (1.25 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of CuSO₄·5H₂O (0.4 eq., 5 mg, 0.0200 mmol) and sodium ascorbate (0.7 eq., 7 mg, 0.0353 mmol) in water (0.3 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 40 min. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/H₂O/NH₄OH (9:1:1) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt) to afford **92** (17 mg, 59%) as a pale yellow oil. The analytical data of **92** were in complete agreement with those reported in the literature.⁷⁶

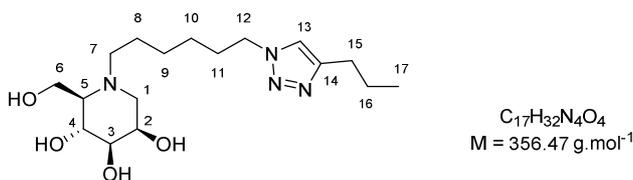
PARTIE EXPÉRIMENTALE

R_f 0.35 (AcOEt, KMnO₄).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H; CH₃-17), 1.20-1.45 (m, 6H; CH₂-8, CH₂-9 and CH₂-10), 1.63-1.73 (m, 2H; CH₂-16), 1.82-1.92 (m, 2H; CH₂-11), 2.01 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.04 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.07 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.10 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.55-2.75 (m, 6H; H^A-1, H-5, CH₂-7 and CH₂-15), 3.03 (dd, *J* = 13.1, 5.0 Hz, 1H; H^B-1), 4.16-4.25 (m, 2H; CH₂-6), 4.29 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H; CH₂-12), 4.96 (dd, *J* = 8.5, 3.5 Hz, 1H; H-3), 5.20-5.29 (m, 2H; H-2 and H-4), 7.24 ppm (s, 1H; H-13).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 13.9 (C-17), 20.9, 20.95, 21.04, 21.2 (4×C(O)CH₃), 22.9 (C-16), 25.2, 26.5, 26.7 (C-8, C-9, C-10), 27.8 (C-15), 30.5 (C-11), 50.1 (C-12), 50.8 (C-1), 52.8 (C-7), 60.1 (C-6), 61.3 (C-5), 67.3 (C-2), 68.1 (C-4), 71.6 (C-3), 120.5 (C-13), 148.4 (C-14), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 ppm (4×C(O)CH₃).

Compound 50a

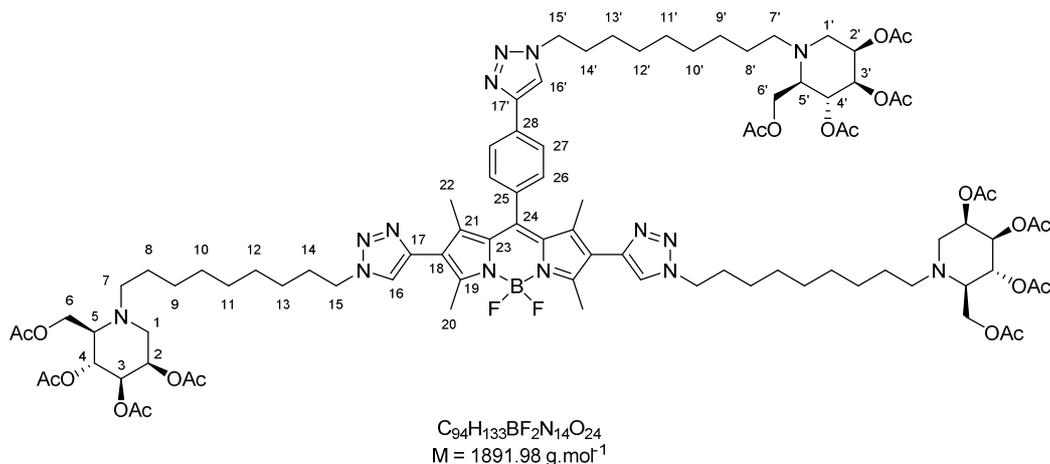


To a solution of **92** (17 mg, 0.0324 mmol) in MeOH (2 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) resin (400 mg). The mixture was rotated at room temperature for 2 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 80:20) to afford **50a** (8 mg, 69%) as a colorless glassy solid. The analytical data of **50a** were in complete agreement with those reported in the literature.⁷⁶

R_f 0.21 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20, KMnO₄).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H; CH₃-17), 1.27-1.38 (m, 4H; CH₂-9 and CH₂-10), 1.41-1.52 (m, 2H; CH₂-8), 1.63-1.74 (m, 2H; CH₂-16), 1.85-1.95 (m, 2H; CH₂-11), 2.10 (dt, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H; H-5), 2.45 (dd, *J* = 12.3, 1.4 Hz, 1H; H^A-1), 2.51-2.60 (m, 1H; H^A-7), 2.66 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H; CH₂-15), 2.70-2.79 (m, 1H; H^B-7), 2.97 (dd, *J* = 12.3, 3.9 Hz, 1H; H^B-1), 3.27-3.31 (m, 1H; H-3), 3.65 (dd, *J* = 9.2, 9.0 Hz, 1H; H-4), 3.80-3.84 (m, 1H; H-2), 3.82-3.90 (m, 2H; CH₂-6), 4.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₂-12), 7.73 ppm (s, 1H; H-13).

Compound 100



To a degassed (by bubbling 15 min with argon) solution of 4,4-difluoro-2,6-diethynyl-8-(4-ethynylbenzene)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene **95** (18 mg, 0.0454 mmol) and **51b** (4.9 eq., 110 mg, 0.2206 mmol) in THF (1.5 mL) was added a degassed (by bubbling 15 min with argon) solution of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.7 eq., 7.6 mg, 0.0320 mmol) and sodium ascorbate (1.4 eq., 13 mg, 0.0656 mmol) in water (1.5 mL) under argon atmosphere. The flask was evacuated under vacuum and backfilled with argon (three cycles) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/H₂O/NH₄OH (10:1:1) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98:2 to 96:4) to afford **100** (63 mg, 73%) as a red oil.

R_f 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -34$ (c 0.1, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.15-1.41 (m, 36H; CH₂-8, CH₂-8', CH₂-9, CH₂-9', CH₂-10, CH₂-10', CH₂-11, CH₂-11', CH₂-12, CH₂-12', CH₂-13 and CH₂-13'), 1.49 (s, 6H; CH₃-22), 1.86-1.96 (m, 6H; CH₂-14 and CH₂-14'), 1.99 (s, 9H; 3×C(O)CH₃), 2.02 (s, 9H; 3×C(O)CH₃), 2.05 (s, 6H; 2×C(O)CH₃), 2.06 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.080 (s, 6H; 2×C(O)CH₃), 2.084 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.54-2.74 (m, 18H; H^A-1, H^A-1', H-5, H-5', CH₂-7, CH₂-7' and CH₃-20), 2.98-3.06 (m, 3H; H^B-1 and H^B-1'), 4.14-4.24 (m, 6H; CH₂-6 and CH₂-6'), 4.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H; CH₂-15), 4.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H; CH₂-15'), 4.91-4.96 (m, 3H; H-3 and H-3'), 5.19-5.27 (m, 6H; H-2, H-2', H-4 and H-4'), 7.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H; H-26), 7.43 (s, 2H; H-16), 7.87 (s, 1H; H-16'), 7.97 ppm (d, $J = 8.1$ Hz, 2H; H-27).

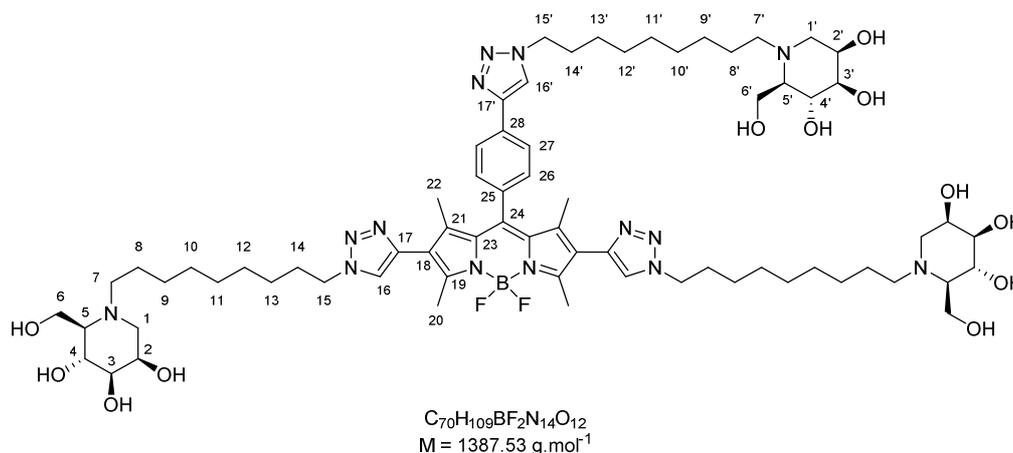
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 13.4 (C-22), 13.9 (C-20), 20.8, 20.9, 21.0, 21.2 (12×C(O)CH₃), 24.9, 26.6, 27.1, 28.99, 29.04, 29.40, 29.44, 29.8 (C-8, C-8', C-9, C-9', C-10, C-10', C-11, C-11', C-12, C-12', C-13, C-13'), 30.3, 30.5 (C-14, C-14'), 50.4 (C-15), 50.6 (C-15'), 51.0 (C-1, C-1'), 52.8 (C-7, C-7'), 60.0 (C-6, C-6'), 61.2 (C-5, C-5'), 67.3 (C-2, C-2'), 68.0 (C-4, C-4'), 71.7 (C-3, C-3'), 120.1 (C-16'), 122.1 (C-16), 122.8 (C-18), 126.5 (C-27), 128.8 (C-26), 131.5, 131.9 (C-23, C-24), 134.7 (C-28), 140.4, 140.6 (C-17, C-21), 142.4 (C-25), 146.9 (C-17'), 155.4 (C-19), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 ppm (12×C(O)CH₃).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 376.5 MHz) δ -145.4 (d, $J = 30.8$ Hz, 1F; BF₂), -145.2 ppm (d, $J = 26.7$ Hz, 1F; BF₂).

¹¹B-NMR (CDCl₃, 128 MHz) δ 0.83 ppm (t, $J = 31.9$ Hz, 1B; BF₂).

IR (neat) 1740 (C=O), 1536 (B-N) cm⁻¹.

HRMS (ESI) m/z calculated for C₉₄H₁₃₃BF₂N₁₄O₂₄ : 946.4919 [M + 2H]²⁺; found 946.4944.

Compound **96**

To a solution of **100** (36 mg, 0.0190 mmol) in MeOH (3 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) resin (2.30 g, freshly prepared from Amberlite[®] IRA400 (Cl⁻)). The mixture was rotated at room temperature for 8 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Because of incomplete deacetylation, the crude was dissolved in MeOH (3 mL) and Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) resin (1.30 g) was added. The mixture was rotated at room temperature for another 16 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was evaporated under reduced pressure to afford **96** (25 mg, 95%) as a red oil.

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -28$ (*c* 0.1, MeOH).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.20-1.40 (m, 30H; CH₂-9, CH₂-9', CH₂-10, CH₂-10', CH₂-11, CH₂-11', CH₂-12, CH₂-12', CH₂-13 and CH₂-13'), 1.40-1.49 (m, 6H; CH₂-8 and CH₂-8'), 1.54 (s, 6H; CH₃-22), 1.88-2.01 (m, 6H; CH₂-14 and CH₂-14'), 2.06-2.12 (m, 3H; H-5 and H-5'), 2.41-2.48 (m, 3H; H^A-1 and H^A-1'), 2.49-2.60 (m, 3H; H^A-7 and H^A-7'), 2.61 (s, 6H; CH₃-20), 2.65-2.78 (m, 3H; H^B-7 and H^B-7'), 2.92-2.99 (m, 3H; H^B-1 and H^B-1'), 3.26-3.32 (m, 3H; H-3 and H-3'), 3.62-3.69 (m, 3H; H-4 and H-4'), 3.78-3.90 (m, 9H; H-2, H-2', CH₂-6 and CH₂-6'), 4.44 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H; CH₂-15), 4.48 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H; CH₂-15'), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H; H-26), 8.05 (s, 2H; H-16), 8.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H; H-27), 8.48 ppm (s, 1H; H-16').

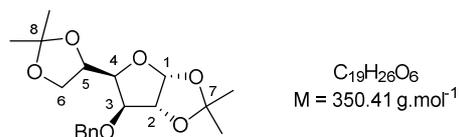
¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 13.6 (C-22), 13.9 (C-20), 25.3, 27.4, 27.5, 28.51, 28.53, 29.9, 30.0, 30.4, 30.47, 30.50 (C-8, C-8', C-9, C-9', C-10, C-10', C-11, C-11', C-12, C-12', C-13, C-13'), 31.2, 31.3 (C-14, C-14'), 51.5 (C-15), 51.6 (C-15'), 53.8 (C-7, C-7'), 56.5 (C-1, C-1'), 59.2 (C-6, C-6'), 67.0 (C-5, C-5'), 69.6 (C-2, C-2', C-4, C-4'), 76.6 (C-3, C-3'), 122.9 (C-16'), 123.9 (C-18), 125.1 (C-16), 127.7 (C-27), 130.2 (C-26), 132.6, 133.2 (C-23, C-24), 135.9 (C-28), 141.0 (C-17), 142.0 (C-21), 144.4 (C-25), 147.8 (C-17'), 156.5 ppm (C-19).

¹⁹F-NMR (CD₃OD, 376.5 MHz) δ -146.0 (d, *J* = 30.4 Hz, 1F; BF₂), -146.2 ppm (d, *J* = 29.6 Hz, 1F; BF₂).

¹¹B-NMR (CD₃OD, 128 MHz) δ 0.89 ppm (t, *J* = 32.1 Hz, 1B; BF₂).

IR (neat) 3359 (O-H), 1536 (B-N) cm⁻¹.

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₇₀H₁₁₀DBF₂N₁₄O₁₂ : 694.9323 [M + 2H]²⁺ ; found 694.9333.

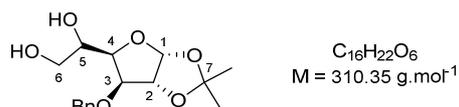
3-*O*-Benzyl-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (137)

To a solution of diacetone-D-glucose (20.0 g, 76.84 mmol) in dry DMF (240 mL) at 0 °C was added portionwise NaH (2.5 eq., 7.80 g, 195.02 mmol, 60% on mineral oil) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. BnBr (1.5 eq., 13.8 mL, 115.36 mmol) was added and the mixture was kept stirring at room temperature for 4 h. For quenching, MeOH (30 mL) was slowly added. The solvent was then evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with Et₂O (150 mL) and water (100 mL), the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2×150 mL). The combined organic layers were washed successively with sat. NaHCO₃ and water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 5:95 to 20:80) to afford **137** (26.55 g, 99%) as a yellow oil. The analytical data of **137** were in complete agreement with those reported in the literature.³³⁴

R_f 0.57 (AcOEt/Petroleum ether 20:80, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.31 (s, 3H; CH₃), 1.38 (s, 3H; CH₃), 1.43 (s, 3H; CH₃), 1.49 (s, 3H; CH₃), 4.00 (dd, *J* = 8.7, 5.9 Hz, 1H; H^A-6), 4.02 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H; H-3), 4.12 (dd, *J* = 8.7, 6.2 Hz, 1H; H^B-6), 4.15 (dd, *J* = 7.7, 3.1 Hz, 1H; H-4), 4.37 (ddd, *J* = 7.7, 6.2 and 5.9 Hz, 1H; H-5), 4.59 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H; H-2), 4.63 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.69 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.90 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H; H-1), 7.27-7.35 ppm (m, 5H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 25.6, 26.4, 26.9, 27.0 (4×CH₃), 67.5 (C-6), 72.5 (OCH₂Ph), 72.7 (C-5), 81.5 (C-4), 81.9 (C-3), 82.8 (C-2), 105.4 (C-1), 109.1 (C-7), 111.9 (C-8), 127.8, 128.0, 128.5 (5×CH_{arom}), 137.8 ppm (C_{arom}).

3-*O*-Benzyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (138)

Compound **137** (13.46 g, 38.41 mmol) was dissolved in a mixture of AcOH and water (1:1, 40 mL) and the solution was heated at 45 °C for 19 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in AcOEt and washed with sat. NaHCO₃ until neutral. The aqueous layers were extracted with AcOEt and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 40:60 to 60:40) to afford **138** (10.18 g, 85%) as a colorless oil. The analytical data of **138** were in complete agreement with those reported in the literature.³³⁵

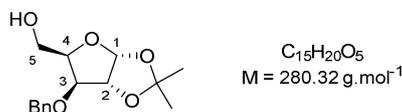
R_f 0.36 (AcOEt/Petroleum ether 70:30, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.32 (s, 3H; CH₃), 1.49 (s, 3H; CH₃), 2.12 (dd, *J* = 6.5, 5.7 Hz, 1H; OH), 2.52 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H; OH), 3.69 (ddd, *J* = 11.5, 5.7 and 5.6 Hz, 1H; H^A-6), 3.81 (ddd, *J* = 11.5, 6.5 and 3.4 Hz, 1H; H^B-6), 4.03 (dddd, *J* = 7.4, 6.0, 5.6 and 3.4 Hz, 1H; H-5), 4.10 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H; H-3), 4.13 (dd, *J* = 7.4, 3.3 Hz, 1H; H-4), 4.54 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.63 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H; H-2), 4.74 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.94 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H; H-1), 7.28-7.41 ppm (m, 5H; H_{arom}).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 26.4, 26.9 ($2\times\text{CH}_3$), 64.6 (C-6), 69.5 (C-5), 72.3 (OCH_2Ph), 80.2 (C-4), 82.2 (C-3), 82.3 (C-2), 105.3 (C-1), 112.0 (C-7), 128.0, 128.4, 128.9 ($5\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 137.3 ppm (C_{arom}).

3-*O*-Benzyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose (**140**)



Compound **138** (16.81 g, 54.17 mmol) was dissolved in a mixture of H_2O and MeOH (1:1, 230 mL) then NaIO_4 (1.2 eq., 13.44 g, 62.83 mmol) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h 30, and then ethylene glycol (1 eq., 3 mL, 53.80 mmol) was added, followed by additional stirring for 20 min. The mixture was diluted with cold MeOH (300 mL), the resulting white precipitate was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. This was repeated once.

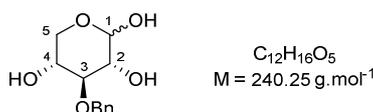
The aldehyde was then dissolved in MeOH (180 mL) and NaBH_4 (1.1 eq., 2.19 g, 57.96 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 40 min, and then quenched by addition of AcOH (3.6 mL). The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with sat. NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to afford **140** (15.15 g, 99%) as a colorless oil. The analytical data of **140** were in complete agreement with those reported in the literature.³³⁶

R_f 0.64 (AcOEt/Petroleum ether 70:30, PMA).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.33 (s, 3H; CH_3), 1.49 (s, 3H; CH_3), 2.08 (br s, 1H; OH), 3.86 (dd, $J = 12.0, 4.7$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-5}}$), 3.95 (dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-5}}$), 4.02 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H; H-3), 4.28 (ddd, $J = 5.2, 4.7$ and 3.5 Hz, 1H; H-4), 4.49 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.64 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H; H-2), 4.72 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 5.99 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H; H-1), 7.29-7.39 ppm (m, 5H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 26.5, 27.0 ($2\times\text{CH}_3$), 61.2 (C-5), 72.1 (OCH_2Ph), 80.2 (C-4), 82.6 (C-2), 82.9 (C-3), 105.2 (C-1), 111.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 127.9, 128.4, 128.8 ($5\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 137.2 ppm (C_{arom}).

3-*O*-Benzyl- α,β -D-xylopyranose (**136**)



Compound **140** (1.34 g, 4.78 mmol) was dissolved in THF (16 mL), then a 1M H_2SO_4 aqueous solution (2.1 eq., 10 mL, 10 mmol) was added and the reaction mixture was heated at 60 °C for 16 h. The reaction mixture was neutralized by addition of a 30% NH_3 aqueous solution and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in MeOH and the insoluble material was filtered and washed with MeOH. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **136** (1.13 g, 98%) as an anomeric mixture (α/β 30:70) and as a white solid.

R_f 0.27 (AcOEt/Petroleum ether 80:20, PMA).

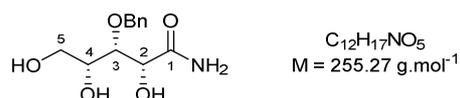
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ 3.19-3.37 (m, 7.5H; $\text{H}^{\beta-3}$, $\text{H}^{\beta-4}$ and $\text{H}^{\beta,\text{A-5}}$), 3.49 (dd, $J = 8.6, 3.4$ Hz, 1H; $\text{H}^{\alpha-2}$), 3.52-3.77 (m, 6.5H; $\text{H}^{\alpha-3}$, $\text{H}^{\alpha-4}$, $\text{H}^{\beta-4}$ and $\text{C}(\text{H}^{\alpha})_2-5$), 3.84 (dd, $J = 11.4, 5.5$ Hz, 2.5H; $\text{H}^{\beta,\text{B-5}}$), 4.44 (d, $J = 7.1$ Hz, 2.5H; $\text{H}^{\beta-1}$), 4.88-4.91 (m, 7H; $\text{OC}(\text{H}^{\alpha})_2\text{Ph}$, $\text{OC}(\text{H}^{\beta})_2\text{Ph}$), 5.03 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H; $\text{H}^{\alpha-1}$), 7.22-7.48 ppm (m, 17.5H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 63.1 ($\text{C}^\beta\text{-5}$), 67.0 ($\text{C}^\alpha\text{-5}$), 71.16, 71.19 ($\text{C}^\alpha\text{-4}$, $\text{C}^\beta\text{-4}$), 73.6 ($\text{C}^\beta\text{-2}$), 75.8, 75.9 ($\text{OC}(\text{H}^\alpha)_2\text{Ph}$, $\text{OC}(\text{H}^\beta)_2\text{Ph}$), 76.1 ($\text{C}^\alpha\text{-2}$), 83.1 ($\text{C}^\alpha\text{-3}$), 86.0 ($\text{C}^\beta\text{-3}$), 94.3 ($\text{C}^\alpha\text{-1}$), 99.0 ($\text{C}^\beta\text{-1}$), 128.5, 129.0, 129.1, 129.2 (CH_{arom}), 140.37, 140.42 ppm (C_{arom}).

IR (neat) 3340 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$: 263.089 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; found 263.088.

3-*O*-Benzyl-D-xylonamide (141)



To a solution of **136** (1.0 g, 4.16 mmol) in a 30% NH_3 aqueous solution (42 mL) was added I_2 (1.2 eq., 1.27 g, 5 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 17 h. Additional I_2 (0.2 eq., 0.21 g, 0.83 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for further 4 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene. The crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 85:15, solid deposition) to afford **141** (700 mg, 66%).

R_f 0.14 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10, PMA).

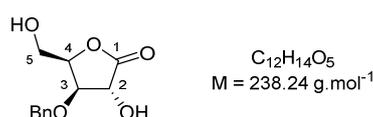
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ 3.70 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H; $\text{CH}_2\text{-5}$), 3.97 (dt, $J = 5.0, 4.8$ Hz, 1H; H-4), 4.01 (dd, $J = 5.0, 2.2$ Hz, 1H; H-3), 4.43 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H; H-2), 4.67 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.74 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.27-7.43 ppm (m, 5H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 62.9 (C-5), 71.9 (C-2), 72.5 (C-4), 75.4 (OCH_2Ph), 80.7 (C-3), 129.0, 129.5 ($5\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 138.2 (C_{arom}), 178.0 ppm (C-1).

IR (neat) 3315 (O-H), 1670 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{Na}$: 278.100 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; found 278.101.

3-*O*-Benzyl-D-xylono-1,4-lactone (145)



Compound **136** (11.80 g, 49.12 mmol) was diluted in a mixture of THF (25 mL) and water (70 mL), and the solution was cooled to $5\text{ }^\circ\text{C}$. K_2CO_3 (1.2 eq., 8.28 g, 59.91 mmol) was added portionwise to the solution maintaining the temperature below $10\text{ }^\circ\text{C}$, and the solution was stirred for 30 min. Br_2 (1.2 eq., 2.90 mL, 56.45 mmol) was then added dropwise at $0\text{ }^\circ\text{C}$ over a period of 1 h 30. The reaction mixture was maintained below $10\text{ }^\circ\text{C}$ for a further 1 h and then stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene. The residue was extracted with hot acetone (6 \times) and the organic extracts were concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{AcOEt}/\text{Petroleum ether}$ 50:50 to 70:30) to afford **145** (9.17 g, 78%) as a white solid.

R_f 0.24 ($\text{AcOEt}/\text{Petroleum ether}$ 1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +40$ (c 1.0, acetone).

$^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 300 MHz) δ 3.82 (ddd, $J = 12.4, 5.6$ and 3.1 Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A}}\text{-5}$), 3.69 (ddd, $J = 12.4, 4.9$ and 3.1 Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B}}\text{-5}$), 4.08 (dd, $J = 5.6, 4.9$ Hz, 1H; OH), 4.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H; H-3), 4.63 (dt, $J = 7.5, 3.1$ Hz,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

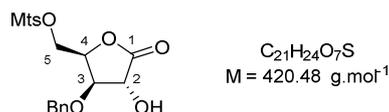
¹H; H-4), 4.72 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.75-4.81 (m, 1H; H-2), 4.84 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.24 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H; OH), 7.26-7.44 ppm (m, 5H; H_{arom}).

¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 100 MHz) δ 60.5 (C-5), 72.8 (C-2), 72.9 (OCH₂Ph), 79.1 (C-4), 82.1 (C-3), 128.5, 129.2 (5×CH_{arom}), 139.1 (C_{arom}), 175.2 ppm (C-1).

IR (neat) 3371 (O-H), 1770 cm⁻¹ (C=O).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₂H₁₄O₅Na : 261.0733 [M + Na]⁺ ; found 261.0712.

3-*O*-Benzyl-5-*O*-(2,4,6-trimethylbenzenesulfonate)-D-xylono-1,4-lactone (146a)

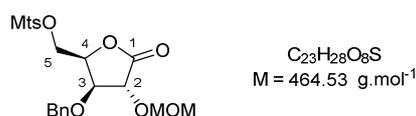


To a solution of **145** (200 mg, 0.840 mmol) in dry pyridine (0.6 mL) at 0 °C was added MtsCl (1.2 eq., 220 mg, 1.006 mmol) and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h then at room temperature for 17 h. Because the conversion was very low, additional MtsCl (0.5 eq., 100 mg, 0.457 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for approximately 4 days. Water was then added (4 mL) and the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3×10 mL). The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was co-evaporated with toluene and then purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 50:50) to afford **146a** (90 mg, 26%).

R_f 0.66 (AcOEt/Petroleum ether 50:50, PMA).

¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 300 MHz) δ 2.27 (s, 3H; *p*-CH₃), 2.54 (s, 6H; 2×*o*-CH₃), 4.19 (dd, *J* = 11.1, 4.7 Hz, 1H; H^A-5), 4.30 (dd, *J* = 11.1, 2.8 Hz, 1H; H^B-5), 4.45 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H; H-3), 4.61 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.77 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.89 (ddd, *J* = 7.3, 4.7 and 2.8 Hz, 1H; H-4), 5.44 (br m, 1H; H-2), 7.02 (s, 2H; H_{arom}), 7.22-7.33 ppm (m, 5H; H_{arom}).

3-*O*-Benzyl-2-*O*-(methoxymethyl)-5-*O*-(2,4,6-trimethylbenzenesulfonate)-D-xylono-1,4-lactone (147a)

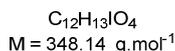
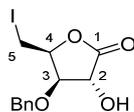


To a solution of **146a** (90 mg, 0.214 mmol) in dimethoxymethane (0.7 mL) was added P₄O₁₀ (1.7 eq., 106 mg, 0.373 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was then slowly treated with sat. NaHCO₃ and extracted with Et₂O (3×). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 20:80) to afford **147a** (75 mg, 75%) as a pale yellow oil.

R_f 0.55 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 2.32 (s, 3H; *p*-CH₃), 2.62 (s, 6H; 2×*o*-CH₃), 3.44 (s, 3H; OCH₂OCH₃), 4.14 (dd, *J* = 11.1, 5.2 Hz, 1H; H^A-5), 4.30 (dd, *J* = 11.1, 3.4 Hz, 1H; H^B-5), 4.33 (dd, *J* = 6.7, 6.0 Hz, 1H; H-3), 4.49 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.55 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.66-4.71 (m, 1H; H-4), 4.72 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.73 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H; H-2), 6.97 (s, 2H; H_{arom}), 7.24-7.29 (m, 2H; H_{arom}), 7.32-7.39 ppm (m, 5H; H_{arom}).

IR (neat) 1797 (C=O), 1359 (SO₂), 1175 cm⁻¹ (SO₂).

3-O-Benzyl-5-iodo-5-deoxy-D-xylo-1,4-lactone (146b)

To a solution of **145** (81 mg, 0.3400 mmol) in dry THF (2.5 mL) under argon were added PPh_3 (1.2 eq., 107 mg, 0.4080 mmol), imidazole (1.5 eq., 35 mg, 0.5141 mmol) and I_2 (1 eq., 88 mg, 0.3467 mmol). The reaction mixture was heated at 60 °C for 4 h, then cooled to room temperature and stirred at this temperature for 16 h. Additional I_2 (0.2 eq., 18 mg, 0.0709 mmol) and PPh_3 (0.2 eq., 16 mg, 0.0610 mmol) were added and the mixture was heated at 65 °C for 2 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt and successively washed with sat. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 25:75) to afford **146b** (107 mg, 90%) as a colorless oil.

R_f 0.21 (CH_2Cl_2 , PMA).

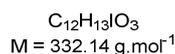
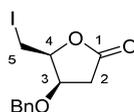
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +16$ (c 2.0, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.15 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H; OH), 3.31 (dd, $J = 10.7, 6.9$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-5}}$), 3.53 (dd, $J = 10.7, 6.1$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-5}}$), 4.29 (dd, $J = 6.5, 5.4$ Hz, 1H; H-3), 4.62 (dd, $J = 5.4, 2.8$ Hz, 1H; H-2), 4.65 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.78 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.83 (ddd, $J = 6.9, 6.5$ and 6.1 Hz, 1H; H-4), 7.30-7.42 ppm (m, 5H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 0.1 (C-5), 71.9 (C-2), 73.0 (OCH_2Ph), 79.8 (C-3), 79.9 (C-4), 128.1, 128.5, 128.8 ($5\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 136.8 (C_{arom}), 174.4 ppm (C-1).

IR (neat) 3431 (O-H), 1776 (C=O), 615 cm^{-1} (C-I).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{IO}_4\text{Na}$: 370.9751 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; found 370.9740.

3-O-Benzyl-5-iodo-2,5-dideoxy-D-xylo-1,4-lactone (150)

A solution of PPh_3 (1.6 eq., 1.79 g, 6.83 mmol) and I_2 (1.5 eq., 1.60 g, 6.30 mmol) in pyridine (13 mL) was stirred at room temperature for 1 h, then **145** (1.0 g, 4.20 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene (2 \times). The crude residue was purified twice by flash column chromatography (first column: AcOEt/Petroleum ether 50:50; second column: CH_2Cl_2) to afford **146b** (623 mg, 43%) and **150** (498 mg, 36%) as a white solid.

R_f 0.60 (CH_2Cl_2 , PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -87$ (c 1.0, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.67 (dd, $J = 17.7, 5.0$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-2}}$), 2.77 (dd, $J = 17.7, 1.0$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-2}}$), 3.42 (dd, $J = 9.5, 5.4$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-5}}$), 3.51 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-5}}$), 4.38 (ddd, $J = 5.0, 4.0$ and 1.0 Hz, 1H; H-3), 4.50 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.60 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.65 (ddd, $J = 9.5, 5.4$ and 4.0 Hz, 1H; H-4), 7.30-7.40 ppm (m, 5H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ -1.5 (C-5), 36.2 (C-2), 72.2 (OCH_2Ph), 74.5 (C-3), 83.2 (C-4), 128.1, 128.3, 128.7 ($5\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 136.8 (C_{arom}), 174.4 ppm (C-1).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

IR (neat) 1777 (C=O), 611 cm⁻¹ (C-I).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₂H₁₃IO₃Na : 354.9802 [M + Na]⁺ ; found 354.9801.

3-O-Benzyl-5-iodo-2-O-(methoxymethyl)-5-deoxy-D-xylono-1,4-lactone (147b)



To a solution of **146b** (4.94 g, 14.19 mmol) in dimethoxymethane (50 mL) was added P₄O₁₀ (1.8 eq., 7.05 g, 24.83 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was then slowly treated with sat. NaHCO₃ and extracted with Et₂O (3×). The combined organic extracts were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 20:80) to afford **147b** (4.71 g, 85%) as a pale yellow oil.

R_f 0.44 (AcOEt/Petroleum ether 20:80, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = + 21 (c 2.0, CHCl₃).

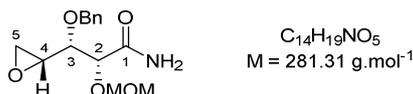
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.36 (dd, *J* = 9.9, 6.0 Hz, 1H; H^A-5), 3.42 (s, 3H; OCH₂OCH₃), 3.48 (dd, *J* = 9.9, 8.4 Hz, 1H; H^B-5), 4.22 (dd, *J* = 4.8, 2.9 Hz, 1H; H-3), 4.40 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H; H-2), 4.61 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.67 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.71 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.81 (ddd, *J* = 8.4, 6.0 and 4.8 Hz, 1H; H-4), 4.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 7.31-7.41 ppm (m, 5H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ -1.2 (C-5), 56.3 (OCH₂OCH₃), 73.1 (OCH₂Ph), 74.2 (C-2), 78.5 (C-3), 81.3 (C-4), 96.0 (OCH₂OCH₃), 128.3, 128.6, 128.8 (5×CH_{arom}), 136.5 (C_{arom}), 172.2 ppm (C-1).

IR (neat) 1786 (C=O), 614 cm⁻¹ (C-I).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₇IO₅Na : 415.0013 [M + Na]⁺ ; found 415.0009.

4,5-Anhydro-3-O-Benzyl-2-O-(methoxymethyl)-D-xylonamide (149)



Compound **147a** (72 mg, 0.1550 mmol) was dissolved in a 30% NH₃ aqueous solution (1.4 mL) and THF (0.6 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 90:10) to afford **149** (20 mg, 46%) and **148** (16 mg, 37%).

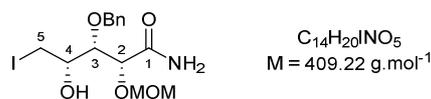
R_f 0.28 (AcOEt, PMA).

¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 300 MHz) δ 2.63 (dd, *J* = 4.8, 2.7 Hz, 1H; H^A-5), 2.78 (dd, *J* = 4.8, 4.2 Hz, 1H; H^B-5), 3.22 (ddd, *J* = 7.4, 4.2 and 2.7 Hz, 1H; H-4), 3.39 (s, 3H; OCH₂OCH₃), 3.40 (dd, *J* = 7.4, 3.6 Hz, 1H; H-3), 4.15 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H; H-2), 4.57 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.70 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.73 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.81 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 6.69 (br s, 1H; NH), 7.03 (br s, 1H; NH), 7.22-7.41 ppm (m, 5H; H_{arom}).

¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 100 MHz) δ 43.5 (C-5), 53.5 (C-4), 56.4 (OCH₂OCH₃), 73.2 (OCH₂Ph), 79.5 (C-2), 83.1 (C-3), 97.4 (OCH₂OCH₃), 128.1, 128.4, 128.9 (5×CH_{arom}), 139.7 (C_{arom}), 172.3 ppm (C-1).

IR (neat) 3380 (N-H), 1644 cm⁻¹ (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₄H₁₉NO₅Na : 304.116 [M + Na]⁺ ; found 304.114.

3-O-Benzyl-5-iodo-2-O-(methoxymethyl)-5-deoxy-D-xylonamide (151)

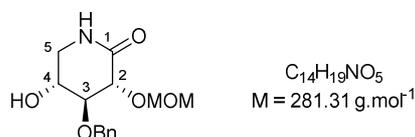
Compound **147b** (106 mg, 0.2703 mmol) was dissolved in a 30% NH₃ aqueous solution (2.5 mL) and THF (1 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h 30. Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt) to afford **151** (75 mg, 68%), **149** (12 mg, 16%) and **148** (6 mg, 8%).

R_f 0.41 (AcOEt, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.00 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H; OH), 3.25 (dd, *J* = 10.1, 6.8 Hz, 1H; H^A-5), 3.32 (dd, *J* = 10.1, 5.6 Hz, 1H; H^B-5), 3.42 (s, 3H; OCH₂OCH₃), 3.91 (dddd, *J* = 6.8, 5.9, 5.6 and 4.2 Hz, 1H; H-4), 4.00 (dd, *J* = 4.6, 4.2 Hz, 1H; H-3), 4.28 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H; H-2), 4.67 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.71 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.73 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.81 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.81 (br s, 1H; NH), 6.61 (br s, 1H; NH), 7.30-7.37 ppm (m, 5H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 8.0 (C-5), 56.9 (OCH₂OCH₃), 71.7 (C-4), 75.5 (OCH₂Ph), 77.9 (C-2), 80.5 (C-3), 97.2 (OCH₂OCH₃) 128.3, 128.4, 128.7 (5×CH_{arom}), 137.5 (C_{arom}), 173.6 ppm (C-1).

IR (neat) 3375, 3200 (N-H, O-H), 1643 cm⁻¹ (C=O).

3-O-Benzyl-2-O-(methoxymethyl)-5-deoxy-5-amino-D-xylono-1,5-lactam (148)

Compound **147b** (94 mg, 0.2397 mmol) was dissolved in a 30% NH₃ aqueous solution (2.2 mL) and DMF (0.9 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 44 h. Solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was co-evaporated with toluene. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt) to afford **148** (58 mg, 86%) as a white solid.

Large scale procedure:

Compound **147b** (5.0 g, 12.75 mmol) was dissolved in a 30% NH₃ aqueous solution (120 mL) and DMF (35 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 44 h. Solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (70 mL) and washed with water (4×70 mL) and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford **148** (3.0 g, 84%) as a white solid.

R_f 0.29 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = +46 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.10 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H; OH), 3.18 (ddd, *J* = 12.3, 6.6 and 2.6 Hz, 1H; H^A-5), 3.44 (s, 3H; OCH₂OCH₃), 3.47 (ddd, *J* = 12.3, 4.6 and 2.8 Hz, 1H; H^B-5), 3.71 (dd, *J* = 7.2, 6.6 Hz, 1H; H-3), 3.96 (tdd, *J* = 6.6, 4.8, and 4.6 Hz, 1H; H-4), 4.16 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H; H-2), 4.70 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.88 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 6.18 (br s, 1H; NH), 7.28-7.39 ppm (m, 5H; H_{arom}).

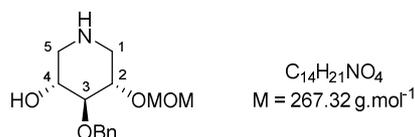
PARTIE EXPÉRIMENTALE

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 44.7 (C-5), 56.5 (OCH_2OCH_3), 67.4 (C-4), 73.9 (OCH_2Ph), 74.5 (C-2), 81.0 (C-3), 97.4 (OCH_2OCH_3) 128.1, 128.3, 128.8 ($5\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 137.8 (C_{arom}), 170.8 ppm (C-1).

IR (neat) 3274 (O-H), 1652 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Na}$: 304.1155 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 304.1118.

3-O-Benzyl-2-O-(methoxymethyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (**152**)



To a suspension of LiAlH_4 (7.8 eq., 3.16 g, 83.26 mmol) in dry THF (120 mL) was added a solution of **148** (3.0 g, 10.66 mmol) in dry THF (120 mL) at 0 °C under argon. The reaction mixture was heated under reflux for 2 h. The reaction mixture was cooled and water (3.2 mL) was cautiously added then a 10% NaOH aqueous solution (6.4 mL) and water (9.6 mL) were successively added, the mixture was then stirred overnight. The insoluble material was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10) to afford **152** (2.29 g, 80%) as a white solid.

R_f 0.25 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10, PMA).

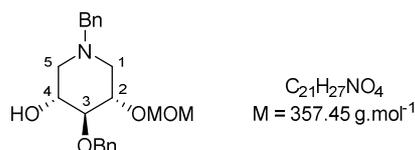
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +43$ (c 1.0, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.46-2.53 (br s, 2H; OH, NH), 2.61 (dd, $J = 12.7, 7.6$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-5}}$), 2.66 (dd, $J = 13.0, 7.6$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-1}}$), 3.14 (dd, $J = 12.7, 3.9$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-5}}$), 3.21 (dd, $J = 13.0, 3.9$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-1}}$), 3.37 (s, 3H; OCH_2OCH_3), 3.38 (dd, $J = 7.0, 6.7$ Hz, 1H; H-3), 3.56 (ddd, $J = 7.6, 6.7$ and 3.9 Hz, 1H; H-4), 3.59 (ddd, $J = 7.6, 7.0$ and 3.9 Hz, 1H; H-2), 4.68 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.69 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H; OCH_2OCH_3), 4.74 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H; OCH_2OCH_3), 4.84 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.27-7.39 ppm (m, 5H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 48.5 (C-1), 49.6 (C-5), 55.8 (OCH_2OCH_3), 70.1 (C-4), 74.2 (OCH_2Ph), 77.4 (C-2), 82.4 (C-3), 96.4 (OCH_2OCH_3), 127.6, 128.0, 128.7 ($5\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 138.6 ppm (C_{arom}).

IR (neat) 3268 cm^{-1} (O-H, N-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Na}$: 290.136 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 290.137.

***N*-Benzyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-(methoxymethyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (155)**

Compound **152** (1.0 g, 3.74 mmol) was dissolved in dry DMF (25 mL), then K_2CO_3 (0.6 eq., 0.31 g, 2.24 mmol) was added, followed by BnBr (1.1 eq., 0.5 mL, 4.18 mmol) and the reaction mixture was stirred at 60 °C for 3 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in AcOEt and washed with water (3×). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 30:70) to afford **155** (1.24 g, 93%) as a pale yellow oil.

R_f 0.23 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, PMA).

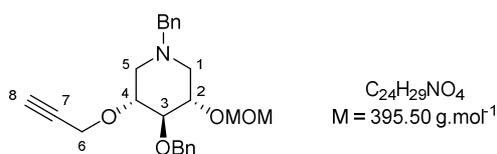
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -19$ (c 1.0, $CHCl_3$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 2.24 (dd, $J = 11.0, 7.8$ Hz, 1H; H^A -5), 2.33 (dd, $J = 11.1, 7.8$ Hz, 1H; H^A -1), 2.58-2.83 (br s, 1H; OH), 2.85 (dd, $J = 11.0, 4.0$ Hz, 1H; H^B -5), 2.92 (dd, $J = 11.0, 4.0$ Hz, 1H; H^B -1), 3.33 (s, 3H; OCH_2OCH_3), 3.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H; H-3), 3.52 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.63 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.71 (ddd, $J = 7.8, 7.0$ and 4.0 Hz, 1H; H-4), 3.77 (ddd, $J = 7.8, 7.0$ and 4.0 Hz, 1H; H-2), 4.65 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H; OCH_2OCH_3), 4.68 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.71 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H; OCH_2OCH_3), 4.84 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.22-7.40 ppm (m, 10H; H_{arom}).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 55.49 (C-1), 55.54 (OCH_2OCH_3), 56.4 (C-5), 62.2 (NCH_2Ph), 69.4 (C-4), 74.0 (OCH_2Ph), 75.9 (C-2), 82.8 (C-3), 96.2 (OCH_2OCH_3), 127.3, 127.8, 127.9, 128.4, 128.6, 129.0 ($10 \times CH_{arom}$), 137.9, 138.7 ppm ($2 \times C_{arom}$).

IR (neat) 3436 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{21}H_{27}NO_4Na$: 380.183 [$M + Na$] $^+$; found 380.184.

***N*-Benzyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-(methoxymethyl)-4-*O*-propargyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (156)**

To a solution of **155** (1.17 g, 3.27 mmol) in dry DMF (15 mL) at 0 °C was added NaH (1.3 eq., 0.17 g, 4.26 mmol, 60% on mineral oil). The resulting suspension was stirred at room temperature for 30 min then propargyl bromide (1.5 eq., 0.53 mL, 4.76 mmol, 80% in toluene) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt and washed with water (3×). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:90) to afford **156** (1.12 g, 87%) as a yellow oil.

R_f 0.66 (AcOEt/Petroleum ether 40:60, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -19$ (c 1.0, $CHCl_3$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 1.94 (dd, $J = 11.1, 10.4$ Hz, 1H; H^A -5 or H^A -1), 2.03 (dd, $J = 11.1, 10.4$ Hz, 1H; H^A -1 or H^A -5), 2.37 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H; H-8), 3.05-3.14 (m, 2H; H^B -1 and H^B -5), 3.32 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H; H-3), 3.34 (s, 3H; OCH_2OCH_3), 3.54 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.55-3.76 (m, 2H; H-2 and H-4), 3.65 (d, $J = 13.5$

PARTIE EXPÉRIMENTALE

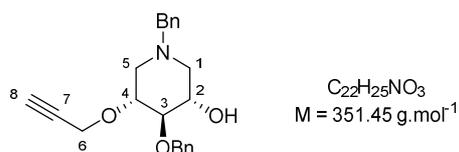
Hz, 1H; NCH₂Ph), 4.23 (dd, $J = 15.7, 2.4$ Hz, 1H; H^A-6), 4.29 (dd, $J = 15.7, 2.4$ Hz, 1H; H^B-6), 4.67 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.81 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.87 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.24-7.45 ppm (m, 10H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 55.58 (OCH₂OCH₃), 55.67, 57.0 (C-1, C-5), 58.5 (C-6), 62.0 (NCH₂Ph), 74.3 (C-8), 75.4 (OCH₂Ph), 77.0, 78.7 (C-2, C-4), 80.3 (C-7), 86.0 (C-3), 96.9 (OCH₂OCH₃), 127.3, 127.6, 128.0, 128.41, 128.43, 129.0 (10×CH_{arom}), 137.9, 139.1 ppm (2×C_{arom}).

IR (neat) 3289 (\equiv C-H), 2117 cm⁻¹ (C \equiv C).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₄H₃₀NO₄ : 396.217 [M + H]⁺ ; found 396.219.

N-Benzyl-3-O-benzyl-4-O-propargyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (153)



A solution of **156** (965 mg, 2.440 mmol) in MeOH (30 mL) and a 6M HCl aqueous solution (5 mL) was heated at 65 °C for 2 h. After being cooled to room temperature, the solution was treated with sat. NaHCO₃ and extracted with AcOEt (2×). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 25:75) to afford **153** (826 mg, 96%) as a white solid.

R_f 0.35 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +4$ (c 1.0, CHCl₃).

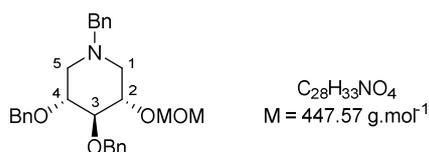
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.23 (dd, $J = 11.1, 8.9$ Hz, 1H; H^A-1), 2.28 (dd, $J = 11.1, 8.2$ Hz, 1H; H^A-5), 2.39 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H; H-8), 2.62 (br s, 1H, OH), 2.86 (ddd, $J = 11.1, 3.7$ and 1.0 Hz, 1H; H^B-1), 2.93 (ddd, $J = 11.1, 2.8$ and 1.0 Hz, 1H; H^B-5), 3.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H; H-3), 3.54 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.60 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.67-3.75 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.18 (dd, $J = 15.8, 2.4$ Hz, 1H; H^A-6), 4.23 (dd, $J = 15.8, 2.4$ Hz, 1H; H^B-6), 4.67 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.88 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.39 ppm (m, 10H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 54.4 (C-1), 56.4 (C-5), 57.1 (C-6), 62.1 (NCH₂Ph), 69.3 (C-2), 74.0 (OCH₂Ph), 74.5 (C-8), 77.2 (C-4), 79.7 (C-7), 82.5 (C-3), 127.2, 127.80, 127.83, 127.3, 127.5, 128.9 (10×CH_{arom}), 137.8, 138.6 ppm (2×C_{arom}).

IR (neat) 3232 (\equiv C-H), 3090 (O-H), 2111 cm⁻¹ (C \equiv C).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₂H₂₆NO₃ : 352.191[M + H]⁺ ; found 352.190.

N-Benzyl-3,4-O-dibenzyl-2-O-(methoxymethyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (157)



To a solution of **152** (1.20 g, 4.49 mmol) in dry THF (26 mL) at 0 °C was added NaH (6.8 eq., 1.22 g, 30.50 mmol, 60% on mineral oil). The suspension was stirred at room temperature for 30 min and BnBr (4.3 eq., 2.3 mL, 19.23 mmol) was added, followed by KI (0.5 eq., 0.37 g, 2.23 mmol). The mixture was stirred at room

temperature for 18 h. For quenching, water (5 mL) was slowly added, and then the mixture was diluted with water and CH_2Cl_2 . The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:90) to afford **157** (1.74 g, 87%) as a pale yellow oil.

R_f 0.30 (AcOEt/Petroleum ether 20:80, PMA).

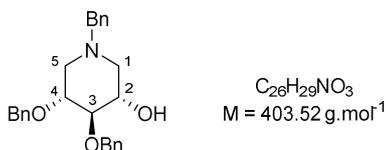
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -30$ (c 1.0, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.96 (dd, $J = 10.9, 10.3$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-5}}$), 2.04 (dd, $J = 10.9, 10.3$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-1}}$), 3.06 (ddd, $J = 10.9, 5.0$ and 2.0 Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-5}}$), 3.09 (ddd, $J = 10.9, 5.0$ and 2.0 Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-1}}$), 3.32 (s, 3H; OCH_2OCH_3), 3.37 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H; H-3), 3.53 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.60 (ddd, $J = 10.3, 9.0$ and 5.0 Hz, 1H; H-4), 3.62 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.72 (ddd, $J = 10.3, 9.0$ and 5.0 Hz, 1H; H-2), 4.59 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.66 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.66 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H; OCH_2OCH_3), 4.79 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H; OCH_2OCH_3), 4.82 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.91 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.24-7.38 ppm (m, 15H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 55.6 (OCH_2OCH_3), 55.8 (C-5), 57.1 (C-1), 62.1 (NCH_2Ph), 73.0 (OCH_2Ph), 75.5 (OCH_2Ph), 77.0 (C-2), 79.0 (C-4), 86.2 (C-3), 97.0 (OCH_2OCH_3), 127.3, 127.5, 127.7, 127.8, 127.9, 128.4, 128.5, 128.9 ($15 \times \text{CH}_{\text{arom}}$), 137.9, 138.7, 139.2 ppm ($3 \times \text{C}_{\text{arom}}$).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{Na}$: 470.230 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 470.230.

***N*-Benzyl-3,4-*O*-dibenzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (**158**)**



A solution of **157** (1.535 g, 3.43 mmol) in MeOH (43 mL) and a 6M HCl aqueous solution (36 mL) was heated at 65 °C for 2 h. After being cooled to room temperature, the solution was treated with sat. NaHCO_3 and extracted with AcOEt (2 \times). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 30:70) to afford **158** (1.34 g, 97%) as a pale yellow oil.

R_f 0.25 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, PMA).

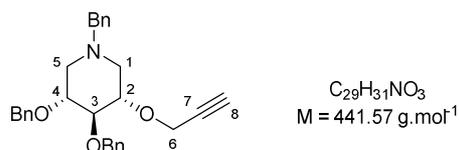
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +7$ (c 1.0, CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.27-2.38 (m, 2H; $\text{H}^{\text{A-5}}$ and $\text{H}^{\text{A-1}}$), 2.86-2.92 (m, 2H; $\text{H}^{\text{B-5}}$ and $\text{H}^{\text{B-1}}$), 2.97 (br s, 1H, OH), 3.43 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H; H-3), 3.54 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.62 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.66 (ddd, $J = 7.8, 6.9$ and 3.9 Hz, 1H; H-4), 3.75 (ddd, $J = 7.8, 6.9$ and 3.9 Hz, 1H; H-2), 4.55 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.59 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.69 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.88 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.22-7.41 ppm (m, 15H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 54.4 (C-5), 56.7 (C-1), 62.2 (NCH_2Ph), 69.4 (C-2), 71.9 (OCH_2Ph), 74.0 (OCH_2Ph), 77.7 (C-4), 82.6 (C-3), 127.2, 127.69, 127.70, 127.77, 127.79, 128.3, 128.4, 128.5, 129.0 ($15 \times \text{CH}_{\text{arom}}$), 138.0, 138.3, 138.7 ppm ($3 \times \text{C}_{\text{arom}}$).

IR (neat) 3301 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{NO}_3$: 404.222 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 404.220.

***N*-Benzyl-3,4-*O*-dibenzyl-2-*O*-propargyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (**154**)**

To a solution of **158** (1.50 g, 3.72 mmol) in dry DMF (16 mL) at 0 °C was added NaH (2.2 eq., 0.33 g, 8.25 mmol, 60% on mineral oil). The suspension was stirred at room temperature for 30 min then propargyl bromide (1.5 eq., 0.63 mL, 5.66 mmol, 80% in toluene) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt and washed with water (3×). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:90) to afford **154** (1.23 g, 75%) as a yellow oil.

R_f 0.31 (AcOEt/Petroleum ether 10:90, PMA).

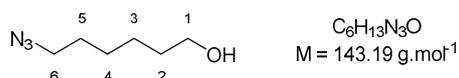
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -18$ (c 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.95 (dd, $J = 10.9, 3.8$ Hz, 1H; H^A-5 or H^A-1), 1.98 (dd, $J = 10.9, 3.8$ Hz, 1H; H^A-1 or H^A-5), 2.37 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H; H-8), 3.06 (ddd, $J = 10.9, 5.1$ and 2.0 Hz, 1H; H^B-5 or H^B-1), 3.10 (ddd, $J = 10.9, 5.1$ and 2.0 Hz, 1H; H^B-1 or H^B-5), 3.37 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H; H-3), 3.53-3.64 (m, 4H; H-2, H-4 and NCH₂Ph), 4.25 (dd, $J = 15.7, 2.4$ Hz, 1H; H^A-6), 4.30 (dd, $J = 15.7, 2.4$ Hz, 1H; H^B-6), 4.60 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.67 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.84 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.88 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.24-7.40 ppm (m, 15H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 56.0, 56.1 (C-1, C-5), 58.6 (C-6), 62.1 (NCH₂Ph), 73.1 (OCH₂Ph), 74.3 (C-8), 75.5 (OCH₂Ph), 78.7, 78.9 (C-4, C-2), 80.4 (C-7), 86.4 (C-3), 127.3, 127.6, 127.7, 127.9, 128.3, 128.1, 128.4, 128.45, 128.49, 129.0 (15×CH_{arom}), 137.9, 138.7, 139.2 ppm (3×C_{arom}).

IR (neat) 3289 (≡C-H), 2114 cm⁻¹ (C≡C).

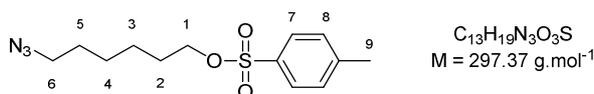
HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₉H₃₂NO₃ : 442.238 [M + H]⁺ ; found 442.235.

6-Azidohexan-1-ol (159**)**

A mixture of 6-chlorohexan-1-ol (2.0 g, 14.64 mmol) and NaN₃ (1.5 eq., 1.43 g, 22.00 mmol) in dry DMF (30 mL) was stirred at 50 °C for 18 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was partitioned between Et₂O and water. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with water (3×), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **159** (1.95 g, 93%) as a colorless oil. The analytical data of **159** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁸⁷

R_f 0.22 (AcOEt/Petroleum ether 25:75, rev. *p*-anisaldehyde).

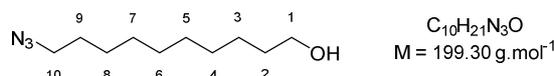
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.34-1.44 (m, 4H; CH₂-3 and CH₂-4), 1.53-1.65 (m, 5H; CH₂-2, CH₂-5 and OH), 3.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H; CH₂-6), 3.62 ppm (t, $J = 6.6$ Hz, 2H; CH₂-1).

6-Azido-1-(4-methylbenzenesulfonate)hexan-1-ol (161)

To a solution of **159** (208 mg, 1.453 mmol) and dry Et₃N (1.2 eq., 0.24 mL, 1.727 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) at 0 °C was added TsCl (1.2 eq., 333 mg, 1.747 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 25 h. Additional dry Et₃N (0.5 eq., 0.1 mL, 0.719 mmol) and TsCl (0.5 eq., 139 mg, 0.729 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 23 h. The reaction mixture was washed with water, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2×). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 5:95) to afford **161** (372 mg, 86%) as a colorless oil. The analytical data of **161** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁸⁶

R_f 0.19 (AcOEt/Petroleum ether 10:90, PMA).

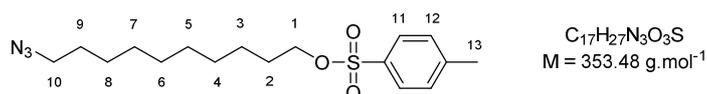
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.28-1.38 (m, 4H; CH₂-3 and CH₂-4), 1.51-1.58 (m, 2H; CH₂-5), 1.62-1.68 (m, 2H; CH₂-2), 2.45 (s, 3H; CH₃-9), 3.23 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H; CH₂-6), 4.02 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H; CH₂-1), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-8), 7.79 ppm (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-7).

10-Azidodecan-1-ol (160)

A mixture of 10-bromodecan-1-ol (1.28 g, 5.40 mmol) and NaN₃ (2.5 eq., 0.875 g, 13.46 mmol) in dry DMF (13 mL) was stirred at 60 °C for 17 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was partitioned between Et₂O and water. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with water (3×), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:90) to afford **160** (1.01 g, 94%) as a pale yellow oil. The analytical data of **160** were in complete agreement with those reported in the literature.³³⁷

R_f 0.30 (AcOEt/Petroleum ether 20:80, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.26-1.39 (m, 12H; CH₂-3, CH₂-4, CH₂-5, CH₂-6, CH₂-7 and CH₂-8), 1.44 (br s, 1H; OH), 1.52-1.62 (m, 4H; CH₂-2 and CH₂-9), 3.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H; CH₂-10), 3.62 ppm (t, *J* = 6.6 Hz, 2H; CH₂-1).

10-Azido-1-(4-methylbenzenesulfonate)decan-1-ol (162)

To a solution of **160** (177 mg, 0.888 mmol) and dry Et₃N (1.7 eq., 0.21 mL, 1.511 mmol) in dry CH₂Cl₂ (7 mL) at 0 °C was added TsCl (1.7 eq., 289 mg, 1.516 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. Additional dry Et₃N (0.5 eq., 0.06 mL, 0.432 mmol) and TsCl (0.5 eq., 85 mg, 0.446 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 25 h. The reaction mixture was washed with water,

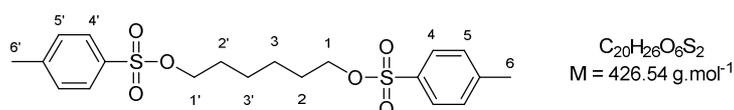
PARTIE EXPÉRIMENTALE

and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum Ether 2:98) to afford **162** (225 mg, 72%) as a colorless oil. The analytical data of **162** were in complete agreement with those reported in the literature.³³⁸

R_f 0.66 (AcOEt/Petroleum Ether 10:90, PMA).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.18-1.39 (m, 12H; CH_2 -3, CH_2 -4, CH_2 -5, CH_2 -6, CH_2 -7 and CH_2 -8), 1.55-1.67 (m, 4H; CH_2 -2 and CH_2 -9), 2.45 (s, 3H; CH_3 -13), 3.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H; CH_2 -10), 4.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H; CH_2 -1), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H-12), 7.79 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H-11).

1,6-Bis(4-methylbenzenesulfonate)hexan-1,6-diol (**172**)

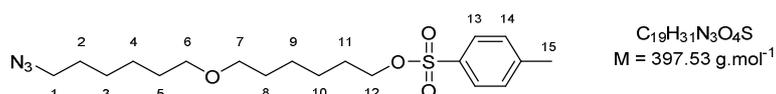


Hexan-1,6-diol (2.0 g, 16.92 mmol), DMAP (0.01 eq., 17 mg, 0.1392 mmol) and dry Et_3N (5 eq., 11.8 mL, 84.89 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (34 mL). Then a solution of TsCl (2.5 eq., 8.07 g, 42.33 mmol) in dry CH_2Cl_2 (34 mL) was slowly added over a period of 30 min under vigorously stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography (CH_2Cl_2 /Petroleum ether 40:60 to 100:0) to afford **172** (6.27 g, 87%) as a white solid. The analytical data of **172** were in complete agreement with those reported in the literature.³³⁹

R_f 0.40 (CH_2Cl_2 /Petroleum ether 2:1, PMA).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.23-1.30 (m, 4H; CH_2 -3 and CH_2 -3'), 1.55-1.63 (m, 4H; CH_2 -2 and CH_2 -2'), 2.45 (s, 6H; CH_3 -6 and CH_3 -6'), 3.98 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H; CH_2 -1 and CH_2 -1'), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H; H-5 and H-5'), 7.77 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 4H; H-4 and H-4').

Compound **171**



To a stirred solution of **159** (250 mg, 1.746 mmol) in dry DMF (20 mL) at 0 °C was added NaH (4 eq., 279 mg, 6.976 mmol, 60% on mineral oil) portionwise under argon atmosphere. After 30 min stirring at 0 °C, a solution of **172** (2 eq., 1.49 g, 3.493 mmol) in dry DMF (10 mL) was added dropwise at 0 °C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h 30. For quenching, water was added and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with AcOEt and washed with water. The aqueous layer was extracted with AcOEt (2 \times). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:90) to afford **171** (138 mg, 20%) as a colorless oil.

R_f 0.31 (AcOEt/Petroleum ether 15:85, PMA).

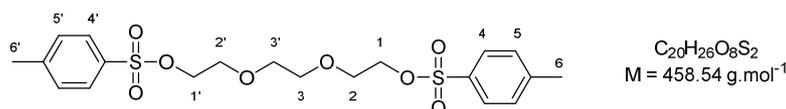
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.20-1.38 (m, 8H; CH_2 -3, CH_2 -4, CH_2 -9 and CH_2 -10), 1.43-1.63 (m, 8H; CH_2 -2, CH_2 -5, CH_2 -8 and CH_2 -11), 2.40 (s, 3H; CH_3 -15), 3.21 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H; CH_2 -1), 3.30 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H; CH_2 -6 or CH_2 -7), 3.33 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H; CH_2 -6 or CH_2 -7), 3.97 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H; CH_2 -12), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H-14), 7.73 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 21.7 (C-15), 25.3, 25.7, 25.9, 26.7 (C-3, C-4, C-9, C-10), 28.9 (C-2, C-11), 29.6, 29.7 (C-5, C-8), 51.5 (C-1), 70.66 (C-12), 70.71, 70.77 (C-6, C-7), 127.9, 129.9 ($4\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 133.3 ($\text{SO}_2\text{-C}_{\text{arom}}$), 144.7 ppm ($\text{C}_{\text{arom}}\text{-CH}_3$).

IR (neat) 2093 (N_3), 1359 (SO_2), 1175 cm^{-1} (SO_2).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}$: 420.193 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; found 420.193.

Triethylene glycol di(4-methylbenzenesulfonate) (173)

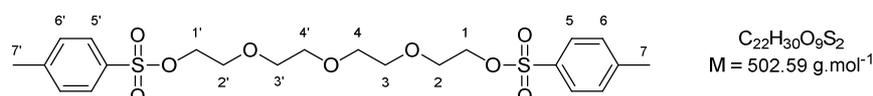


To a solution of triethylene glycol (2.0 g, 13.32 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) was added TsCl (2 eq., 5.08 g, 26.65 mmol) and the mixture was cooled to 0 °C. KOH (8 eq., 5.98 g, 106.58 mmol) was carefully added portionwise maintaining the temperature below 5 °C and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 4 h. A mixture of ice and water was added, followed by CH_2Cl_2 . The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford **173** (5.81 g, 95%) as a white solid. The analytical data of **173** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁹²

R_f 0.47 (AcOEt/Petroleum ether 50:50, PMA).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.44 (s, 6H; $\text{CH}_3\text{-6}$ and $\text{CH}_3\text{-6}'$), 3.52 (s, 4H; $\text{CH}_2\text{-3}$ and $\text{CH}_2\text{-3}'$), 3.63-3.66 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{-2}$ and $\text{CH}_2\text{-2}'$), 4.12-4.14 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{-1}$ and $\text{CH}_2\text{-1}'$), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H; H-5 and H-5'), 7.78 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 4H; H-4 and H-4').

Tetraethylene glycol di(4-methylbenzenesulfonate) (174)

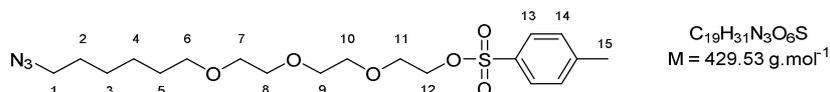


To a solution of tetraethylene glycol (2.0 g, 10.30 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added TsCl (2 eq., 3.92 g, 20.56 mmol) and the mixture was cooled to 0 °C. KOH (8 eq., 4.62 g, 82.34 mmol) was carefully added portionwise maintaining the temperature below 5 °C and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 4 h. A mixture of ice and water was added, followed by CH_2Cl_2 . The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford **174** (4.99 g, 96%) as a colorless oil. The analytical data of **174** were in complete agreement with those reported in the literature.³⁴⁰

R_f 0.26 (AcOEt/Petroleum ether 50:50, PMA).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.43 (s, 6H; $\text{CH}_3\text{-7}$ and $\text{CH}_3\text{-7}'$), 3.52-3.57 (m, 8H; $\text{CH}_2\text{-3}$, $\text{CH}_2\text{-3}'$, $\text{CH}_2\text{-4}$ and $\text{CH}_2\text{-4}'$), 3.65-3.67 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{-2}$ and $\text{CH}_2\text{-2}'$), 4.12-4.15 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{-1}$ and $\text{CH}_2\text{-1}'$), 7.32 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H; H-6 and H-6'), 7.77 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 4H; H-5 and H-5').

Compound 175



To a stirred solution of **159** (250 mg, 1.746 mmol) and **173** (2 eq., 1.60 g, 3.489 mmol) in dry DMF (30 mL) was added NaH (4 eq., 279 mg, 6.976 mmol, 60% on mineral oil) portionwise under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was diluted with CH₂Cl₂ and washed with water. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2×). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 30:70) to afford **175** (287 mg, 38%) as a colorless oil.

R_f 0.21 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, PMA).

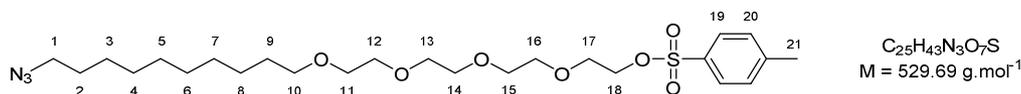
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.31-1.40 (m, 4H; CH₂-3 and CH₂-4), 1.53-1.61 (m, 4H; CH₂-2 and CH₂-5), 2.42 (s, 3H; CH₃-15), 3.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H; CH₂-1), 3.42 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H; CH₂-6), 3.52-3.59 (m, 8H; CH₂-7, CH₂-8, CH₂-9 and CH₂-10), 3.66 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H; CH₂-11), 4.13 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H; CH₂-12), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-14), 7.77 ppm (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-13).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 21.7 (C-15), 25.7, 26.6, 28.8, 29.5 (C-2, C-3, C-4, C-5), 51.4 (C-1), 68.7 (C-11), 69.3 (C-12), 70.1, 70.6, 70.7, 70.8 (C-7, C-8, C-9, C-10), 71.3 (C-6), 128.0, 129.9 (4×CH_{arom}), 133.1 (SO₂-C_{arom}), 144.8 ppm (C_{arom}-CH₃).

IR (neat) 2094 (N₃), 1354 (SO₂), 1176 cm⁻¹ (SO₂).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₉H₃₁N₃O₆SNa : 452.183 [M + Na]⁺ ; found 452.185.

Compound 176



To a stirred solution of **160** (367 mg, 1.842 mmol) and **174** (2 eq., 1.83 g, 3.641 mmol) in dry DMF (30 mL) was added NaH (4 eq., 295 mg, 7.376 mmol, 60% on mineral oil) portionwise under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was diluted with CH₂Cl₂ and washed with water. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2×). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 40:60) to afford **176** (379 mg, 39%) as a colorless oil.

R_f 0.27 (AcOEt/Petroleum ether 40:60, PMA).

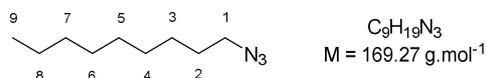
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.24-1.38 (m, 12H; CH₂-3, CH₂-4, CH₂-5, CH₂-6, CH₂-7 and CH₂-8), 1.52-1.61 (m, 4H; CH₂-2 and CH₂-9), 2.43 (s, 3H; CH₃-21), 3.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H; CH₂-1), 3.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H; CH₂-10), 3.54-3.64 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 3.67 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H; CH₂-17), 4.14 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H; CH₂-18), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-20), 7.78 ppm (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-19).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 21.7 (C-21), 26.2, 26.8, 28.9, 29.2, 29.50, 29.52, 29.6, 29.7 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 51.6 (C-1), 68.8 (C-17), 69.3 (C-18), 70.1, 70.6, 70.65, 70.70, 70.8 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16), 71.6 (C-10), 128.1, 129.9 (4×CH_{arom}), 133.0 (SO₂-C_{arom}), 144.9 ppm (C_{arom}-CH₃).

IR (neat) 2094 (N₃), 1355 (SO₂), 1176 cm⁻¹ (SO₂).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{25}H_{43}N_3O_7SNa$: 552.271 $[M + Na]^+$; found 552.268.

