

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE – URCA

UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES-TECHNOLOGIES-SANTÉ

Année 2007

N°

DOCTORAT DE CHIMIE ORGANIQUE

ALINE BANCHET

Alcynylation d'aldéhydes chiraux dérivés de sucres.

Application à la synthèse d'un analogue

C-Glycosidique d'une molécule bioactive

Thèse soutenue le **16 novembre 2007** à **semi huis-clos**

Jury :

Pr Pierre SINAÏ	<i>Président</i>
Pr Peter GOEKJIAN	<i>Rapporteur</i>
Dr Jean SUFFERT	<i>Rapporteur</i>
Dr Norbert HOFFMANN	<i>Examineur</i>
Pr Jan SZYMONIAK	<i>Examineur</i>
Pr Arnaud HAUDRECHY	<i>Directeur de thèse</i>

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE – URCA

UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES-TECHNOLOGIES-SANTÉ

Année 2007

N°

DOCTORAT DE CHIMIE ORGANIQUE

ALINE BANCHET

Alcynylation d'aldéhydes chiraux dérivés de sucres.

Application à la synthèse d'un analogue

C-Glycosidique d'une molécule bioactive

Thèse soutenue le **16 novembre 2007** à **semi huis-clos**

Jury :

Pr Pierre SINAÏ	<i>Président</i>
Pr Peter GOEKJIAN	<i>Rapporteur</i>
Dr Jean SUFFERT	<i>Rapporteur</i>
Dr Norbert HOFFMANN	<i>Examineur</i>
Pr Jan SZYMONIAK	<i>Examineur</i>
Pr Arnaud HAUDRECHY	<i>Directeur de thèse</i>

NOM BANCHET
PRENOM ALINE
SUJET ALCYNYLATION D'ALDÉHYDES CHIRAUX DÉRIVÉS DE SUCRES.
APPLICATION À LA SYNTHÈSE D'UN ANALOGUE C-GLYCOSIDIQUE
D'UNE MOLÉCULE BIOACTIVE

Dans notre laboratoire, nous avons récemment développé une stratégie de synthèse de C-glycosides basée sur une addition Nucléophile stéréosélective suivie d'une Ouverture régiosélective d'un Époxyde : la stratégie **NOÉ**.

Par cette méthode, les composés désirés peuvent être obtenus avec succès par addition d'organozinciques sur des époxyaldéhydes chiraux conduisant aux alcools propargyliques 1,2-*syn* intermédiaires, suivie d'une cyclisation *in situ*. Cette séquence a été étudiée sur les 2,3-dialkoxyaldéhydes dérivés du D-Galactose et du D-Mannose en présence de divers nucléophiles fonctionnalisés (alcynures, indoles lithiés). Dans le cas du D-Galactose, la synthèse stéréosélective d' α -C-Galactosides attendus a été accomplie. Par contre, de façon inattendue, la série D-Mannose conduit aux furanes et à un mélange d' α,β -C-Mannosides après un traitement acide de l'alcool 1,2-*syn* intermédiaire.

Durant nos études, nous avons également tiré profit d'une réaction secondaire afin de synthétiser des thiosucres.

Enfin, la stratégie NOÉ a également été appliquée comme réaction clé à la synthèse d'un analogue α -C-Galactosidique particulier d'un glycolipide bioactif, le KRN 7000.

MOTS CLÉS STRATEGIE NOÉ, ALCYNYLATION, 2,3-DIALKOXYALDÉHYDES CHIRAUX, KRN 7000, ANALOGUE C-GLYCOSIDIQUE, THIOSUCRES

Ce travail a été réalisé à :

Faculté des Sciences de Reims Champagne-Ardenne
UMR 6519, Laboratoire Réactions Sélectives et Applications, Equipe Glycosynthèse
Bât.18, Moulin de la Housse
Boîte 44, BP 1039
51687 REIMS Cedex 2

...et a donné lieu à 3 publications et à la préparation d'un dossier de valorisation.

- 1) Guillaume S., Plé K., Banchet A., Liard A., Haudrechy A. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2355-2403
- 2) Banchet A., Guillaume S., Haudrechy A. *Synlett* **2007**, 9, 1467-1469
- 3) Nuzillard J.-M., Banchet A., Haudrechy A. *J. Chem. Inf. and Mod.* **2007**, 47, 5, 1979-1985

Une quatrième publication est actuellement en préparation sur les résultats obtenus en modélisation moléculaire.

SURNAME BANCHET
FORNAME ALINE
SUBJECT ALKYNYLATION OF CHIRAL ALDEHYDES DERIVED FROM SUGARS.
SYNTHESIS OF A C-GLYCOSIDE ANALOGUE OF A BIOACTIVE
COMPOUND

In our laboratory, we have recently developed a synthetic strategy for the synthesis of C-glycosides based on a stereoselective Nucleophilic addition followed by a regioselective Epoxide Opening; the NEO strategy.

With this method, the desired compounds can be successfully obtained by alkynylorganozinc addition to chiral epoxy aldehydes to give 1,2-*syn* propargylic alcohol intermediates, followed by *in situ* cyclization. The starting 2,3-dialkoxyaldehydes are obtained from sugar derivatives. This reaction sequence has been studied with D-Galactose and D-Mannose derived epoxyaldehydes in the presence of diverse functionalized nucleophiles (alkynylides, lithiated indoles). In the case of D-Galactose, the stereoselective synthesis of the desired α -C-glycosides was achieved. Unexpectedly, the use of D-Mannose lead to furans and a mixture of α,β -C-mannosides after acidic treatment of the isolated 1,2-*syn* alcohol intermediate.

During our studies, we also made good use of a side reaction leading to thiosugars.

Finally, the NEO strategy was also applied as a key reaction sequence to the synthesis of a particular α -C-Galactoside analogue of the bioactive glycolipid KRN 7000.

KEY WORDS NEO STRATEGY, ALKYNYLATION, CHIRAL 2,3-DIALKOXYALDEHYDES, KRN 7000, C-GLYCOSIDE ANALOGUE, THIOSUGARS

This work has made at :

Faculté des Sciences de Reims Champagne-Ardenne
UMR 6519, Laboratoire Réactions Sélectives et Applications, Equipe Glycosynthèse
Bât.18, Moulin de la Housse
Boîte 44, BP 1039
51687 REIMS Cedex 2
France

Three publications have been produced and a patent is in progress.

- 1) Guillarme S., Plé K., Banchet A., Liard A., Haudrechy A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2355-2403
- 2) Banchet A., Guillarme S., Haudrechy A. *Synlett* **2007**, *9*, 1467-1469
- 3) Nuzillard J.-M., Banchet A., Haudrechy A. *J. Chem. Inf. and Mod.* **2007**, *47*, 5, 1979-1985

A fourth publication is in progress about results obtained by molecular modelization.

Remerciements...

Deux mois et quelques jours plus tard, la dernière touche est apportée à ce manuscrit de thèse, pluridisciplinaire, qui relate les trois années exceptionnelles et inoubliables passées dans l'équipe Glycosynthèse.

Par ces quelques mots, je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance au Pr Arnaud Haudrechy de m'avoir accueillie au sein de son équipe, de m'avoir offert l'opportunité d'enrichir mes connaissances chimiques au quotidien, de m'avoir donné l'occasion de participer à l'organisation de projet présenté lors de la Fête de la Science et de co-encadrer deux étudiants. Je le remercie pour sa disponibilité, sa gentillesse et surtout pour ses précieux conseils et sa confiance qui m'ont permis d'acquérir une certaine autonomie. Plus qu'un chef, il est pour moi un véritable ami.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté de participer à la commission d'examen. Cette soutenance de thèse aura été pour moi un honneur :

- de rencontrer le Professeur P. Sinaÿ dont j'ai si souvent entendu parler et que je remercie d'avoir présidé ce jury.

- de retrouver Messieurs P. Goekjian et J. Suffert après notre rencontre à Lyon et à Strasbourg. Je les remercie profondément d'avoir jugé ces travaux.

- de présenter mes résultats de thèse à Messieurs N. Hoffmann et J. Szymoniak qui m'ont vu « grandir » lors de mes études à la Faculté des Sciences de Reims. Je les remercie pour leur amabilité de faire partie de ce jury.

Je remercie particulièrement Stéphane Guillarme (Loulou) pour avoir partagé son expérience en chimie organique, pour ses conseils, sa gentillesse et son amitié durant ma première année de thèse.

Depuis plus de deux ans maintenant, les journées au laboratoire sont rythmées par le dynamisme de Karen Plé (*like a summer wind* ☺). Je la remercie profondément pour son aide, ses précieux conseils, ses encouragements, sa bonne humeur, sa gentillesse, son amitié et son soutien durant ces dernières semaines. Je la remercie aussi d'avoir consacré du temps pour effectuer plusieurs spectres RMN 500 MHz et à la relecture d'une partie de ce rapport.

Mes sincères remerciements vont également à Messieurs Jean-Hugues Renault, Manuel Dauchez et Eric Hénon. Les conseils, les expériences, le soutien et l'amitié de ces trois mousquetaires m'ont beaucoup apporté durant mes travaux et la rédaction de ce manuscrit.

Un grand merci à Fanny Monneaux, mon immunologiste préférée, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils et la relecture du chapitre C de ce manuscrit. Je remercie Véronique Parietti pour les tests biologiques effectués et lui souhaite bon courage pour la fin de sa thèse.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces trois années de thèse, qui m'ont aidé au quotidien et notamment lors de la Fête de la Science:

- Jacqueline (la « McGyver » de l'UMR), Henri (RMN), Sylvie (Analyses élémentaires), Dominique (Spectrométrie de masse), Martine (Secrétariat) et Aldo pour nos discussions philosophiques...
- les doctorants Mathieu, Caroline (que de bons moments passés avec toi en DEA), Antoine, Jean, Leslie, Pierre-Olivier, Nicolas (mon collègue saxophoniste), M'Hamed, Marion, Loïc et les autres...
- les anciens doctorants Alix (ce fut un plaisir de travailler avec toi), Ariane, Céline, Carole, Catherine, Clément et les autres... (Bon courage à tous)
- les maîtres de conférences, chargés de recherche, ingénieurs de recherche et les professeurs du bâtiment 18...

Un énorme merci à Michael Bublé, Paul Anka, Jerry Lee Lewis et autres big band de Jazz pour avoir fait valser mes molécules...

Merci à mon ordinateur portable qui a réussi à tenir le choc durant la rédaction !

Comme dans tous les remerciements, on oublie sûrement quelqu'un qui nous a rendu service, alors qui que vous soyez... merci.

Bien sûr rien n'aurait pu être accompli sans le soutien inconditionnel de mes parents, de mon frère, de toute ma famille, de mes amis (Sabine, Audrey, Béné, Ludo, Nico et les autres) et plus particulièrement de mon Homme Antoine. Présent depuis le début de ma thèse, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tes encouragements quotidiens, ta gentillesse, ton réconfort, ta compréhension et surtout pour ton soutien accompagné de bons petits plats durant la rédaction de ce manuscrit. Merci.

A ma grand-mère

A ma tante

« Conservons par la sagesse ce que nous avons acquis par l'enthousiasme »

Condorcet

LISTE DES ABREVIATIONS..... 15

CHAPITRE A : ALCYNYLATION D'ALDEHYDES CHIRAUX, ACCES AUX C-GLYCOSIDES..... 19

I) INTRODUCTION 19

- 1) Les C-Glycosides 19
- a- Intérêt pour les C-glycosides..... 19
- b- Méthodes de synthèse de C-glycosides..... 23
- 2) Addition d'alcynures sur des aldéhydes chiraux..... 30
- a- Chélation 1,2..... 31
- b- Chélation 1,3..... 34
- c- Cas des 2,3-dialkoxy-aldéhydes: Chélation 1,2 ou 1,3 ?..... 36
- d- Conclusion 37

II) STRATEGIE NOÉ : ADDITION NUCLEOPHILE-OUVERTURE D'ÉPOXYDE 39

- 1) Elaboration de la stratégie : Accès aux C-Galactosides..... 39
- a- Alcynylation 1,2-syn sélective sur un sucre acyclique : Rôle marquant du dichlorure de zinc 40
- b- Synthèse sélective d' α -C-(alcynyl)-Galactosides par une réaction tandem efficace 45
- c- Conclusion 49
- 2) Stratégie NOÉ : Accès aux C-Mannosides ?..... 49
- Introduction : Rôle du zinc..... 49
- a- Sous-produits inattendus lors de la première attaque nucléophile 52
- b- Conformations défavorables 54
- c- Doute sur la structure des produits cyclisés 55
- d- Seconde étape activée en milieu acide : accès à des dérivés furaniques 59
- e- Cas des C-D-Mannosyltryptophanes 61
- f- Conclusion sur le cas D-Mannose..... 69

III) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 69

CHAPITRE B : APPLICATION DE LA STRATEGIE NOÉ A LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES C-GLYCOSIDIQUES D'UN COMPOSE BIOLOGIQUEMENT ACTIF : LE KRN 7000 73

I) LE KRN 7000 73

- 1) Origine du KRN 7000..... 73
- a- Découverte des Agélasphines 75
- b- Etude des relations structure-activité..... 76
- 2) Activités remarquables *in vivo* du KRN 7000..... 78
- a- Potentiel d'activité très diversifié..... 78
- b- Interactions biologiques des α -GalCer 79
- 3) Analogues remarquables du KRN 7000..... 80

II) SYNTHÈSES CONNUES DE L'ANALOGUE C-GLYCOSIDIQUE DU KRN 7000.....	86
1) Les α -C-GalCer	86
a- Brevet déposé par H. Tomiyama et coll. (Société pharmaceutique Kirin).....	86
b- Première synthèse de Franck et coll.....	88
c- Deuxième synthèse de Franck et coll.....	88
d- Synthèse d'Annoura et coll.....	89
e- Synthèse de Wipf et Pierce	90
f- Activités biologiques de l'analogue C-Galactosidique du KRN 7000	91
2) Les β -C-GalCer.....	92
3) Autres analogues C-Galactosidiques intéressants.....	93
4) Notre inscription dans cette course aux analogues C-Galactosidiques du KRN 7000.....	93
III) COURSE AUX ANALOGUES C-GLYCOSIDIQUES DU KRN 7000.....	95
1) Détermination des affinités essentielles avec l'environnement cellulaire et des motifs structuraux à envisager pour induire une activité biologique optimale.....	95
a- Interactions physico-chimiques entre le KRN 7000 et le CD1d	95
b- Comportement dynamique du glycolipide avec le CD1d	105
2) Schéma rétrosynthétique à l'aide du programme QUIRAL.....	112
a- Description du logiciel	112
b- Analyse de notre molécule cible par le programme.....	113
IV) SYNTHÈSE D'UN ANALOGUE C-GLYCOSIDIQUE PARTICULIER DU KRN 7000 SELON NOTRE STRATEGIE NOÉ.....	113
1) Rétrosynthèse.....	113
2) Synthèse (1 ^{ère} partie)	113
3) Synthèse (2 ^{ème} partie).....	113
4) Premiers essais de purification par la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).....	114
a- Principe de la CPC	114
b- Grandeurs chromatographiques	116
c- Caractéristiques importantes en CPC.....	119
d- Essais de purification effectués sur notre analogue	121
V) CONCLUSIONS.....	122

CHAPITRE C : ASPECTS BIOLOGIQUES ET TESTS IMMUNOLOGIQUES SUR NOTRE ANALOGUE.....	127
I) INTERACTIONS CD1d/α-GALCER/CELLULES TNK.....	127
1) L'immunité	127
2) Les lymphocytes impliqués dans la reconnaissance des antigènes	128
3) Les CD1 et leurs ligands glycolipidiques	130
4) Interaction CD1d/Antigène/récepteur des cellules TNK	131
5) Production de cytokines.....	135
a) Propriétés générales	136
b) Différents types de cytokines.....	136
c) Production de cytokines en présence de ligands glycolipidiques.....	138
d) Activation des autres cellules de l'immunité par les cytokines libérées	140
II) APPLICATION DE LA RECONNAISSANCE DES GLYCOLIPIDES PAR LES LYMPHOCYTES CD1d-RESTREINTS EN IMMUNOTHERAPIE	142
III) TESTS IMMUNOLOGIQUES SUR LE NOUVEL ANALOGUE	144
1) Introduction.....	144
2) Capacité du ligand à activer les cellules TNK <i>ex vivo</i>	145
a) Protocole expérimental	145
b) Tests effectués <i>ex vivo</i>	146
3) Capacité du ligand à activer les cellules TNK <i>in vivo</i>	146
a) Protocole expérimental	146
b) Résultats obtenus	146
IV) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	146
CHAPITRE D : SYNTHÈSE DE THIOSUCRES.....	151
I) ACCES AUX THIOSUCRES DÉRIVÉS DU D-GALACTOSE ET DU D-MANNOSE	152
1) Série D-Galactose.....	152
2) Série D-Mannose.....	157
II) APPROCHE SYNTHÉTIQUE DU MOTIF CYCLIQUE DU SALACINOL ET DU KOTALANOL	160
1) Introduction.....	160
2) Rétrosynthèse.....	161
3) Discussion.....	161
III) CONCLUSION	167
CONCLUSION.....	168
PARTIES EXPÉRIMENTALES	171
INSTRUMENTATIONS ET SOLVANTS	173

PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE A.....	175
PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE D.....	201
ANNEXES.....	211
Annexe A.....	213
Etude des conformations du D-Mannose et de ses dérivés	213
Annexe B.....	217
Liste des acides aminés impliqués dans les interactions KRN7000/CD1d	217
Annexe C.....	219
Description du logiciel QUIRAL et mode d'emploi	219
Annexe D.....	223
1) Glossaire d'immunologie.....	223
2) Activités des α -GalCer	226
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	231

Liste des abréviations

AE	acétate d'éthyle
AGL	agélasphine
AIBN	2,2-Azobisisobutyronitrile
APTS	acide <i>para</i> -toluènesulfonique
aq.	aqueux
BCR	récepteur des cellules B (<i>B cells receptor</i>)
BF ₃ .OEt ₂	éthérate de trifluoroborane
Bn	benzyl
Bz	benzoyl
cat.	catalytique
Cbz	benzyloxycarbonyl
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD1	Cluster de Différentiation 1
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
CSA	acide camphor-sulfonique
DCC	dicyclohexyle carbodiimide
DDQ	1,2-dichloro-4,5-dicyanobenzoquinone
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DME	1,2-diméthoxyéthane
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
ed	excès diastéréoisomérique
EDC.HCl	chlorhydrate de <i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
ee	excès énantiomérique
éq.	équivalent(s)
ESI	ionisation par électrospray
Et	éthyl
EP	éther de pétrole
Et ₂ O	éther diéthylique
HMPT	hexaméthylphosphorotriamide
HRMS	spectrométrie de masse haute résolution
Hz	Herz
ind.A	indole A
ind.B	indole B
ind.C	indole C
IFN	interféron
IL	interleukine
Im	imidazole
IR	infrarouge
KHMDS	hexaméthylidisilylamidure de potassium
LDA	Di- <i>iso</i> -propylamidure de lithium
Li-N	lithium naphthalène
LRMS	spectrométrie de masse basse résolution
LTP	<i>Lipid Transfer Proteins</i>
M	métal
\mathcal{M}	masse molaire
mg	milligramme
mL	millilitre

Ms	mésyl
MS-4Å	tamis moléculaire 4Å
MΦ	macrophage
MTP	<i>Microsomal triglyceride Transfer Protein</i>
n.d.	non déterminé
nM	nanomolaire
nOe	effets Overhauser nucléaires
<i>n</i> Hept	<i>n</i> -heptane
NH ₄ F	fluorure d'ammonium
NK	cellule <i>natural killer</i>
Nu	nucléophile
P	groupe protecteur
PF	point de fusion
Pht	phtalimide
Piv	pivaloyl
PMB	<i>para</i> -méthoxybenzyl
ppm	partie par million
PPTS	<i>para</i> -toluènesulfonate de pyridinium
Py	pyridine
quant.	quantitatif
rd	rapport diastéréoisomérique
rdt	rendement
rdt _G	rendement global
R _f	rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SM	Spectrométrie de Masse
T.A.	Température Ambiante
TBAF	fluorure de tetrabutylammonium
TBAI	iodure de tetrabutylammonium
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphénylesilyl
TBS	<i>tert</i> -butyldiméthylesilyl
TCR	récepteur des cellules T (<i>T cells receptor</i>)
Tf	trifluorométhanesulfonyl
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tetrahydrofurane
TMS	triméthylesilyl
TMSOTf	triflate de triméthylesilyle
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNK	cellule T <i>Natural Killer</i>
TNK inv	cellule T <i>Natural Killer</i> invariant
Tos	toluènesulfonyl
Tr	trityl
UV	ultraviolet
Δ	chauffage
μg	microgramme
α-C-GalCer	α-C-Galactosylceramide
α-GalCer	α-Galactosylceramide

CHAPITRE A : ALCYNYLATION D'ALDEHYDES CHIRAUX, ACCES AUX C-GLYCOSIDES.....	19
I) INTRODUCTION	19
1) Les C-Glycosides	19
a- Intérêt pour les C-glycosides.....	19
b- Méthodes de synthèse de C-glycosides.....	23
2) Addition d'alcynures sur des aldéhydes chiraux.....	30
a- Chélation 1,2.....	31
b- Chélation 1,3.....	34
c- Cas des 2,3-dialkoxy-aldéhydes: Chélation 1,2 ou 1,3 ?.....	36
d- Conclusion	37
II) STRATEGIE NOÉ : ADDITION NUCLEOPHILE-OUVERTURE D'ÉPOXYDE	39
1) Elaboration de la stratégie : Accès aux C-Galactosides.....	39
a- Alcynylation 1,2-syn sélective sur un sucre acyclique : Rôle marquant du dichlorure de zinc	40
b- Synthèse sélective d' α -C-(alcynyl)-Galactosides par une réaction tandem efficace	45
c- Conclusion	49
2) Stratégie NOÉ : Accès aux C-Mannosides ?.....	49
Introduction : Rôle du zinc.....	49
a- Sous-produits inattendus lors de la première attaque nucléophile	52
b- Conformations défavorables	54
c- Doute sur la structure des produits cyclisés	55
d- Seconde étape activée en milieu acide : accès à des dérivés furaniques.....	59
e- Cas des C-D-Mannosyltryptophanes	61
f- Conclusion sur le cas D-Mannose.....	69
III) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	69

CHAPITRE A : Alcynylation d'aldéhydes chiraux, **accès aux C-Glycosides**

I) Introduction

1) Les C-Glycosides

a- Intérêt pour les C-glycosides

La synthèse de C-glycosides tient une place importante dans la littérature.¹ Ceci est dû, à l'origine, à leurs propriétés pharmacologiques (C-nucléosides) et leur présence dans de nombreux produits naturels, tels que l'ambruticine² ou la palytoxine³, et c'est pourquoi l'intérêt pour ces composés n'a cessé de croître.

Ils sont surtout utilisés comme synthons chiraux clé dans de nombreuses synthèses organiques.⁴ Depuis peu, l'accent est mis sur leurs forts potentiels biologiques comme agents antiviraux,⁵ antimicrobiens⁶ ou anticancéreux,⁷ mais aussi comme inhibiteurs d'enzymes⁸ (Schéma 1). Les C-glycosides sont également utilisés dans la synthèse de détergents et d'émulsifiants.⁹

¹ (a) Levy D. E., Tang C. *The chemistry of C-Glycosides* **1995**, vol. 13, Pergamon Press, Oxford; (b) Postema M. H. D. *C-Glycoside Synthesis* **1995**, CRC Press, Inc; (c) Du Y., Linhardt R. J. *Tetrahedron* **1998**, 54, 34, 9913; (d) Beau J. M., Gallagher T. *Top. Curr. Chem.* **1997**, 187, 1; (e) Nicotra F. *Top. Curr. Chem.* **1997**, 187, 55; (f) Sinaÿ P. *Pure & Appl. Chem.* **1997**, 69, 3, 459 et références citées

² (a) Ringel S. M., Greenough R. C., Roemer S., Connor D., Gutt A. L., Blair B., Kanter G., Von Strandtmann M. J. *Antibiot.* **1977**, 30, 371; (b) Kende A. S., Fujii Y., Mendoza J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 26, 9645; (c) Kende A. S., Mendoza J. S., Fujii Y. *Tetrahedron* **1993**, 49, 36, 8015

³ Pettit G. R., Cichacz Z. A., Gao F., Herald C. L., Boyg M. R., Schmidt J. M., Hooper J. N. A. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6, 1302

⁴ Hanessian S. *Total Synthesis of Natural Products. The Chiron Approach* **1983**, Pergamon Press, Oxford

⁵ Cai S. Q., Wang R., Yang W., Shang M., Ma C., Shoyama Y. *Chemistry & Biodiversity* **2006**, 3, 3, 343

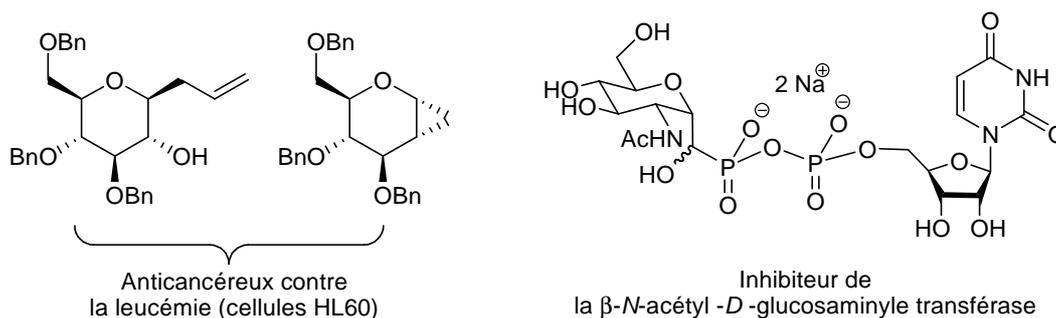
⁶ Dinda B., Bhattacharya A., De Chandra U., Arima S., Takayanagi H., Harigaya Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54, 5, 679

⁷ (a) Sanhueza C. A., Mayato C., Garcia-Chicano M., Diaz-Penate R., Dorta R. L., Vazquez J. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 16, 4223; (b) Chaulagain M. R., Postema M. H. D., Valeriote F., Pietraszkewicz H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 41, 7791

⁸ (a) Zou W. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2005**, 5, 14, 1363; (b) Stolz F., Blume A., Hinderlich S., Reutter W., Schmidt R. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 15, 3304

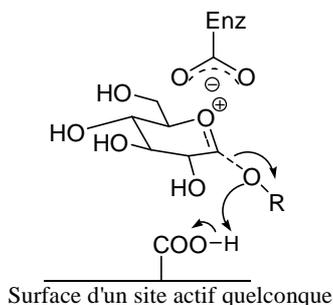
⁹ (a) Robson R. J., Dennis E.A. *Acc. Chem. Res.* **1983**, 16, 7, 251; (b) Förster T., Claas M., Seipel W. Brevet DE4417476A1 **1995**

Schéma 1: C-glycosides reconnus comme anticancéreux et inhibiteurs d'enzymes



Leur activité biologique est en grande partie due à leur stabilité vis-à-vis de leurs homologues O-glycosidiques contre, notamment, l'hydrolyse *in vivo* de la liaison anomérique par les glycosidases (Schéma 2). Toutefois, les C-glycosides ne sont pas à l'abri d'autres enzymes dégradantes s'ils doivent être éliminés par l'organisme.