1-Azidononane (179)

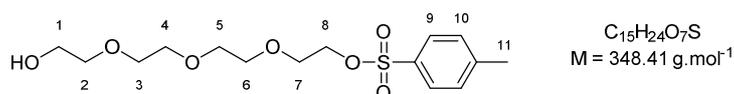


A mixture of 1-bromononane (540 mg, 2.607 mmol) and NaN_3 (1.1 eq., 190 mg, 2.923 mmol) in dry DMF (3 mL) was heated under microwave irradiation at 100 °C for 15 min. Additional NaN_3 (0.9 eq., 152 mg, 2.34 mmol) was added and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 100 °C for another 30 min. The reaction mixture was diluted with Et_2O and washed with water (3 \times) and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH_2Cl_2) to afford **179** (401 mg, 91%) as a colorless oil. The analytical data of **179** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁹³

R_f 0.88 (CH_2Cl_2 , PMA).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H; CH_3 -9), 1.24-1.40 (m, 12H; CH_2 -3, CH_2 -4, CH_2 -5, CH_2 -6, CH_2 -7 and CH_2 -8), 1.60 (tt, $J = 7.3, 7.0$ Hz, 2H; CH_2 -2), 3.25 ppm (t, $J = 7.0$ Hz, 2H; CH_2 -1).

Tetraethylene glycol mono(4-methylbenzenesulfonate) (181)



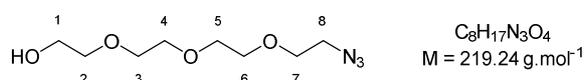
$NaOH$ (1.5 eq., 29 mg, 0.725 mmol) was added to a solution of tetraethylene glycol (10 eq., 1.0 g, 4.802 mmol) in THF (0.3 mL) at 0 °C, followed by slow addition of a solution of $TsCl$ (92 mg, 0.483 mmol) in THF (0.9 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h 30. The reaction mixture was poured into a mixture of ice and water. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times). The combined organic layers were washed with water (2 \times), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography ($AcOEt$ /Petroleum ether 90:10) to afford **181** (144 mg, 86%) as a colorless oil. The analytical data of **181** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁹⁴

R_f 0.12 ($AcOEt$ /Petroleum ether 90:10, $KMnO_4$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 2.27 (br s, 1H; OH), 2.44 (s, 3H; CH_3 -11), 3.58-3.72 (m, 14H; CH_2 -1, CH_2 -2, CH_2 -3, CH_2 -4, CH_2 -5, CH_2 -6 and CH_2 -7), 4.15-4.17 (m, 2H; CH_2 -8), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H-10), 7.80 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H-9).

(*J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 949-957)

2-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethanol (182)



A mixture of **181** (136 mg, 0.390 mmol) and NaN_3 (5 eq., 127 mg, 1.952 mmol) in $EtOH$ (3 mL) was stirred at 70 °C for 18 h. The reaction was quenched by addition of water (2 mL). The solvents were evaporated under

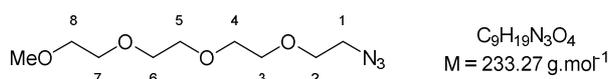
PARTIE EXPÉRIMENTALE

reduced pressure and the residue was partitioned between water and AcOEt. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (3×). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt) to afford **182** (52 mg, 61%) as a colorless oil. The analytical data of **182** were in complete agreement with those reported in the literature.²⁹⁴

R_f 0.31 (AcOEt, KMnO₄).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.68 (br s, 1H; OH), 3.36 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H; CH₂-8), 3.56-3.58 (m, 2H; CH₂-7), 3.62-3.65 (m, 10H; CH₂-2, CH₂-3, CH₂-4, CH₂-5 and CH₂-6), 3.67-3.70 ppm (m, 2H; CH₂-1).

1-Azido-2-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethane (**183**)



A solution of **182** (100 mg, 0.456 mmol) in dry THF (1.2 mL) was added to a stirred suspension of NaH (2 eq., 37 mg, 0.925 mmol, 60% on mineral oil) in dry THF (3.6 mL). After 30 min stirring at room temperature, MeI (10.6 eq., 0.30 mL, 4.819 mmol) was added and stirring was prolonged for 18 h. The reaction mixture was diluted with Et₂O and washed with water and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 100:0 to 98:2) to afford **183** (50 mg, 47%) as a colorless oil. The analytical data of **183** were in complete agreement with those reported in the literature.³⁴¹

R_f 0.36 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2, KMnO₄).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.33-3.37 (m, 5H; CH₂-1 and OCH₃), 3.50-3.52 (m, 2H; CH₂-2), 3.60-3.66 ppm (m, 12H; CH₂-3, CH₂-4, CH₂-5, CH₂-6, CH₂-7 and CH₂-8).

General procedure A: CuAAC reaction

To a solution of alkyne and azide in DMF (15 mL per mmol of alkyne) in a microwave vial was added a yellow suspension of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 eq. per alkyne) and sodium ascorbate (0.2 eq. per alkyne) in water (0.25 mL per mL of DMF). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 30 to 60 min. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt (2×). The combined organic extracts were washed with water (2×), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography to afford the desired iminosugar click cluster.

General procedure B: synthesis of azide

Sodium azide (4 eq.) was added to a solution of *p*-toluenesulfonate ester in dry DMF (15 mL per mmol of substrate) under argon atmosphere, and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was then evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with AcOEt and washed with water (3×). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography to afford the desired azide.

General procedure C: deprotection of *O*-benzyl and *N*-benzyl groups

To a solution of benzyl-protected compound in CH_2Cl_2 (40 mL per mmol of substrate) at -60 °C was added dropwise a 1M BCl_3 solution in CH_2Cl_2 (2 eq. per benzyl group). The solution was allowed to raise room temperature and stirred overnight. A mixture of MeOH/ H_2O (20:1, 12 mL per mmol of BCl_3) was added to the reaction mixture and after 10 min stirring, the solvent was evaporated under reduced pressure. This was repeated twice.

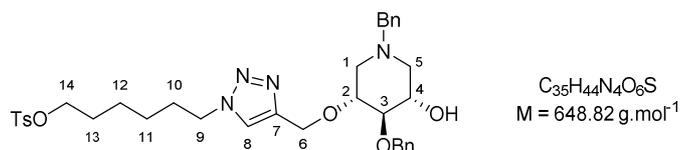
Partially debenzylated product was dissolved in *i*PrOH (20 mL per mmol of substrate) and H_2O (2 mL per mmol of substrate), then 1M HCl aqueous solution (15 mL per mmol of substrate) and palladium catalyst[#] were added. The flask was evacuated under vacuum and backfilled with argon (four cycles) and then evacuated under vacuum and backfilled with H_2 (four cycles). The reaction mixture was stirred under an atmosphere of H_2 (1 atm) at room temperature for 19 to 91 h. The reaction mixture was then filtered through a pad of celite (previously rinsed with at least 250 mL of a 1M HCl aqueous solution and then water) and rinsed with MeOH and water. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in a mixture of MeOH and water (1:1) then ion exchange resin Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) was added and the suspension was rotated at room temperature for 1 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and water and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (MeCN/ H_2O / NH_4OH 5:1:1 to 15:1:1 depending on the polarity of the product) to afford the desired debenzylated compound.

[#] The palladium catalyst was Pd/C (0.3 eq., 10% Pd on carbon) for compounds **165a**, **165c**, **169**, **163m** and $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.5 eq., 20% Pd on carbon, nominally 50% water) for compounds **163h** and **163i**. Compound **165b** was hydrogenated a first time with Pd/C as a catalyst, then a second hydrogenation was performed with $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$.

General procedure D: optimized deprotection of *O*-benzyl and *N*-benzyl groups

Benzyl-protected compound was dissolved in *i*PrOH (14 mL per mmol of substrate) and THF (14 mL per mmol of substrate), then a 1M HCl aqueous solution (8 mL per mmol of substrate) and Pd(OH)₂/C (0.2 eq., 20% Pd on carbon, nominally 50% water) were added. The flask was evacuated under vacuum and backfilled with argon (four cycles) and then evacuated under vacuum and backfilled with H₂ (four cycles). The reaction mixture was stirred under an atmosphere of H₂ (1 atm) at room temperature for 20 h. The reaction mixture was then filtered through a pad of celite (previously rinsed with at least 250 mL of a 1M HCl aqueous solution and then water) and rinsed with MeOH and water. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in a mixture of MeOH and water (1:1) then ion exchange resin Amberlite® IRA400 (OH⁻) was added and the suspension was rotated at room temperature for 1 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and water and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (MeCN/H₂O/NH₄OH 5:1:1 to 14:1:1 depending on the polarity of the product) to afford the desired debenzylated compound.

Compound 163a



Compound **163a** (154 mg, 86%) was prepared by general procedure A, starting from **153** (97 mg, 0.2760 mmol) and **161** (1.2 eq., 100 mg, 0.3363 mmol).

R_f 0.16 (AcOEt/Petroleum ether 80:20, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -6$ (c 1.0, CHCl₃).

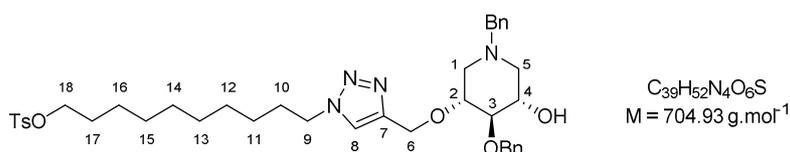
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.20-1.36 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.56-1.64 (m, 2H; CH₂-13), 1.73-1.80 (m, 2H; CH₂-10), 2.16-2.29 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.44 (s, 3H; CH₃), 2.86-2.99 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.08 (br s, 1H; OH), 3.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H; H-3), 3.53 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.60 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.64-3.74 (m, 2H; H-2 and H-4), 3.99 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H; CH₂-14), 4.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H; CH₂-9), 4.66 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^A-6), 4.72 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.74 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^B-6), 4.85 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.40 (m, 13H; H-8 and H_{arom}), 7.78 ppm (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 21.5 (CH₃), 24.7, 25.7, 28.5, 29.8 (C-10, C-11, C-12, C-13), 50.4 (C-9), 54.6 (C-5), 56.7 (C-1), 62.0 (NCH₂Ph), 63.5 (C-6), 69.5 (C-4), 70.2 (C-14), 73.9 (OCH₂Ph), 77.8 (C-2), 83.3 (C-3), 122.1 (C-8), 127.1, 127.5, 127.7, 128.2, 128.3, 128.8, 129.8 (14×CH_{arom}), 133.0, 137.7, 138.8, 144.7 (4×C_{arom}), 145.2 ppm (C-7).

IR (neat) 3416 (O-H), 1356 (SO₂), 1175 cm⁻¹ (SO₂).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₅H₄₅N₄O₆S : 649.305 [M + H]⁺ ; found 649.306.

Compound 163b



Compound **163b** (174 mg, 87%) was prepared by general procedure A, starting from **153** (110 mg, 0.2845 mmol) and **162** (1.1 eq., 110 mg, 0.3112 mmol).

R_f 0.19 (AcOEt/Petroleum ether 80:20, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -6$ (c 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.18-1.33 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.58-1.66 (m, 2H; CH₂-17), 1.78-1.86 (m, 2H; CH₂-10), 2.21-2.33 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.44 (s, 3H; CH₃), 2.70 (br s, 1H; OH), 2.84-2.95 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.35 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H; H-3), 3.53 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.61 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.64-3.74 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.01 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H; CH₂-18), 4.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H; CH₂-9), 4.65 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^A-6), 4.66 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.73 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^B-6), 4.84 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.38 (m, 13H; H-8 and H_{arom}), 7.78 ppm (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 21.8 (CH₃), 25.4, 26.6, 28.95, 28.97, 29.33, 29.34, 30.4 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.4 (C-9), 54.6 (C-5), 56.6 (C-1), 62.2 (NCH₂Ph), 63.7 (C-6), 69.5 (C-4), 70.8 (C-

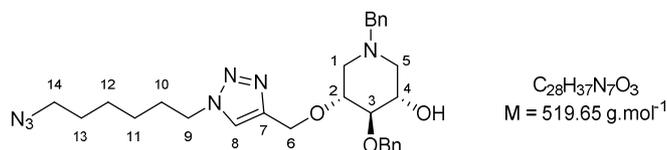
PARTIE EXPÉRIMENTALE

18), 74.0 (OCH₂Ph), 77.8 (C-2), 82.8 (C-3), 122.2 (C-8), 127.4, 127.8, 127.9, 128.0, 128.5, 128.6, 129.1, 129.9 (14×CH_{arom}), 133.4, 137.8, 138.8, 144.7 (4×C_{arom}), 145.3 ppm (C-7).

IR (neat) 3400 (O-H), 1356 (SO₂), 1175 cm⁻¹ (SO₂).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₃₉H₅₃N₄O₆S : 705.368 [M + H]⁺ ; found 705.364.

Compound 164a



Compound **164a** (103 mg, 86%) was prepared by general procedure B, starting from **163a** (150 mg, 0.2312 mmol).

R_f 0.29 (AcOEt/Petroleum ether 90:10, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = -9 (c 1.0, CHCl₃).

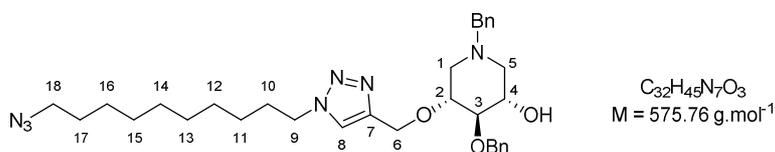
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.27-1.44 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.53-1.61 (m, 2H; CH₂-13), 1.81-1.90 (m, 2H; CH₂-10), 2.19-2.35 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.70 (br s, 1H; OH), 2.84-2.97 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.25 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H; CH₂-14), 3.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H; H-3), 3.54 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.61 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.65-3.75 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H; CH₂-9), 4.66 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^A-6), 4.67 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.74 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^B-6), 4.85 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.40 ppm (m, 11H; H-8 and H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 26.2, 26.3, 28.8, 30.2 (C-10, C-11, C-12, C-13), 50.2 (C-9), 51.4 (C-14), 54.6 (C-5), 56.6 (C-1), 62.3 (NCH₂Ph), 63.7 (C-6), 69.5 (C-4), 74.1 (OCH₂Ph), 77.9 (C-2), 82.9 (C-3), 122.2 (C-8), 127.4, 127.8, 127.9, 128.5, 128.3, 128.6, 129.1 (10×CH_{arom}), 137.9, 138.8 (2×C_{arom}), 145.4 ppm (C-7).

IR (neat) 3383 (O-H), 2093 cm⁻¹ (N₃).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₈H₃₈N₇O₃ : 520.303 [M + H]⁺ ; found 520.302.

Compound 164b



Compound **164b** (113 mg, 81%) was prepared by general procedure B, starting from **163b** (170 mg, 0.2412 mmol).

R_f 0.23 (AcOEt/Petroleum ether 70:30, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = -7 (c 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.21-1.39 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.54-1.63 (m, 2H; CH₂-17), 1.78-1.88 (m, 2H; CH₂-10), 2.19-2.35 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.72 (br s, 1H; OH), 2.83-2.95 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H; CH₂-18), 3.35 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H; H-3), 3.53 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.61 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.64-3.76 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.25 (t, *J* = 7.3 Hz,

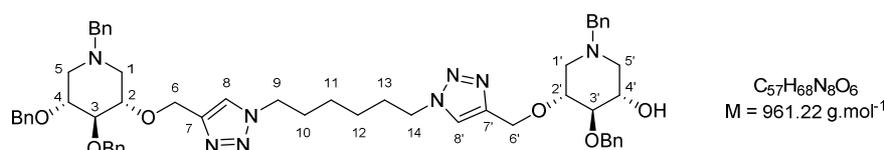
2H; CH₂-9), 4.65 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^A-6), 4.67 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.74 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^B-6), 4.84 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.39 ppm (m, 11H; H-8 and H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 26.6, 26.8, 28.9, 29.1, 29.2, 29.4, 29.5, 30.4 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.4 (C-9), 51.6 (C-18), 54.6 (C-5), 56.6 (C-1), 62.2 (NCH₂Ph), 63.7 (C-6), 69.5 (C-4), 74.0 (OCH₂Ph), 77.9 (C-2), 82.8 (C-3), 122.2 (C-8), 127.4, 127.8, 127.9, 128.4, 128.6, 129.1 (10×CH_{arom}), 137.9, 138.8 (2×C_{arom}), 145.3 ppm (C-7).

IR (neat) 3400 (O-H), 2093 cm⁻¹ (N₃).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₂H₄₅N₇O₃Na : 598.348 [M + Na]⁺ ; found 598.343.

Compound 165a



Compound **165a** (119 mg, 64%) was prepared by general procedure A, starting from **164a** (100 mg, 0.1924 mmol) and **154** (1.1 eq., 96 mg, 0.2174 mmol).

R_f 0.20 (CH₂Cl₂/MeOH 96:4, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = 0 (*c* 1.0, CHCl₃).

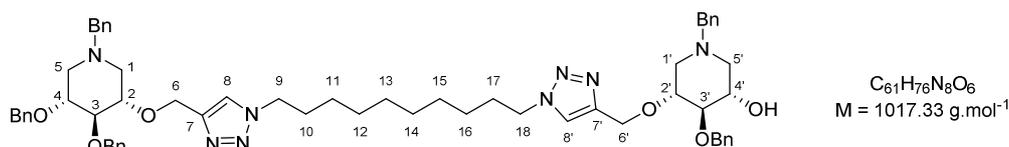
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.21-1.33 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.69-1.84 (m, 4H; CH₂-10 and CH₂-13), 1.93-2.02 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.19-2.34 (m, 2H; H^A-1' and H^A-5'), 2.79 (br s, 1H; OH), 2.84-2.98 (m, 2H; H^B-1' and H^B-5'), 3.04-3.13 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H; H-3'), 3.39 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-3), 3.51-3.74 (m, 8H; H-2, H-2', H-4, H-4' and 2×NCH₂Ph), 4.14 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H; CH₂-9 or CH₂-14), 4.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H; CH₂-9 or CH₂-14), 4.61 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.66 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^A-6'), 4.67 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.68 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.742 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^B-6'), 4.744 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^A-6), 4.78 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^B-6), 4.83 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.84 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.92 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.22-7.39 ppm (m, 27H; H-8, H-8' and H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 25.9, 30.0, 30.1 (C-10, C-11, C-12, C-13), 50.0, 50.1 (C-9, C-14), 54.6 (C-5'), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 56.7 (C-1'), 62.1, 62.2 (2×NCH₂Ph), 63.6 (C-6'), 64.5 (C-6), 69.5 (C-4'), 73.0, 74.1, 75.3 (3×OCH₂Ph), 77.8 (C-2'), 78.7, 78.9 (C-2, C-4), 83.0 (C-3'), 86.3 (C-3), 122.3 (C-8, C-8'), 127.4, 127.5, 127.7, 127.80, 127.82, 127.9, 128.41, 128.44, 128.5, 128.6, 128.9, 129.1 (25×CH_{arom}), 137.8, 137.9, 138.6, 138.8, 139.4 (5×C_{arom}), 145.4 (C-7'), 145.8 ppm (C-7).

IR (neat) 3416 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₅₇H₆₉N₈O₆ : 961.533 [M + H]⁺ ; found 961.529.

Compound 165b



Compound **165b** (128 mg, 66%) was prepared by general procedure A, starting from **164b** (110 mg, 0.1911 mmol) and **154** (1.1 eq., 93 mg, 0.2106 mmol).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

R_f 0.27 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +1$ (*c* 1.0, CHCl₃).

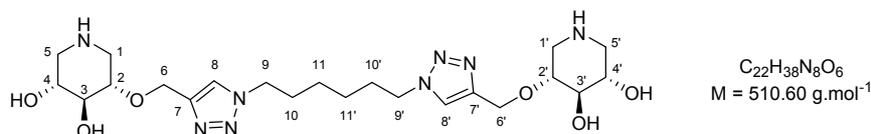
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.21-1.33 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.71-1.87 (m, 4H; CH₂-10 and CH₂-17), 1.93-2.01 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.20-2.36 (m, 2H; H^A-1' and H^A-5'), 2.76 (br s, 1H; OH), 2.84-2.97 (m, 2H; H^B-1' and H^B-5'), 3.04-3.13 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.36 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H; H-3'), 3.39 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-3), 3.52-3.75 (m, 8H; H-2, H-2', H-4, H-4' and 2×NCH₂Ph), 4.14-4.19 (m, 2H; CH₂-9 or CH₂-18), 4.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H; CH₂-9 or CH₂-18), 4.60 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.66 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^A-6'), 4.67 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.68 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.746 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^B-6'), 4.749 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^A-6), 4.79 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^B-6), 4.837 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.842 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.92 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.22-7.40 ppm (m, 27H; H-8, H-8' and H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 26.5, 26.6, 29.0, 29.4, 30.3, 30.4 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.3, 50.4 (C-9, C-18), 54.5 (C-5'), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 56.6 (C-1'), 62.1, 62.2 (2×NCH₂Ph), 63.7 (C-6'), 64.6 (C-6), 69.5 (C-4'), 73.0, 74.0, 75.3 (3×OCH₂Ph), 77.8 (C-2'), 78.7, 78.9 (C-2, C-4), 83.0 (C-3'), 86.3 (C-3), 122.2 (C-8, C-8'), 127.4, 127.5, 127.7, 127.77, 127.82, 127.9, 128.4, 128.45, 128.47, 128.6, 129.0, 129.1 (25×CH_{arom}), 137.8, 138.6, 138.8, 139.4 (5×C_{arom}), 145.3 (C-7'), 145.7 ppm (C-7).

IR (neat) 3400 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₆₁H₇₇N₈O₆ : 1017.596 [M + H]⁺ ; found 1017.587.

Compound 166a



Compound **166a** (44 mg, 70%) was prepared by general procedure C, starting from **165a** (119 mg, 0.1238 mmol).

R_f 0.33 (MeCN/H₂O/NH₄OH 5:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = 0$ (*c* 1.0, H₂O).

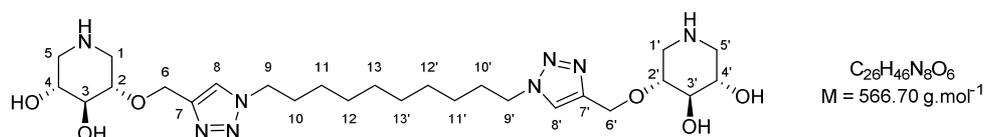
¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ 1.19-1.29 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-11'), 1.82-1.92 (m, 4H; CH₂-10 and CH₂-10'), 2.67 (dd, *J* = 12.6, 10.2 Hz, 2H; H^A-5 and H^A-5'), 2.68 (dd, *J* = 12.6, 10.2 Hz, 2H; H^A-1 and H^A-1'), 3.28 (dd, *J* = 12.6, 4.8 Hz, 2H; H^B-5 and H^B-5'), 3.39 (dd, *J* = 12.6, 4.8 Hz, 2H; H^B-1 and H^B-1'), 3.51 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-3 and H-3'), 3.59 (ddd, *J* = 10.2, 8.2, 4.8 Hz, 2H; H-2 and H-2'), 3.67 (ddd, *J* = 10.2, 8.2, 4.8 Hz, 2H; H-4 and H-4'), 4.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H; CH₂-9 and CH₂-9'), 4.79-4.85 (m, 4H; CH₂-6 and CH₂-6'), 8.04 ppm (s, 2H; H-8 and H-8').

¹³C-NMR (D₂O, 75.5 MHz) δ 24.9 (C-11, C-11'), 29.0 (C-10, C-10'), 45.5 (C-1, C-1'), 47.7 (C-5, C-5'), 50.3 (C-9, C-9'), 63.0 (C-6, C-6'), 69.0 (C-4, C-4'), 75.1 (C-3, C-3'), 76.9 (C-2, C-2'), 125.0 (C-8, C-8'), 143.9 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3188 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₂H₃₈N₈O₆Na : 533.281 [M + Na]⁺ ; found 533.281.

Compound 166b



Compound **166b** (27 mg, 39%) was prepared by general procedure C, starting from **165b** (125 mg, 0.1229 mmol).

R_f 0.20 (MeCN/H₂O/NH₄OH 10:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = 0$ (*c* 1.0, H₂O).

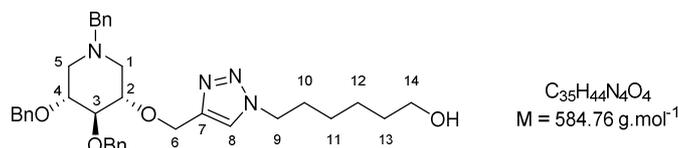
¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ 1.13-1.27 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-11', CH₂-12, CH₂-12', CH₂-13 and CH₂-13'), 1.80-1.90 (m, 4H; CH₂-10 and CH₂-10'), 2.80 (dd, *J* = 12.7, 9.8 Hz, 2H; H^A-5 and H^A-5'), 2.795 (dd, *J* = 12.7, 9.8 Hz, 2H; H^A-1 and H^A-1'), 3.36 (dd, *J* = 12.7, 4.6 Hz, 2H; H^B-5 and H^B-5'), 3.45 (dd, *J* = 12.7, 4.6 Hz, 2H; H^B-1 and H^B-1'), 3.55 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-3 and H-3'), 3.64 (ddd, *J* = 9.8, 8.2, 4.6 Hz, 2H; H-2 and H-2'), 3.73 (ddd, *J* = 9.8, 8.2, 4.6 Hz, 2H; H-4 and H-4'), 4.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H; CH₂-9 and CH₂-9'), 4.78-4.84 (m, 4H; CH₂-6 and CH₂-6'), 8.03 ppm (s, 2H; H-8 and H-8').

¹³C-NMR (D₂O, 100 MHz) δ 25.4, 27.8, 28.2 (C-11, C-11', C-12, C-12', C-13, C-13'), 29.2 (C-10, C-10'), 44.8 (C-1, C-1'), 46.9 (C-5, C-5'), 50.5 (C-9), 63.0 (C-6, C-6'), 68.0 (C-4, C-4'), 74.2 (C-3, C-3'), 75.8 (C-2, C-2'), 125.0 (C-8, C-8'), 143.7 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3280 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₆H₄₆N₈O₆Na : 589.3433 [M + Na]⁺; found 589.3398.

Compound 169



Compound **169** (265 mg, 98%) was prepared by general procedure A, starting from **154** (205 mg, 0.4643 mmol) and **159** (1.1 eq., 73 mg, 0.5098 mmol).

R_f 0.11 (AcOEt/Petroleum ether 80:20, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +8$ (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.25-1.41 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.50-1.57 (m, 2H; CH₂-13), 1.60 (br s, 1H; OH), 1.76-1.83 (m, 2H; CH₂-10), 1.95-2.01 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 3.06-3.12 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.40 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-3), 3.55-3.65 (m, 6H; H-2, H-4, CH₂-14 and NCH₂Ph), 4.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₂-9), 4.61 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.68 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.75 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^A-6), 4.79 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^B-6), 4.84 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.93 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.24-7.39 ppm (m, 16H; H-8 and H_{arom}).

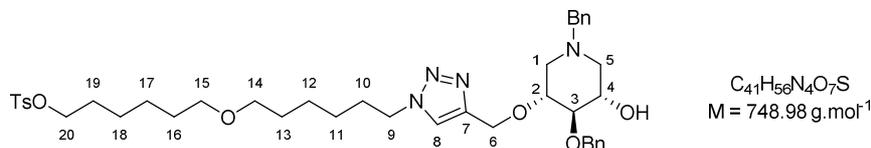
¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 25.2, 26.3, 30.2, 32.5 (C-10, C-11, C-12, C-13), 50.2 (C-9), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 62.1 (NCH₂Ph), 62.6 (C-14), 64.5 (C-6), 73.0 (OCH₂Ph), 75.3 (OCH₂Ph), 78.6, 78.9 (C-2, C-4), 86.3 (C-3), 122.3 (C-8), 127.4, 127.5, 127.7, 127.8, 127.9, 128.4, 128.46, 128.48, 129.0 (15×CH_{arom}), 137.7, 138.6, 139.4 (3×C_{arom}), 145.7 ppm (C-7).

IR (neat) 3396 cm⁻¹ (O-H).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{35}H_{44}N_4O_4Na$: 607.325 $[M + Na]^+$; found 607.322.

Compound 163c



Compound **163c** (103 mg, 81%) was prepared by general procedure A, starting from **153** (60 mg, 0.1707 mmol) and **171** (1.1 eq., 75 mg, 0.1887 mmol).

R_f 0.23 (AcOEt/Petroleum ether 70:30, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -6$ (c 1.0, $CHCl_3$).

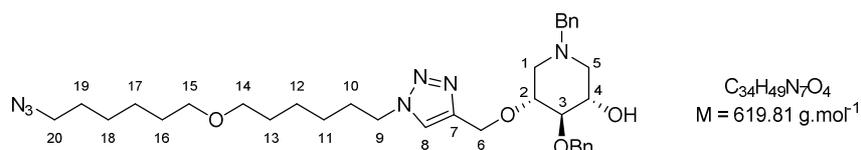
1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.24-1.41 (m, 8H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -17 and CH_2 -18), 1.47-1.59 (m, 4H; CH_2 -13 and CH_2 -16), 1.60-1.69 (m, 2H; CH_2 -19), 1.79-1.88 (m, 2H; CH_2 -10), 2.18-2.34 (m, 2H; H^A -1 and H^A -5), 2.45 (s, 3H; CH_3), 2.75 (br s, 1H; OH), 2.84-2.96 (m, 2H; H^B -1 and H^B -5), 3.31-3.40 (m, 5H; H-3, CH_2 -14 and CH_2 -15), 3.53 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.61 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.64-3.74 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.01 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H; CH_2 -20), 4.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.65 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^A -6), 4.67 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.73 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^B -6), 4.85 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.23-7.39 (m, 13H; H-8 and H_{arom}), 7.78 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H_{arom}).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz) δ 21.8 (CH_3), 25.4, 25.7, 25.8, 26.5 (C-11, C-12, C-17, C-18), 28.9, 29.63, 29.64, 30.3 (C-10, C-13, C-16, C-19), 50.3 (C-9), 54.6 (C-5), 56.6 (C-1), 62.2 (NCH_2Ph), 63.7 (C-6), 69.5 (C-4), 70.70, 70.72, 70.78 (C-14, C-15, C-20), 74.1 (OCH_2Ph), 77.9 (C-2), 82.9 (C-3), 122.2 (C-8), 127.4, 127.8, 127.9, 128.0, 128.4, 128.6, 129.1, 129.9 ($14 \times CH_{arom}$), 133.4, 137.9, 138.8, 144.8 ($4 \times C_{arom}$), 145.3 ppm (C-7).

IR (neat) 3410 (O-H), 1357 (SO_2), 1175 cm^{-1} (SO_2).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{41}H_{57}N_4O_7S$: 749.394 $[M + H]^+$; found 749.390.

Compound 164c



Compound **164c** (68 mg, 82%) was prepared by general procedure B, starting from **163c** (100 mg, 0.1335 mmol).

R_f 0.45 (AcOEt/Petroleum ether 80:20, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -6$ (c 1.0, $CHCl_3$).

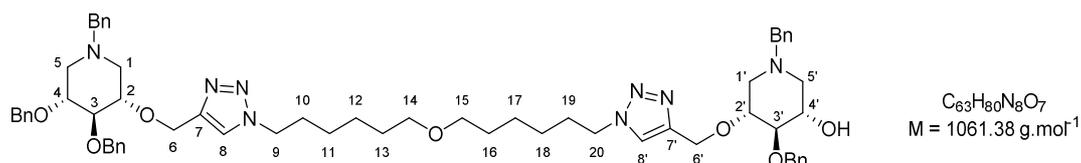
1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.25-1.46 (m, 8H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -17 and CH_2 -18), 1.51-1.70 (m, 6H; CH_2 -13, CH_2 -16 and CH_2 -19), 1.79-1.90 (m, 2H; CH_2 -10), 2.18-2.34 (m, 2H; H^A -1 and H^A -5), 2.75-2.99 (m, 3H; H^B -1, H^B -5 and OH), 3.27 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H; CH_2 -20), 3.33-3.44 (m, 5H; H-3, CH_2 -14 and CH_2 -15), 3.54 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.61 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.65-3.75 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.67 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^A -6), 4.70 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.75 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^B -6), 4.86 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.24-7.41 ppm (m, 11H; H-8 and H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 25.7, 25.9, 26.4, 26.6 (C-11, C-12, C-17, C-18), 28.9, 29.6, 29.7, 30.3 (C-10, C-13, C-16, C-19), 50.3 (C-9), 51.5 (C-20), 54.6 (C-5), 56.6 (C-1), 62.2 (NCH₂Ph), 63.6 (C-6), 69.5 (C-4), 70.7, 70.8 (C-14, C-15), 74.0 (OCH₂Ph), 77.8 (C-2), 83.0 (C-3), 122.2 (C-8), 127.3, 127.7, 127.8, 128.4, 128.6, 129.0 (10 \times CH_{arom}), 137.8, 138.8 (2 \times C_{arom}), 145.3 ppm (C-7).

IR (neat) 3411 (O-H), 2094 cm⁻¹ (N₃).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₄H₅₀N₇O₄ : 620.392 [M + H]⁺ ; found 620.385.

Compound 165c



Compound **165c** (69 mg, 61%) was prepared by general procedure A, starting from **164c** (66 mg, 0.1065 mmol) and **154** (1.1 eq., 52 mg, 0.1178 mmol).

R_f 0.24 (CH₂Cl₂/MeOH 96:4, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +1$ (*c* 1.0, CHCl₃).

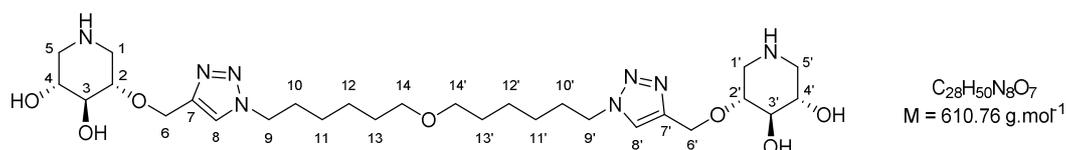
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.24-1.44 (m, 8H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-17 and CH₂-18), 1.51-1.61 (m, 4H; CH₂-13 and CH₂-16), 1.74-1.89 (m, 4H; CH₂-10 and CH₂-19), 1.94-2.03 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.19-2.35 (m, 2H; H^A-1' and H^A-5'), 2.85-3.01 (m, 3H; H^B-1', H^B-5' and OH), 3.06-3.15 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.33-3.45 (m, 6H; H-3, H-3', CH₂-14 and CH₂-15), 3.52-3.77 (m, 8H; H-2, H-2', H-4, H-4' and 2 \times NCH₂Ph), 4.16-4.21 (m, 2H; CH₂-9 or CH₂-20), 4.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H; CH₂-9 or CH₂-20), 4.63 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.68 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^A-6'), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.71 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.76 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; H^B-6'), 4.77 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^A-6), 4.80 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^B-6), 4.86 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.87 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.95 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.42 ppm (m, 27H; H-8, H-8' and H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ 25.7, 26.4 (C-11, C-12, C-17, C-18), 29.6, 30.22, 30.24 (C-10, C-13, C-16, C-19), 50.15, 50.23 (C-9, C-20), 54.6 (C-5'), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 56.7 (C-1'), 62.1, 62.2 (2 \times NCH₂Ph), 63.6 (C-6'), 64.5 (C-6), 69.5 (C-4'), 70.7 (C-14, C-15), 72.9, 74.0, 75.3 (3 \times OCH₂Ph), 77.8 (C-2'), 78.6, 78.9 (C-2, C-4), 83.0 (C-3'), 86.2 (C-3), 122.1 (C-8, C-8'), 127.3, 127.4, 127.6, 127.68, 127.74, 127.8, 128.3, 128.35, 128.40, 128.5, 128.9, 129.0 (25 \times CH_{arom}), 137.7, 137.9, 138.6, 138.8, 139.3 (5 \times C_{arom}), 145.3 (C-7'), 145.6 ppm (C-7).