Schéma 2 : Etat de transition de l'hydrolyse *in vivo* de la liaison anomérique

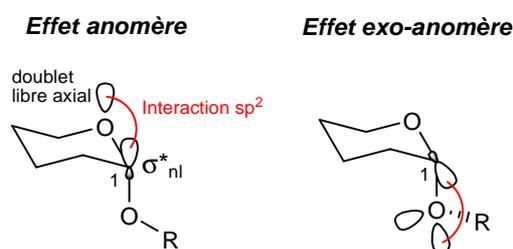


Leurs propriétés physiques (Tableau 1) sont aussi un atout car il n'existe pas d'effet anomère ni exo-anomère. Le moment dipolaire et l'électronégativité de la liaison anomérique s'en trouvent diminués. Tout ceci favorise une certaine stabilité réactionnelle en milieu biologique. Toutefois l'absence de formation de liaison hydrogène avec l'oxygène anomère peut être un obstacle pour interagir efficacement avec le site actif d'une enzyme.

Tableau 1 : Propriétés physiques des O- et C-glycosides

	O-Glycosides	C-Glycosides
Longueur de liaison	O-C ₁ = 1,43 Å	O-C ₁ = 1,54 Å
Rayon de Van Der Waals	O = 1,52 Å	O = 2,0 Å
Electronégativité	O = 3,51	C = 2,35
Moment Dipolaire	C ₁ -O = 0,74 D	C ₁ -C = 0,3 D
Liaison Hydrogène possible	2	-
Effet anomère ^{10a} (Schéma 3)	oui	non
Effet exo-anomère ^{10b} (Schéma 3)	oui	non

Schéma 3 : Effets anomère et exo-anomère



Même en l'absence d'effets anomère et exo-anomère, les C-glycosides adoptent une conformation anomérique antipériplanaire similaire à celle des O-glycosides (Schéma 4).¹¹ En effet, l'étude des constantes de couplages par RMN démontre clairement cette attitude. De plus, la comparaison des interactions stériques entre les diverses conformations anomériques montre que l'interaction gauche carbone/oxygène (cas I-A) est moins défavorable que l'interaction gauche carbone/carbone (cas I-B), elle-même moins défavorable que la double interaction gauche carbone/carbone-carbone/oxygène (cas I-C). En outre, les valeurs des angles dièdres ϕ pour la configuration α (+55°) et pour la configuration β (-80°) sont en accord avec les données obtenues pour les méthyl-D-glucosides.¹²

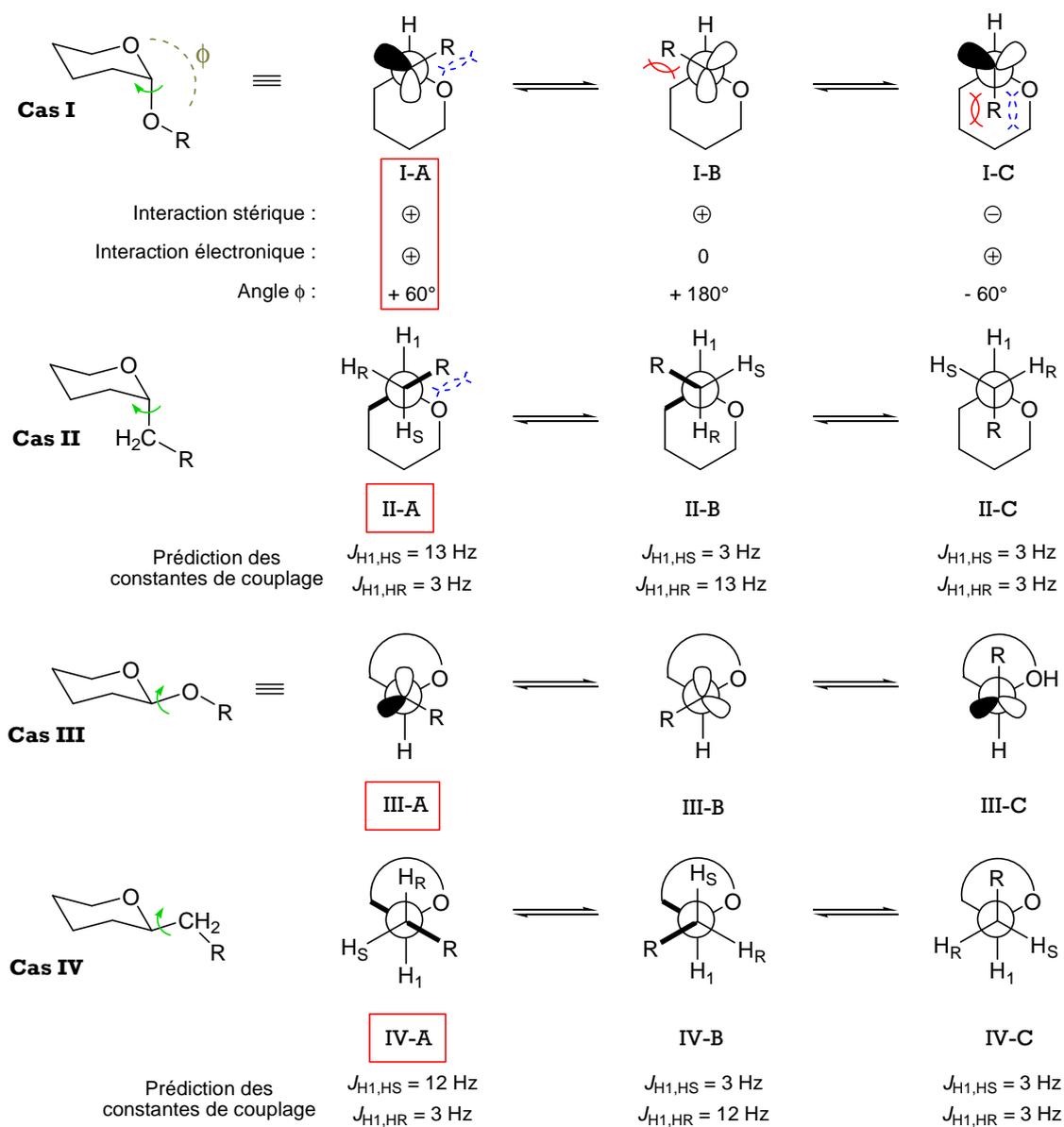
¹⁰ (a) Effet anomère : Tendance d'un groupement alkoxy sur le carbone anomérique C₁, à s'orienter en position axiale plutôt qu'en position équatoriale, malgré les interactions stériques défavorables. (Terme introduit par Lemieux R. U. *Abstracts of papers, Am. Chem. Soc.* **1958**, 133, 31N). En terme orbitaire, il existe un recouvrement entre un des doublets non liants de l'oxygène endo-cyclique et l'orbitale anti-liante σ^* de la liaison C₁-OR.

(b) Effet exo-anomère : orientation privilégiée de la liaison O-R du groupe alkoxy sur le centre anomérique. (Terme également introduit par Lemieux R. U. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 4427)

¹¹ Wu T. C., Goekjian P. G., Kishi Y. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4819

¹² Lemieux R. U., Koto S. *Tetrahedron* **1974**, 30, 13, 1933

Schéma 4 : Comparaison des conformations



Interaction gauche carbone/oxygène Interaction gauche carbone/carbone

⊕ favorable ⊖ défavorable H_R : proton pro R H_S : proton pro S

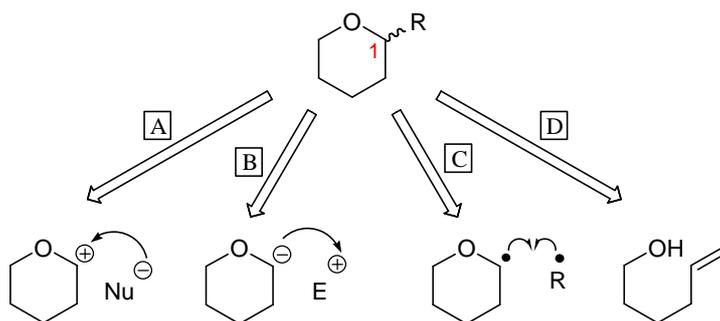
Ainsi, les C-glycosides sont des candidats biologiquement intéressants pour mimer les O-glycosides dans le milieu cellulaire.

b- Méthodes de synthèse de C-glycosides^{1a, b}

Il existe principalement quatre approches pour synthétiser divers C-glycosides (Schéma 5) :

- Voie A : Attaque d'un nucléophile sur le carbone anomérique (Substitution électrophile)
- Voie B : Attaque d'un électrophile sur le carbone anomérique (Substitution nucléophile)
- Voie C : Réactions radicalaires
- Voie D : Formation du cycle du glycoside

Schéma 5 : Quatre principales méthodologies pour synthétiser des C-glycosides



Dans ces quatre méthodologies, l'induction stéréosélective aboutissant à la configuration α ou β du carbone anomérique C1 est constamment un défi. Cette sélectivité dépend de la nature de l'électrophile, du nucléophile, du sucre en lui-même (D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose...) et des conditions réactionnelles.

La voie A est sans doute la méthode la plus connue et la plus exploitée.

Elle regroupe, entre autres, les substitutions de groupes partants ou halogénés en position anomérique par un organométallique¹³ (Schéma 6), l'ouverture de 1,2-anhydrosucres¹⁴ (Schéma 7), l'addition sur des lactones¹⁵ (Schéma 8) et les réactions sur des glycols¹⁶ (Schéma 9).

¹³ (a) Brown D. S., Bruno M., Davenport R. J., Ley S. V. *Tetrahedron* **1989**, 45, 13, 4293; (b) Kozikowski A. P., Konoike T., Ritter A. *Carbohydr. Res.* **1987**, 171, 1, 109

¹⁴ (a) Rainier J. D., Cox J. M. *Org. Lett.* **2000**, 2, 17, 2707; (b) Leeuwenburgh M. A., Timmers C. M., Van der Marel G. A., Van Boom J. H., Mallet J. M., Sinaý P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 35, 6251; (c) Leeuwenburgh M. A., Litjens R. E. J. N., Codée J. D. C., Overkleef H. S., Van der Marel G. A., Van Boom J. H. *Org. Lett.* **2000**, 2, 9, 1275; (d) Bellosta V., Czernecki S. *Carbohydr. Res.* **1993**, 244, 2, 275

¹⁵ Streicher H., Reiner M., Schmidt R. R. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, 16, 3, 277

¹⁶ Toshima K., Miyamoto N., Matsuo G., Nakata M., Matsumura S. *Chem. Commun.* **1996**, 11, 1379

Schéma 6 : Substitution d'un groupe partant par un organométallique

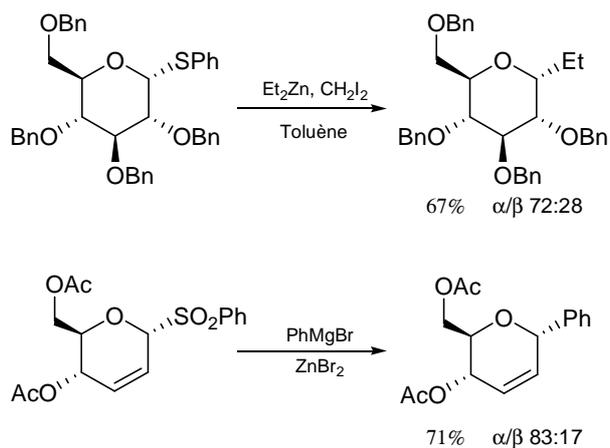


Schéma 7 : Ouverture de 1,2-anhydrosucres

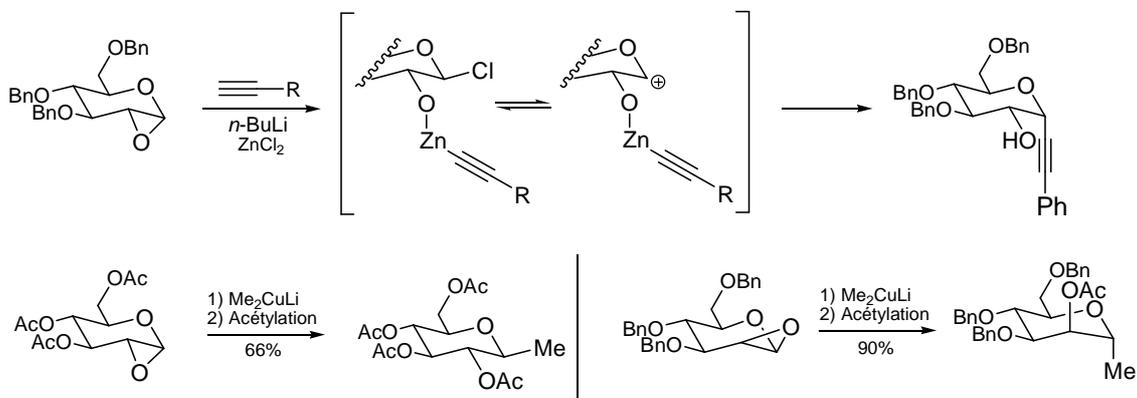


Schéma 8 : Addition sur une lactone

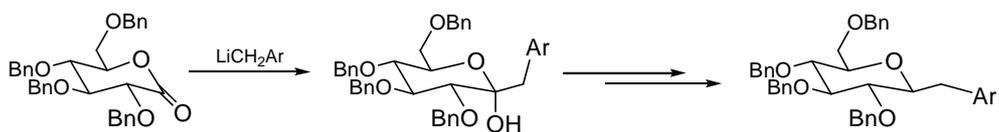
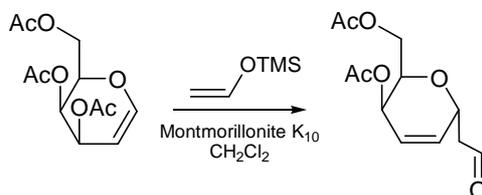


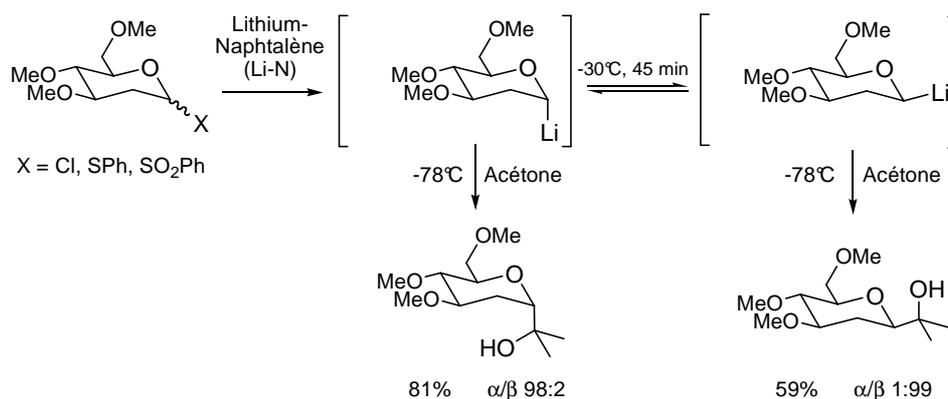
Schéma 9 : Réactions sur des glycols



La voie B met en jeu des sucres métallés obtenus soit par réduction, soit par déprotonation ou par échange métallique.

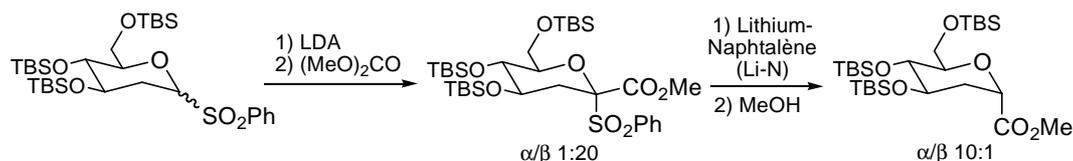
La méthode utilisant la réduction d'un groupement sulfure^{17a, b} ou sulfone,^{17c} par exemple, en position anomérique permet de former un lithien intermédiaire. Celui-ci réagit à basse température avec divers électrophiles pour conduire sélectivement à l' α -C-Glycoside. Si l'addition des électrophiles est effectuée après une remontée de la température, alors nous accédons majoritairement aux β -C-Glycosides (Schéma 10).

Schéma 10 : Sucres métallés obtenus par réduction



Il est possible de déprotoner la position anomérique possédant un groupe stabilisateur d'anion (nitro, sulfone, ester, ...). Après formation de la liaison C-C souhaitée, le groupe stabilisateur doit être enlevé. Cette coupure est l'étape déterminant la configuration α ou β du C-glycoside final (Schéma 11).¹⁸

Schéma 11 : Sucres métallés obtenus par déprotonation



Les glycosides métallés sont également accessibles par transmétallation. Hanessian et coll.¹⁹ ont utilisé la base de Schlosser pour déprotoner un glycal, puis un groupe stannylé est introduit en position C1. L'étape suivante est un échange étain-lithium suivi de l'attaque de l'anion obtenu sur un électrophile E⁺ (Schéma 12). Cette méthode a été utilisée par Kessler pour la synthèse de C-glycopeptides.²⁰

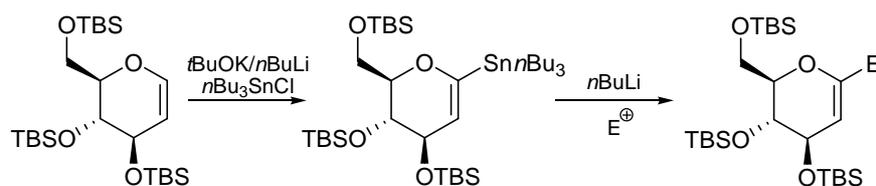
¹⁷ (a) Cohen T., Matz J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 22, 6900; (b) Cohen T., Lin M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4, 1130; (c) Beau J. M., Sinaÿ P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 50, 6185

¹⁸ (a) Beau J. M., Sinaÿ P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 50, 6193; (b) Aebischer B., Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 789; (c) Baumberger F., Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2210

¹⁹ Hanessian S., Martin M., Desai R. C. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1986**, 926

²⁰ Burkhardt F., Hoffmann M., Kessler H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1191

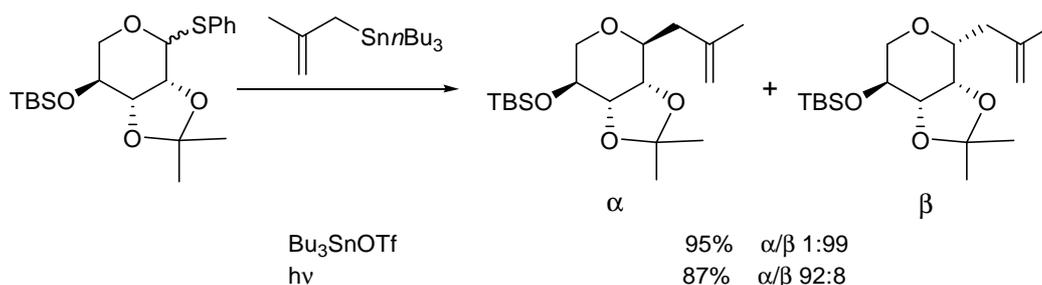
Schéma 12 : Sucres métallés obtenus par transmétallation



La voie C présente l'avantage de se dérouler dans des conditions réactionnelles douces et compatibles avec de nombreux groupes fonctionnels. Elle évite les réactions secondaires d'épimérisation ou d'élimination dues à la formation d'un anion (inconvenients de la voie B) et permet une bonne stéréosélectivité. La voie C met en jeu des réactions inter- et intramoléculaires.

Les radicaux anomériques peuvent être générés par coupure homolytique de diverses liaisons carbone-hétéroatome soit avec des dérivés de l'étain en présence d'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN), en tant qu'initiateur, soit par irradiation ultra-violette. Le radical formé est stabilisé par effet anomère. La présence d'alcènes pauvres en électrons conduit aux C-glycosides correspondants dont la configuration dépend du mode d'amorçage (dérivés de l'étain ou irradiation) (Schéma 13).²¹

Schéma 13 : Réactions radicalaires

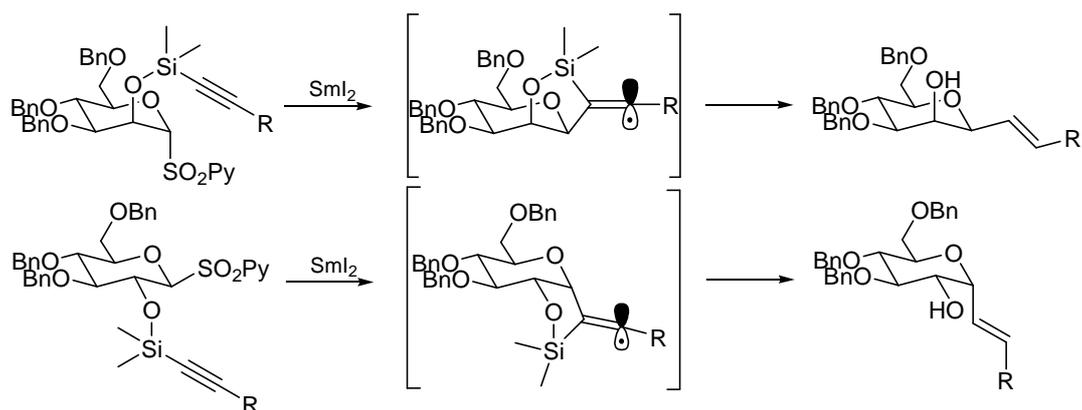


L'équipe de J.M. Beau²² a développé des réactions radicalaires intramoléculaires faisant intervenir le diiodure de samarium. Selon la configuration du carbone 2, on accède aux C-glycosides α ou β (Schéma 14).

²¹ (a) Hanessian S. *Preparative Carbohydrate Chemistry* **1997**, Marcel Dekker Inc., New York, 507; (b) Keck G. E., Enholm E. J., Kochensky D. F. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1867; (c) Dupuis J., Giese B., Hartwig J., Leising M., Korth H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4332

²² (a) Mazeas D., Skrydstrup T., Doumeix O., Beau J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 13, 1383; (b) Skrydstrup T., Mazeas D., Elmouchir M., Doisneau G., Riche C., Chiaroni A., Beau J. M. *Chem. Eur.J.* **1997**, 3, 1342

Schéma 14 : Réaction intramoléculaire avec activation par le diiodure de samarium



La voie D est très intéressante car elle couvre plusieurs types de formation de cycle.

- Soit le cycle glycosidique existe déjà, son ouverture suivie de sa refermeture permet alors d'induire préférentiellement un anomère par rapport à l'autre. C'est une méthode largement utilisée faisant intervenir le plus souvent la réaction de Wittig suivie d'une cyclisation soit par une base²³ (Schéma 15), soit via un bromonium,²⁴ via un iodonium,²⁵ soit par oxymercuration²⁶ ou encore par un dérivé du sélénium²⁷ (Schéma 16).

Schéma 15 : Cyclisation en utilisant une base

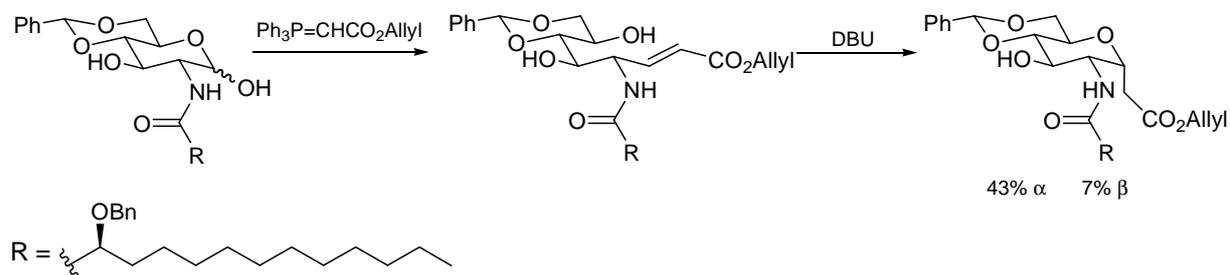
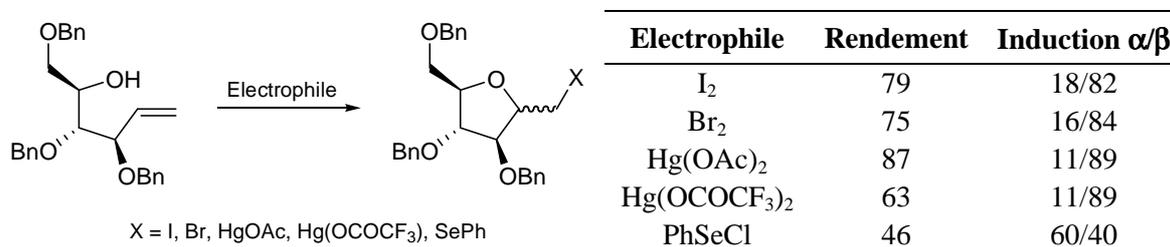


Schéma 16 : Comparaisons des inductions des cyclisations avec des dérivés halogénés, mercuriques et séléniés



²³ Vyplel H., Scholz D., Macher I., Schindlmaier K., Schütze E. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2759

²⁴ Armstrong R. W., Teegarden B. R. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 915

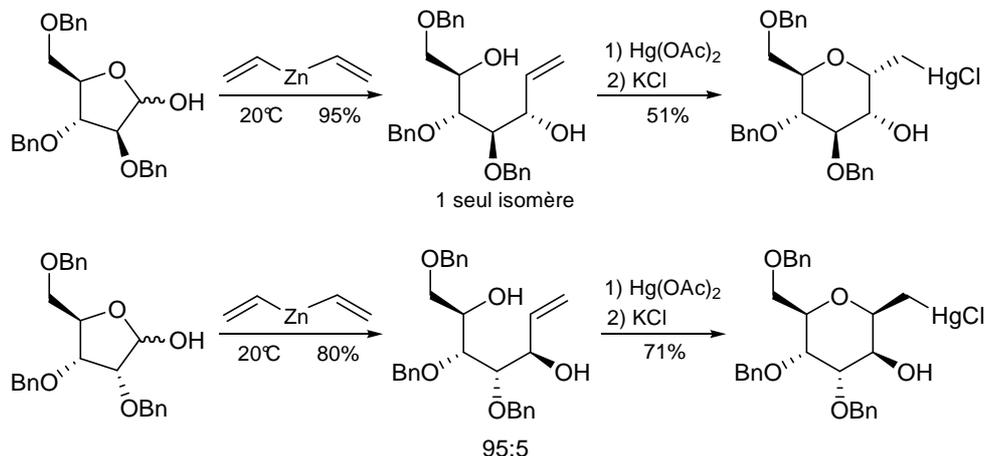
²⁵ Nicotra F., Panza L., Ronchetti F., Russo G., Toma L. *Carbohydr. Res.* **1987**, 171, 49

²⁶ (a) Liu P. S. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4717; (b) Qjao L., Vedras J. C. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3480

²⁷ Lancelin J. M., Pougny J. R., Sinaÿ P. *Carbohydr. Res.* **1985**, 136, 369

- Soit la taille du cycle du glycoside initial est inférieure à celle du cycle nouvellement formé. Là encore une ouverture-fermeture s'impose. Cette fois, il faut utiliser des réactifs de Grignard ou des dérivés organozinciques. Après introduction d'un groupe vinylique en position anomérique d'un furane, les sels de mercure conduisent au cycle pyranique avec une excellente induction et des rendements corrects (Schéma 17).²⁸

Schéma 17 : D'un cycle furanique à un cycle pyranique



- Soit le composé initial est une chaîne ouverte. Pour obtenir une cyclisation, ce produit doit notamment posséder un bon groupe partant tel un halogène²⁹ (Schéma 18) ou contenir une fonction époxyde³⁰ (Schéma 19).