IR (neat) 3400 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₆₃H₈₁N₈O₇ : 1061.622 [M + H]⁺ ; found 1061.612.

Compound 166c



Compound **166c** (18 mg, 47%) was prepared by general procedure C, starting from **165c** (66 mg, 0.0622 mmol).

R_f 0.24 (MeCN/H₂O/NH₄OH 8:1:1, PMA).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = 0$ (c 1.0, H₂O).

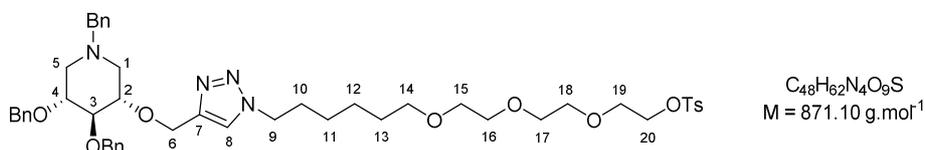
¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ 1.18-1.35 (m, 8H; CH₂-11, CH₂-11', CH₂-12 and CH₂-12'), 1.45-1.54 (m, 4H; CH₂-13 and CH₂-13'), 1.83-1.93 (m, 4H; CH₂-10 and CH₂-10'), 2.38-2.50 (m, 4H; H^A-1, H^A-1', H^A-5 and H^A-5'), 3.09-3.16 (m, 2H; H^B-5 and H^B-5'), 3.20-3.27 (m, 2H; H^B-1 and H^B-1'), 3.33-3.49 (m, 8H; H-2, H-2', H-3, H-3', CH₂-14 and CH₂-14'), 3.50-3.58 (m, 2H; H-4 and H-4'), 4.42 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H; CH₂-9 and CH₂-9'), 4.75-4.79 (m, 4H; CH₂-6 and CH₂-6'), 8.03 ppm (s, 2H; H-8 and H-8').

¹³C-NMR (D₂O, 100 MHz) δ 24.6, 25.2 (C-11, C-11', C-12, C-12'), 28.2 (C-13, C-13'), 29.2 (C-10, C-10'), 46.4 (C-1, C-1'), 48.6 (C-5, C-5'), 50.4 (C-9), 62.9 (C-6, C-6'), 70.25 (C-14), 70.28 (C-4, C-4'), 76.5 (C-3, C-3'), 78.3 (C-2, C-2'), 125.0 (C-8, C-8'), 144.0 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3292 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₈H₅₀N₈O₇Na : 633.3695 [M + Na]⁺ ; found 633.3720.

Compound 163d



Compound **163d** (54 mg, 86%) was prepared by general procedure A, starting from **154** (32 mg, 0.0725 mmol) and **175** (1.5 eq., 45 mg, 0.1048 mmol).

R_f 0.29 (AcOEt/Petroleum ether 70:30, PMA).

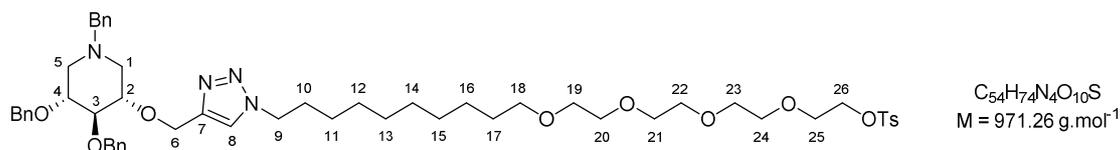
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +7$ (c 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.24-1.41 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.51-1.61 (m, 2H; CH₂-13), 1.73-1.83 (m, 2H; CH₂-10), 1.93-2.02 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.45 (s, 3H; CH₃), 3.04-3.13 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.40 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H; H-3), 3.43 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H; CH₂-14), 3.52-3.74 (m, 14H; H-2, H-4, CH₂-15, CH₂-16, CH₂-17, CH₂-18, CH₂-19 and NCH₂Ph), 4.12-4.22 (m, 4H; CH₂-9 and CH₂-20), 4.61 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.68 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.75 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H; H^A-6), 4.79 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H; H^B-6), 4.84 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.93 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.40 (m, 18H; H-8 and H_{arom}), 7.80 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 2H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 21.8 (CH₃), 25.7, 26.4, 29.5, 30.3 (C-10, C-11, C-12, C-13), 50.2 (C-9), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 62.1 (NCH₂Ph), 64.5 (C-6), 68.8 (C-19), 69.3 (C-20), 70.2, 70.6, 70.7, 70.9, (C-15, C-16, C-17, C-18), 71.2 (C-14), 73.0 (OCH₂Ph), 75.3 (OCH₂Ph), 78.7, 78.9 (C-2, C-4), 86.3 (C-3), 122.2 (C-8), 127.3, 127.5, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.40, 128.44, 128.9, 129.9 (19×CH_{arom}), 133.1, 137.8, 138.6, 139.3, 144.9 (5×C_{arom}), 145.6 ppm (C-7).

IR (neat) 1357 (SO₂), 1176 cm⁻¹ (SO₂).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₄₈H₆₃N₄O₉S : 871.431 [M + H]⁺ ; found 871.431.

Compound **163e**

Compound **163e** (278 mg, 84%) was prepared by general procedure A, starting from **154** (150 mg, 0.3397 mmol) and **176** (1.1 eq., 198 mg, 0.3738 mmol).

R_f 0.16 (AcOEt/Petroleum ether 60:40, PMA).

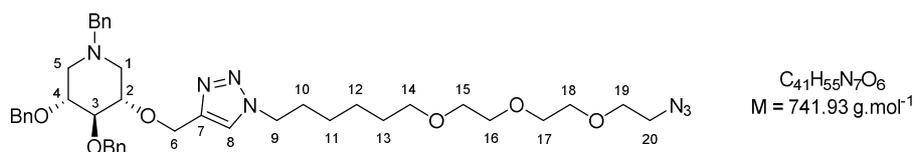
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +6$ (c 1.0, $CHCl_3$).

¹H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.20-1.35 (m, 12H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -15 and CH_2 -16), 1.52-1.62 (m, 2H; CH_2 -17), 1.72-1.81 (m, 2H; CH_2 -10), 1.92-2.02 (m, 2H; H^A -1 and H^A -5), 2.45 (s, 3H; CH_3), 3.04-3.12 (m, 2H; H^B -1 and H^B -5), 3.39 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H; H-3), 3.44 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H; CH_2 -18), 3.53-3.71 (m, 18H; H-2, H-4, CH_2 -19, CH_2 -20, CH_2 -21, CH_2 -22, CH_2 -23, CH_2 -24, CH_2 -25 and NCH_2Ph), 4.13-4.21 (m, 4H; CH_2 -9 and CH_2 -26), 4.61 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.68 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.75 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H; H^A -6), 4.78 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H; H^B -6), 4.84 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.92 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.23-7.39 (m, 18H; H-8 and H_{arom}), 7.80 ppm (d, $J = 8.3$ Hz, 2H; H_{arom}).

¹³C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 21.8 (CH_3), 26.2, 26.6, 29.1, 29.4, 29.52, 29.6, 29.7, 30.3 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.3 (C-9), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 62.1 (NCH_2Ph), 64.5 (C-6), 68.8 (C-25), 69.3 (C-26), 70.2, 70.6, 70.7, 70.8, 70.9 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 71.6 (C-18), 73.0 (OCH_2Ph), 75.3 (OCH_2Ph), 78.7, 78.9 (C-2, C-4), 86.3 (C-3), 122.2 (C-8), 127.3, 127.5, 127.7, 127.79, 127.84, 128.1, 128.4, 128.9, 129.0, 129.9 ($19 \times CH_{arom}$), 133.1, 137.8, 138.6, 139.3, 144.9 ($5 \times C_{arom}$), 145.6 ppm (C-7).

IR (neat) 1358 (SO_2), 1176 cm^{-1} (SO_2).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{54}H_{75}N_4O_{10}S$: 971.520 $[M + H]^+$; found 971.518.

Compound **164d**

Compound **164d** (62 mg, 88%) was prepared by general procedure B, starting from **163d** (83 mg, 0.0953 mmol).

R_f 0.28 (AcOEt/Petroleum ether 60:40, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +7$ (c 1.0, $CHCl_3$).

¹H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.23-1.42 (m, 4H; CH_2 -11 and CH_2 -12), 1.52-1.62 (m, 2H; CH_2 -13), 1.73-1.84 (m, 2H; CH_2 -10), 1.93-2.03 (m, 2H; H^A -1 and H^A -5), 3.04-3.14 (m, 2H; H^B -1 and H^B -5), 3.36-3.47 (m, 5H; H-3, CH_2 -14 and CH_2 -20), 3.54-3.71 (m, 14H; H-2, H-4, CH_2 -15, CH_2 -16, CH_2 -17, CH_2 -18, CH_2 -19 and NCH_2Ph), 4.14-4.22 (m, 2H; CH_2 -9), 4.62 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.68 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.76 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H; H^A -6), 4.79 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H; H^B -6), 4.85 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.93 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.24-7.40 ppm (m, 16H; H-8 and H_{arom}).

¹³C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 25.6, 26.4, 29.5, 30.3 (C-10, C-11, C-12, C-13), 50.2 (C-9), 50.8 (C-20), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 62.1 (NCH_2Ph), 64.5 (C-6), 70.1, 70.2, 70.7, 70.78, 70.80 (C-15, C-16, C-17, C-18, C-19), 71.2

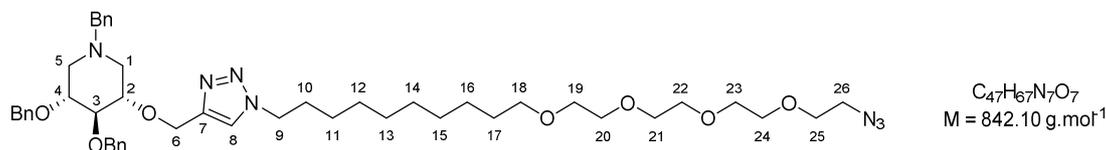
PARTIE EXPÉRIMENTALE

(C-14), 73.0 (OCH₂Ph), 75.3 (OCH₂Ph), 78.6, 78.9 (C-2, C-4), 86.3 (C-3), 122.2 (C-8), 127.3, 127.5, 127.7, 127.78, 127.83, 128.39, 128.43, 128.9 (15×CH_{arom}), 137.8, 138.6, 139.3 (3×C_{arom}), 145.6 ppm (C-7).

IR (neat) 2101 cm⁻¹ (N₃).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₄₁H₅₆N₇O₆ : 742.429 [M + H]⁺ ; found 742.437.

Compound 164e



Compound **164e** (208 mg, 87%) was prepared by general procedure B, starting from **163e** (276 mg, 0.2842 mmol).

R_f 0.31 (AcOEt/Petroleum ether 60:40, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +7$ (c 1.0, CHCl₃).

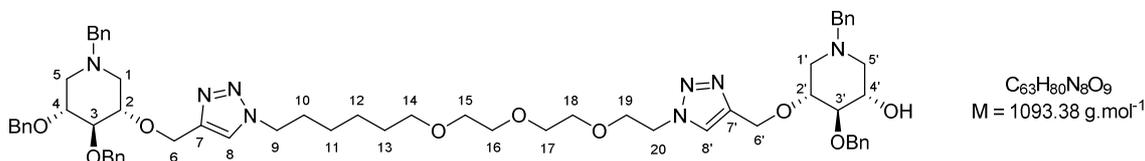
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.21-1.39 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.54-1.64 (m, 2H; CH₂-17), 1.73-1.83 (m, 2H; CH₂-10), 1.94-2.03 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 3.05-3.15 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.37-3.50 (m, 5H; H-3, CH₂-18 and CH₂-26), 3.54-3.71 (m, 18H; H-2, H-4, CH₂-19, CH₂-20, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-23, CH₂-24, CH₂-25 and NCH₂Ph), 4.14-4.23 (m, 2H; CH₂-9), 4.63 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.77 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H; H^A-6), 4.80 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H; H^B-6), 4.86 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.94 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.24-7.41 ppm (m, 16H; H-8 and H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 26.1, 26.5, 29.0, 29.4, 29.45, 29.49, 29.7, 30.2 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.2 (C-9), 50.7 (C-26), 55.8, 55.9 (C-1, C-5), 62.0 (NCH₂Ph), 64.4 (C-6), 70.05, 70.08, 70.62, 70.64, 70.7 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25), 71.5 (C-18), 72.9 (OCH₂Ph), 75.2 (OCH₂Ph), 78.6, 78.8 (C-2, C-4), 86.2 (C-3), 122.1 (C-8), 127.3, 127.4, 127.6, 127.7, 127.8, 128.3, 128.4, 128.8 (15×CH_{arom}), 137.7, 138.5, 139.3 (3×C_{arom}), 145.5 ppm (C-7).

IR (neat) 2101 cm⁻¹ (N₃).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₄₇H₆₇N₇O₇Na : 864.499 [M + Na]⁺ ; found 864.510.

Compound 165d



Compound **165d** (74 mg, 84%) was prepared by general procedure A, starting from **164d** (60 mg, 0.0809 mmol) and **153** (1.1 eq., 31 mg, 0.0882 mmol).

R_f 0.21 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +3$ (c 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.22-1.42 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.50-1.62 (m, 2H; CH₂-13), 1.71-1.84 (m, 2H; CH₂-10), 1.93-2.04 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.19-2.36 (m, 2H; H^A-1' and H^A-5'), 2.83-2.99 (m, 2H; H^B-1' and H^B-5'), 3.04-3.15 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H; H-3'), 3.40 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-

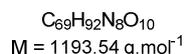
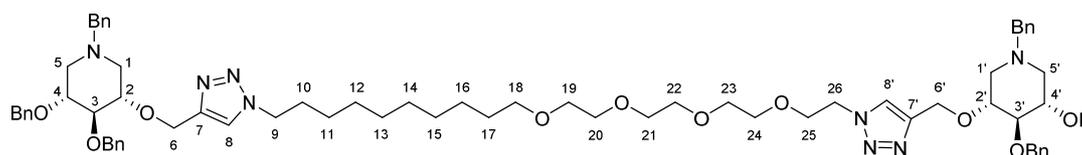
3), 3.43 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H; CH₂-14), 3.50-3.76 (m, 16H; H-2, H-2', H-4, H-4', CH₂-15, CH₂-16, CH₂-17, CH₂-18 and 2×NCH₂Ph), 3.83 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH₂-19), 4.11-4.23 (m, 2H; CH₂-9), 4.48 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH₂-20), 4.62 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.67 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^A-6'), 4.68 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.69 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.75 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^B-6'), 4.73-4.82 (m, 2H; CH₂-6), 4.85 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.86 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.94 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.22-7.41 (m, 26H; H-8 and H_{arom}), 7.63 ppm (s, 1H; H-8').

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 25.6, 26.4 (C-11, C-12), 29.5, 30.2 (C-10, C-13), 50.1, 50.3 (C-9, C-20), 54.6 (C-5'), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 56.6 (C-1'), 62.1, 62.2 (2×NCH₂Ph), 63.5 (C-6'), 64.5 (C-6), 69.47 (C-4'), 69.51 (C-19), 70.2, 70.5, 70.6, 70.7 (C-15, C-16, C-17, C-18), 71.2 (C-14), 72.9, 74.0, 75.3 (3×OCH₂Ph), 77.8 (C-2'), 78.7, 78.9 (C-2, C-4), 82.9 (C-3'), 86.3 (C-3), 122.2 (C-8), 123.6 (C-8'), 127.28, 127.30, 127.5, 127.7, 127.76, 127.78, 127.81, 128.36, 128.37, 128.41, 128.6, 128.9, 129.0 (25×CH_{arom}), 137.8, 137.9, 138.6, 138.8, 139.3 (5×C_{arom}), 145.1 (C-7'), 145.6 ppm (C-7).

IR (neat) 3416 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₆₃H₈₁N₈O₉ : 1093.612 [M + H]⁺ ; found 1093.609.

Compound 165e



Compound **165e** (115 mg, 83%) was prepared by general procedure A, starting from **164e** (98 mg, 0.1164 mmol) and **153** (1.1 eq., 45 mg, 0.1280 mmol).

R_f 0.22 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +2$ (c 1.0, CHCl₃).

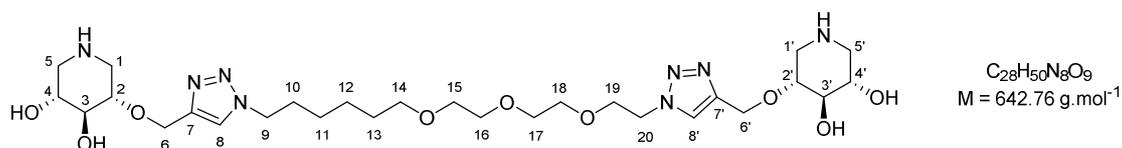
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.20-1.39 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.53-1.65 (m, 2H; CH₂-17), 1.72-1.84 (m, 2H; CH₂-10), 1.94-2.05 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.19-2.35 (m, 2H; H^A-1' and H^A-5'), 2.85-3.00 (m, 2H; H^B-1' and H^B-5'), 3.05-3.16 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H; H-3'), 3.42 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H; H-3), 3.46 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H; CH₂-18), 3.52-3.77 (m, 20H; H-2, H-2', H-4, H-4', CH₂-19, CH₂-20, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-23, CH₂-24 and 2×NCH₂Ph), 3.84 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH₂-25), 4.13-4.24 (m, 2H; CH₂-9), 4.49 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH₂-26), 4.63 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.69 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^A-6'), 4.70 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.70 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.76 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^B-6'), 4.74-4.84 (m, 2H; CH₂-6), 4.87 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.88 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.95 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.22-7.42 (m, 26H; H-8 and H_{arom}), 7.65 ppm (s, 1H; H-8').

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 26.1, 26.5, 29.0, 29.36, 29.44, 29.5, 29.6, 30.2 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.2 (C-9, C-26), 54.6 (C-5'), 55.85, 55.92 (C-1, C-5), 56.6 (C-1'), 62.0, 62.1 (2×NCH₂Ph), 63.4 (C-6'), 64.4 (C-6), 69.5 (C-4', C-25), 70.1, 70.5, 70.56, 70.59, 70.63 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 71.5 (C-18), 72.9, 74.0, 75.2 (3×OCH₂Ph), 77.8 (C-2'), 78.6, 78.8 (C-2, C-4), 83.0 (C-3'), 86.2 (C-3), 122.1 (C-8), 123.6 (C-8'), 127.2, 127.3, 127.4, 127.6, 127.70, 127.74, 127.8, 128.30, 128.32, 128.4, 128.5, 128.8, 128.9 (25×CH_{arom}), 137.7, 137.9, 138.5, 138.8, 139.3 (5×C_{arom}), 145.0 (C-7'), 145.5 ppm (C-7).

IR (neat) 3433 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₆₉H₉₃N₈O₁₀ : 1193.701 [M + H]⁺ ; found 1193.696.

Compound 166d



Compound **166d** (23 mg, 93%) was prepared by general procedure D, starting from **165d** (42 mg, 0.0384 mmol).

R_f 0.31 (MeCN/H₂O/NH₄OH 6:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = 0$ (c 1.0, H₂O).

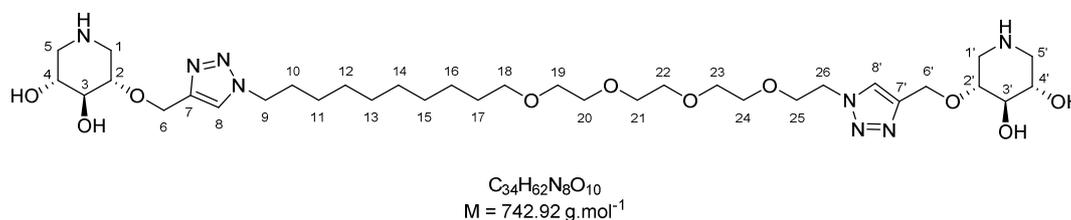
¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ 1.20-1.39 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.48-1.59 (m, 2H; CH₂-13), 1.84-1.95 (m, 2H; CH₂-10), 2.72-2.86 (m, 4H; H^A-1, H^A-1', H^A-5 and H^A-5'), 3.31-3.39 (m, 2H; H^B-5 and H^B-5'), 3.42-3.52 (m, 4H; H^B-1, H^B-1' and CH₂-14), 3.52-3.69 (m, 12H; H-2, H-2', H-3, H-3', CH₂-15, CH₂-16, CH₂-17 and CH₂-18), 3.69-3.77 (m, 2H; H-4 and H-4'), 3.98 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H; CH₂-19), 4.43 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H; CH₂-9), 4.64 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H; CH₂-20), 4.80-4.86 (m, 4H; CH₂-6 and CH₂-6'), 8.05 (s, 1H; H-8), 8.11 ppm (s, 1H; H-8').

¹³C-NMR (D₂O, 100 MHz) δ 24.6 (C-11), 25.3 (C-12), 28.3 (C-13), 29.2 (C-10), 45.0 (C-1, C-1'), 47.08, 47.10 (C-5, C-5'), 50.1 (C-20), 50.4 (C-9), 63.0 (C-6, C-6'), 68.16, 68.19 (C-4, C-4'), 68.7, 69.1, 69.4, 69.6, 69.7 (C-15, C-16, C-17, C-18, C-19), 70.8 (C-14), 74.37, 74.41 (C-3, C-3'), 76.0, 76.1 (C-2, C-2'), 125.1 (C-8), 125.5 (C-8'), 143.8, 143.9 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3285 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₈H₅₁N₈O₉ : 643.3774 [M + H]⁺ ; found 643.3753.

Compound 166e



Compound **166e** (43 mg, 90%) was prepared by general procedure C, starting from **165e** (77 mg, 0.0645 mmol).

R_f 0.24 (MeCN/H₂O/NH₄OH 8:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = 0$ (c 1.0, MeOH).

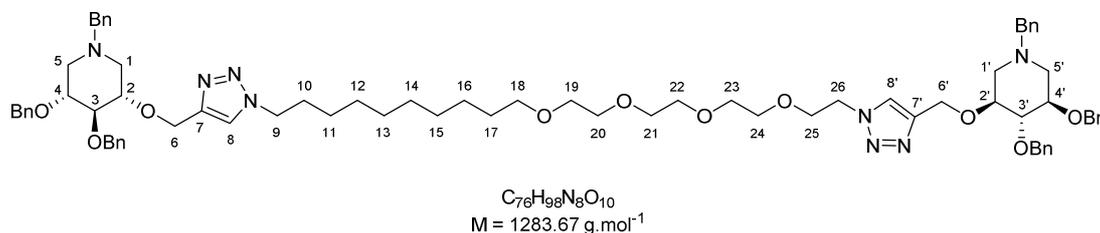
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.24-1.38 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.49-1.58 (m, 2H; CH₂-17), 1.85-1.94 (m, 2H; CH₂-10), 2.39-2.54 (m, 4H; H^A-1, H^A-1', H^A-5 and H^A-5'), 3.05-3.15 (m, 2H; H^B-5 and H^B-5'), 3.19-3.28 (m, 2H; H^B-1 and H^B-1'), 3.33-3.64 (m, 20H; H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4', CH₂-18, CH₂-19, CH₂-20, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-23 and CH₂-24), 3.89 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H; CH₂-25), 4.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H; CH₂-9), 4.58 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH₂-26), 4.74-4.81 (m, 4H; CH₂-6 and CH₂-6'), 8.00 (s, 1H; H-8), 8.06 ppm (s, 1H; H-8').

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 27.2, 27.4, 30.0, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 31.3 (C-10), 48.2, 48.3 (C-1, C-1'), 50.7 (C-5, C-5'), 51.36, 51.44 (C-9, C-26), 64.52, 64.55 (C-6, C-6'), 70.4 (C-25), 71.2, 71.4, 71.51, 71.54, 71.56 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 71.8 (C-4, C-4'), 72.3 (C-18), 78.1, 78.2 (C-3, C-3'), 79.8 (C-2, C-2'), 124.9 (C-8), 125.8 (C-8'), 146.1, 146.2 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3294 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{34}H_{63}N_8O_{10}$: 743.4662 $[M + H]^+$; found 743.4743.

Compound 165f



Compound **165f** (142 mg, 90%) was prepared by general procedure A, starting from **164e** (104 mg, 0.1235 mmol) and **154** (1.1 eq., 60 mg, 0.1359 mmol).

R_f 0.25 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2, PMA).

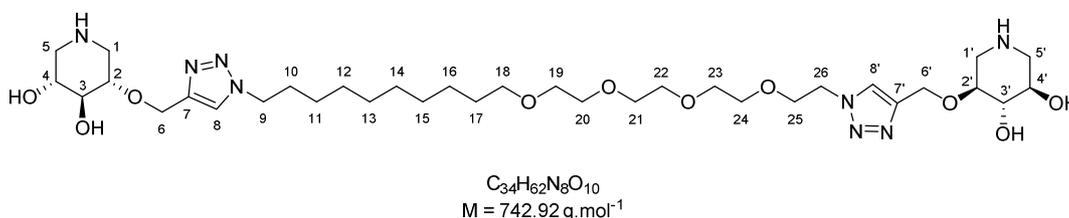
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +7$ (c 1.0, $CHCl_3$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 1.22-1.42 (m, 12H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -15 and CH_2 -16), 1.55-1.67 (m, 2H; CH_2 -17), 1.74-1.86 (m, 2H; CH_2 -10), 1.96-2.07 (m, 4H; H^A -1, H^A -1', H^A -5 and H^A -5'), 3.06-3.18 (m, 4H; H^B -1, H^B -1', H^B -5 and H^B -5'), 3.44 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H; H-3 and H-3'), 3.47 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H; CH_2 -18), 3.55-3.72 (m, 20H; H-2, H-2', H-4, H-4', CH_2 -19, CH_2 -20, CH_2 -21, CH_2 -22, CH_2 -23, CH_2 -24 and $2 \times NCH_2Ph$), 3.82 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H; CH_2 -25), 4.15-4.25 (m, 2H; CH_2 -9), 4.42-4.49 (m, 2H; CH_2 -26), 4.64 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.65 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.71 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.72 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.76-4.87 (m, 4H; CH_2 -6 and CH_2 -6'), 4.89 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.90 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.94 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.97 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.23-7.45 (m, 31H; H-8 and H_{arom}), 7.62 ppm (s, 1H; H-8').

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz) δ 26.1, 26.5, 29.0, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 30.2 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.1, 50.2 (C-9, C-26), 55.8, 55.9 (C-1, C-1', C-5, C-5'), 62.0 ($2 \times NCH_2Ph$), 64.4 (C-6, C-6'), 69.4 (C-25), 70.0, 70.4, 70.5, 70.56, 70.61 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 71.5 (C-18), 72.9, 75.2 ($4 \times OCH_2Ph$), 78.6, 78.7, 78.77, 78.81 (C-2, C-2', C-4, C-4'), 86.18, 86.23 (C-3, C-3'), 122.1 (C-8), 123.5 (C-8'), 127.20, 127.22, 127.4, 127.55, 127.57, 127.68, 127.73, 127.83, 128.27, 128.33, 128.8 ($30 \times CH_{arom}$), 137.70, 137.73, 138.52, 138.54, 139.20, 139.27 ($6 \times C_{arom}$), 145.3, 145.5 ppm (C-7, C-7').

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{76}H_{99}N_8O_{10}$: 1283.748 $[M + H]^+$; found 1283.741.

Compound 177



Compound **177** (49 mg, 93%) was prepared by general procedure D, starting from **165f** (91 mg, 0.0709 mmol).

R_f 0.24 ($MeCN/H_2O/NH_4OH$ 8:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +7$ (c 1.0, $MeOH$).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

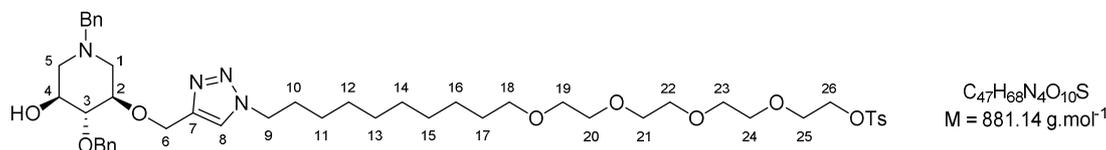
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.24-1.38 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.50-1.59 (m, 2H; CH₂-17), 1.84-1.94 (m, 2H; CH₂-10), 2.42-2.53 (m, 4H; H^A-1, H^A-1', H^A-5 and H^A-5'), 3.07-3.15 (m, 2H; H^B-5 and H^B-5'), 3.20-3.28 (m, 2H; H^B-1 and H^B-1'), 3.34-3.64 (m, 20H; H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4', CH₂-18, CH₂-19, CH₂-20, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-23 and CH₂-24), 3.89 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H; CH₂-25), 4.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₂-9), 4.58 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H; CH₂-26), 4.73-4.82 (m, 4H; CH₂-6 and CH₂-6'), 8.00 (s, 1H; H-8), 8.06 ppm (s, 1H; H-8').

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 27.2, 27.4, 30.0, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 31.3 (C-10), 48.17, 48.23 (C-1, C-1'), 50.57, 50.61 (C-5, C-5'), 51.35, 51.43 (C-9, C-26), 64.52, 64.54 (C-6, C-6'), 70.4 (C-25), 71.1, 71.4, 71.50, 71.53, 71.55 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 71.69, 71.74 (C-4, C-4'), 72.3 (C-18), 78.0, 78.1 (C-3, C-3'), 79.7, 79.8 (C-2, C-2'), 124.9 (C-8), 125.8 (C-8'), 146.1, 146.2 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3263 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₄H₆₂N₈O₁₀Na : 765.4481 [M + Na]⁺ ; found 765.4460.

Compound 163g



Compound **163g** (117 mg, 78%) was prepared by general procedure A, starting from **153** (60 mg, 0.1707 mmol) and **176** (1.1 eq., 100 mg, 0.1888 mmol).

R_f 0.12 (AcOEt/Petroleum ether 85:15, PMA).

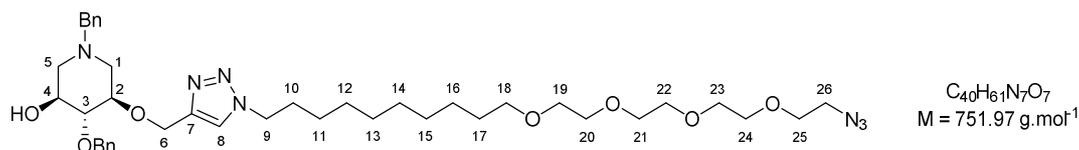
Specific rotation [α]_D²⁰ = -5 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.22-1.34 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.52-1.61 (m, 2H; CH₂-17), 1.77-1.86 (m, 2H; CH₂-10), 2.19-2.34 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.45 (s, 3H; CH₃), 2.74 (br s, 1H; OH), 2.84-2.96 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H; H-3), 3.44 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H; CH₂-18), 3.51-3.73 (m, 18H; H-2, H-4, CH₂-19, CH₂-20, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-23, CH₂-24, CH₂-25 and NCH₂Ph), 4.16 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H; CH₂-26), 4.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H; CH₂-9), 4.66 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H; H^A-6), 4.67 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.74 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H; H^B-6), 4.85 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.38 (m, 13H; H-8 and H_{arom}), 7.80 ppm (d, *J* = 8.3 Hz, 2H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 21.8 (CH₃), 26.2, 26.6, 29.1, 29.45, 29.53, 29.6, 29.8, 30.4 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.4 (C-9), 54.6 (C-5), 56.6 (C-1), 62.2 (NCH₂Ph), 63.7 (C-6), 68.8 (C-25), 69.4 (C-26), 69.5 (C-4), 70.2, 70.6, 70.7, 70.8, 70.9 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 71.6 (C-18), 74.0 (OCH₂Ph), 77.9 (C-2), 82.9 (C-3), 122.2 (C-8), 127.3, 127.75, 127.84, 128.1, 128.4, 128.6, 129.0, 129.9 (14×CH_{arom}), 133.2, 137.9, 138.8, 144.9 (4×C_{arom}), 145.3 ppm (C-7).

IR (neat) 3424 (O-H), 1355 (SO₂), 1176 cm⁻¹ (SO₂).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₄₇H₆₈N₄O₁₀SNa : 903.455 [M + Na]⁺ ; found 903.454.

Compound **164g**

Compound **164g** (87 mg, 89%) was prepared by general procedure B, starting from **163g** (114 mg, 0.1294 mmol).

R_f 0.45 (AcOEt/Petroleum ether 85:15, PMA).

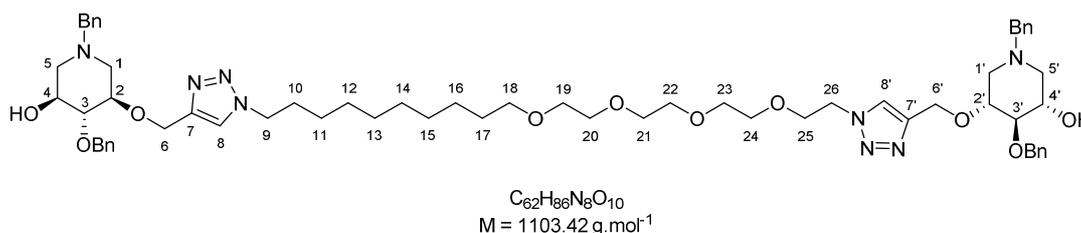
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -5$ (c 1.0, $CHCl_3$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.20-1.38 (m, 12H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -15 and CH_2 -16), 1.52-1.63 (m, 2H; CH_2 -17), 1.76-1.88 (m, 2H; CH_2 -10), 2.15-2.32 (m, 2H; H^A -1 and H^A -5), 2.82-3.01 (m, 3H; H^B -1, H^B -5 and OH), 3.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H; H-3), 3.39 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H; CH_2 -26), 3.45 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H; CH_2 -18), 3.51-3.74 (m, 18H; H-2, H-4, CH_2 -19, CH_2 -20, CH_2 -21, CH_2 -22, CH_2 -23, CH_2 -24, CH_2 -25 and NCH_2Ph), 4.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.66 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H; H^A -6), 4.70 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.74 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H; H^B -6), 4.85 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.22-7.41 ppm (m, 11H; H-8 and H_{arom}).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz) δ 26.1, 26.5, 29.0, 29.3, 29.41, 29.44, 29.6, 30.2 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.3 (C-9), 50.7 (C-26), 54.6 (C-5), 56.7 (C-1), 62.1 (NCH_2Ph), 63.6 (C-6), 69.5 (C-4), 70.0, 70.1, 70.60, 70.62, 70.63, 70.7 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25), 71.5 (C-18), 74.0 (OCH_2Ph), 77.8 (C-2), 83.0 (C-3), 122.1 (C-8), 127.2, 127.6, 127.7, 128.3, 128.5, 128.9 ($10 \times CH_{arom}$), 137.8, 138.8 ($2 \times C_{arom}$), 145.2 ppm (C-7).