Schéma 18 : Cyclisation par substitution d'un halogène

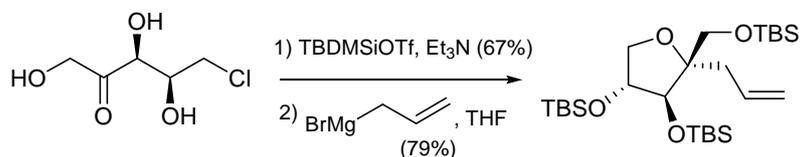
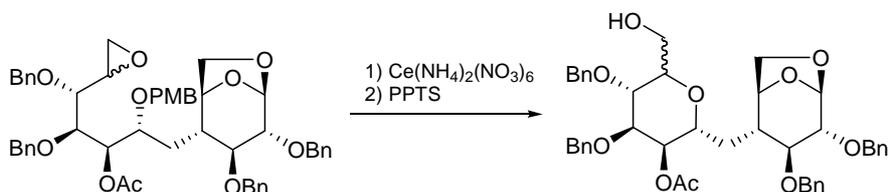


Schéma 19 : Formation d'un cycle pyranique par ouverture d'un époxyde



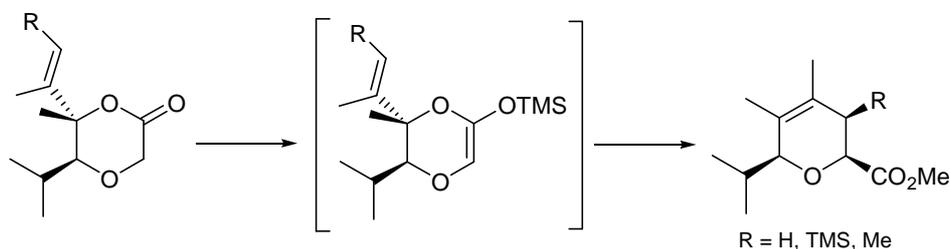
²⁸ Boschetti A., Nicotra F., Panza L., Russo G. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 18, 4181

²⁹ Schmid W., Whitesides G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9670

³⁰ Wang Y., Babirad S. A., Kishi Y. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 468

- Soit les C-glycosides sont formés, par exemple, par une transposition de Claisen³¹ (Schéma 20).

Schéma 20 : Transposition de Claisen

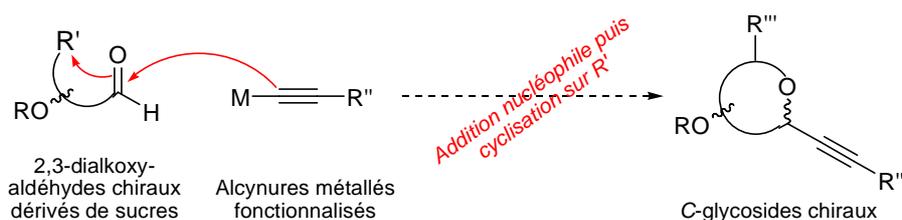


Ce rapide survol sur les différentes méthodes de synthèses des C-glycosides nous montre bien la difficulté pour obtenir une excellente induction anomérique quel que soit le substrat.

Notre laboratoire s'intéresse principalement à la voie D. Nous souhaitons développer une stratégie globale simple et généralisable basée sur l'ouverture-fermeture d'un pyranose, avec ou sans réduction de taille, en induisant une excellente stéréosélectivité.

L'alcynylation de 2,3-dialkoxy-aldéhydes chiraux, issus de sucres, suivie d'une cyclisation intramoléculaire, nous permettrait de synthétiser divers C-glycosides (Schéma 21). Afin d'obtenir d'excellentes diastéréosélectivités, l'utilisation de métaux est un paramètre crucial. Nous devons donc étudier les chélation possibles entre des métaux appropriés et nos substrats chiraux.

Schéma 21 : Projet orienté vers la synthèse de C-glycosides



³¹ Burke S. D., Armistead D. M., Schoenen F. J., Fevig J. M. *Tetrahedron* **1986**, 42, 2787

2) Addition d'alcynures sur des aldéhydes chiraux³²

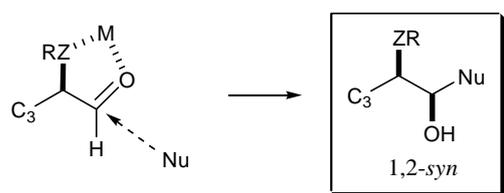
L'addition de réactifs organométalliques sur des aldéhydes chiraux est souvent rencontrée dans les synthèses organiques et le contrôle de la stéréosélectivité de ces réactions est un défi permanent. Les travaux de Cram, Felkin et Anh proposent des modèles³³ pour expliquer les configurations relatives obtenues. Ces études sont d'ailleurs toujours d'actualité dans la littérature.³⁴

Les alcools propargyliques chiraux, issus de l'addition d'alcynures sur des aldéhydes chiraux, sont des synthons très appréciés dans la synthèse de composés biologiquement actifs.³⁵ Par conséquent, le contrôle de la diastéréosélectivité de ce type de réaction est extrêmement important et implique le plus souvent l'utilisation de métaux.

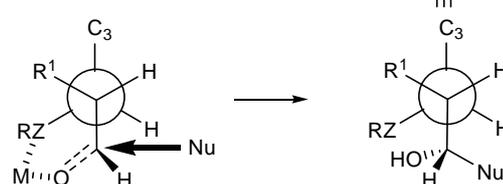
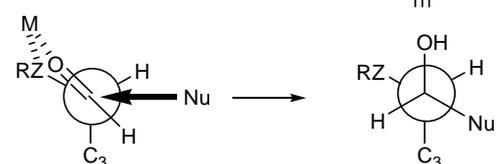
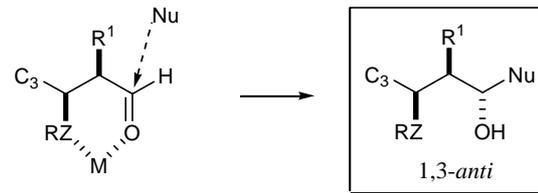
En général, ces additions dépendent fortement du substrat et de différents paramètres tels que le solvant, la température de réaction, la nature et la position des groupes protecteurs présents. Diverses chélation entre les hétéroatomes, en α et/ou en β de la fonction aldéhyde, et un métal jouent également un rôle crucial dans la détermination de la diastéréosélectivité de la réaction. Dans le cas où un seul hétéroatome (O, N, S) est en position 2 ou 3 de la fonction aldéhyde, alors la chélation 1,2 favorise une approche 1,2-*syn* du nucléophile (Schéma 22, cas a) tandis que la chélation 1,3 induit préférentiellement une sélectivité 1,3-*anti* (Schéma 22, cas b). La prédiction de la diastéréosélectivité devient plus périlleuse pour les aldéhydes 2,3-difonctionnalisés à cause de la compétition entre ces chélation 1,2 et 1,3.

Schéma 22 : Modèle de Cram chélaté pour les chélation bidentées 1,2 et 1,3

Chélation 1,2: cas a



Chélation 1,3: cas b



M = cation métallique R = groupe protecteur
Z = O, NR', S R¹ = H, alkyl, OR', NR'R'', SR'

³² Guillaume S., Plé K., Banchet A., Liard A., Haudrechy A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2355

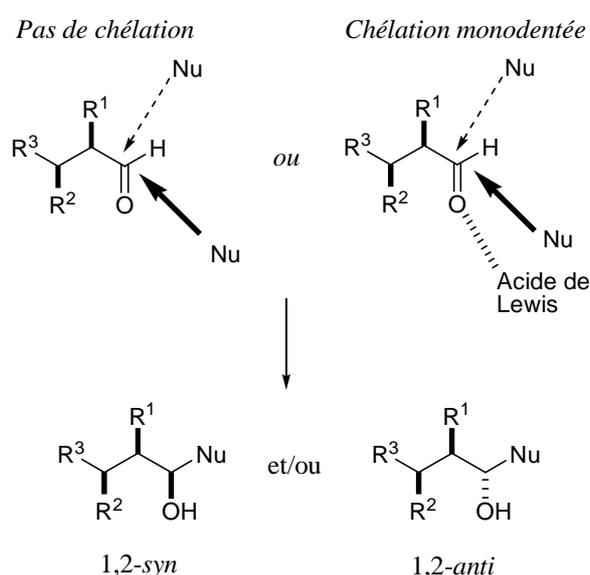
³³ (a) Cram D. J., Abd Elhafez F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 23, 5828; (b) Chérest M., Felkin H., Prudent N. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *18*, 2199; (c) Anh N. T. *Top. Curr. Chem.* **1980**, *88*, 145

³⁴ (a) Reetz M. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 8, 556; (b) Mengel A., Reiser O. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1191; (c) Smith R. J., Trzoss M., Bühl M., Bienz S. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *16*, 2770

³⁵ (a) Fürstner A., Wuchrer M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 76; (b) Hanessian S., Sahoo S. P., Botta M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 11, 1143; (c) Lopez R., Poupon J.-C., Prunet J., Férézou J.-P., Ricard L. *Synthesis* **2005**, *4*, 644; (d) Lam H. W., Pattenden G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3, 508

Quand il n'y a pas de chélation possible (ou s'il y a possibilité d'une coordination monodentée avec un acide de Lewis par exemple), l'attaque nucléophile peut s'effectuer des deux côtés de l'aldéhyde et conduit aux produits 1,2-*syn* et 1,2-*anti*. L'addition étant régie par les règles de Felkin-Anh, la proportion des produits obtenus dépend alors de la nature des groupes présents en position 2 et 3 de l'aldéhyde (Schéma 23). Dans le cas d'une complexation de l'aldéhyde avec un acide de Lewis très encombrant, les interactions stériques jouent un rôle très important et une sélectivité 1,2-*anti* est attendue. Toutefois, la littérature nous indique que les inductions observées ne sont pas aussi élevées qu'espérées car il faut également prendre en compte un autre facteur décisif, celui de l'interaction stérique entre le nucléophile et le groupe en position 2 (R¹) et/ou la deuxième chaîne (CHR²R³). Il est alors parfois difficile de prédire l'approche préférentielle du nucléophile.

Schéma 23 : Approche de Felkin-Anh en présence ou non d'une chélation monodentée



a- Chélation 1,2

La chélation 1,2 est possible pour les 2-alkoxy-aldéhydes (Z = O). Observons le comportement de divers métaux sur ce type d'aldéhyde.

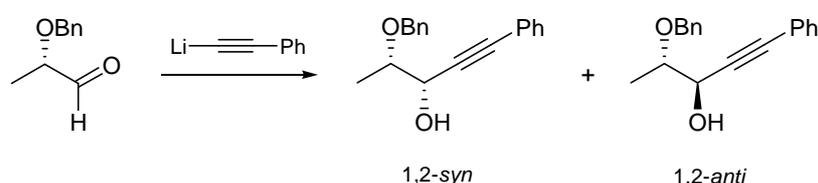
- Avec le lithium, trois tendances sont observées :
 - 1) un groupe protecteur encombrant OR en position 2 conduit au produit 1,2-*anti*^{36, 37}
 - 2) l'addition d'éther couronne spécifique du cation Li⁺ ou de HMPT à la réaction améliore encore la sélectivité en faveur du 1,2-*anti*³⁶
 - 3) dans le cas d'un groupe protecteur moins encombrant en position 2, une bonne sélectivité 1,2-*anti* peut être obtenue dans le THF à basse température (-78°C)³⁸

³⁶ Alami M., Crousse B., Linstrumelle G., Mambu L., Larchevêque M. *Tetrahedron: Asymm.* **1997**, 8, 2949

³⁷ Pilli R. A., Victor M. M., de Meijere A. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5910

- L'utilisation de dérivés du bore en tant qu'acide de Lewis montre une induction très favorable pour le diastéréoisomère 1,2-*anti*.³⁹
- Les dérivés du magnésium favorisent fortement la chélation 1,2 conduisant à des diastéréoisomères 1,2-*syn*.⁴⁰ Il est à noter que l'utilisation de solvants coordinants du cation Mg²⁺ (THF/HMPT) affaiblit la chélation 1,2 due au magnésium.
- En 1987, Mead a publié une étude détaillée de l'addition de dérivés d'alcyngures zinciques sur des 2-alkoxy-aldéhydes. Il a montré que l'utilisation de sels de zinc conduit à une excellente sélectivité 1,2-*syn* qui dépend aussi bien du contre-anion associé au zinc que de la température de réaction et du solvant (Schéma 24).⁴¹

Schéma 24 : Influence des sels de zinc et du solvant



Conditions de réaction	Rendement (%)	1,2- <i>syn</i> /1,2- <i>anti</i>
THF, -78°C	/	45/55
ZnCl ₂ , THF, -78°C	/	66/34
ZnBr ₂ , THF, -78°C	75	81/19
ZnBr ₂ , THF, 0°C	70	76/24
ZnCl ₂ , Et ₂ O, -78°C	65	88/12
ZnBr₂, Et₂O, -78°C	95	95/5

L'auteur se base sur le schéma 22 pour expliquer la stéréosélectivité observée. Dans le THF, l'addition d'alcyngure zincique sur l'aldéhyde augmente la quantité de produit 1,2-*syn* formé. Cette sélectivité est encore améliorée si le contre-anion est un ion bromure (ZnBr₂). Les meilleurs résultats ont été obtenus à basse température (-78°C). Les mêmes tests effectués dans un solvant moins chélatant (le diéthyléther) conduit au produit 1,2-*syn* avec un excellent rendement de 95% et une bonne sélectivité. Mead, Maezaki et Trost indiquent également que les résultats précédents sont toujours valables lorsque l'aldéhyde possède des groupements plus encombrants (Schéma 25).^{41, 42}

³⁸ Young R. N., Champion E., Gauthier J. Y., Jones T. R., Leger S., Zamboni R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 539

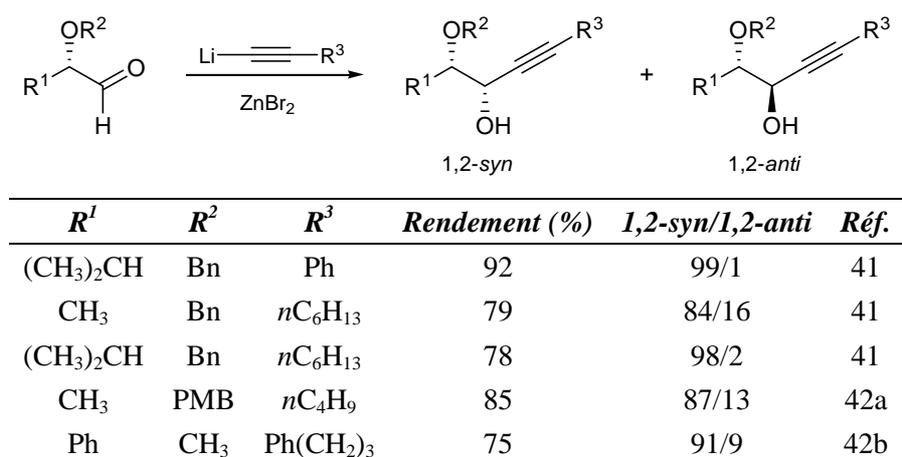
³⁹ Evans J. C., Goralski C. T., Hasha D. L. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2941

⁴⁰ Clive D. L. J., Tao, Y., Bo Y., Hu Y.-Z., Selvakumar N., Sun S., Daigneault S., Wu Y.-J. *Chem. Commun.* **2000**, 1341

⁴¹ Mead K. T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 10, 1019

⁴² (a) Maezaki N., Hirose, Y., Tanaka T. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2177; (b) Trost B. M., Ball Z. T., Jöge T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3415

Schéma 25 : Addition d'alcynures zinciques sur divers aldéhydes



- Peu d'exemples sont reportés dans la littérature concernant l'utilisation de dérivés du césium. Ishiyama et al. ont observé une diastéréosélectivité modeste en faveur du produit 1,2-syn lors de la synthèse de l'amphidinolide B.⁴³
- L'utilisation de plusieurs métaux permet de générer des espèces organométalliques particulières à partir d'un alcynure lithié suite à un échange lithium/métal, ce dernier étant introduit généralement en quantité stœchiométrique (Tableau 2). Dans certains cas, la nature exacte de l'organométallique formé est sujet à caution et le métal ajouté peut alors jouer le rôle d'acide de Lewis (cas du bore).⁴⁴

Tableau 2 : Influence de la transmétallation sur la diastéréosélectivité

Aldéhyde	Alcynure métallé	Echange Li/Métal M	1,2-syn / 1,2-anti	Réf.
	M—C≡C—TMS	Li/Mg	95/5	45
		Li/Ti	11/89	
	M—C≡C—Ph	Li/Mg	74/26	41
		Li/Ti	36/64	46
		Li/Zn	95/5	41

Cette étude sur la chélation 1,2 et les métaux capables d'induire une bonne diastéréosélectivité nous permet déjà d'entrevoir quels métaux et quelles conditions de

⁴³ Ishiyama H., Takemura T., Tsuda M., Kobayashi J. *Tetrahedron* **1999**, 55, 4583

⁴⁴ Dolence E. K., Adamczyk M., Watt D. S., Russell G. B., Horn D. H. S. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1189

⁴⁵ Abel S., Faber D., Hüter O., Giese B. *Synthesis* **1999**, 1, 188

⁴⁶ Krause N., Seebach D. *Chem. Ber.* **1987**, 120, 1845

réaction (solvant, température) sont intéressants pour notre projet. En effet, l'utilisation du zinc nous donnerait accès aux alcools propargyliques 1,2-syn et le titane induirait la stéréosélectivité inverse. La sélectivité de ces métaux est améliorée à basse température dans le diéthyléther pour le zinc et dans le THF pour le titane.

Nos aldéhydes possédant un groupement ZR en position 3, nous devons également observer les influences de la chélation 1,3.

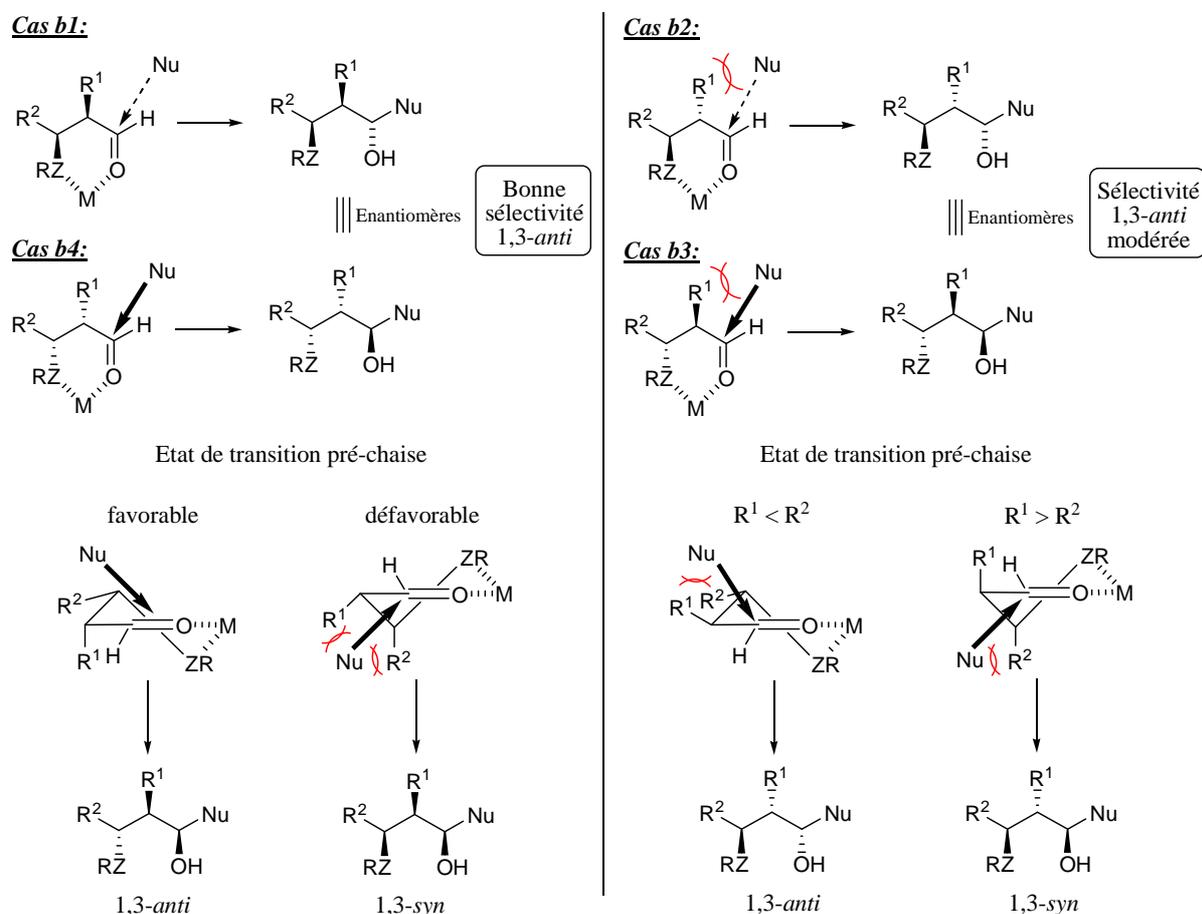
b- Chélation 1,3

Considérons d'abord les cas où la position 2 de l'aldéhyde ne possède pas d'hétéroatomes chélatants.

La chélation 1,3 étant la seule possible, la qualité de l'induction dépend de la configuration et de l'encombrement stérique du groupe R¹ en position 2 de l'aldéhyde. Quatre stéréoisomères sont envisagés (Schéma 26) :

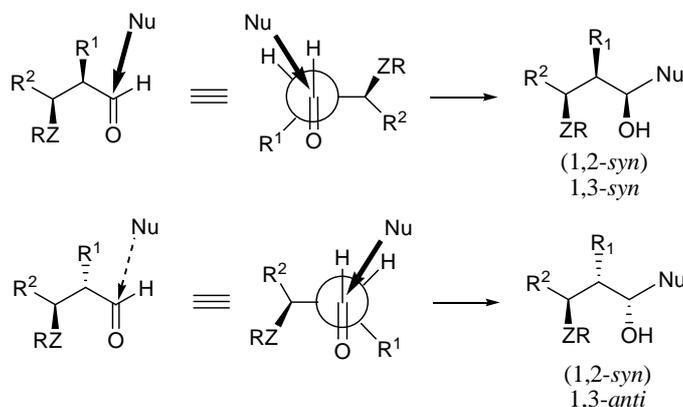
- si ZR et R¹ sont en position *syn*, alors le produit 1,3-*anti* est majoritairement obtenu
- si ZR et R¹ sont en position *anti*, alors l'induction 1,3-*anti* sera modérée

Schéma 26 : Chélation bidentée 1,3



Si aucune chélation n'est observée, la diastéréosélectivité est définie en suivant les règles de Felkin-Anh. La configuration relative au pied de R¹ joue toujours un rôle important et les deux produits 1,3-*syn* et 1,3-*anti* peuvent être formés avec, dans chaque cas, une diastéréosélectivité 1,2-*syn* prédominante (Schéma 27).

Schéma 27 : Absence de chélation : règles de Felkin-Anh



- Selon la littérature, le lithium⁴⁷ et le magnésium⁴⁸ n'induisent pas ou sinon très peu de sélectivité.
- Les alcynures d'étain sont plus sélectifs en faveur du produit 1,3-*anti* (ed > 90) mais il est nécessaire d'ajouter un acide de Lewis tel que Me₂AlCl ou BF₃·OEt₂. La diastéréosélectivité s'inverse en faveur du produit 1,3-*syn* avec un acide de Lewis dérivé du titane (TiCl₃OⁱPr).⁴⁹

Ce type de chélation est plus délicat. Peu de métaux sont capables d'induire une bonne sélectivité, ils ont de surcroît besoin de l'aide d'un acide de Lewis.

Nos aldéhydes possèdent des groupements alkoxy à la fois en position 2 et en position 3. Les paramètres pour favoriser une chélation soit 1,2 soit 1,3 sont différents et il faut maintenant tenir compte de l'influence conjuguée de ces deux chélations.

⁴⁷ (a) Takatori K., Tanaka N., Tanaka K., Kajiwara M. *Heterocycles* **1993**, *36*, 1489; (b) Miyata O., Nakajima E., Naito T. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 213; (c) Marshall J. A., Johns B. A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1501; (d) Toshima K., Arita T., Kato K., Tanaka D., Matsumura S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8873

⁴⁸ (a) Haustedt L. O., Panicker S. B., Kleinert M., Hartung I. V., Eggert U., Niess B., Hoffmann H. M. R. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6967; (b) Ball M., Gaunt M. J., Hook D. F., Jessiman A. S., Kawahara S., Orsini P., Scolaro A., Talbot A. C., Tanner H. R., Yamanoi S., Ley S. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5433

⁴⁹ (a) Evans D. A., Halstead D. P., Allison B. D. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4461; (b) Evans D. A., Allison B. D., Yang M. G. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4457

c- Cas des 2,3-dialkoxy-aldéhydes: Chélation 1,2 ou 1,3 ?

Prédire la stéréosélectivité de l'addition d'un alcynure métallé sur un 2,3-dialkoxy-aldéhyde chiral relève du défi. Le choix du métal devient alors primordial et les conditions de réactions devront être plus rigoureuses. Les meilleures inductions sont attendues pour les diastéréoisomères correspondant à la fois à une chélation 1,2 et à une chélation 1,3 (en tenant compte de l'encombrement dû au groupement alkoxy en position 2).