IR (neat) 3426 (O-H), 2102 cm^{-1} (N_3).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{40}H_{62}N_7O_7$: 752.471 [$M + H$] $^+$; found 752.476.

Compound **165g**

Compound **165g** (131 mg, 94%) was prepared by general procedure A, starting from **164g** (95 mg, 0.1263 mmol) and **153** (1.1 eq., 49 mg, 0.1394 mmol).

R_f 0.20 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -7$ (c 1.0, $CHCl_3$).

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.22-1.38 (m, 12H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -15 and CH_2 -16), 1.53-1.63 (m, 2H; CH_2 -17), 1.78-1.88 (m, 2H; CH_2 -10), 2.17-2.35 (m, 4H; H^A -1, H^A -1', H^A -5 and H^A -5'), 2.83-3.06 (m, 6H; H^B -1, H^B -1', H^B -5, H^B -5' and $2 \times OH$), 3.36 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H; H-3 and H-3'), 3.45 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H; CH_2 -18), 3.51-3.77 (m, 20H; H-2, H-2', H-4, H-4', CH_2 -19, CH_2 -20, CH_2 -21, CH_2 -22, CH_2 -23, CH_2 -24 and $2 \times NCH_2Ph$), 3.83 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH_2 -25), 4.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.47 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH_2 -26), 4.64-4.78 (m, 6H; CH_2 -6, CH_2 -6' and OCH_2Ph), 4.86 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.87 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.24-7.40 (m, 21H; H-8 and H_{arom}), 7.64 ppm (s, 1H; H-8').

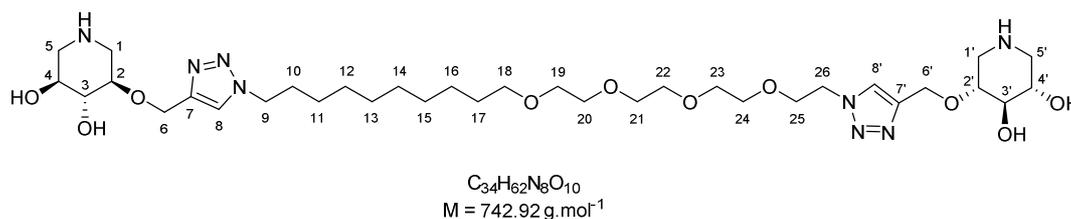
PARTIE EXPÉRIMENTALE

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 26.0, 26.5, 29.0, 29.3, 29.40, 29.44, 29.6, 30.2 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.2, 50.3 (C-9, C-26), 54.6 (C-5, C-5'), 56.6, 56.7 (C-1, C-1'), 62.1 ($2\times\text{NCH}_2\text{Ph}$), 63.4, 63.6 (C-6, C-6'), 69.4 (C-25), 69.5 (C-4, C-4'), 70.0, 70.4, 70.50, 70.54, 70.6 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 71.5 (C-18) 74.0 ($2\times\text{OCH}_2\text{Ph}$), 77.8 (C-2, C-2'), 83.1 (C-3, C-3'), 122.1 (C-8), 123.6 (C-8'), 127.19, 127.20, 127.6, 127.66, 127.67, 127.71, 128.3, 128.4, 128.9 ($20\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 137.75, 137.78, 138.74, 138.76 ($4\times\text{C}_{\text{arom}}$), 145.0, 145.2 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3413 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{62}\text{H}_{87}\text{N}_8\text{O}_{10}$: 1103.654 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 1103.645.

Compound 178



Compound **178** (69 mg, 78%) was prepared by general procedure D, starting from **165g** (131 mg, 0.1187 mmol).

R_f 0.34 (MeCN/H₂O/NH₄OH 8:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7$ (c 1.0, MeOH).

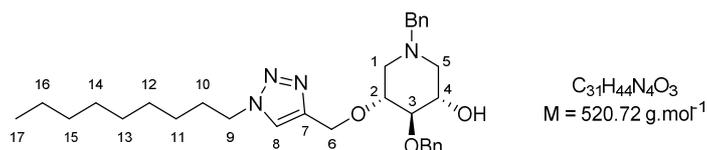
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 1.24-1.38 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.50-1.58 (m, 2H; CH₂-17), 1.85-1.94 (m, 2H; CH₂-10), 2.55-2.65 (m, 4H; H^A-1, H^A-1', H^A-5 and H^A-5'), 3.13-3.20 (m, 2H; H^B-5 and H^B-5'), 3.25-3.32 (m, 2H; H^B-1 and H^B-1'), 3.41-3.52 (m, 6H; H-2, H-2', H-3, H-3' and CH₂-18), 3.53-3.64 (m, 14H; H-4, H-4', CH₂-19, CH₂-20, CH₂-21, CH₂-22, CH₂-23 and CH₂-24), 3.89 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H; CH₂-25), 4.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H; CH₂-9), 4.58 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H; CH₂-26), 4.75-4.82 (m, 4H; CH₂-6 and CH₂-6'), 8.01 (s, 1H; H-8), 8.07 ppm (s, 1H; H-8').

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 27.2, 27.4, 30.0, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 31.3 (C-10), 47.53, 47.56 (C-1, C-1'), 49.92, 49.93 (C-5, C-5'), 51.36, 51.44 (C-9, C-26), 64.45, 64.48 (C-6, C-6'), 70.4 (C-25), 70.98, 71.00 (C-4, C-4'), 71.1, 71.4, 71.48, 71.51, 71.54 (C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24), 72.3 (C-18), 76.69, 76.68 (C-3, C-3'), 78.90, 78.87 (C-2, C-2'), 125.0 (C-8), 125.9 (C-8'), 145.9, 146.0 ppm (C-7, C-7').

IR (neat) 3295 cm^{-1} (O-H, N-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{Na}$: 765.4481 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 765.4376.

Compound 163h



Compound **163h** (94 mg, 91%) was prepared by general procedure A, starting from **153** (70 mg, 0.1992 mmol) and **179** (1.1 eq., 37 mg, 0.2186 mmol).

R_f 0.17 (AcOEt/Petroleum ether 60:40, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -8$ (c 1.0, CHCl_3).

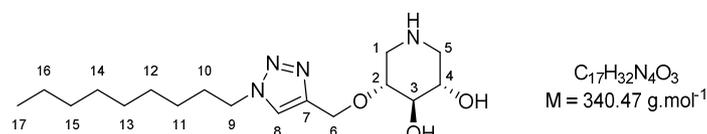
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.89 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H; CH_3 -17), 1.21-1.34 (m, 12H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -15 and CH_2 -16), 1.78-1.88 (m, 2H; CH_2 -10), 2.21-2.35 (m, 2H; H^{A} -1 and H^{A} -5), 2.75 (br s, 1H; OH), 2.84-2.96 (m, 2H; H^{B} -1 and H^{B} -5), 3.36 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H; H-3), 3.54 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.61 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H; NCH_2Ph), 3.65-3.75 (m, 2H; H-2 and H-4), 4.25 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.66 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^{A} -6), 4.68 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.74 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; H^{B} -6), 4.85 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.23-7.40 ppm (m, 11H; H-8 and H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ 14.2 (C-17), 22.8, 26.6, 29.1, 29.3, 29.5, 30.4, 31.9 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16), 50.5 (C-9), 54.6 (C-5), 56.6 (C-1), 62.2 (NCH_2Ph), 63.7 (C-6), 69.5 (C-4), 74.0 (OCH_2Ph), 77.9 (C-2), 82.8 (C-3), 122.2 (C-8), 127.4, 127.75, 127.84, 128.4, 128.6, 129.1 ($10 \times \text{CH}_{\text{arom}}$), 137.9, 138.8 ($2 \times \text{C}_{\text{arom}}$), 145.3 ppm (C-7).

IR (neat) 3416 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$: 543.331 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 543.331.

Compound 180



Compound **180** (51 mg, 83%) was prepared by general procedure C, starting from **163h** (94 mg, 0.1805 mmol).

R_f 0.39 (MeCN/ H_2O / NH_4OH 14:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -9$ (c 1.0, MeOH).

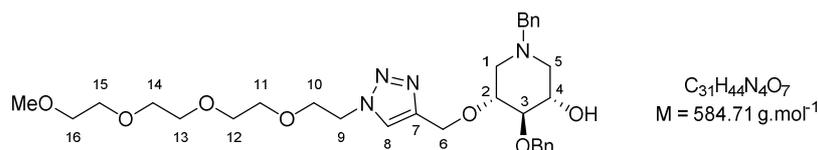
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H; CH_3 -17), 1.22-1.38 (m, 12H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -15 and CH_2 -16), 1.47-1.57 (m, 2H; CH_2 -17), 1.84-1.94 (m, 2H; CH_2 -10), 2.36-2.46 (m, 2H; H^{A} -1 and H^{A} -5), 3.20-3.26 (ddd, $J = 12.6, 4.8, 1.0$ Hz, 1H; H^{B} -5), 3.16-3.23 (m, 1H; H^{B} -1), 3.33-3.39 (m, 2H; H-2 and H-3), 3.41-3.50 (m, 1H; H-4), 4.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.77 (s, 2H; CH_2 -6), 7.98 ppm (s, 1H; H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 14.4 (C-17), 23.7 (C-16), 27.5, 30.1, 30.3, 30.5 (C-11, C-12, C-13, C-14), 31.3 (C-10), 33.0 (C-15), 48.6 (C-1), 51.0 (C-5), 51.4 (C-9), 64.5 (C-6), 72.2 (C-4), 78.4 (C-3), 80.2 (C-2), 124.8 (C-8), 146.3 ppm (C-7).

IR (neat) 3350 cm^{-1} (O-H, N-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_3$: 341.2547 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 341.2554.

Compound 163i



Compound **163i** (60 mg, 90%) was prepared by general procedure A, starting from **153** (40 mg, 0.1138 mmol) and **183** (1.2 eq., 32 mg, 0.1372 mmol).

R_f 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96:4, KMnO_4).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -4$ (c 1.0, CHCl_3).

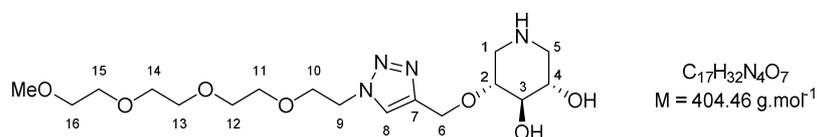
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.18-2.35 (m, 2H; $\text{H}^{\text{A-1}}$ and $\text{H}^{\text{A-5}}$), 2.74 (br s, 1H; OH), 2.83-2.96 (m, 2H; $\text{H}^{\text{B-1}}$ and $\text{H}^{\text{B-5}}$), 3.35 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H; H-3), 3.36 (s, 3H; OCH_3), 3.51-3.65 (m, 14H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14, CH_2 -15, CH_2 -16 and NCH_2Ph), 3.66-3.73 (m, 2H; H-2 and H-4), 3.83 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH_2 -10), 4.48 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.66 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 4.67 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-6}}$), 4.74 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-6}}$), 4.85 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H; OCH_2Ph), 7.23-7.37 (m, 10H; H_{arom}), 7.63 ppm (s, 1H; H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 50.4 (C-9), 54.7 (C-5), 56.6 (C-1), 59.1 (OCH_3), 62.2 (NCH_2Ph), 63.5 (C-6), 69.5 (C-4), 69.6 (C-10), 70.60, 70.64, 70.66, 70.72 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 72.0 (C-16), 74.0 (OCH_2Ph), 77.8 (C-2), 82.9 (C-3), 123.8 (C-8), 127.3, 127.8, 128.4, 128.6, 129.0 ($10\times\text{CH}_{\text{arom}}$), 137.9, 138.8 ($2\times\text{C}_{\text{arom}}$), 145.1 ppm (C-7).

IR (neat) 3423 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: 607.310 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 607.311.

Compound 184



Compound **184** (27 mg, 65%) was prepared by general procedure C, starting from **163i** (60 mg, 0.1026 mmol).

R_f 0.51 ($\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$ 7:1:1, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -2$ (c 1.0, MeOH).

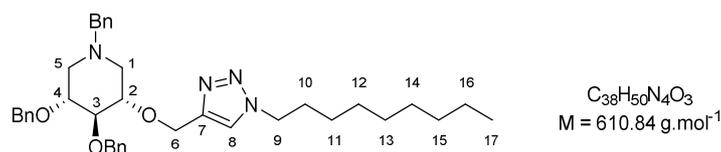
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 2.96-3.03 (m, 1H; $\text{H}^{\text{A-5}}$), 3.06-3.13 (m, 1H; $\text{H}^{\text{A-1}}$), 3.33-3.35 (m, 3H, CH_3 -17), 3.35-3.45 (m, 2H; $\text{H}^{\text{B-1}}$ and $\text{H}^{\text{B-5}}$), 3.51-3.55 (m, 2H; CH_2 -16), 3.56-3.64 (m, 10H; CH_2 -11, CH_2 -12, CH_2 -13, CH_2 -14 and CH_2 -15), 3.69-3.76 (m, 2H; H-2 and H-3), 3.77-3.84 (m, 1H; H-4), 3.90 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH_2 -10), 4.60 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H; CH_2 -9), 4.77-4.85 (m, 2H; CH_2 -6), 8.11 ppm (s, 1H; H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 31.3 (C-10), 33.0 (C-15), 45.2 (C-1), 47.5 (C-5), 51.5 (C-9), 59.1 (C-17), 64.4 (C-6), 68.3 (C-4), 70.4 (C-10), 71.3, 71.41, 71.43, 71.5 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15), 72.0 (C-3), 72.9 (C-16), 75.8 (C-2), 126.1 (C-8), 145.4 ppm (C-7).

IR (neat) 3341 cm^{-1} (O-H, N-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: 427.2163 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 427.2197.

Compound 163j



Compound **163j** (62 mg, 88%) was prepared by general procedure A, starting from **154** (51 mg, 0.1155 mmol) and **179** (1.1 eq., 22 mg, 0.1300 mmol).

R_f 0.29 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, PMA).

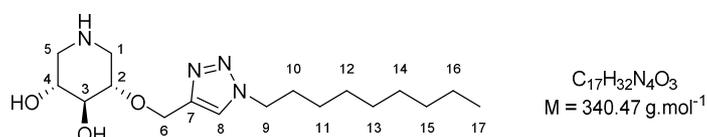
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +9$ (c 1.0, CHCl_3).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.92 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; CH₃-17), 1.23-1.37 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.76-1.84 (m, 2H; CH₂-10), 1.97-2.04 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 3.07-3.15 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.42 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-3), 3.57-3.67 (m, 4H; H-2, H-4 and NCH₂Ph), 4.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₂-9), 4.64 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.70 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.78 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^A-6), 4.82 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; H^B-6), 4.87 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.96 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.26-7.42 ppm (m, 16H; H-8 and H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 14.2 (C-17), 22.7 (C-16), 26.6 (C-11), 29.1, 29.3, 29.4 (C-12, C-13, C-14), 30.3 (C-10), 31.9 (C-15), 50.3 (C-9), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 62.1 (NCH₂Ph), 64.5 (C-6), 73.0 (OCH₂Ph), 75.3 (OCH₂Ph), 78.7, 78.9 (C-2, C-4), 86.3 (C-3), 122.2 (C-8), 127.3, 127.5, 127.7, 127.79, 127.84, 128.39, 128.44, 128.9 (15×C_H_{arom}), 137.8, 138.6, 139.4 (3×C_{arom}), 145.7 ppm (C-7).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₈H₅₁N₄O₃ : 611.3956 [M + H]⁺ ; found 611.3922.

Compound 185



Compound **185** (26 mg, 76%) was prepared by general procedure D, starting from **163j** (61 mg, 0.0999 mmol).

R_f 0.40 (MeCN/H₂O/NH₄OH 14:1:1, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = + 7 (*c* 1.0, MeOH).

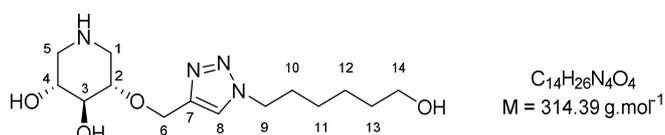
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; CH₃-17), 1.23-1.39 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.84-1.95 (m, 2H; CH₂-10), 2.28-2.39 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.98-3.06 (m, 1H; H^B-5), 3.13-3.20 (m, 1H; H^B-1), 3.26-3.31 (m, 2H; H-2 and H-3), 3.36-3.46 (m, 1H; H-4), 4.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₂-9), 4.73-4.80 (m, 2H; CH₂-6), 7.97 ppm (s, 1H; H-8).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 14.4 (C-17), 23.7, 27.5, 30.1, 30.3, 30.5, 31.3, 33.0 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16), 49.0 (C-1), 51.36 (C-9), 51.44 (C-5), 64.5 (C-6), 72.7 (C-4), 79.2 (C-3), 80.8 (C-2), 124.8 (C-8), 146.4 ppm (C-7).

IR (neat) 3350 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₇H₃₃N₄O₃ : 341.2547 [M + H]⁺ ; found 341.2542.

Compound 186



Compound **186** (30 mg, 73%) was prepared by general procedure C, starting from **169** (76 mg, 0.1300 mmol).

R_f 0.35 (MeCN/H₂O/NH₄OH 8:1:1, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = + 8 (*c* 1.0, MeOH).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.28-1.46 (m, 4H; CH₂-11 and CH₂-12), 1.47-1.57 (m, 2H; CH₂-13), 1.86-1.97 (m, 2H; CH₂-10), 2.59-2.72 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 3.14-3.21 (m, 1H; H^B-5), 3.25-3.31 (m, 1H; H^B-1), 3.45-

PARTIE EXPÉRIMENTALE

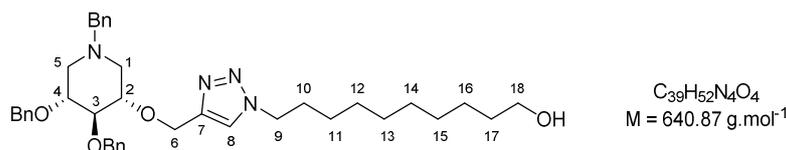
3.62 (m, 5H; H-2, H-3, H-4 and CH₂-14), 4.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₂-9), 4.74-4.81 (m, 2H; CH₂-6), 8.01 ppm (s, 1H; H-8).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 26.3 (C-12), 27.2 (C-11), 31.3 (C-10), 33.3 (C-13), 47.2 (C-1), 49.6 (C-5), 51.3 (C-9), 62.7 (C-14), 64.4 (C-6), 70.7 (C-4), 75.8 (C-3), 78.5 (C-2), 125.0 (C-8), 146.0 ppm (C-7).

IR (neat) 3268 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₄H₂₇N₄O₄ : 315.2027 [M + H]⁺ ; found 315.2022.

Compound 163k



Compound **163k** (260 mg, 84%) was prepared by general procedure A, starting from **154** (213 mg, 0.4824 mmol) and **160** (1.1 eq., 106 mg, 0.5318 mmol).

R_f 0.15 (AcOEt/Petroleum ether 70:30, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = + 8 (*c* 1.0, CHCl₃).

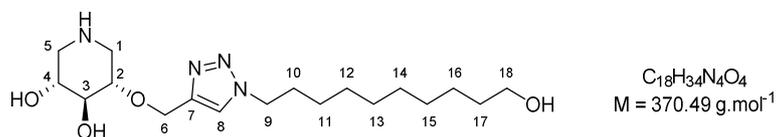
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.22-1.39 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.50-1.69 (m, 3H; CH₂-17 and OH), 1.72-1.83 (m, 2H; CH₂-10), 1.93-2.02 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 3.04-3.14 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.40 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-3), 3.55-3.66 (m, 6H; H-2, H-4, CH₂-18 and NCH₂Ph), 4.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H; CH₂-9), 4.61 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.68 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.75 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H; H^A-6), 4.80 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H; H^B-6), 4.84 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.93 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.23-7.40 ppm (m, 16H; H-8 and H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 25.8, 26.5, 29.0, 29.36, 29.42, 29.5, 30.3, 32.9 (C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17), 50.3 (C-9), 55.9, 56.0 (C-1, C-5), 62.1 (NCH₂Ph), 63.1 (C-18), 64.5 (C-6), 73.0 (OCH₂Ph), 75.3 (OCH₂Ph), 78.7, 78.9 (C-2, C-4), 86.3 (C-3), 122.2 (C-8), 127.4, 127.5, 127.7, 127.8, 127.9, 128.4, 128.5, 128.9 (15×CH_{arom}), 137.8, 138.6, 139.4 (3×C_{arom}), 145.7 ppm (C-7).

IR (neat) 3398 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₉H₅₃N₄O₄ : 641.406 [M + H]⁺ ; found 641.400.

Compound 187



Compound **187** (39 mg, 81%) was prepared by general procedure C, starting from **163k** (83 mg, 0.1295 mmol).

R_f 0.20 (MeCN/H₂O/NH₄OH 11:1:1, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = + 7 (*c* 1.0, MeOH).

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.25-1.41 (m, 12H; CH₂-11, CH₂-12, CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 and CH₂-16), 1.47-1.57 (m, 2H; CH₂-17), 1.85-1.95 (m, 2H; CH₂-10), 2.70-2.84 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 3.20-3.26 (m, 1H;

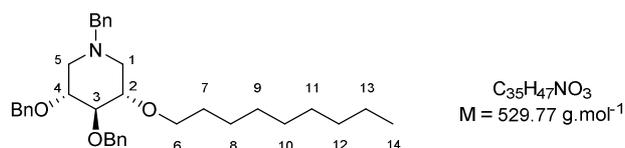
H^B-5), 3.30-3.36 (m, 1H; H^B-1), 3.51-3.59 (m, 4H; H-2, H-3 and CH₂-18), 3.61-3.68 (m, 1H; H-4), 4.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H; CH₂-9), 4.75-4.82 (m, 2H; CH₂-6), 8.01 ppm (s, 1H; H-8).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 26.9, 27.4, 30.0, 30.45, 30.50, 30.6 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16), 31.3 (C-10), 33.6 (C-17), 46.7 (C-1), 49.0 (C-5), 51.4 (C-9), 63.0 (C-18), 64.4 (C-6), 70.1 (C-4), 74.7 (C-3), 77.8 (C-2), 125.0 (C-8), 145.8 ppm (C-7).

IR (neat) 3341 cm⁻¹ (O-H, N-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₃₄N₄O₄Na : 393.2472 [M + Na]⁺ ; found 393.2494.

Compound 188



To a solution of **158** (39 mg, 0.0967 mmol) in dry DMF (2 mL) was added NaH (2.6 eq., 10 mg, 0.2500 mmol, 60% on mineral oil) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 30 min then 1-bromononane (3.2 eq., 0.06 mL, 0.3128 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 17 h. The reaction was quenched by slow addition of water, and the reaction mixture was extracted with AcOEt (2×). The combined organic extracts were washed with sat. NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:90) to afford **188** (45 mg, 88%) as a colorless oil.

R_f 0.35 (AcOEt/Petroleum ether 10:90, PMA).

Specific rotation [α]_D²⁰ = +1 (*c* 1.0, CHCl₃).

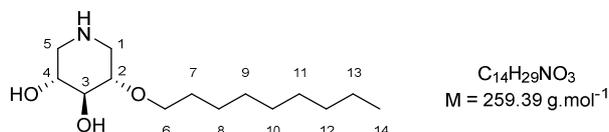
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; CH₃-14), 1.11-1.27 (m, 12H; CH₂-8, CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.41-1.49 (m, 2H; CH₂-7), 1.83 (dd, *J* = 11.2, 10.2 Hz, 1H; H^A-5), 1.88 (dd, *J* = 11.2, 10.2 Hz, 1H; H^A-1), 2.92-3.00 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.25 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-3), 3.35 (ddd, *J* = 10.2, 8.9 and 4.9 Hz, 1H; H-2), 3.42-3.53 (m, 5H; H-4, CH₂-6 and NCH₂Ph), 4.51 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.60 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.76 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.81 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.13-7.31 ppm (m, 15H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 14.3 (C-14), 22.8 (C-13), 26.3, 29.4, 29.65, 29.70, 30.5, 32.0 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 56.2, 56.3 (C-1, C-5), 62.2 (NCH₂Ph), 71.3 (C-6), 73.1, 75.5 (2×OCH₂Ph), 78.8 (C-4), 79.3 (C-2), 86.5 (C-3), 127.3, 127.5, 127.6, 127.8, 128.0, 128.36, 128.44, 128.9 (15×CH_{arom}), 138.0, 138.8, 139.4 ppm (3×C_{arom}).

IR (neat) 2924 cm⁻¹ (C-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₃₅H₄₈NO₃ : 530.3629 [M + H]⁺ ; found 530.3603.

Compound 189



PARTIE EXPÉRIMENTALE

Compound **188** (43 mg, 0.0812 mmol) was dissolved in *i*PrOH (1 mL) and THF (1 mL), then a 1M HCl aqueous solution (0.6 mL) and Pd(OH)₂/C (0.2 eq., 21 mg, 0.0150 mmol, 20% Pd on carbon, nominally 50% water) were added. The flask was evacuated under vacuum and backfilled with argon (four cycles) and then evacuated under vacuum and backfilled with H₂ (four cycles). The reaction mixture was stirred under an atmosphere of H₂ (1 atm) at room temperature for 17 h. The reaction mixture was then filtered through a pad of celite (previously rinsed with at least 250 mL of a 1M HCl aqueous solution and then water) and rinsed with MeOH. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in MeOH then ion exchange resin Amberlite® IRA400 (OH⁻) was added and the suspension was rotated at room temperature for 1 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 80:20) to afford **189** (21 mg, quant.) as a white solid.

R_f 0.28 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +16$ (*c* 1.0, MeOH).

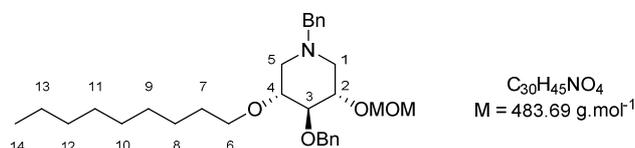
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; CH₃-14), 1.23-1.40 (m, 12H; CH₂-8, CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.53-1.62 (m, 2H; CH₂-7), 2.27-2.35 (m, 1H; H^A-1), 2.36 (dd, *J* = 12.4, 10.2 Hz, 1H; H^A-5), 3.03 (ddd, *J* = 12.4, 4.9 and 1.0 Hz, 1H; H^B-5), 3.11-3.19 (m, 2H; H^B-1 and H-2), 3.24 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H; H-3), 3.40 (ddd, *J* = 10.2, 8.4 and 4.9 Hz, 1H; H-4), 3.59 ppm (t, *J* = 6.7 Hz, 2H; CH₂-6).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 14.4 (C-14), 23.7 (C-13), 27.2, 30.4, 30.6, 30.7, 31.2, 33.1 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 48.8 (C-1), 51.4 (C-5), 71.9 (C-6), 72.6 (C-4), 78.9 (C-3), 80.8 ppm (C-2).

IR (neat) 3286 (O-H, N-H), 2920 cm⁻¹ (C-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₄H₃₀NO₃ : 260.2220 [M + H]⁺ ; found 260.2219.

Compound 190



To a solution of **155** (30 mg, 0.0839 mmol) in dry DMF (1.2 mL) was added NaH (3.9 eq., 13 mg, 0.3250 mmol, 60% on mineral oil) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 30 min then 1-bromononane (3.1 eq., 0.05 mL, 0.2607 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 14 h. The reaction was quenched by slow addition of water, and the reaction mixture was extracted with AcOEt (2×). The combined organic extracts were washed with sat. NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:90) to afford **190** (36 mg, 89%) as a colorless oil.

R_f 0.28 (AcOEt/Petroleum ether 10:90, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -24$ (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; CH₃-14), 1.11-1.26 (m, 12H; CH₂-8, CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.39-1.49 (m, 2H; CH₂-7), 1.80 (dd, *J* = 11.0, 10.3 Hz, 1H; H^A-5), 1.92 (dd, *J* = 10.9, 10.5 Hz, 1H; H^A-1), 2.93-3.01 (m, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.18 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H; H-3), 3.23 (s, 3H; OCH₂OCH₃), 3.35 (ddd, *J* = 10.3, 8.9 and 4.9 Hz, 1H; H-4), 3.45 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H; CH₂-6), 3.46 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.53 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.35 (ddd, *J* = 10.5, 8.9 and 5.0 Hz, 1H; H-2), 4.56 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.690 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.694 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H; OCH₂OCH₃), 4.80 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.16-7.31 ppm (m, 10H; H_{arom}).

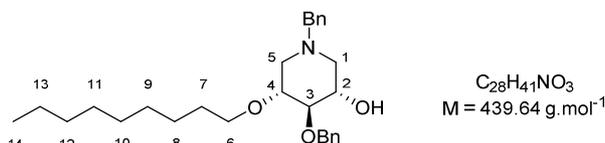
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 14.3 (C-14), 22.8 (C-13), 26.3, 29.4, 29.65, 29.69, 30.5, 32.0 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 55.5 (OCH₂OCH₃), 55.9 (C-5), 57.1 (C-1), 62.2 (NCH₂Ph), 71.2 (C-6), 75.4 (OCH₂Ph), 76.8

(C-2), 79.3 (C-4), 86.1 (C-3), 97.0 (OCH₂OCH₃), 127.3, 127.5, 127.9, 128.36, 128.44, 128.9 (10×CH_{arom}), 138.0, 139.3 ppm (2×C_{arom}).

IR (neat) 2925 cm⁻¹ (C-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₃₀H₄₆NO₄ : 484.3421 [M + H]⁺ ; found 484.3464.

Compound 191



A solution of **190** (34 mg, 0.0703 mmol) in MeOH (1 mL) and a 6M HCl aqueous solution (0.5 mL) was heated at 65 °C for 2 h 30. After being cooled to room temperature, the solution was treated with sat. NaHCO₃ and extracted with AcOEt (2×). The combined organic extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 20:80) to afford **191** (29 mg, 94%) as a colorless oil.

R_f 0.28 (AcOEt/Petroleum ether 20:80, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -1$ (c 1.0, CHCl₃).

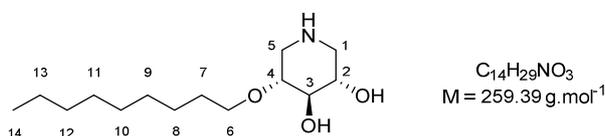
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.81 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; CH₃-14), 1.12-1.29 (m, 12H; CH₂-8, CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.42-1.51 (m, 2H; CH₂-7), 2.12-2.26 (m, 2H; H^A-1 and H^A-5), 2.50-2.96 (m, 1H; OH), 2.77 (dd, *J* = 11.0, 3.7 Hz, 2H; H^B-1 and H^B-5), 3.25 (dd, *J* = 7.1, 6.5 Hz, 1H; H-3), 3.30-3.44 (m, 3H; H-4 and CH₂-6), 3.43 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.54 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H; NCH₂Ph), 3.30-3.44 (ddd, *J* = 7.4, 7.1 and 3.7 Hz, 1H; H-2), 4.58 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.78 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.15-7.30 ppm (m, 10H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 14.3 (C-14), 22.8 (C-13), 26.3, 29.4, 29.6, 29.7, 30.3, 32.0 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 54.5 (C-5), 56.6 (C-1), 62.3 (NCH₂Ph), 69.4 (C-2), 70.2 (C-6), 73.9 (OCH₂Ph), 78.2 (C-4), 82.4 (C-3), 127.3, 127.9, 128.4, 128.6, 129.0 (10×CH_{arom}), 138.1, 139.9 ppm (2×C_{arom}).

IR (neat) 3427 (O-H), 2924 cm⁻¹ (C-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₈H₄₂NO₃ : 440.3159 [M + H]⁺ ; found 440.3215.

Compound 192



Compound **191** (27 mg, 0.0614 mmol) was dissolved in *i*PrOH (0.7 mL) and THF (0.7 mL), then a 1M HCl aqueous solution (0.5 mL) and Pd(OH)₂/C (0.1 eq., 11 mg, 0.0078 mmol, 20% Pd on carbon, nominally 50% water) were added. The flask was evacuated under vacuum and backfilled with argon (four cycles) and then evacuated under vacuum and backfilled with H₂ (four cycles). The reaction mixture was stirred under an atmosphere of H₂ (1 atm) at room temperature for 16 h. The reaction mixture was then filtered through a pad of celite (previously rinsed with at least 250 mL of a 1M HCl aqueous solution and then water) and rinsed with MeOH. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in MeOH then ion exchange resin Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) was added and the suspension was rotated at room temperature for 1

PARTIE EXPÉRIMENTALE

h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 90:10) to afford **192** (15.5 mg, 97%) as a white solid.

R_f 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10, PMA).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = -18$ (*c* 1.0, MeOH).

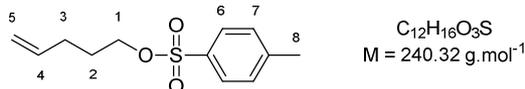
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H; CH₃-14), 1.24-1.40 (m, 12H; CH₂-8, CH₂-9, CH₂-10, CH₂-11, CH₂-12 and CH₂-13), 1.53-1.62 (m, 2H; CH₂-7), 2.28 (ddd, *J* = 11.2, 11.2, 2.4 Hz, 1H; H^A-5), 2.34 (dd, *J* = 12.4, 10.3 Hz, 1H; H^A-1), 3.02 (ddd, *J* = 12.4, 5.1 and 1.1 Hz, 1H; H^B-1), 3.09-3.18 (m, 2H; H-4 and H^B-5), 3.23 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H; H-3), 3.39 (ddd, *J* = 10.3, 8.5 and 5.1 Hz, 1H; H-2), 3.59 ppm (t, *J* = 6.7 Hz, 2H; CH₂-6).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 14.4 (C-14), 23.7 (C-13), 27.2, 30.4, 30.6, 30.7, 31.2, 33.1 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12), 49.1 (C-5), 51.5 (C-1), 71.9 (C-6), 72.8 (C-2), 79.2 (C-3), 80.9 ppm (C-4).

IR (neat) 3286 (O-H, N-H), 2922 cm⁻¹ (C-H).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₄H₃₀NO₃ : 260.2220 [M + H]⁺ ; found 260.2251.

1-(4-methylbenzenesulfonate)-4-penten-1-ol (**203**)

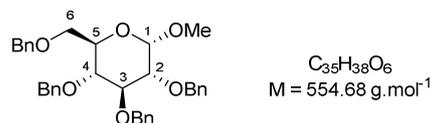


To a solution of 4-penten-1-ol (1.00 g, 11.61 mmol) in dry CH₂Cl₂ (12 mL) was added TsCl (1.5 eq., 3.32 g, 17.41 mmol) and pyridine (2 eq., 1.90 mL, 23.49 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h. Water and Et₂O were added to the reaction mixture and the layers were separated. The organic layer was successively washed with a 2M HCl aqueous solution and sat. NaHCO₃, this operation was repeated twice. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 0:100 to 10:90) to afford **203** (2.30 g, 82%) as a pale yellow oil. The analytical data of **203** were in complete agreement with those reported in the literature.³¹⁸

R_f 0.48 (AcOEt/Petroleum ether 10:90, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.74 (quintet, *J* = 6.9 Hz, 2H; CH₂-2), 2.04-2.12 (m, 2H; CH₂-3), 2.45 (s, 3H; CH₃-8), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H; CH₂-1), 4.91-4.99 (m, 2H; CH₂-5), 5.62-5.75 (m, 1H; H-4), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-7), 7.79 ppm (d, *J* = 8.2 Hz, 2H; H-6).