- Hormis certains cas,⁵⁰ le lithium n'est pas un métal permettant une excellente induction.³²
- Une forte chélation 1,2 avec les 2,3-dialkoxy-aldéhydes et le magnésium est attendue pour conduire majoritairement à l'isomère 1,2-*syn*.⁵¹ Si la chélation est difficile ou impossible (cas des isopropylidènes), la diastéréosélectivité est en faveur du produit 1,2-*anti*.^{52,53}
- En général, l'utilisation de dérivés du titane conduit favorablement à une diastéréosélectivité 1,2-*anti*. Il est à noter qu'elle suit les règles de Felkin-Anh car il n'y a pas de chélation pour des raisons stériques.⁵⁴
- Un seul cas reporte l'utilisation de dérivés du manganèse. Ceux-ci induisent des produits 1,2-*syn* grâce à une chélation 1,2 efficace.⁵⁵
- Selon l'étude des 2-alkoxy-aldéhydes, le zinc est très efficace dans les chélation 1,2 et induit une excellente sélectivité 1,2-*syn*. Mead a également observé cette tendance avec un 2,3-dialkoxy-aldéhyde (Schéma 28).⁴¹ Lu et al. ont exploité cette diastéréosélectivité dans la synthèse de la L-Lyx-phytosphingosine.⁵⁶

⁵⁰ (a) Bukownik R. R., Wilcox C. S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 463; (b) Gaudino J. J., Wilcox C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4374; (c) Williams D. R., Jass A. P., Tse H.-L. A., Gaston R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4552; (d) Sharma G. V. M., Punna S., Hymavathi L., Reddy N. Y., Krishna P. R., Chorghade M. S., Ley S. V. *Tetrahedron: Asymm.* **2005**, *16*, 1135; (e) Su Y.-L., Yang C.-S., Teng S.-J., Zhao G., Ding, Y. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2147

⁵¹ (a) Smith A. B., Friestad G. K., Barbosa J., Bertounesque E., Hull K. G., Iwashima M., Qui Y., Salvatore B. A., Spoor P. G., Duan J. J.-W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10468; (b) Czernecki S., Horns S., Valery J.-M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 650; (c) Michelet V., Adiey K., Tanier S., Dujardin G., Genêt J.-P. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2947

⁵² (a) Marco-Contelles J., de Opazo E., Arroyo N. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4729 ; (b) Marco-Contelles J., de Opazo E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3705; (c) Ley S. V., Michel P. *Synthesis* **2004**, 147; (d) Michel P., Ley S. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3898; (e) Dixon D. J., Krause L., Ley S. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **2001**, 2516

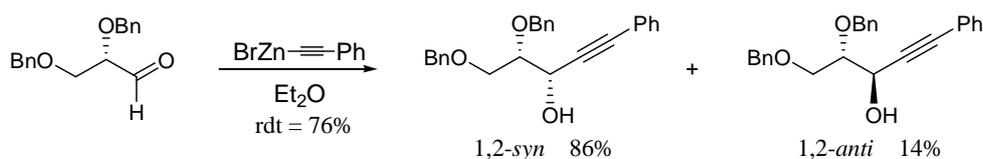
⁵³ (a) Buchanan J. G., Dunn A. D., Edgar A. R. *Carbohydrate. Res.* **1974**, *36*, 1, C5; (b) Buchanan J. G., Dunn A. D., Edgar A. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 1191; (c) Pearson W. H., Hembre E. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8273

⁵⁴ Trost B. M., Harrington P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5028

⁵⁵ Kasatkin A. N., Podlipchuk R. P., Biktimirov R. K., Tolstikov G. A. *Russ. Chem. Bull.* **1993**, *42*, 1078

⁵⁶ Lu X., Byun H.-S., Bittman R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5433

Schéma 28 : Addition d'un alcynure de zinc sur un 2,3-dialkoxy-aldéhyde



- Tezuka et al.⁵⁷ ont utilisé le cérium pour son caractère d'acide de Lewis et la faculté de chélation en 1,2. Le produit 1,2-syn est obtenu majoritairement voire exclusivement.

La présence de groupements alkoxy en positions 2 et 3 altère plus ou moins sensiblement les possibilités de chélation 1,2 ou 1,3. Soit les métaux utilisés sont moins efficaces dans leur chélation et une baisse de la sélectivité s'en ressent, soit l'encombrement des alkoxy et des ligands propres au métal favorise les règles de Felkin-Anh et enlève toute ambiguïté sur la sélectivité (caractère acide de Lewis mis en avant). Cependant quel que soit le type de métal utilisé, ces réactions dépendent fortement du substrat.

d- Conclusion

Ces trois cas d'étude nous indiquent plusieurs paramètres que nous ne devons pas négliger :

1) Un soin particulier doit être accordé au substrat car les groupes protecteurs des alcools en positions 2 et 3 jouent un rôle non négligeable sur la chélation et par conséquent sur la sélectivité. C'est pourquoi les groupements silylé et isopropylidène sont à éviter. Les groupements benzyliques semblent plus appropriés pour intervenir favorablement dans les chélation tout en limitant leur encombrement stérique. De plus, les produits d'alcynylation formés doivent être stables afin d'éviter tout équilibre réactionnel et modifier la sélectivité initiale.

2) Les métaux les plus efficaces sont principalement le magnésium, le zinc et le titane. Toutefois leurs réactivités dépendent énormément du solvant, de la température de réaction, de leurs propres ligands (surtout pour le titane et le zinc) et aussi du substrat.

⁵⁷ Tezuka K., Compain P., Martin O. R. *Synlett* **2000**, 1837

3) Le choix du solvant sera également crucial pour la sélectivité. Le diéthyléther semble être le solvant le plus approprié. Toutefois selon le métal utilisé, il est possible que le THF soit préféré.

4) Les conditions de réaction devront être rigoureuses (travail sous atmosphère inerte, solvants et réactifs anhydres). La température de réaction devra être contrôlée et adaptée au métal utilisé (-40°C pour le titane, 0°C pour le zinc par exemple).

Ces concepts de base nous permettent d'amorcer notre étude sur l'alcynylation d'aldéhydes chiraux dans le but d'accéder à divers C-glycosides.

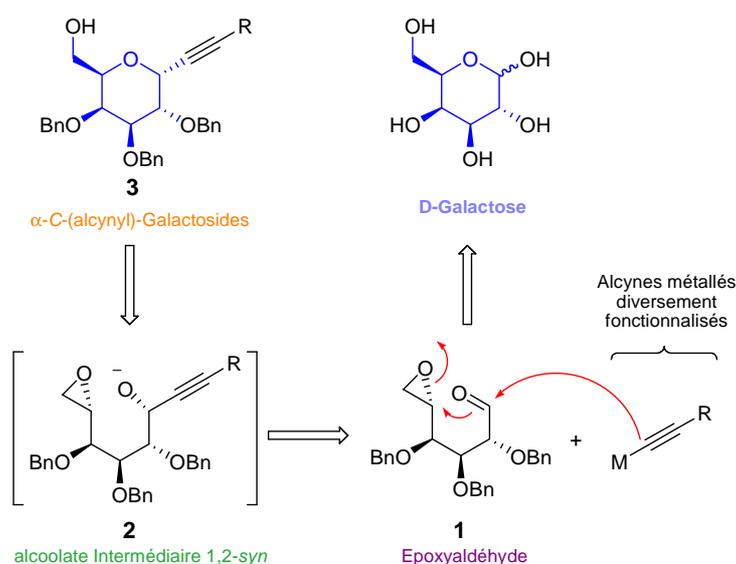
II) Stratégie NOÉ : addition Nucléophile-Ouverture d'Époxyde

1) Elaboration de la stratégie : Accès aux C-Galactosides

De nombreuses synthèses d' α -C-(alcynyl)-Galactosides ont été développées ces dernières années car ce sont des composés très attrayants pour la préparation d'analogues galactosidiques.^{58, 14b} Notre laboratoire s'y est également intéressé et une méthode efficace a été développée pour accéder sélectivement aux α -C-(alcynyl)-Galactosides à partir d'un sucre acyclique.

La stratégie est basée sur le contrôle de la diastéréosélectivité de l'alcynylation d'un aldéhyde α,β -*syn*-dialkoxy chiral **1**, avec l'appui des centres asymétriques déjà présents sur le sucre acyclique, suivie d'une ouverture sélective intramoléculaire de l'époxyde (Schéma 29).

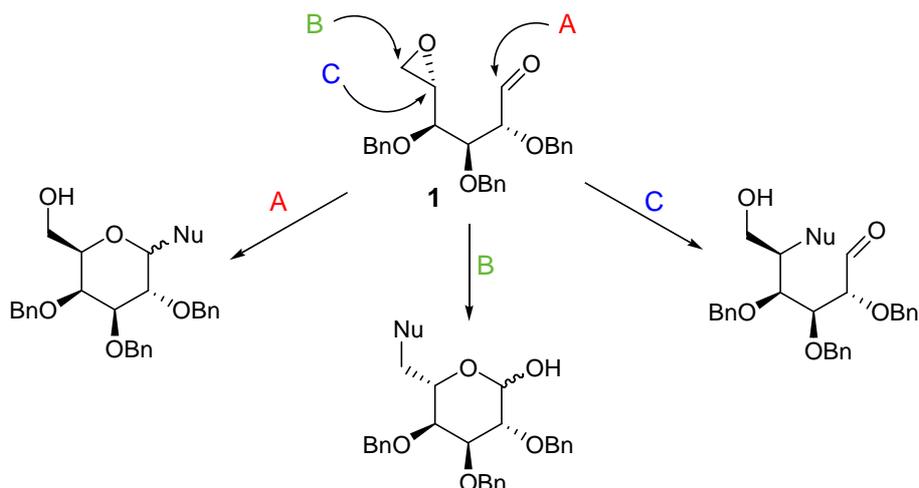
Schéma 29 : Méthodologie développée au laboratoire pour la synthèse d' α -C-(alcynyl)-Galactosides



Cette méthode est un véritable défi en terme de régiosélectivité. En effet, l'époxyaldéhyde **1** possède trois sites électrophiles et la réaction de **1** avec un nucléophile peut suivre trois voies A, B et/ou C selon les conditions de réaction (Schéma 30). Cette stratégie est d'autant plus osée qu'elle consiste à ouvrir un sucre et à le reconstituer après une cascade de réactions.

⁵⁸ (a) Leteux C., Veyrières A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2647; (b) Désiré J., Veyrières A. *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 177; (c) Dondoni A., Mariotti G., Marra A. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4475; (d) Chen G., Schmiegl J., Tsuji M., Franck R. W. *Org. Lett.* **2004**, 6, 4077; (e) Toba T., Murata K., Yamamura T., Miyake S., Annoura H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 5043

Schéma 30 : Trois voies d'additions possibles sur l'époxyaldéhyde **1**



Cette méthode a été élaborée en suivant deux phases :

- 1) Etude modèle sur l'aldéhyde fonctionnalisé **4** (Cf. Schéma 31) afin de définir les meilleures conditions d'addition d'un alcynure métallé (solvant, température, nature du métal) par la voie A
- 2) Etude de la cascade de réactions *in situ* avec divers alcynes sur l'époxyaldéhyde **1**

Ces travaux ont été effectués par le Dr. Stéphane Guillaume lors de son stage post-doctoral (2003-2005) et ont fait l'objet de deux publications.⁵⁹

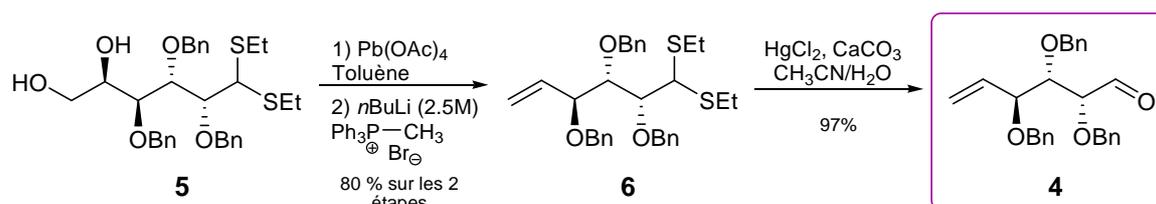
a- Alcynylation 1,2-syn sélective sur un sucre acyclique : Rôle marquant du dichlorure de zinc^{59a}

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre A-I-2, la chélation joue un rôle crucial dans la stéréosélectivité de la réaction. Le choix des groupes protecteurs, du solvant, du métal et de la température doit être judicieux pour espérer obtenir les composés désirés. C'est pourquoi le premier réflexe a été de bannir les groupes isopropylidène et silylé dans la synthèse de l'aldéhyde modèle **4**. Celui-ci est obtenu en trois étapes à partir du diol **5** connu, synthétisé à partir du D-Galactose⁶⁰ (Rendement global de 49% sur les 7 étapes) (Schéma 31).

⁵⁹ (a) Guillaume S., Haudrechy A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3175; (b) Guillaume S., Plé K., Haudrechy A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1015

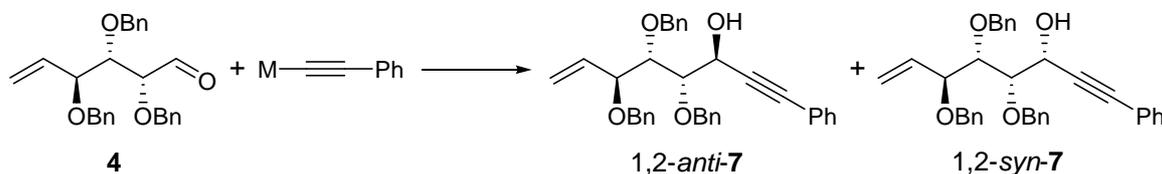
⁶⁰ Frankowski A., Deredas D., Streith J., Tschamber T. *Tetrahedron* **1998**, 54, 31, 9033

Schéma 31 : Synthèse de l'aldéhyde modèle 4



Par la suite, la réaction d'addition a été étudiée entre l'aldéhyde modèle 4 et le phénylacétylène en variant le solvant et la nature du métal (Schéma 32). Les premières additions ont montré que les résultats les plus significatifs sont obtenus en utilisant 3,5 équivalents d'alcyne par rapport à l'aldéhyde introduit. Ces proportions se sont révélées optimales dans les études suivantes.