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- α -methyl-gluco-*D*-pyranoside (**205**)



To a solution of methyl-*D*-glucopyranoside (5.01 g, 25.77 mmol) in dry DMF (200 mL) was added BnBr (6.2 eq., 19 mL, 158.86 mmol). The solution was cooled to 0 °C and NaH (6.2 eq., 6.40 g, 160.01 mmol, 60% on mineral oil) was added portionwise. The solution was then allowed to warm to room temperature and stirred for 15 h. The reaction was quenched by addition of MeOH (5 mL). Water and Et₂O were added, the layers were separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3 \times). The combined organic layers were washed with sat. NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue

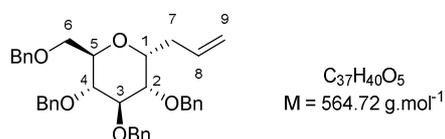
was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 10:70 to 10:50) to afford **205** (13.79 g, 96%) as a pale yellow oil. The analytical data of **205** were in complete agreement with those reported in the literature.³⁴²

R_f 0.32 (AcOEt/Petroleum ether 10:60, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.41 (s, 3H; OCH₃), 3.60 (dd, *J* = 9.6, 3.5 Hz, 1H; H-2), 3.63-3.70 (m, 2H; H-4 and H^A-6), 3.72-3.81 (m, 2H; H-5 and H^B-6), 4.02 (dd, *J* = 9.6, 8.9 Hz, 1H; H-3), 4.506 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.508 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.64 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.67 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H; H-1), 4.70 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.83 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.86 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.87 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.02 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H; OCH₂Ph), 7.13-7.41 ppm (m, 20H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 55.3 (OCH₃), 68.6 (C-6), 70.2 (C-5), 73.5, 73.6, 75.1, 75.9 (4×OCH₂Ph), 77.8 (C-4), 80.0 (C-2), 82.3 (C-3), 98.3 (C-1), 127.7, 127.75, 127.78, 127.95, 128.0, 128.1, 128.2, 128.45, 128.49, 128.6 (20×CH_{arom}), 138.1, 138.3, 138.4, 138.9 ppm (4×C_{arom}).

3-(2',3',4',6'-Tetra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyl)-1-propene (**202a**)



To a solution of **205** (2.01 g, 3.62 mmol) in dry MeCN (20 mL) was added allyltrimethylsilane (3 eq., 1.75 mL, 11.01 mmol) at room temperature and the solution was stirred for 30 min. The solution was then cooled to 0 °C and TMSOTf (1 eq., 0.66 mL, 3.65 mmol) was added dropwise. The solution was allowed to warm to room temperature and stirred for 19 h. Et₂O was added and the organic layer was successively washed with sat. NaHCO₃, water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (Et₂O/Petroleum ether 20:80) to afford **202a** (1.49 g, 73%) and **202b** (150 mg, 7%) as white solids. The analytical data of **202a** were in complete agreement with those reported in the literature.^{320,321}

Anomer β:

R_f 0.49 (Et₂O/Petroleum ether 20:80, PMA).

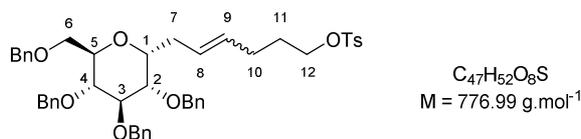
Anomer α:

R_f 0.42 (Et₂O/Petroleum ether 20:80, PMA).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.46-2.58 (m, 2H; CH₂-7), 3.61-3.86 (m, 6H; H-2, H-3, H-4, H-5 and CH₂-6), 4.16 (ddd, *J* = 10.2, 5.4, 4.8 Hz, 1H; H-1), 4.50 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.50 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.65 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.66 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.72 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.83 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.84 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H; OCH₂Ph), 4.96 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H; OCH₂Ph), 5.10 (dd, *J* = 10.0, 1.5 Hz, 1H; H^B-9), 5.14 (dd, *J* = 17.1, 1.5 Hz, 1H; H^A-9), 5.85 (ddt, *J* = 17.1, 10.0 and 7.0 Hz, 1H; H-8), 7.12-7.18 (m, 2H; H_{arom}), 7.26-7.39 ppm (m, 18H; H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 30.0 (C-7), 69.1 (C-6), 71.3 (C-5), 73.2, 73.6 (2×OCH₂Ph), 73.9 (C-1), 75.2, 75.6 (2×OCH₂Ph), 78.3 (C-4), 80.2 (C-2), 82.6 (C-3), 117.0 (C-9), 127.7, 127.8, 127.9, 127.96, 128.01, 128.07, 128.12, 128.47, 128.53, 128.6 (20×CH_{arom}), 134.9 (C-8), 138.2, 138.3, 138.4, 138.9 ppm (4×C_{arom}).

Compound 204



An oven-dried Schlenk tube was charged with **202a** (52 mg, 0.0921 mmol), **203** (5.4 eq., 120 mg, 0.4993 mmol), 1,4-benzoquinone (0.2 eq., 2 mg, 0.0185 mmol) and Grubbs 2nd generation catalyst (10 mol%, 7.7 mg, 0.0091 mmol). The Schlenk tube was evacuated under vacuum and backfilled with argon (three cycles) and then dry and degassed CH_2Cl_2 (1.2 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h under argon atmosphere. Additional Grubbs 2nd generation catalyst (5 mol%, 3.9 mg, 0.0046 mmol) was added to the reaction mixture, followed by additional stirring at room temperature for 64 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 15:85 to 20:80; solid deposition) to afford **204** (49 mg, 68%) as a mixture of E/Z isomers and as a colorless oil.

R_f 0.34 (AcOEt/Petroleum ether 20:80, PMA).

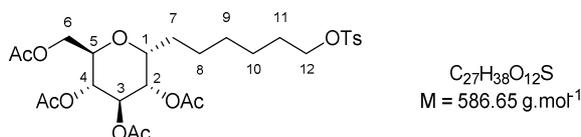
¹H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.62-1.72 (m, 2H; CH_2 -11), 1.96-2.08 (m, 2H; CH_2 -10), 2.31-2.46 (m, 5H; CH_2 -7 and CH_3), 3.53-3.81 (m, 6H; H-2, H-3, H-4, H-5 and CH_2 -6), 3.96-4.06 (m, 3H; H-1 and CH_2 -12), 4.43-4.50 (m, 2H; OCH_2Ph), 4.57-4.64 (m, 2H; OCH_2Ph), 4.65-4.71 (m, 1H; OCH_2Ph), 4.77-4.83 (m, 2H; OCH_2Ph), 4.90-4.96 (m, 1H; OCH_2Ph), 5.30-5.45 (m, 2H; H-8 and H-9), 7.10-7.15 (m, 2H; H_{arom}), 7.22-7.36 (m, 20H; H_{arom}), 7.76-7.80 ppm (m, 2H; H_{arom}).

¹³C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 21.8 (CH_3), 28.5, 28.6, 28.7 (C-7, C-10, C-11), 69.2 (C-6), 70.1 (C-12), 71.2 (C-5), 73.2, 73.6 ($2 \times OCH_2Ph$), 74.0 (C-1), 75.2, 75.6 ($2 \times OCH_2Ph$), 78.3 (C-4), 80.3 (C-2), 82.5 (C-3), 127.6, 127.7, 127.8, 127.88, 127.93, 128.01, 128.03, 128.05, 128.12, 128.47, 128.54, 128.6 (C-8, C-9, $24 \times CH_{arom}$), 134.9 (C-8), 133.4, 138.2, 138.3, 138.4, 138.9, 144.8 ppm ($6 \times C_{arom}$).

IR (neat) 1360 (SO_2), 1175 cm^{-1} (SO_2).

HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{47}H_{52}O_8SNa$: 799.3275 [$M + Na$]⁺ ; found 799.3279.

Compound 208



To a solution of **204** (144 mg, 0.1853 mmol) in THF (4 mL) and MeOH (2 mL) were added a 1M HCl aqueous solution (0.25 mL) and Pd/C (0.1 eq., 20 mg, 0.0188 mmol, 10% Pd on carbon). The flask was evacuated under vacuum and backfilled with argon (four cycles) and then evacuated under vacuum and backfilled with H_2 (four cycles). The reaction mixture was stirred under an atmosphere of H_2 (1 atm) at room temperature for 4 h. The reaction mixture was then filtered through a pad of celite (previously rinsed with at least 250 mL of a 1M HCl aqueous solution and then water) and rinsed with MeOH. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was then dissolved in a mixture of dry pyridine and Ac_2O (1:1, 8 mL) and DMAP (0.2 eq., 4.5 mg, 0.0368 mmol) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. Solvents were evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 30:70) to afford **208** (74 mg, 68%) as a colorless oil.

R_f 0.43 (AcOEt/Petroleum ether 40:60, $KMnO_4$).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +40$ (c 1.0, CHCl_3).

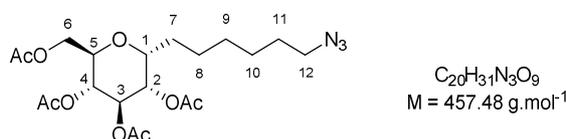
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.22-1.48 (m, 7H; $\text{H}^{\text{A-7}}$, CH_2 -8, CH_2 -9 and CH_2 -10), 1.59-1.68 (m, 2H; CH_2 -11), 1.69-1.80 (m, 1H; $\text{H}^{\text{B-7}}$), 2.02 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 2.03 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 2.04 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 2.07 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 2.45 (s, 3H; CH_3), 3.79 (ddd, $J = 9.4, 5.3$ and 2.3 Hz, 1H; H-5), 4.01 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H; CH_2 -12), 4.07 (dd, $J = 12.1, 2.3$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-6}}$), 4.09-4.16 (m, 1H; H-1), 4.22 (dd, $J = 12.1, 5.3$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-6}}$), 4.96 (dd, $J = 9.4, 8.8$ Hz, 1H; H-4), 5.05 (dd, $J = 9.5, 5.7$ Hz, 1H; H-2), 5.30 (dd, $J = 9.5, 8.8$ Hz, 1H; H-3), 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H; H_{arom}), 7.78 ppm (d, $J = 8.1$ Hz, 2H; H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.7, 20.75, 20.77 ($4 \times \text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 21.7 (CH_3), 24.8, 25.2, 25.4, 28.6, 28.8 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), 62.5 (C-6), 68.6 (C-5), 69.0 (C-4), 70.48, 70.52 (C-2, C-3, C-12), 72.5 (C-1), 127.9, 129.9 ($4 \times \text{CH}_{\text{arom}}$), 133.2, 144.8 ($2 \times \text{C}_{\text{arom}}$), 169.6, 169.7, 170.2, 170.7 ppm ($4 \times \underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat) 1744 (C=O), 1365 (SO_2), 1175 cm^{-1} (SO_2).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{12}\text{SNa}$: 609.1976 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 609.1897.

Compound 198



NaN_3 (4.6 eq., 41 mg, 0.6307 mmol) was added to a solution of **208** (80 mg, 0.1364 mmol) in dry DMF (2 mL) under argon atmosphere, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 17 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was diluted with AcOEt and washed with water (2 \times) and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 30:70) to afford **198** (57 mg, 91%) as a white solid.

R_f 0.30 (AcOEt/Petroleum ether 30:70, KMnO_4).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +63$ (c 2.0, CHCl_3).

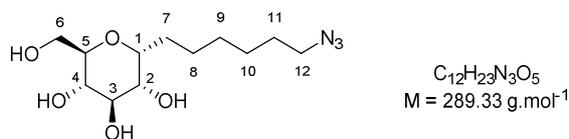
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.22-1.50 (m, 7H; $\text{H}^{\text{A-7}}$, CH_2 -8, CH_2 -9 and CH_2 -10), 1.53-1.63 (m, 2H; CH_2 -11), 1.70-1.81 (m, 1H; $\text{H}^{\text{B-7}}$), 2.00 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 2.01 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 2.02 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 2.06 (s, 3H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 3.25 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H; CH_2 -12), 3.78 (ddd, $J = 9.4, 5.3$ and 2.4 Hz, 1H; H-5), 4.05 (dd, $J = 12.1, 2.4$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{A-6}}$), 4.10-4.17 (m, 1H; H-1), 4.21 (dd, $J = 12.1, 5.3$ Hz, 1H; $\text{H}^{\text{B-6}}$), 4.95 (dd, $J = 9.4, 8.9$ Hz, 1H; H-4), 5.04 (dd, $J = 9.5, 5.8$ Hz, 1H; H-2), 5.29 ppm (dd, $J = 9.5, 8.9$ Hz, 1H; H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.7, 20.8 ($4 \times \text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$), 24.9, 25.2, 26.8, 28.8, 28.9 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), 51.4 (C-12), 62.5 (C-6), 68.7 (C-5), 69.0 (C-4), 70.5 (C-3), 70.6 (C-2), 72.6 (C-1), 169.6, 169.7, 170.2, 170.7 ppm ($4 \times \underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat) 2096 (N_3), 1743 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$: 480.1953 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; found 480.1976.

Compound 201



To a solution of **198** (130 mg, 0.2842 mmol) in a mixture of MeOH and H₂O (1:1, 14 mL) was added Amberlite® IRA400 (OH⁻) resin (3.5 g). The mixture was rotated at room temperature for 18 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 90:10) to afford **201** (70 mg, 85%) as an off-white oil.

R_f 0.28 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10, KMnO₄).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +69$ (*c* 2.0, MeOH).

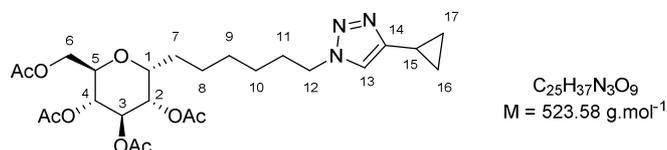
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 1.26-1.48 (m, 7H; H^A-7, CH₂-9 and CH₂-10), 1.49-1.75 (m, 5H; H^B-7, CH₂-8 and CH₂-11), 3.21-3.34 (m, 3H; H-4 and CH₂-12), 3.35-3.43 (m, 1H; H-5), 3.50-3.68 (m, 3H; H-2, H-3 and H^A-6), 3.75-3.82 (m, 1H; H^B-6), 3.84-3.92 ppm (m, 1H; H-1).

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 25.2, 26.5, 27.8, 29.8, 30.0 (C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), 52.4 (C-12), 63.1 (C-6), 72.4 (C-4), 73.1 (C-2), 74.3 (C-5), 75.3 (C-3), 77.2 ppm (C-1).

IR (neat) 3353 (O-H), 2096 cm⁻¹ (N₃).

HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₂H₂₃N₃O₅Na : 312.1530 [M + Na]⁺ ; found 312.1556.

Compound 211



To a solution of **198** (29 mg, 0.0634 mmol) and cyclopropylacetylene (3.7 eq., 0.02 mL, 0.2363 mmol) in DMF (1.7 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of CuSO₄·5H₂O (0.13 eq., 2 mg, 0.0080 mmol) and sodium ascorbate (0.24 eq., 3 mg, 0.0151 mmol) in water (0.45 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 30 min. Additional cyclopropylacetylene (3.7 eq., 0.02 mL, 0.2363 mmol) was added and the reaction mixture was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for another 30 min. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt (3×). The combined organic extracts were washed with water (3×), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/H₂O/NH₄OH (10:1:1) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography (AcOEt/Petroleum ether 70:30) to afford **211** (30 mg, 90%) as a white solid.

R_f 0.36 (AcOEt/Petroleum ether 70:30, KMnO₄).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +54$ (*c* 1.0, CHCl₃).

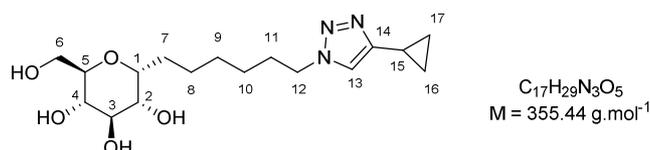
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 0.78-0.96 (m, 4H; CH₂-16 and CH₂-17), 1.18-1.49 (m, 7H; H^A-7, CH₂-8, CH₂-9 and CH₂-10), 1.67-1.80 (m, 1H; H^B-7), 1.81-1.96 (m, 3H; CH₂-11 and H-15), 2.01 (s, 6H; 2×C(O)CH₃), 2.03 (s, 3H; C(O)CH₃), 2.05 (s, 3H; C(O)CH₃), 3.73-3.81 (m, 1H; H-5), 4.02-4.09 (m, 1H; H^A-6), 4.09-4.16 (m, 1H; H-1), 4.17-4.31 (m, 3H; H^B-6 and CH₂-12), 4.10-4.17 (m, 1H; H-1), 4.91-4.99 (m, 1H; H-4), 5.00-5.08 (m, 1H; H-2), 5.24-5.32 (m, 1H; H-3), 7.20 ppm (s, 1H; H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 6.8 (C-15), 7.8 (C-16, C-17), 20.76, 20.82, 20.9 ($4\times\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 24.9, 25.3, 26.6, 28.8 (C-7, C-8, C-9, C-10), 30.3 (C-11), 51.1 (C-12), 62.5 (C-6), 68.7 (C-5), 69.0 (C-4), 70.5, 70.6 (C-2, C-3), 72.6 (C-1), 119.5 (C-13), 150.3 (C-14), 169.6, 169.8, 170.3, 170.7 ppm ($4\times\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

IR (neat) 1746 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_9$: 524.2603 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 524.2628.

Compound 212



To a solution of **211** (28 mg, 0.0535 mmol) in MeOH (3 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH^-) resin (1.0 g). The mixture was rotated at room temperature for 16 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10 to 85:15) to afford **212** (17 mg, 89%) as a colorless oil.

R_f 0.20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10, KMnO_4).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +53$ (c 1.0, MeOH).

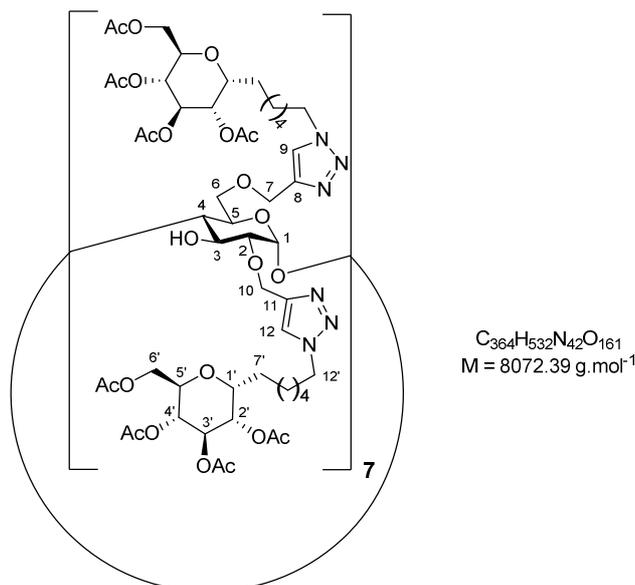
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 0.72-0.79 (m, 2H; CH_2 -16 or CH_2 -17), 0.91-1.00 (m, 2H; CH_2 -16 or CH_2 -17), 1.24-1.45 (m, 5H; H^{A} -8, CH_2 -9 and CH_2 -10), 1.47-1.71 (m, 3H; CH_2 -7 and H^{B} -8), 1.83-1.99 (m, 3H; CH_2 -11 and H-15), 3.22 (dd, $J = 9.5, 8.5$ Hz 1H; H-4), 3.34-3.41 (m, 1H; H-5), 3.50 (dd, $J = 9.4, 8.5$ Hz 1H; H-3), 3.57 (dd, $J = 9.4, 5.6$ Hz 1H; H-2), 3.61 (dd, $J = 11.5, 5.6$ Hz 1H; H^{A} -6), 3.77 (dd, $J = 11.5, 2.3$ Hz 1H; H^{B} -6), 3.86 (ddd, $J = 10.3, 5.6$ and 3.9 Hz 1H; H-1), 4.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H; CH_2 -12), 7.67 ppm (s, 1H; H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 7.3 (C-15), 8.2 (C-16, C-17), 25.3 (C-7), 26.4 (C-8), 27.4 (C-10), 29.8 (C-9), 31.2 (C-11), 51.2 (C-12), 63.2 (C-6), 72.5 (C-4), 73.1 (C-2), 74.4 (C-5), 75.3 (C-3), 77.2 (C-1), 121.8 (C-13), 151.4 ppm (C-14).

IR (neat) 3340 cm^{-1} (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_5$: 356.2180 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 356.2200.

Compound 213



To a solution of heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptaose **199** (13 mg, 0.0078 mmol) and **198** (15.4 eq., 55 mg, 0.1202 mmol) in DMF (1.2 mL) in a microwave vial was added a yellow suspension of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.5 eq., 3 mg, 0.0120 mmol) and sodium ascorbate (3.2 eq., 5 mg, 0.0252 mmol) in water (0.3 mL). The resulting suspension was stirred and heated under microwave irradiation at 80 °C for 30 min. The reaction mixture was diluted with water and extracted with AcOEt (3×10 mL). The combined organic extracts were washed with water, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with a mixture of MeCN/ H_2O / NH_4OH (15:0.5:0.5) and filtered through a pad of silica gel, using the same mixture as eluent. Copper precipitated as a blue powder and remained at the top of the silica gel pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 95:5) to afford **213** (52 mg, 83%) as a pale yellow oil.

R_f 0.34 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96:4, KMnO_4).

Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +57$ (c 2.0, CHCl_3).

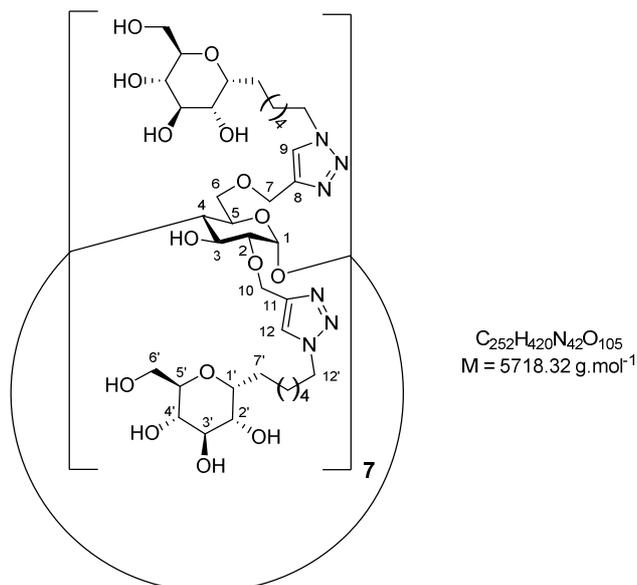
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.19-1.51 (m, 98H; $\text{H}^A\text{-7}'$, $\text{CH}_2\text{-8}'$, $\text{CH}_2\text{-9}'$ and $\text{CH}_2\text{-10}'$), 1.68-1.81 (m, 1H; $\text{H}^B\text{-7}'$), 1.81-1.95 (m, 28H; $\text{CH}_2\text{-11}'$), 1.95-2.07 (m, 168H; $56 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 3.28-3.54 (m, 14H; H-2 and H-4), 3.56-3.73 (m, 14H; H-5 and $\text{CH}_2\text{-6}$), 3.73-3.83 (m, 14H; H-5'), 3.85-3.97 (m, 7H; H-3), 4.21 (dt, $J = 12.1, 2.3$ Hz, 14H; $\text{H}^A\text{-6}'$), 4.08-4.15 (m, 14H; H-1'), 4.21 (dd, $J = 12.1, 4.9$ Hz, 14H; $\text{H}^B\text{-6}'$), 4.30 (t, $J = 7.3$ Hz, 14H; H-12'), 4.35 (t, $J = 7.3$ Hz, 14H; H-12'), 4.42-4.68 (m, 14H; $\text{CH}_2\text{-7}$ or $\text{CH}_2\text{-10}$), 4.69-4.81 (m, 7H; H-1), 4.84-4.93 (m, 14H; $\text{CH}_2\text{-7}$ or $\text{CH}_2\text{-10}$), 4.95 (dd, $J = 9.3, 8.8$ Hz, 14H; H-4'), 5.02 (dd, $J = 9.5, 5.7$ Hz, 14H; H-2'), 5.27 (dd, $J = 9.5, 8.8$ Hz, 14H; H-3'), 7.54-7.80 ppm (m, 14H; H-9 and H-12).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.7, 20.78, 20.82 ($56 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 25.0, 25.3, 26.66, 26.70, 28.79, 28.83 (C-7, C-8, C-9, C-10), 30.4 (C-11'), 50.3, 50.4 (C-12'), 62.4 (C-6'), 64.9, 65.2 (C-7, C-10), 68.7 (C-5'), 68.9 (C-6), 69.0 (C-4'), 70.4 (C-5), 70.5 (C-3'), 70.6 (C-2'), 72.6 (C-1'), 73.4 (C-3), 79.1 (C-2), 83.0 (C-4), 101.7 (C-1), 122.9, 123.6 (C-9, C-12), 144.1, 144.7 (C-8, C-11), 169.6, 169.7, 170.2, 170.7 ppm ($56 \times \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

IR (neat) 3424 (O-H), 1744 cm^{-1} (C=O).

HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{364}\text{H}_{532}\text{N}_{42}\text{O}_{161}\text{Na}_3$: 2713.4844 [$\text{M} + 3\text{Na}$] $^{3+}$; found 2713.4838.

Compound 196



To a solution of **213** (50 mg, 0.0062 mmol) in a mixture of MeOH and water (1:1, 2 mL) was added Amberlite[®] IRA400 (OH⁻) resin (2.20 g). The mixture was rotated at room temperature for 20 h. The resin was filtered, rinsed with MeOH and water, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The solvents were evaporated under reduced pressure to afford **196** (33 mg, 93%) as a pale yellow oil.

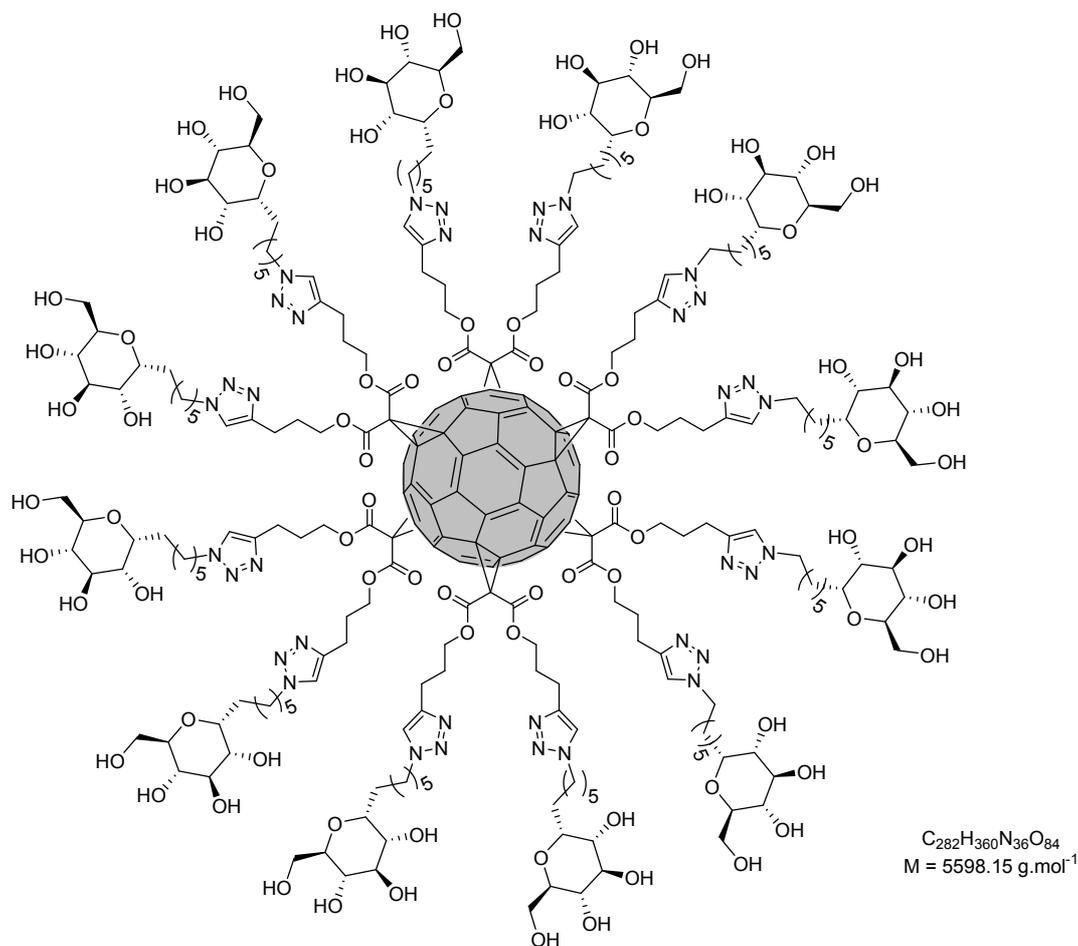
Specific rotation $[\alpha]_D^{20} = +80$ (c 1.0, H₂O).

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) δ 1.10-1.94 (m, 140H; CH₂-7', CH₂-8', CH₂-9', CH₂-10' and CH₂-11'), 3.30-3.99 (m, 140H; H-1', H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', CH₂-6 and CH₂-6'), 4.15-4.65 (m, 42H; CH₂-7 or CH₂-10, CH₂-12), 4.80-5.04 (m, 21H; H-1, CH₂-7 or CH₂-10), 7.92 (br s, 7H; H-9 or H-12), 8.09 ppm (s, 7H; H-9 or H-12).

¹³C-NMR (D₂O, 75.5 MHz) δ 23.4, 23.5, 24.4, 24.5, 25.55, 25.62, 27.8, 27.9, 29.5, 29.6 (C-7', C-8', C-9', C-10', C-11'), 50.2, 50.4 (C-12'), 61.1 (C-6'), 63.4, 64.5 (C-7, C-10), 68.6 (C-6), 70.3, 70.4 (C-4', C-5), 71.3 (C-2'), 70.6 (C-5'), 72.8 (C-3), 73.4 (C-3'), 75.7 (C-1'), 79.4 (C-2), 81.9 (C-4), 100.3 (C-1), 124.6, 125.2 (C-9, C-12), 143.4, 143.9 ppm (C-8, C-11).

IR (neat) 3369 cm⁻¹ (O-H).

HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₅₂H₄₂₄N₄₂O₁₀₅ : 1430.4799 [M + 4H]⁴⁺ ; found 1430.4807.

Compound 197 (reaction performed by Dr Thi Minh Nguyet Trinh)

A mixture of alkyne-armed fullerene **200** (37.3 mg, 0.018 mmol), azide-armed C-glucoside **201** (13.1 eq., 68 mg, 0.235 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.3 eq., 1.3 mg, 0.0052 mmol) and sodium ascorbate (1 eq., 3.5 mg, 0.018 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (0.6: 0.4: 0.4 mL) was vigorously stirred at 30 °C under argon for 3 days. The crude product was precipitated in MeOH and the precipitate was dissolved in water acidified with 2M HCl. A gel permeation chromatography (Sephadex® G-25, H_2O) and then a filtration through a Quadrasil® Mercaptopropyl column gave **197** (33 mg, 34%) as a brown glassy product.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 1.03-1.54 (m, 84H), 1.57-2.05 (m, 60H), 2.62 (m, 24H), 3.01 (m, 12H), 3.17 (m, 12H), 3.66 (m, 12H), 4.02-4.42 (m, 60H), 4.80 (m, 36H), 7.84 ppm (s, 12H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) δ 21.9, 24.3, 25.4, 26.4, 28.2, 28.8, 30.1, 46.0, 49.9, 61.9, 67.0, 69.2, 71.3, 71.9, 73.8, 74.2, 75.5, 122.5, 141.2, 145.4, 146.2, 163.2 ppm.

IR (neat) 3340 (O-H), 1738 cm^{-1} (C=O).

BIBLIOGRAPHIE

1. Sears, P.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300–2324.
2. *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*; Compain, P.; Martin, O. R., Eds.; Wiley, Chichester, **2007**.
3. Paulsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 597–597.
4. Hanessian, S.; Haskell, T. H. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2604–2610.
5. Jones, J. K. N.; Turner, J. C. *J. Chem. Soc. Resumed* **1962**, 4699–4703.
6. Paulsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1966**, *5*, 495–510.
7. Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Nida, T. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1966**, *19*, 288–292.
8. Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Ito, T.; Niida, T. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2125–2144.
9. Yagi, M.; Kouno, T.; Aoyagi, Y.; Murai, H. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **1976**, *50*, 571–572.
10. Fellows, L. E.; Bell, E. A.; Lynn, D. G.; Pilkiewicz, F.; Miura, I.; Nakanishi, K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 977–978.
11. Isobe, M.; Sakamura, S. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1111–1112.
12. Welter, A.; Jadot, J.; Dardenne, G.; Marlier, M.; Casimir, J. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 747–749.
13. Colegate, S.; Dorling, P.; Huxtable, C. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2257–2264.
14. Hohenschutz, L. D.; Bell, E. A.; Jewess, P. J.; Leworthy, D. P.; Pryce, R. J.; Arnold, E.; Clardy, J. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 811–814.
15. Asano, N. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 471–484.
16. Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 1645–1680.
17. Vocadlo, D. J.; Davies, G. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 539–555.
18. Carbohydrate Actives Enzymes database (CAZy). Glycoside Hydrolase Family Classification [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (consulté le 10.10.2015)
19. Henrissat, B.; Davies, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 637–644.
20. Wolfenden, R.; Lu, X.; Young, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814–6815.
21. Koshland, D. E. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416–436.
22. Chiba, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1233–1239.
23. Zechel, D. L.; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11–18.
24. McCarter, J. D.; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885–892.
25. Chang, C.-F.; Ho, C.-W.; Wu, C.-Y.; Chao, T.-A.; Wong, C.-H.; Lin, C.-H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1301–1306.
26. Martin, O. R. *Ann. Pharm. Fr.* **2007**, *65*, 5–13.
27. Mitrakou, A.; Tountas, N.; Raptis, A. E.; Bauer, R. J.; Schulz, H.; Raptis, S. A. *Diabet. Med.* **1998**, *15*, 657–660.
28. Herscovics, A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1999**, *1473*, 96–107.
29. Elbein, A. D.; Molyneux, R. J. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*; Stütz, A. E., Ed.; Wiley, Weinheim, **1999**; pp. 216–251.
30. Durantel, D. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2009**, *10*, 860–870.
31. Low, J. G.; Sung, C.; Wijaya, L.; Wei, Y.; Rathore, A. P. S.; Watanabe, S.; Tan, B. H.; Toh, L.; Chua, L. T.; Hou, Y.; Chow, A.; Howe, S.; Chan, W. K.; Tan, K. H.; Chung, J. S.; Cherng, B. P.; Lye, D. C.; Tambayah, P. A.; Ng, L. C.; Connolly, J.; Hibberd, M. L.; Leo, Y. S.; Cheung, Y. B.; Ooi, E. E.; Vasudevan, S. G. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 706–715.
32. Goss, P. E.; Baker, M. A.; Carver, J. P.; Dennis, J. W. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 935–944.

BIBLIOGRAPHIE

33. Goss, P. E.; Reid, C. L.; Bailey, D.; Dennis, J. W. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 1077–1086.
34. Dechecchi, M. C.; Nicolis, E.; Norez, C.; Bezzerri, V.; Borgatti, M.; Mancini, I.; Rizzotti, P.; Ribeiro, C. M. P.; Gambari, R.; Becq, F.; Cabrini, G. *J. Cystic Fibrosis* **2008**, *7*, 555–565.
35. Norez, C.; Noel, S.; Wilke, M.; Bijvelds, M.; Jorna, H.; Melin, P.; DeJonge, H.; Becq, F. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2081–2086.
36. Fan, J.-Q.; Ishii, S.; Asano, N.; Suzuki, Y. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 112–115.
37. Fan, J.-Q. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355–360.
38. Orsato, A.; Barbagallo, E.; Costa, B.; Olivieri, S.; De Gioia, L.; Nicotra, F.; La Ferla, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 5012–5019.
39. Decroocq, C.; Stauffert, F.; Pamlard, O.; Oulaïdi, F.; Gallienne, E.; Martin, O. R.; Guillou, C.; Compain, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 830–833.
40. Sharon, N.; Lis, H. *Glycobiology* **2004**, *14*, 53R–62R.
41. Kiessling, L. L.; Young, T.; Mortell, K. H. dans *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I–III*; Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg, **2001**; pp. 1817–1861.
42. Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 543–551.
43. Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578.
44. Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327.
45. Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966–979.
46. Sharon, N.; Lis, H. *Sci. Am.* **1993**, *268*, 82–89.
47. Pieters, R. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013–2025.
48. Chabre, Y.; Roy, R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1237–1285.
49. Sigal, G. B.; Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789–3800.
50. Choi, S.-K.; Mammen, M.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103–4111.
51. Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. *Nature* **2000**, *403*, 669–672.
52. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696–703.
53. Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
54. Fan, E.; Zhang, Z.; Minke, W. E.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663–2664.
55. Zhang, Z.; Merritt, E. A.; Ahn, M.; Roach, C.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Fan, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12991–12998.
56. Wittmann, V.; Pieters, R. J. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4492–4503.
57. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
58. Page, M. I.; Jencks, W. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, *68*, 1678–1683.
59. Jencks, W. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 4046–4050.
60. Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409–3424.
61. Sigurskjold, B. W.; Christensen, T.; Payre, N.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Svensson, B. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37*, 10446–10452.
62. Banerjee, A. L.; Eiler, D.; Roy, B. C.; Jia, X.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K. *Biochemistry (Mosc.)* **2005**, *44*, 3211–3224.
63. Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Cavada, B. S.; Nascimento, K. S.; Moura, T. R.; Brewer, C. F. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256–28263.

64. Benito, J. M.; Gómez-García, M.; Ortiz Mellet, C.; Baussanne, I.; Defaye, J.; García Fernández, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10355–10363.
65. Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190.
66. Johns, B. A.; Johnson, C. R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 749–752.
67. Lohse, A.; Jensen, K. B.; Lundgren, K.; Bols, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965–1971.
68. McCort, I.; Sanière, M.; Le Merrer, Y. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2693–2700.
69. Le Merrer, Y.; Poitout, L.; Depezay, J.-C.; Dosbaa, I.; Geoffroy, S.; Foglietti, M.-J. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 519–533.
70. Wennekes, T.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Bongers, K. M.; Donker-Koopman, W. E.; Ghisaidoobe, A.; van der Marel, G. A.; Strijland, A.; Aerts, J. M. F. G.; Overkleeft, H. S. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 836–846.
71. Chabre, Y. M.; Roy, R. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4657–4708.
72. Jiménez Blanco, J. L.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4518–4531.
73. Diot, J.; García-Moreno, M. I.; Gouin, S. G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt, K.; Kovensky, J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357–363.
74. Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753–5756.
75. Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825–13831.
76. Decroocq, C.; Joosten, A.; Sergent, R.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2038–2049.
77. Joosten, A.; Schneider, J. P.; Lepage, M. L.; Tarnus, C.; Bodlenner, A.; Compain, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 1866–1872.
78. Rísquez-Cuadro, R.; García Fernández, J. M.; Nierengarten, J.-F.; Ortiz Mellet, C. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16791–16803.
79. Bonduelle, C.; Huang, J.; Mena-Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Decroocq, C.; Etamé, E.; Heise, A.; Compain, P.; Lecommandoux, S. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3350–3352.
80. D’Adamio, G.; Parmeggiani, C.; Goti, A.; Moreno-Vargas, A. J.; Moreno-Clavijo, E.; Robina, I.; Cardona, F. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6250–6266.
81. Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Molina, L.; Wright, D. W.; Davies, G. J.; Robina, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 7328–7336.
82. Brissonnet, Y.; Ortiz Mellet, C.; Morandat, S.; Garcia Moreno, M. I.; Deniaud, D.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Šesták, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18427–18435.
83. Lepage, M. L.; Meli, A.; Bodlenner, A.; Tarnus, C.; De Riccardis, F.; Izzo, I.; Compain, P. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1406–1412.
84. Zelli, R.; Longevial, J.-F.; Dumy, P.; Marra, A. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 5050–5074.
85. Gouin, S. G. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11616–11628.
86. Compain, P.; Bodlenner, A. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1239–1251.
87. Gómez-García, M.; Benito, J. M.; Rodríguez-Lucena, D.; Yu, J.-X.; Chmurski, K.; Ortiz Mellet, C.; Gutiérrez Gallego, R.; Maestre, A.; Defaye, J.; García Fernández, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970–7971.
88. Kumar, A.; Gaikwad, S. M. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49*, 1066–1071.
89. Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Ikeda, K.; Asano, N.; Compain, P. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 661–664.
90. Butters, T. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 412–418.

BIBLIOGRAPHIE

91. Sawkar, A. R.; Cheng, W.-C.; Beutler, E.; Wong, C.-H.; Balch, W. E.; Kelly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 15428–15433.
92. Compain, P.; Martin, O. R.; Boucheron, C.; Godin, G.; Yu, L.; Ikeda, K.; Asano, N. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1356–1359.
93. Asano, N.; Ishii, S.; Kizu, H.; Ikeda, K.; Yasuda, K.; Kato, A.; Martin, O. R.; Fan, J.-Q. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4179–4186.
94. Joosten, A.; Decroocq, C.; de Sousa, J.; Schneider, J. P.; Etamé, E.; Bodlenner, A.; Butters, T. D.; Compain, P. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 309–319.
95. Compain, P.; Decroocq, C.; Joosten, A.; de Sousa, J.; Rodríguez-Lucena, D.; Butters, T. D.; Bertrand, J.; Clément, R.; Boinot, C.; Becq, F.; Norez, C. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2050–2058.
96. Dennis, J. W.; Koch, K.; Yousefi, S.; VanderElst, I. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1867–1872.
97. Hodson, M. E. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* **2000**, *67*, 595–607.
98. Farrell, P. M. *J. Cystic Fibrosis* **2008**, *7*, 450–453.
99. Bellis, G.; Lemonnier, L.; Sponga, M. *Registre Français de la Mucoviscidose - Bilan des données 2013*; Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d'études démographiques (INED), **2015**.
100. Lubamba, B.; Dhooghe, B.; Noel, S.; Leal, T. *Clin. Biochem.* **2012**, *45*, 1132–1144.
101. Bui, S.; Boisserie-Lacroix, V.; Ceccato, F.; Clouzeau, H.; Debeleix, S.; Fayon, M. *Arch. Pédiatrie* **2012**, *19*, *Supplement 1*, S8–S12.
102. Lochouarn, M. (2011, 1 mai). Des progrès contre la mucoviscidose. *Le Figaro.fr*. Disponible sur : <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2011/05/01/10844-progres-contre-mucoviscidose>
103. Ikpa, P. T.; Bijvelds, M. J. C.; de Jonge, H. R. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *52*, 192–200.
104. O'Sullivan, B. P.; Freedman, S. D. *The Lancet* **2009**, *373*, 1891–1904.
105. Fanconi, G.; Uehlinger, E.; Knauer, C. *Wien. Med. Wochenschr.* **1936**, *86*, 753–756.
106. Andersen, D. *Am. J. Dis. Child.* **1938**, *56*, 344–399.
107. Farber, S. *N. Engl. J. Med.* **1943**, *229*, 653–657.
108. Di Sant'agnese, P. A.; Darling, R. C.; Perera, G. A.; Shea, E. *Pediatrics* **1953**, *12*, 549–563.
109. Gibson, L. E.; Cooke, R. E. *Pediatrics* **1959**, *23*, 545–549.
110. Sheppard, D. N.; Welsh, M. J. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, S23–S45.
111. Li, H.; Cai, Z.; Chen, J.-H.; Ju, M.; Xu, Z.; Sheppard, D. N. *Sheng Li Xue Bao* **2007**, *59*, 416–430.
112. Kunzelmann, K. *Physiology* **2001**, *16*, 167–170.
113. Edelman, A.; Sausseureau, E. *Arch. Pédiatrie* **2012**, *19*, *Supplement 1*, S13–S16.
114. Schwiebert, E. M.; Benos, D. J.; Egan, M. E.; Stutts, M. J.; Guggino, W. B. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, S145–S166.
115. Tang, L.; Fatehi, M.; Linsdell, P. *J. Cystic Fibrosis* **2009**, *8*, 115–121.
116. Koeppen, B. M.; Stanton, B. A. *Berne and Levy Physiology*; 6th Edition.; Mosby, **2008**.
117. Poulsen, J. H.; Fischer, H.; Illek, B.; Machen, T. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 5340–5344.
118. Pezzulo, A. A.; Tang, X. X.; Hoegger, M. J.; Abou Alaiwa, M. H.; Ramachandran, S.; Moninger, T. O.; Karp, P. H.; Wohlford-Lenane, C. L.; Haagsman, H. P.; van Eijk, M.; Bánfi, B.; Horswill, A. R.; Stoltz, D. A.; McCray, P. B.; Welsh, M. J.; Zabner, J. *Nature* **2012**, *487*, 109–113.
119. Quinton, P. M. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2010**, *299*, C1222–C1233.
120. Kerem, B.; Rommens, J. M.; Buchanan, J. A.; Markiewicz, D.; Cox, T. K.; Chakravarti, A.; Buchwald, M.; Tsui, L. C. *Science* **1989**, *245*, 1073–1080.

121. Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J. L.; Ai, E. *Science* **1989**, *245*, 1066–1073.
122. Rommens, J. M.; Iannuzzi, M. C.; Kerem, B.; Drumm, M. L.; Melmer, G.; Dean, M.; Rozmahel, R.; Cole, J. L.; Kennedy, D.; Hidaka, N.; Ai, E. *Science* **1989**, *245*, 1059–1065.
123. Bell, S. C.; De Boeck, K.; Amaral, M. D. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *145*, 19–34.
124. Cheng, S. H.; Gregory, R. J.; Marshall, J.; Paul, S.; Souza, D. W.; White, G. A.; O’Riordan, C. R.; Smith, A. E. *Cell* **1990**, *63*, 827–834.
125. Dalemans, W.; Barbry, P.; Champigny, G.; Jallat, S.; Jallat, S.; Dott, K.; Dreyer, D.; Crystal, R. G.; Pavirani, A.; Lecocq, J.-P.; Lazdunski, M. *Nature* **1991**, *354*, 526–528.
126. Griesenbach, U.; Alton, E. W. F. W. *F1000Prime Rep* **2015**, *7*.
127. Becq, F.; Mall, M. A.; Sheppard, D. N.; Conese, M.; Zegarra-Moran, O. *J. Cystic Fibrosis* **2011**, *10*, S129–S145.
128. Ellgaard, L.; Helenius, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 181–191.
129. Helenius, A.; Aebi, M. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019–1049.
130. Lederkremer, G. Z. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 515–523.
131. Caramelo, J. J.; Parodi, A. J. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3379–3387.
132. Mellor, H. R.; Neville, D. C. A.; Harvey, D. J.; Platt, F. M.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 867–875.
133. Norez, C.; Antigny, F.; Noel, S.; Vandebrouck, C.; Becq, F. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *41*, 217–225.
134. Lubamba, B.; Lebacq, J.; Lebecque, P.; Vanbever, R.; Leonard, A.; Wallemacq, P.; Leal, T. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2009**, *179*, 1022–1028.
135. ClinicalTrials.gov. Effect of Miglustat on the Nasal Potential Difference in Patients With Cystic Fibrosis Homozygous for the F508del Mutation (MIGLUSTAT-CF) [en ligne]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02325362?term=zavesca&rank=3> (Consulté le 15.09.2015)
136. Aerts, J. M. F.; Boot, R. G. Improved treatment of cystic fibrosis. Brevet WO20077123403, **2007**.
137. Best, D.; Jenkinson, S. F.; Saville, A. W.; Alonzi, D. S.; Wormald, M. R.; Butters, T. D.; Norez, C.; Becq, F.; Blériot, Y.; Adachi, I.; Kato, A.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4170–4174.
138. Ardes-Guisot, N.; Alonzi, D. S.; Reinkensmeier, G.; Butters, T. D.; Norez, C.; Becq, F.; Shimada, Y.; Nakagawa, S.; Kato, A.; Blériot, Y.; Sollogoub, M.; Vauzeilles, B. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5373–5388.
139. da Cruz, F. P.; Newberry, S.; Jenkinson, S. F.; Wormald, M. R.; Butters, T. D.; Alonzi, D. S.; Nakagawa, S.; Becq, F.; Norez, C.; Nash, R. J.; Kato, A.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 219–223.
140. Alonzi, D. S.; Neville, D. C. A.; Lachmann, R. H.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 571–580.
141. Yoshida, Y.; Tanaka, K. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2010**, *1800*, 172–180.
142. Vallée, F.; Karaveg, K.; Herscovics, A.; Moremen, K. W.; Howell, P. L. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 41287–41298.
143. Daniel, P. F.; Winchester, B.; Warren, C. D. *Glycobiology* **1994**, *4*, 551–566.
144. Moremen, K.; Trimble, R. B.; Herscovics, A. *Glycobiology* **1994**, *4*, 113–125.
145. Elbein, A. D. *FASEB J.* **1991**, *5*, 3055–3063.
146. Amiri, M.; Naim, H. Y. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2012**, *35*, 949–954.

BIBLIOGRAPHIE

147. Sidelarbi, K.; Bertrand, J.; Joosten, A.; Stauffert, F.; Bodlenner, A.; Becq, F.; Compain, P.; Norez, C. (2015, mars). *Iminosugars acting as mannosidase inhibitors in CF: Design of multivalent correctors and identification of new pharmaceutical targets*. Poster présenté au ECFS Cystic Fibrosis Molecular & Cell Biology and Physiology Basic Science Working Group, Albufeira, Portugal.
148. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
149. Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
150. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
151. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
152. Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999.
153. Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715–2750.
154. Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
155. Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210–2215.
156. Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Díaz Díaz, D.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12705–12712.
157. Kuang, G.-C.; Guha, P. M.; Brotherton, W. S.; Simmons, J. T.; Stankee, L. A.; Nguyen, B. T.; Clark, R. J.; Zhu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13984–14001.
158. Straub, B. F. *Chem. Commun.* **2007**, 3868–3870.
159. Ahlquist, M.; Fokin, V. V. *Organometallics* **2007**, *26*, 4389–4391.
160. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340*, 457–460.
161. Lauria, A.; Delisi, R.; Mingoia, F.; Terenzi, A.; Martorana, A.; Barone, G.; Almerico, A. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 3289–3306.
162. Massarotti, A.; Aprile, S.; Mercalli, V.; Del Grosso, E.; Grosa, G.; Sorba, G.; Tron, G. C. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2497–2508.
163. Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278–308.
164. Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979.
165. Lee, S. G.; Yoon, Y.-J.; Park, K. H. *J. Heterocycl. Chem.* **1998**, *35*, 711–715.
166. Csuk, R.; Hugener, M.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 609–618.
167. Regeling, H.; de Rouville, E.; Chittenden, G. J. F. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, *106*, 461–464.
168. Fleet, G. W. J.; Ramsden, N. G.; Witty, D. R. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2871–2874.
169. O'Brien, J. L.; Tosin, M.; Murphy, P. V. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3353–3356.
170. Baxter, E. W.; Reitz, A. B. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3175–3185.
171. De Raadt, A.; Stütz, A. E. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 189–192.
172. Fleet, G. W. J.; Ramsden, N. G.; Witty, D. R. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 327–336.
173. Racine, E.; Bello, C.; Gerber-Lemaire, S.; Vogel, P.; Py, S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1766–1769.
174. Panday, N.; Meyyappan, M.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 513–538.
175. Overkleeft, H. S.; van Wiltenburg, J.; Pandit, U. K. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4215–4224.
176. Hoos, R.; Naughton, A. B.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1802–1807.
177. Colombeau, L.; Traoré, T.; Compain, P.; Martin, O. R. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8647–8650.
178. Chen, M.-Y.; Hsu, J.-L.; Shie, J.-J.; Fang, J.-M. *J. Chin. Chem. Soc.* **2003**, *50*, 129–133.
179. Albright, J. D.; Goldman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4214–4216.

180. Boucheron, C.; Compain, P.; Martin, O. R. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3081–3084.
181. Bruckner, R. *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*; Springer, Berlin, Heidelberg, **2010**.
182. Jagadish, B.; Sankaranarayanan, R.; Xu, L.; Richards, R.; Vagner, J.; Hruby, V. J.; Gillies, R. J.; Mash, E. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3310–3313.
183. Papp, I.; Dervede, J.; Enders, S.; Haag, R. *Chem. Commun.* **2008**, 5851–5853.
184. Mollard, A.; Zharov, I. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10172–10179.
185. a) Lepage, M. (2014). Conception et synthèse de nouvelles classes d'iminosucres d'intérêt biologique : ingénierie click pour des systèmes multivalents (Thèse de doctorat). Université de Strasbourg; b) Lepage, M. L.; Schneider, J. P.; Bodlenner, A.; Compain, P. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 10719–10733.
186. Creary, X.; Anderson, A.; Brophy, C.; Crowell, F.; Funk, Z. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8756–8761.
187. Nait Ajjou, A.; Ferguson, G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3719–3722.
188. Li, P.; Fong, W. M.; Chao, L. C. F.; Fung, S. H. C.; Williams, I. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4087–4090.
189. Kislukhin, A. A.; Hong, V. P.; Breitenkamp, K. E.; Finn, M. G. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 684–689.
190. Li, C.; Henry, E.; Mani, N. K.; Tang, J.; Brochon, J.-C.; Deprez, E.; Xie, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2395–2405.
191. Lepage, M. L.; Mirloup, A.; Ripoll, M.; Stauffert, F.; Bodlenner, A.; Ziessel, R.; Compain, P. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 659–667.
192. Duxbury, C. J.; Cummins, D.; Heise, A. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3795–3802.
193. Glaser, C. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1869**, *2*, 422–424.
194. Grabowski, G. A. *The Lancet* **2008**, *372*, 1263–1271.
195. Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 885–903.
196. Stirnemann, J.; Hamroun, D.; Bengherbia, M.; Yousfi, K.; Fantin, B.; Belmatoug, N. *Rev. Médecine Interne* **2015**, *36*, *Supplement 1*, A31.
197. Wennekes, T.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Boot, R. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8848–8869.
198. Cox, T. M. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2001**, *24*, 107–123.
199. Tamargo, R. J.; Velayati, A.; Goldin, E.; Sidransky, E. *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *106*, 257–263.
200. Gaucher, P. C. E. (1882). De l'épithélioma primitif de la rate. Hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie (Thèse de doctorat). Université de Paris.
201. Lieb, H. *Ztschr Physiol Chem* **1924**, *140*, 305–313.
202. Aghion, A. (1934). La maladie de gaucher dans l'enfance (Thèse de doctorat). Université de Paris.
203. Brady, R. O.; Kanfer, J. N.; Shapiro, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *18*, 221–225.
204. Dalbies, F.; Ianotto, J.-C.; Marion, V.; Berthou, C. *Hématologie* **2009**, *15*, 272–280.
205. American Society of Hematology Image Bank. Pseudo-Gaucher cells [en ligne]. Disponible sur : <http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=3494&AssetType=Asset> (Consulté le 02.09.2015)
206. Germain, D. P. *Pathol. Biol.* **2004**, *52*, 343–350.

BIBLIOGRAPHIE

207. GaucherFrance.fr. Quels sont les symptômes de ma maladie [en ligne]. Disponible sur : <http://www.gaucherfrance.fr/symptomes-de-ma-maladie-de-gaucher.html> (Consulté le 24.09.2015)
208. Orvisky, E.; Sidransky, E.; McKinney, C. E.; Lamarca, M. E.; Samimi, R.; Krasnewich, D.; Martin, B. M.; Ginns, E. I. *Pediatr. Res.* **2000**, *48*, 233–237.
209. Stirnemann, J. *Rev. Médecine Interne* **2008**, *29*, 176–178.
210. Hruska, K. S.; LaMarca, M. E.; Scott, C. R.; Sidransky, E. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 567–583.
211. Ramirez-Alvarado, M.; Kelly, J. W.; Dobson, C. M. *Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies*; John Wiley & Sons, **2010**.
212. Germain, D. P.; Puech, J.-P.; Caillaud, C.; Kahn, A.; Poenaru, L. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 415–427.
213. Schmitz, M.; Alfalah, M.; Aerts, J. M. F. G.; Naim, H. Y.; Zimmer, K.-P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 2310–2320.
214. Wei, R. R.; Hughes, H.; Boucher, S.; Bird, J. J.; Guziewicz, N.; Patten, S. M. V.; Qiu, H.; Pan, C. Q.; Edmunds, T. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 299–308.
215. Ron, I.; Horowitz, M. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 2387–2398.
216. Sawkar, A. R.; Adamski-Werner, S. L.; Cheng, W.-C.; Wong, C.-H.; Beutler, E.; Zimmer, K.-P.; Kelly, J. W. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1235–1244.
217. Beck, M. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 33–40.
218. Grabowski, G. A.; Hopkin, R. J. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2003**, *4*, 403–436.
219. Barton, N. W.; Brady, R. O.; Dambrosia, J. M.; Di Bisceglie, A. M.; Doppelt, S. H.; Hill, S. C.; Mankin, H. J.; Murray, G. J.; Parker, R. I.; Argoff, C. E.; Grewal, R. P.; Yu, K.-T. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1464–1470.
220. Deegan, P. B.; Cox, T. M. *Drug Des. Devel. Ther.* **2012**, *6*, 81–106.
221. Lieberman, R. L. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*.
222. Weinreb, N. J.; Charrow, J.; Andersson, H. C.; Kaplan, P.; Kolodny, E. H.; Mistry, P.; Pastores, G.; Rosenbloom, B. E.; Scott, C. R.; Wappner, R. S.; Zimran, A. *Am. J. Med.* **2002**, *113*, 112–119.
223. Berger, M. *Rev. Médecine Interne* **2015**, *36*, *Supplement 1*, A7–A8.
224. Van Dussen, L.; Biegstraaten, M.; Hollak, C. E.; Dijkgraaf, M. G. *Orphanet J. Rare Dis.* **2014**, *9*.
225. Vunnam, R. R.; Radin, N. S. *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *26*, 265–278.
226. Platt, F. M.; Neises, G. R.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8362–8365.
227. Cox, T.; Lachmann, R.; Hollak, C.; Aerts, J.; van Weely, S.; Hrebíček, M.; Platt, F.; Butters, T.; Dwek, R.; Moyses, C.; Gow, I.; Elstein, D.; Zimran, A. *The Lancet* **2000**, *355*, 1481–1485.
228. Platt, F. M.; Neises, G. R.; Reinkensmeier, G.; Townsend, M. J.; Perry, V. H.; Proia, R. L.; Winchester, B.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *Science* **1997**, *276*, 428–431.
229. Schiffmann, R.; FitzGibbon, E. J.; Harris, C.; DeVile, C.; Davies, E. H.; Abel, L.; Van Schaik, I. N.; Benko, W. S.; Timmons, M.; Ries, M.; Vellodi, A. *Ann. Neurol.* **2008**, *64*, 514–522.
230. Lopez, O.; Bols, M. dans *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*; Compain, P.; Martin, O. R., Eds.; Wiley, Chichester, **2007**; pp. 131–151.
231. Sinha, G. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 970–971.
232. Grogan, K. (2010, 13 janvier). FDA panel recommends new use of Actelion's Zavesca. *PharmaTimes*. Disponible sur : http://www.pharmatimes.com/article/10-01-13/FDA_panel_recommends_new_use_of_Actelion_s_Zavesca.aspx.
233. Fan, J.-Q. *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 1–11.

234. Tang, L.; Coales, S. J.; Morrow, J. A.; Edmunds, T.; Hamuro, Y. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2243–2250.
235. Babajani, G.; Tropak, M. B.; Mahuran, D. J.; Kermode, A. R. *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *106*, 323–329.
236. Schueler, U. H.; Kolter, T.; Kaneski, C. R.; Zirzow, G. C.; Sandhoff, K.; Brady, R. O. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2004**, *27*, 649–658.
237. Dlott, B.; d' Azzo, A.; Quon, D. V.; Neufeld, E. F. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17921–17927.
238. Hartl, F. U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. *Nature* **2011**, *475*, 324–332.
239. Ringe, D.; Petsko, G. A. *J. Biol.* **2009**, *8*.
240. Diamant, S.; Eliahu, N.; Rosenthal, D.; Goloubinoff, P. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39586–39591.
241. Smid, B. E.; Aerts, J. M. F. G.; Boot, R. G.; Linthorst, G. E.; Hollak, C. E. M. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2010**, *19*, 1367–1379.
242. Fan, J.-Q. dans *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*; Compain, P.; Martin, O. R., Eds.; Wiley, Chichester, **2007**; pp. 225–247.
243. Alfonso, P.; Pampín, S.; Estrada, J.; Rodríguez-Rey, J. C.; Giraldo, P.; Sancho, J.; Pocoví, M. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2005**, *35*, 268–276.
244. Chang, H.-H.; Asano, N.; Ishii, S.; Ichikawa, Y.; Fan, J.-Q. *FEBS J.* **2006**, *273*, 4082–4092.
245. Trapero, A.; Llebaria, A. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 573–590.
246. Yu, L.; Ikeda, K.; Kato, A.; Adachi, I.; Godin, G.; Compain, P.; Martin, O.; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736–7744.
247. Zhu, X.; Sheth, K. A.; Li, S.; Chang, H.-H.; Fan, J.-Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7450–7453.
248. Horne, G.; Wilson, F. X.; Tinsley, J.; Williams, D. H.; Storer, R. *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 107–118.
249. Fan, J.-Q.; Sheth, K.; Zhu, X. Hydroxy piperidine derivatives to treat gaucher disease. Brevet WO2005046612, **2005**.
250. Yu, Z.; Sawkar, A. R.; Whalen, L. J.; Wong, C.-H.; Kelly, J. W. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 94–100.
251. Steet, R. A.; Chung, S.; Wustman, B.; Powe, A.; Do, H.; Kornfeld, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 13813–13818.
252. Wang, G.-N.; Reinkensmeier, G.; Zhang, S.-W.; Zhou, J.; Zhang, L.-R.; Zhang, L.-H.; Butters, T. D.; Ye, X.-S. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3146–3149.
253. Fan, J.-Q.; Sheth, K.; Zhu, X. Glucoimidazole and polyhydroxycyclohexenyl amine derivatives to treat gaucher disease. Brevet WO2005046611, **2005**.
254. Egado-Gabás, M.; Canals, D.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 992–994.
255. Trapero, A.; González-Bulnes, P.; Butters, T. D.; Llebaria, A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4479–4488.
256. Serra-Vinardell, J.; Díaz, L.; Casas, J.; Grinberg, D.; Vilageliu, L.; Michelakakis, H.; Mavridou, I.; Aerts, J. M. F. G.; Decroocq, C.; Compain, P.; Delgado, A. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1744–1754.
257. Dvir, H.; Harel, M.; McCarthy, A. A.; Toker, L.; Silman, I.; Futerman, A. H.; Sussman, J. L. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 704–709.
258. Fan, J.-Q.; Ishii, S.; Asano, N. Method for increasing the activity of lysosomal enzymes. Brevet US20070021381, **2007**.
259. Schönemann, W.; Gallienne, E.; Ikeda-Obatake, K.; Asano, N.; Nakagawa, S.; Kato, A.; Adachi, I.; Górecki, M.; Frelek, J.; Martin, O. R. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1805–1817.

BIBLIOGRAPHIE

260. Khanna, R.; Benjamin, E. R.; Pellegrino, L.; Schilling, A.; Rigat, B. A.; Soska, R.; Nafar, H.; Ranes, B. E.; Feng, J.; Lun, Y.; Powe, A. C.; Palling, D. J.; Wustman, B. A.; Schiffmann, R.; Mahuran, D. J.; Lockhart, D. J.; Valenzano, K. J. *FEBS J.* **2010**, *277*, 1618–1638.
261. Stütz, A. E.; Wrodnigg, T. M. *Curr. Enzyme Inhib.* **2012**, *8*, 47–99.
262. Boyd, R. E.; Lee, G.; Rybczynski, P.; Benjamin, E. R.; Khanna, R.; Wustman, B. A.; Valenzano, K. J. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2705–2725.
263. Tropak, M. B.; Kornhaber, G. J.; Rigat, B. A.; Maegawa, G. H.; Buttner, J. D.; Blanchard, J. E.; Murphy, C.; Tuske, S. J.; Coales, S. J.; Hamuro, Y.; Brown, E. D.; Mahuran, D. J. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2650–2662.
264. Maegawa, G. H. B.; Tropak, M. B.; Buttner, J. D.; Rigat, B. A.; Fuller, M.; Pandit, D.; Tang, L.; Kornhaber, G. J.; Hamuro, Y.; Clarke, J. T. R.; Mahuran, D. J. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23502–23516.
265. Luan, Z.; Li, L.; Higaki, K.; Nanba, E.; Suzuki, Y.; Ohno, K. *Brain Dev.* **2013**, *35*, 317–322.
266. Zimran, A.; Altarescu, G.; Elstein, D. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2013**, *50*, 134–137.
267. Goldin, E.; Zheng, W.; Motabar, O.; Southall, N.; Choi, J. H.; Marugan, J.; Austin, C. P.; Sidransky, E. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29861.
268. Patnaik, S.; Zheng, W.; Choi, J. H.; Motabar, O.; Southall, N.; Westbroek, W.; Lea, W. A.; Velayati, A.; Goldin, E.; Sidransky, E.; Leister, W.; Marugan, J. J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5734–5748.
269. Kuriyama, C.; Kamiyama, O.; Ikeda, K.; Sanae, F.; Kato, A.; Adachi, I.; Imahori, T.; Takahata, H.; Okamoto, T.; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7330–7336.
270. Oulaïdi, F.; Front-Deschamps, S.; Gallienne, E.; Lesellier, E.; Ikeda, K.; Asano, N.; Compain, P.; Martin, O. R. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 353–361.
271. Pang, Y.-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646–23649.
272. Banerjee, A. L.; Eiler, D.; Roy, B. C.; Jia, X.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K. *Biochemistry (Mosc.)* **2005**, *44*, 3211–3224.
273. Díaz, L.; Bujons, J.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5248–5255.
274. Decroocq, C. (2012). Conception et synthèse de nouvelles classes d'iminosucres d'intérêt thérapeutique : chimie click, multivalence et maladies génétiques rares (Thèse de doctorat, Université de Strasbourg). Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01124060>
275. Schwörer, C. J.; Oberthür, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 6129–6139.
276. Front, S.; Court, N.; Bourigault, M.-L.; Rose, S.; Ryffel, B.; Erard, F.; Quesniaux, V. F. J.; Martin, O. R. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2081–2093.
277. Johnston, J. N.; Paquette, L. A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4341–4344.
278. Smith, A. B.; Rivero, R. A.; Hale, K. J.; Vaccaro, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2092–2112.
279. Falentin, C.; Beaupère, D.; Demailly, G.; Stasik, I. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5364–5366.
280. Soucy, F.; Grenier, L.; Behnke, M. L.; Destree, A. T.; McCormack, T. A.; Adams, J.; Plamondon, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9967–9976.
281. Godskesen, M.; Lundt, I.; Madsen, R.; Winchester, B. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1857–1865.
282. Chaudhuri, N. C.; Moussa, A.; Stewart, A.; Wang, J.; Storer, R. *Org. Process Res. Dev.* **2005**, *9*, 457–465.
283. Hu, G.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 2405–2433.
284. Lundt, I.; Madsen, R.; Daher, S. A.; Winchester, B. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7513–7520.
285. Dobson, T. A.; Davis, M. A.; Hartung, A. M. *Can. J. Chem.* **1968**, *46*, 3391–3397.

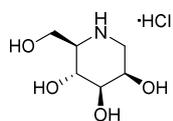
286. Goldup, S. M.; Leigh, D. A.; Long, T.; McGonigal, P. R.; Symes, M. D.; Wu, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15924–15929.
287. Rawlings, A. J.; Lomas, H.; Pilling, A. W.; Lee, M. J.-R.; Alonzi, D. S.; Rountree, J. S. S.; Jenkinson, S. F.; Fleet, G. W. J.; Dwek, R. A.; Jones, J. H.; Butters, T. D. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1101–1105.
288. Oulaïdi, F. (2011). Conception et synthèse d'iminoglycolipides comme inhibiteurs d'enzymes lysosomales à effet chaperon pharmacologique (Thèse de doctorat, Université d'Orléans). Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00623109>
289. Zhang, G.-L.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5062–5068.
290. Deng, L.; Norberg, O.; Uppalapati, S.; Yan, M.; Ramström, O. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3188–3198.
291. Fan, J.; Zeng, F.; Wu, S.; Wang, X. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 4126–4137.
292. Bongers, K. M.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. P.; Oosterom, J.; Timmers, C. M.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4841–4856.
293. Hansen, S. G.; Jensen, H. H. *Synlett* **2009**, *2009*, 3275–3276.
294. Sanders, B. C.; Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbua, N. E.; Arumugam, S.; Guo, J.; Boltje, T. J.; Popik, V. V.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 949–957.
295. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*; Portland Press Ltd, London, **1995**.
296. Segel, I. H. *Enzyme kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*; Wiley, New-York, **1975**.
297. Keillor, J. W. (2005). BCM 2504 - Enzymologie. Inhibition des réactions enzymatiques (Recueil de cours). Université de Montréal.
298. Burlingham, B. T.; Widlanski, T. S. *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 214.
299. Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
300. Jenkinson, S. F.; Fleet, G. W. J.; Nash, R. J.; Koike, Y.; Adachi, I.; Yoshihara, A.; Morimoto, K.; Izumori, K.; Kato, A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4064–4067.
301. Serra-Vinardell, J.; Díaz, L.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sánchez-Ollé, G.; Bujons, J.; Michelakakis, H.; Mavridou, I.; Aerts, J. M. F. G.; Delgado, A.; Grinberg, D.; Vilageliu, L.; Casas, J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *54*, 245–254.
302. Hurd, C. D.; Bonner, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 1972–1977.
303. Nicotra, F. dans *Glycoscience Synthesis of Substrate Analogs and Mimetics*; Driguez, H.; Thiem, J., Eds.; Topics in Current Chemistry Vol. 187; Springer, Berlin, Heidelberg, **1997**; pp. 55–83.
304. Moore, R. E.; Scheuer, P. J. *Science* **1971**, *172*, 495–498.
305. Moore, R. E.; Bartolini, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2491–2494.
306. Ramos, V.; Vasconcelos, V. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2021–2037.
307. Levy, D. E.; Tang, C. *The Chemistry of C-glycosides*; Elsevier, New York, **1995**.
308. Postema, M. *C-Glycoside Synthesis*; CRC Press, **1995**.
309. Dondoni, A.; Marra, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546–7557.
310. Dondoni, A.; Kleban, M.; Hu, X.; Marra, A.; Banks, H. D. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4722–4733.
311. Pérez-Balderas, F.; Hernández-Mateo, F.; Santoyo-González, F. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9338–9348.
312. Miller, G. J.; Gardiner, J. M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5262–5265.
313. Nolting, B.; Yu, J.-J.; Liu, G.; Cho, S.-J.; Kauzlarich, S.; Gervay-Hague, J. *Langmuir* **2003**, *19*, 6465–6473.

BIBLIOGRAPHIE

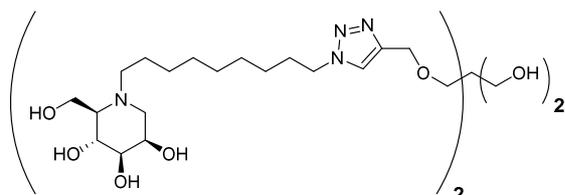
314. Arya, P.; Kutterer, K. M. K.; Qin, H.; Roby, J.; Barnes, M. L.; Lin, S.; Lingwood, C. A.; Peter, M. G. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2823–2833.
315. Iehl, J.; Nierengarten, J.-F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7306–7309.
316. Decroocq, C.; Laparra, L. M.; Rodríguez-Lucena, D.; Compain, P. *J. Carbohydr. Chem.* **2011**, *30*, 559–574.
317. Hosomi, A.; Sakata, Y.; Sakurai, H. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2383–2386.
318. Šmejkal, T.; Breit, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 311–315.
319. Hosomi, A.; Sakata, Y.; Sakurai, H. *Carbohydr. Res.* **1987**, *171*, 223–232.
320. McGarvey, G. J.; LeClair, C. A.; Schmidtman, B. A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4727–4730.
321. Brenna, E.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Serra, S.; Zambotti, S. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1872–1878.
322. Chatterjee, A. K.; Choi, T.-L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360–11370.
323. O’Doherty, I.; Yim, J. J.; Schmelz, E. A.; Schroeder, F. C. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5900–5903.
324. Schmidt, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 1865–1880.
325. Hong, S. H.; Day, M. W.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7414–7415.
326. McGrath, D. V.; Grubbs, R. H. *Organometallics* **1994**, *13*, 224–235.
327. Hong, S. H.; Sanders, D. P.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17160–17161.
328. Csjernyik, G.; Éll, A. H.; Fadini, L.; Pugin, B.; Bäckvall, J.-E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1657–1662.
329. Nierengarten, J.-F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Muñoz, A.; Martín, N.; Rojo, J.; Sánchez-Navarro, M.; Cecioni, S.; Vidal, S.; Buffet, K.; Durka, M.; Vincent, S. P. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3860–3862.
330. Snaith, S. M. *Biochem. J.* **1975**, *147*, 83–90.
331. Marra, A.; Zelli, R.; D’Orazio, G.; La Ferla, B.; Dondoni, A. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 9387–9393.
332. Heck, M.-P.; Vincent, S. P.; Murray, B. W.; Bellamy, F.; Wong, C.-H.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1971–1979.
333. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
334. Dang, H.-S.; Roberts, B. P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1161–1170.
335. Kapeller, D. C.; Hammerschmidt, F. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 591–598.
336. Mandal, S.; Sharma, N.; Mukhopadhyay, B. *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21*, 2172–2176.
337. Yamakoshi, H.; Kanoh, N.; Kudo, C.; Sato, A.; Ueda, K.; Muroi, M.; Kon, S.; Satake, M.; Ohori, H.; Ishioka, C.; Oshima, Y.; Osada, H.; Chiba, N.; Shibata, H.; Iwabuchi, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 273–276.
338. Li, H.; Zhu, Z.; Fahrenbach, A. C.; Savoie, B. M.; Ke, C.; Barnes, J. C.; Lei, J.; Zhao, Y.-L.; Lilley, L. M.; Marks, T. J.; Ratner, M. A.; Stoddart, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 456–467.
339. Burns, D. H.; Chan, H.; Miller, J. D.; Jayne, C. L.; Eichhorn, D. M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5185–5196.
340. Liu, Y.; Kuzuya, A.; Sha, R.; Guillaume, J.; Wang, R.; Canary, J. W.; Seeman, N. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10882–10883.
341. Kitto, H. J.; Schwartz, E.; Nijemeisland, M.; Koepf, M.; Cornelissen, J. J. L. M.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 5615–5624.
342. Bernardes, G. J. L.; Grayson, E. J.; Thompson, S.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; El Oualid, F.; Claridge, T. D. W.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244–2247.

**INDEX DES
COMPOSÉS
SYNTHÉTISÉS**

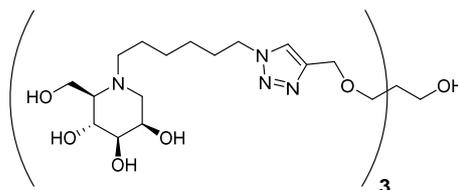
N° du composé (N° de page dans la partie théorique, N° de page dans la partie expérimentale)



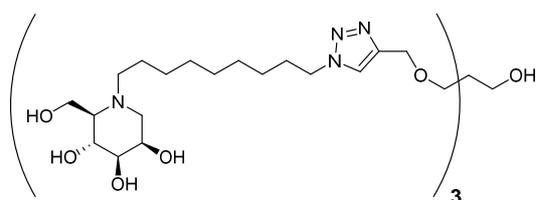
3-HCl (61, 179)



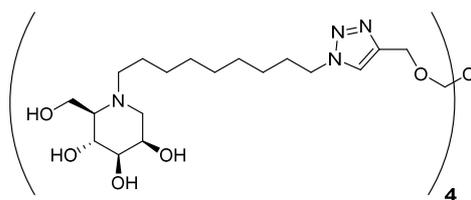
47b (66, 188)



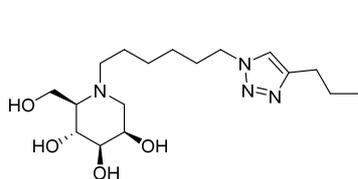
48a (65, 184)



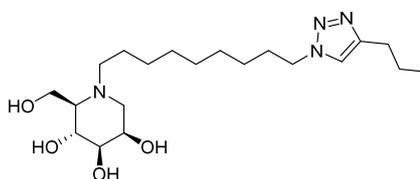
48b (65, 185)



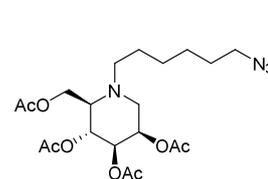
49b (66, 186)



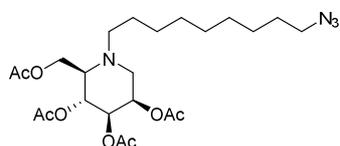
50a (68, 190)



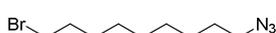
50b (68, 189)



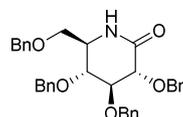
51a (62, 180)



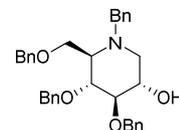
51b (62, 181)



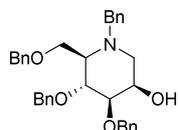
52b (62, 180)



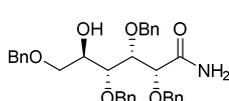
74a (58, 176)



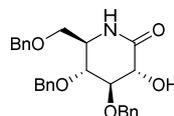
75 (60, 178)



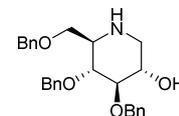
76 (60, 179)



77 (58, 176)

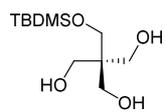


79 (59, 177)

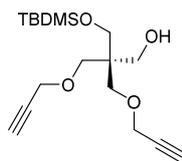


80 (60, 177)

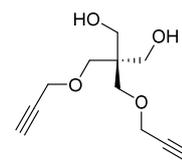
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS



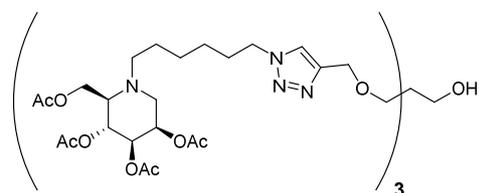
83 (63, 181)



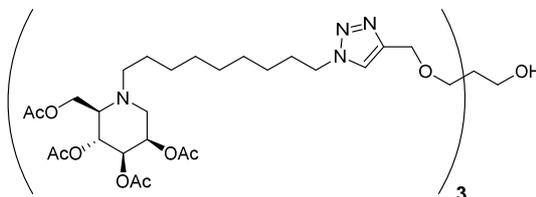
85 (63, 182)



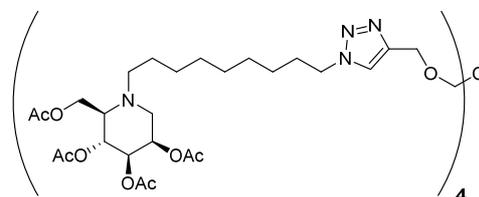
87 (63, 182)



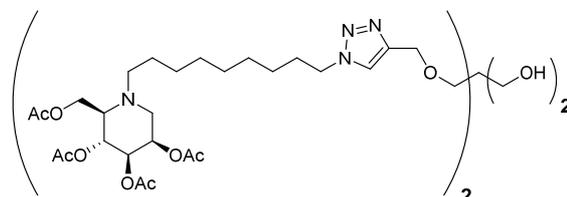
88a (65, 183)



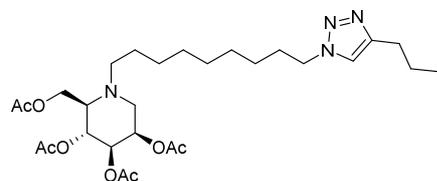
88b (65, 184)



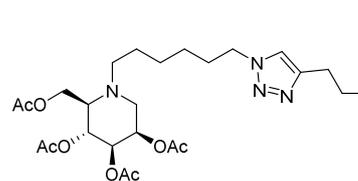
88c (66, 186)



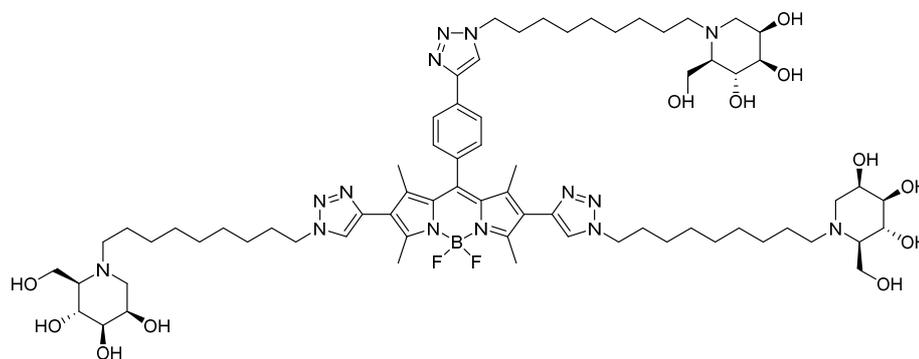
88d (66, 187)



89 (67, 188)



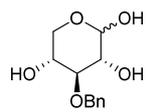
92 (68, 189)



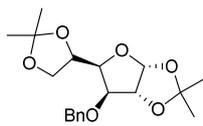
96: R = OH (77, 192)

100: R = Ac (76, 191)

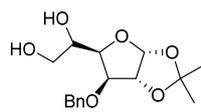
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS



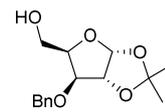
136 (110, 194)



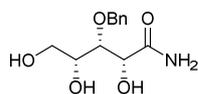
137 (109, 193)



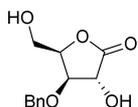
138 (109, 193)



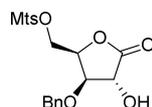
140 (109, 194)



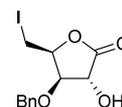
141 (111, 195)



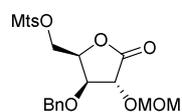
145 (115, 195)



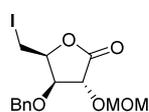
146a (115, 196)



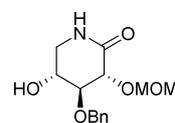
146b (116, 197)



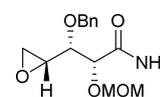
147a (115, 196)



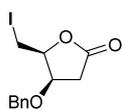
147b (117, 198)



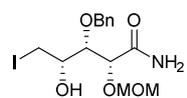
148 (117, 199)



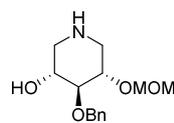
149 (115, 198)



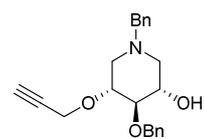
150 (115, 197)



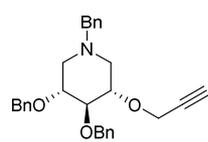
151 (117, 199)



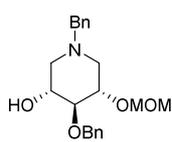
152 (119, 200)



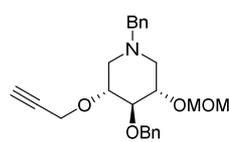
153 (119, 202)



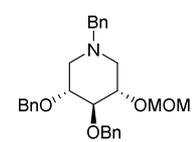
154 (120, 204)



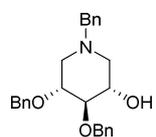
155 (119, 201)



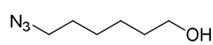
156 (119, 201)



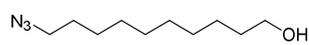
157 (120, 202)



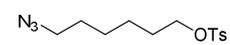
158 (120, 203)



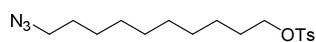
159 (120, 204)



160 (120, 205)

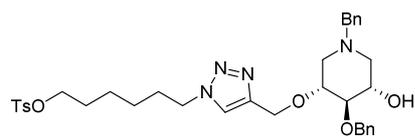


161 (120, 205)

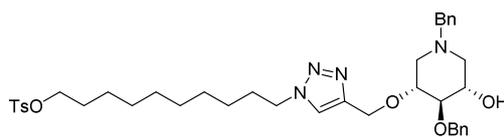


162 (120, 205)

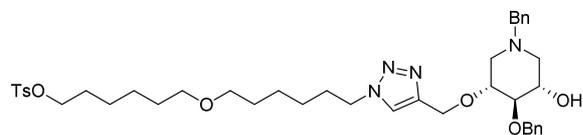
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS



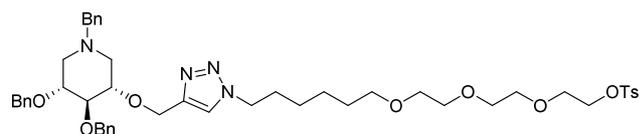
163a (121, 213)



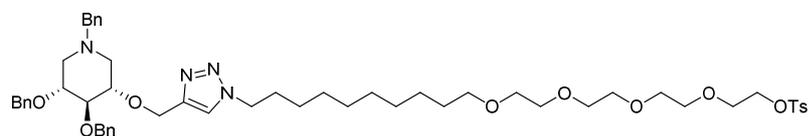
163b (121, 213)



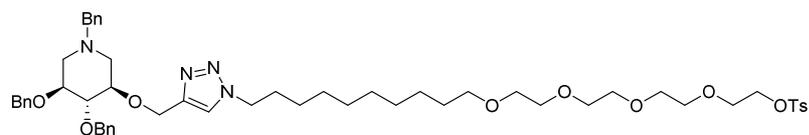
163c (127, 218)



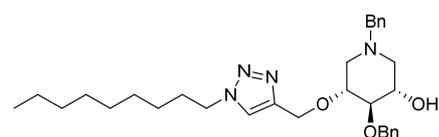
163d (128, 220)



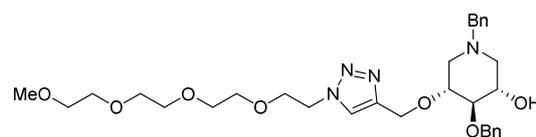
163e (128, 221)



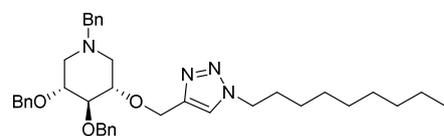
163g (130, 226)



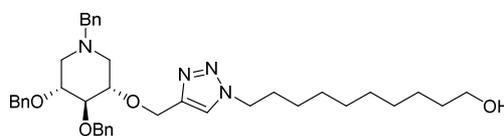
163h (131, 228)



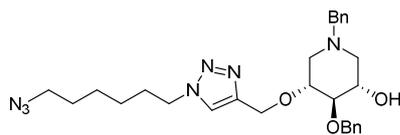
163i (131, 229)



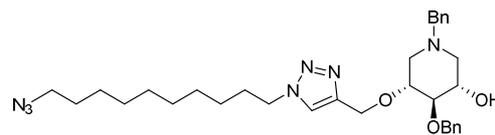
163j (132, 230)



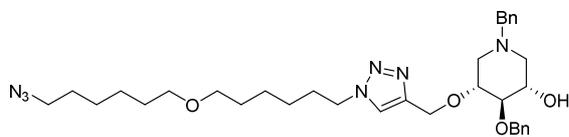
163k (132, 232)



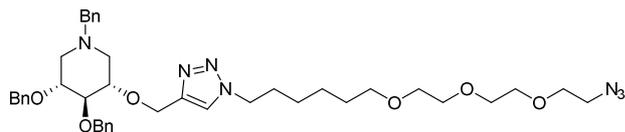
164a (121, 214)



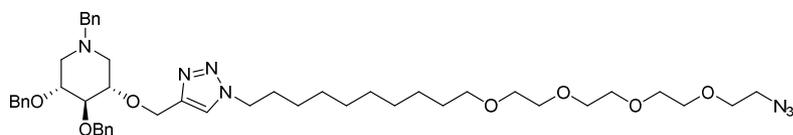
164b (121, 214)



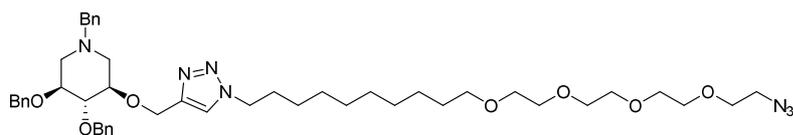
164c (127, 218)



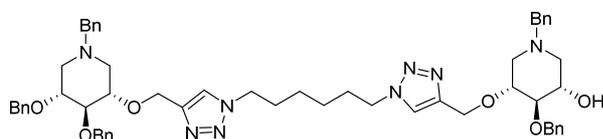
164d (128, 221)



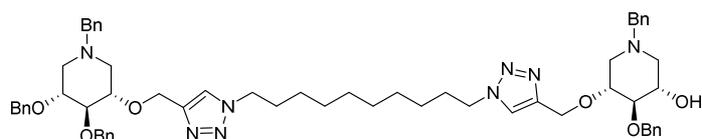
164e (128, 222)



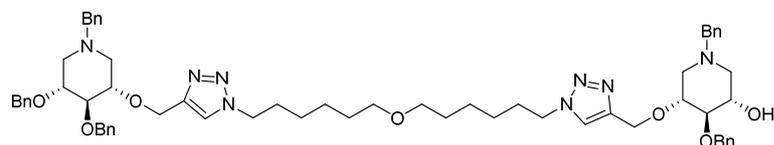
164g (130, 227)



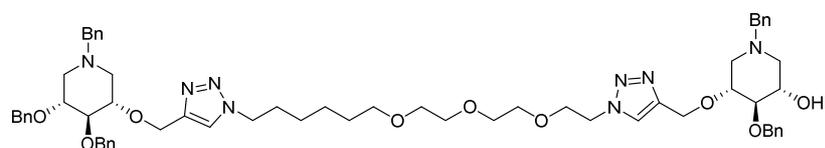
165a (121, 215)



165b (121, 215)

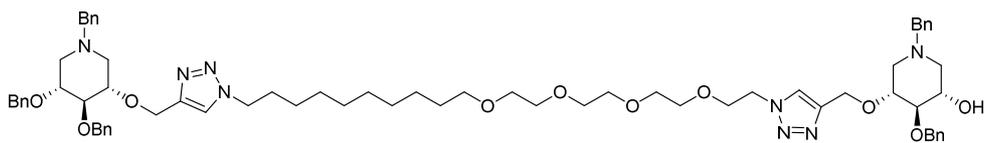


165c (127, 219)

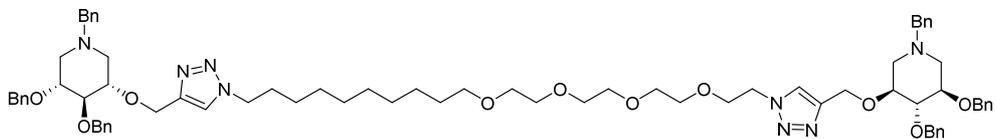


165d (128, 222)

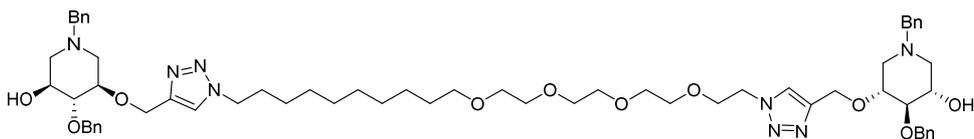
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS



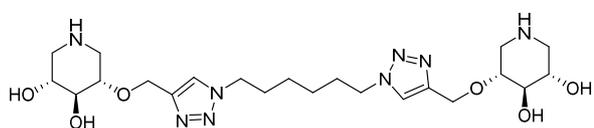
165e (128, 223)



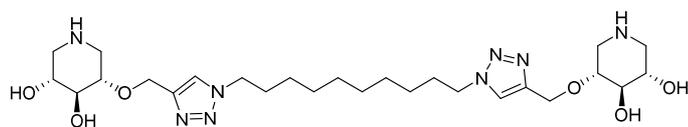
165f (130, 225)



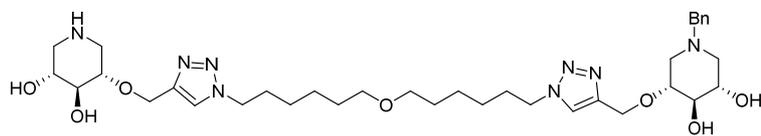
165g (130, 227)



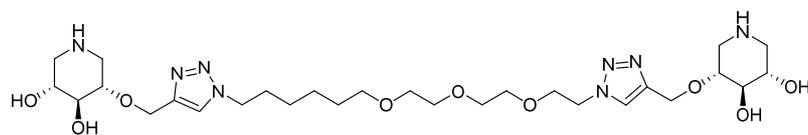
166a (122, 216)



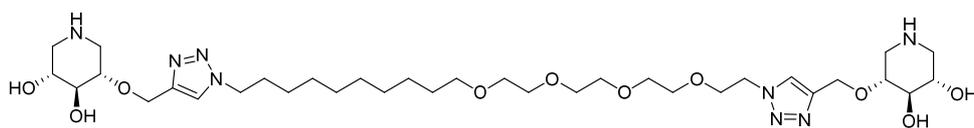
166b (123, 217)



166c (127, 219)

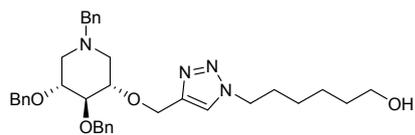


166d (129, 224)

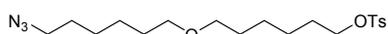


166e (129, 224)

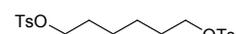
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS



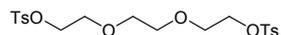
169 (125, 217)



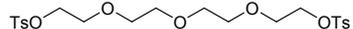
171 (126, 206)



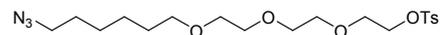
172 (126, 206)



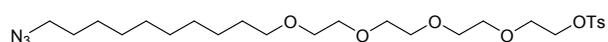
173 (128, 207)



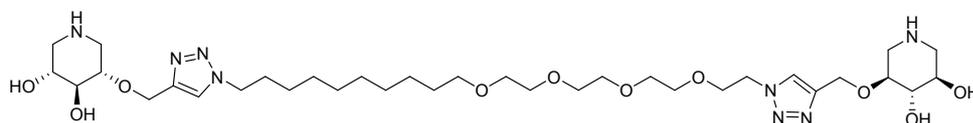
174 (128, 207)



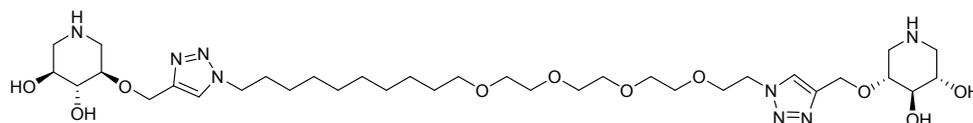
175 (128, 208)



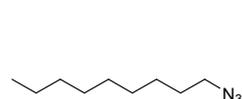
176 (128, 208)



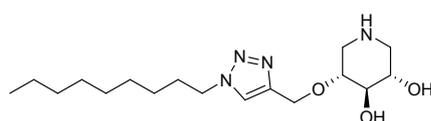
177 (130, 225)



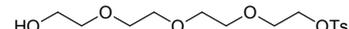
178 (130, 228)



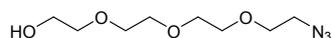
179 (131, 209)



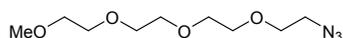
180 (131, 229)



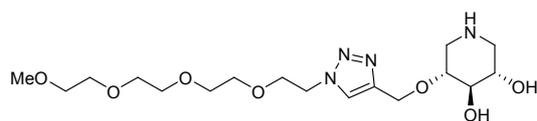
181 (131, 209)



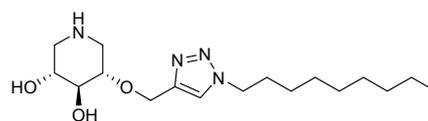
182 (131, 209)



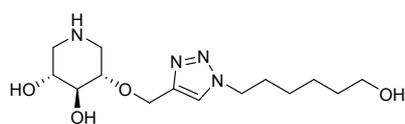
183 (131, 210)



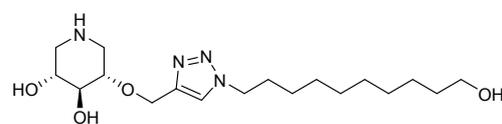
184 (131, 230)



185 (132, 231)

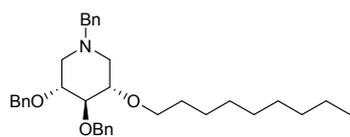


186 (132, 231)

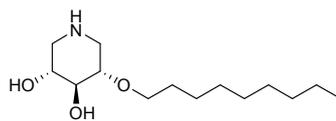


187 (132, 232)

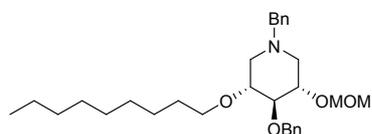
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS



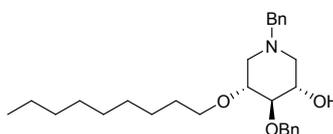
188 (132, 233)



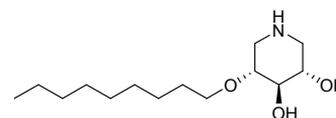
189 (132, 233)



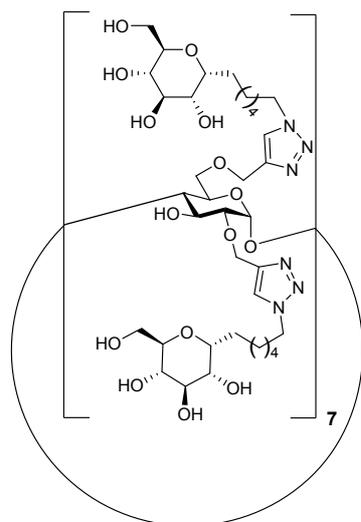
190 (133, 234)



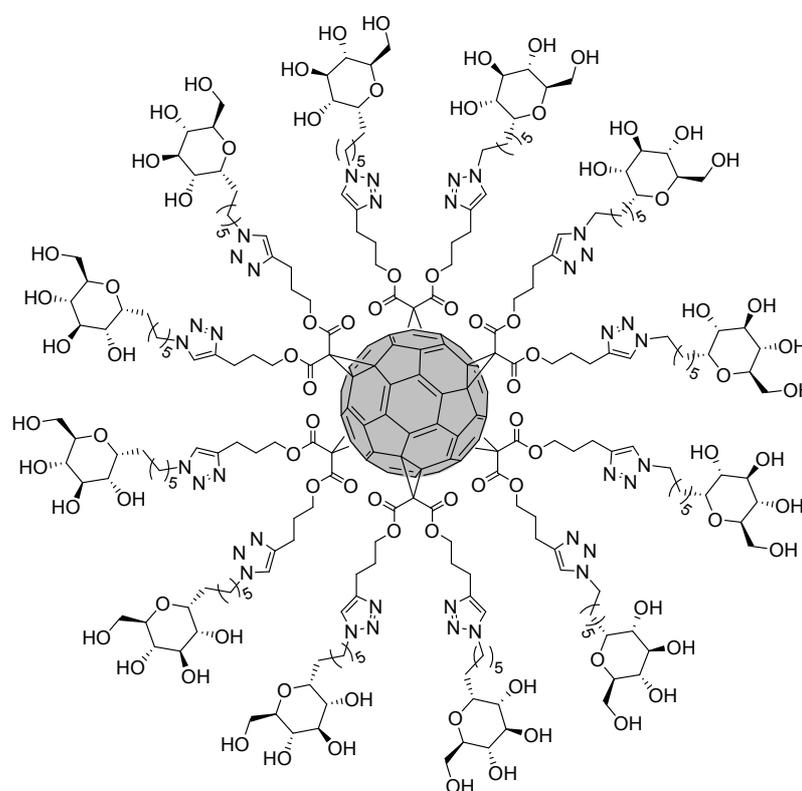
191 (133, 235)



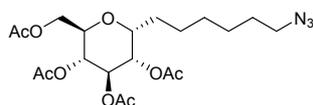
192 (133, 235)



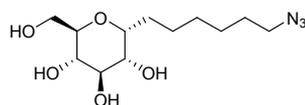
196 (166, 243)



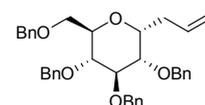
197 (167, 244)



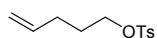
198 (163, 239)



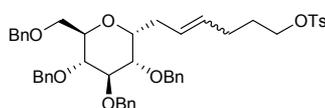
201 (163, 240)



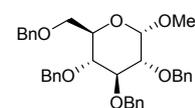
202α (159, 237)



203 (158, 236)

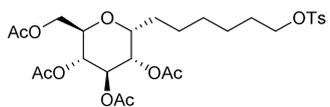


204 (163, 238)

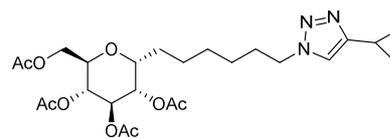


205 (159, 236)

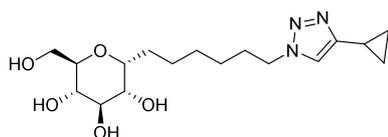
INDEX DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS



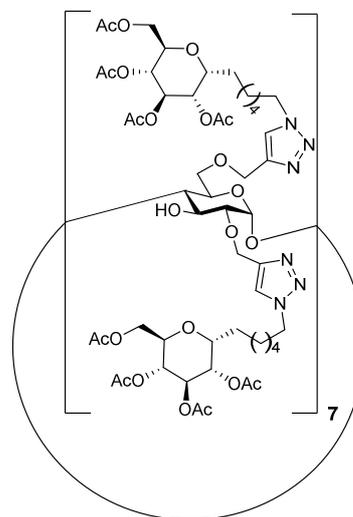
208 (163, 238)



211 (165, 240)



212 (162, 241)



213 (166, 242)

Conception et Synthèse d'Iminosucres Di- à Tétravalents comme Sondes Mécanistiques et Agents Thérapeutiques Potentiels

Résumé

Dans un contexte où les iminosucres multivalents représentent, en tant qu'inhibiteurs puissants de glycosidases, des structures privilégiées pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à ce type de composés pour le traitement de deux maladies génétiques rares. Le premier axe de recherche a consisté à synthétiser des iminosucres di- à tétravalents en série 1-déoxymannojirimycine dans le but d'inhiber l' α 1,2-mannosidase I du réticulum endoplasmique qui est impliquée dans la destruction de la protéine delF508-CFTR chez les malades atteints de la mucoviscidose. Un effet multivalent fort sur la correction de cette protéine mutée a alors été mis en évidence avec un composé trivalent basé sur le pentaérythritol. Efficace à des concentrations submicromolaires, ce dernier s'est montré 140 fois plus efficace que le modèle monovalent correspondant. Le second axe de recherche a consisté à identifier de nouveaux chaperons pharmacologiques de la β -glucocérébrosidase, l'enzyme lysosomale impliquée dans la maladie de Gaucher. Pour cela, nous avons préparé une série d'iminosucres hétérodivalents conçus pour cibler simultanément le site actif et un site secondaire de cette enzyme. Même si cet objectif n'a pas encore été atteint, nous avons malgré tout mis en évidence des chaperons monovalents capables de quasiment quadrupler l'activité de la β -glucocérébrosidase portant la mutation G202R. En marge de ces deux axes principaux, une sonde mécanistique basée sur un C-glycoside multivalent a également été développée dans le but de préciser les mécanismes à l'origine des effets multivalents puissants observés pour l'inhibition des glycosidases.

Mots clés : Iminosucres, Multivalence, Inhibiteurs de glycosidase, Mucoviscidose, Protéine CFTR, Correcteur, Maladie de Gaucher, β -Glucocérébrosidase, Chaperons pharmacologiques, Chimie click, C-Glycoside.

Abstract

Because multivalent iminosugars represent, as potent glycosidase inhibitors, privileged structures for the design of novel drugs, we took a particular interest in this class of compounds for the treatment of two rare genetic diseases. The first research topic was dedicated to the synthesis of di- to tetravalent iminosugars in the 1-deoxymannojirimycin series in order to inhibit the endoplasmic reticulum α 1,2-mannosidase I involved in the destruction of delF508-CFTR, the mutant protein responsible of cystic fibrosis. A strong multivalent effect for restoring its activity in cells was reported with a trivalent analogue based on pentaerythritol. This submicromolar corrector was found to be 140-fold more potent than the corresponding monovalent model. The second research topic focused on the identification of novel pharmacological chaperones of the β -glucocerebrosidase, the lysosomal enzyme involved in Gaucher's disease. For this purpose, we developed a series of heterodivalent iminosugars designed to both bind to the active site and a secondary site of the enzyme. This goal could not be reached yet, nevertheless we identified monovalent chaperones which were able to fourfold increase β -glucocerebrosidase activity in G202R cell lines. Next to these main research topics, a mechanistic probe based on a multivalent C-glycoside was also developed to investigate the multivalent effect of iminosugar clusters in glycosidase inhibition.

Key words : Iminosugars, Multivalency, Glycosidase inhibitors, Cystic fibrosis, CFTR corrector, Gaucher's disease, β -Glucocerebrosidase, Pharmacological chaperones, C-Glycoside, Click chemistry.