Schéma 32 : Réaction entre 4 et le phénylacétylène en présence de différents métaux



Sachant que la chélation 1,2 est plus efficace que la chélation 1,3 dans le cas des 2,3-dialkoxy-aldéhydes, les sels métalliques les plus intéressants sont les dérivés du magnésium, du cérium, du titane, de l'aluminium, de l'étain et du zinc. Les solvants THF, éther et toluène ont été utilisés en fonction du métal choisi. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Variation du métal et du solvant utilisés dans l'étude modèle

Entrée	Conditions	Rendement ^a (%)	Rapport ^b
			1,2- <i>anti</i> -7 / 1,2- <i>syn</i> -7
1	$n\text{-BuLi}$, THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$	75	65/35
2	$n\text{-BuLi}$, Et_2O , $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$	75	50/50
3	$n\text{-BuLi}$, toluène, $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$	71	40/60
4	$n\text{-BuLi}$, $\text{MgBr}_2\cdot\text{OEt}_2$, THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$	56	63/37
5	$n\text{-BuLi}$, $\text{MgBr}_2\cdot\text{OEt}_2$, Et_2O , $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$	74	42/58
6	$n\text{-BuLi}$, CeCl_3 , THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{T.A.}$	53	67/33
7	$n\text{-BuLi}$, $\text{MgBr}_2\cdot\text{OEt}_2$, $\text{CuBr}\cdot\text{SMe}_2$, THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{T.A.}$	56	50/50
8	$n\text{-BuLi}$, $\text{ClTi}(\text{O-}i\text{Pr})_3$, THF, $-40^\circ\text{C} \rightarrow \text{T.A.}$	53	74/26
9	$n\text{-BuLi}$, AlEt_2Cl , THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{T.A.}$	-	-
10	$n\text{-BuLi}$, ZnBr_2 , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{T.A.}$	23	23/77
11	$n\text{-BuLi}$, ZnBr_2 , Et_2O , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{T.A.}$	37	17/83
12	$n\text{-BuLi}$, ZnCl_2, Et_2O, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{T.A.}$	79	7/93
13	$n\text{-BuLi}$, SnMe_3Cl , THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$	33	16/84

a- Rendement après purification sur gel de silice

b- Rapport déterminé par CLHP en phase inverse avec une colonne Nucleodur et $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 78:22 comme éluant

L'impact du solvant sur la sélectivité a été observé avec l'alcynure lithié (Entrées 1 à 3). Son addition sur l'aldéhyde **4** dans le THF à -78°C conduit au mélange 1,2-*anti* et 1,2-*syn* des deux alcools propargyliques **7**, non séparables sur une colonne chromatographique sur gel de silice classique, avec un rendement de 75% dans un rapport diastéréoisomérique 65:35 (déterminé par dérivatisation avec les Esters de Mosher) (Entrée 1). L'utilisation de solvants moins complexants du métal (THF → Et₂O → Toluène) montre une évolution de la sélectivité en faveur du diastéréoisomère 1,2-*syn*. Ceci est tout à fait en accord avec une amélioration de la chélation 1,2 (Entrées 2 et 3). Toutefois, les réactifs de Grignard n'ont pas permis d'accroître significativement la sélectivité observée dans le cas du lithium (Entrées 4 et 5). Comme les sélectivités obtenues avec le lithium et le magnésium sont trop faibles, la chélation 1,2 doit être amorcée par des métaux plus chélatants.

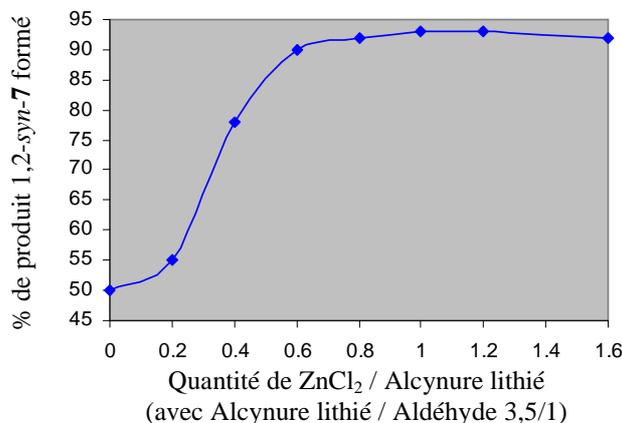
Les tests effectués avec des dérivés du cérium, du cuivre, du titane, ou de l'aluminium (Entrées 6 à 9) affectent peu l'induction observée précédemment avec le lithium ou le magnésium. Par contre, l'utilisation de dibromure de zinc (Entrée 11) donne une excellente sélectivité en faveur de l'isomère 1,2-*syn* mais avec un rendement faible. Ce rendement, ainsi que la sélectivité, sont légèrement améliorés lorsque la réaction est effectuée dans l'éther. Contrairement aux résultats de Mead obtenus dans le cas des 2-alkoxyaldéhydes⁴¹ (Cf. Schéma 24), la meilleure induction accompagnée d'une forte hausse du rendement ont été observées avec le dichlorure de zinc fondu sous vide (Entrée 12). Un dérivé de l'étain a également été testé et présente une sélectivité similaire au dichlorure de zinc mais avec un très faible rendement (Entrée 13).

Dans le but d'identifier la nature des espèces les plus impliquées dans l'induction 1,2-*syn* dans le cas du dichlorure de zinc (le chlorure de lithium, sel formé *in situ*, ou une espèce zincique ?), plusieurs expériences ont été réalisées :

- L'ajout de LiCl dans les conditions définies à l'entrée 2, n'a pas modifié le rapport diastéréoisomérique observé. Ceci peut être dû aux problèmes de solubilité indiquant que le lithium n'est probablement pas impliqué dans l'espèce chélatée.
- Une étude a été effectuée en faisant varier les quantités de dichlorure de zinc dans les conditions définies dans l'entrée 12. Le profil obtenu montre qu'une certaine concentration en dichlorure de zinc est essentielle pour obtenir majoritairement le produit 1,2-*syn* (Schéma 33).

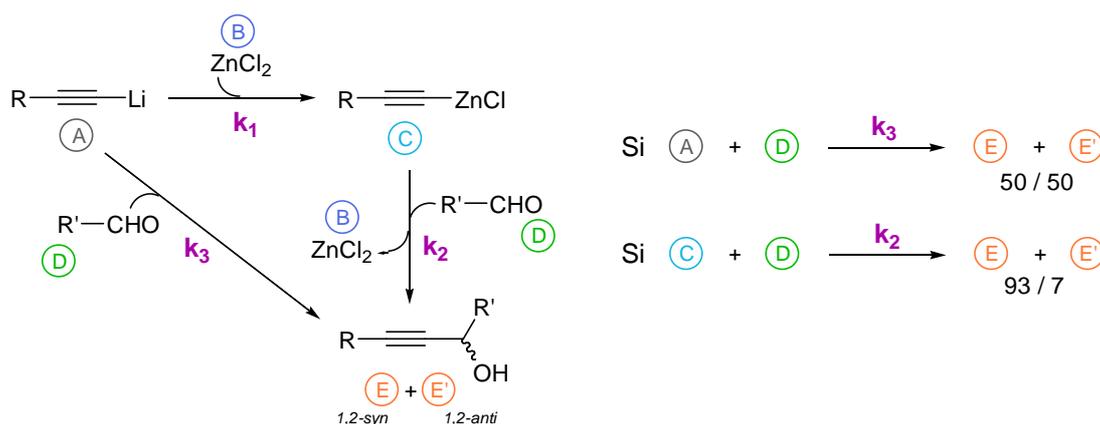
Schéma 33 : Quantité de produit 1,2-syn formé en fonction de la quantité de dichlorure de zinc introduite

Quantité de ZnCl ₂ / Alcynure lithié	% de produit 1,2-syn-7 formé
0	50
0,2	55
0,4	78
0,6	90
0,8	92
1	93
1,2	93
1,6	92



D'un point de vue cinétique, ce profil est meilleur que celui fourni par la statistique. En effet, les relations cinétiques suivantes ont été examinées (Schéma 34) :

Schéma 34 : Relations de cinétique chimique



Les calculs théoriques effectués pour 0,2 équivalents de dichlorure de zinc, en supposant que l'espèce C est plus réactive que l'espèce A ($k_2 > k_3$), montrent que :

$$\text{pour E : } 0,8 \text{ éq. A} + 0,2 \text{ éq. C} = (0,8 \times 50\% + 0,2 \times 93\%) = 59\% \rightarrow \text{valeur obtenue : } 55\%$$

$$\text{pour E}' : 0,8 \text{ éq. A} + 0,2 \text{ éq. C} = (0,8 \times 50\% + 0,2 \times 7\%) = 41\% \rightarrow \text{valeur obtenue : } 45\%$$

Ces calculs concordent avec les valeurs observées.

Or à partir de 0,4 équivalents jusqu'à 0,8 équivalents de dichlorure de zinc, la statistique ne corrèle plus avec les rapports diastéréoisomériques relevés (Schéma 35).

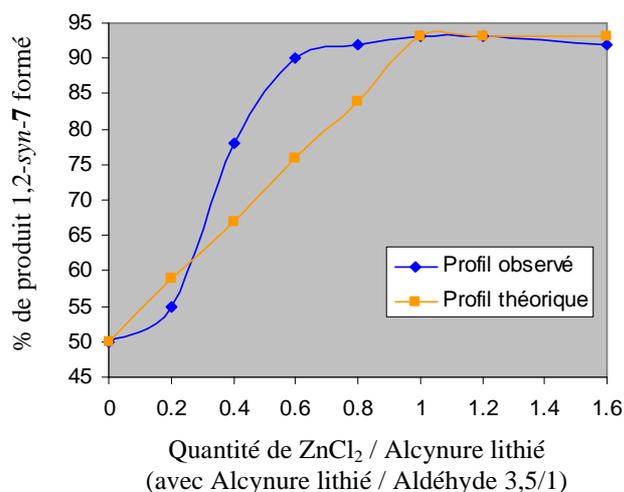
$$\text{Pour E : } 0,6 \text{ éq. A} + 0,4 \text{ éq. C} = (0,6 \times 50\% + 0,4 \times 93\%) = 67\% \rightarrow \text{valeur obtenue : } 78\%$$

$$\text{Pour E}' : 0,6 \text{ éq. A} + 0,4 \text{ éq. C} = (0,6 \times 50\% + 0,4 \times 7\%) = 33\% \rightarrow \text{valeur obtenue : } 22\%$$

Certes ces calculs ne sont que des approximations, une étude cinétique plus poussée doit être effectuée pour valider ces remarques et déterminer quelle espèce métallée est la plus réactive.

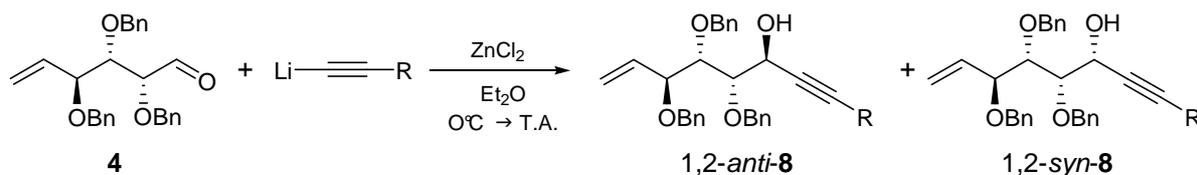
Schéma 35 : Comparaison avec les calculs théoriques

Quantité de ZnCl ₂ / Alcynure lithié	% de produit 1,2- <i>syn</i> -7 théoriquement formé
0	50
0,2	59
0,4	67
0,6	76
0,8	84
1	93
1,2	93
1,6	93



Avant de poursuivre l'étude sur la cascade de réactions, l'approche sur l'aldéhyde modèle **4** a été étendue à divers alcynes (Tableau 4).

Tableau 4 : Réactions entre l'aldéhyde **4** et divers alcynes



Entrée	R	Rendement ^a (%)	Rapport ^b 1,2- <i>anti</i> -8 / 1,2- <i>syn</i> -8
1	Ph	79	7/93
2	<i>n</i> -C ₃ H ₇	47	17/83
3	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	32	14/86
4	TMS	85	< 6 / >94
5	CO ₂ Et	< 5	-
6	CH ₂ OTBS	55	14/86

a- Rendement après purification sur gel de silice

b- Rapport déterminé par CLHP en phase inverse avec une colonne Nucleodur et MeOH/H₂O 78:22 comme éluant

Bien que les alcynes contenant une chaîne alkyle soient moins efficaces en termes de réactivité et de sélectivité (Entrées 2 et 3), l'essence même de l'approche est conservée. La présence d'un groupement ester sur l'alcyne génère beaucoup de difficultés. Même si le dérivé lithié est connu,⁶¹ il semble que la température à laquelle les réactions sont effectuées et la réactivité sur l'aldéhyde

⁶¹ (a) Herrmann J. L., Berger M. H., Schlessinger R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6, 1544; (b) Midland, M. M., Tramontano A., Cable J. R. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1, 28

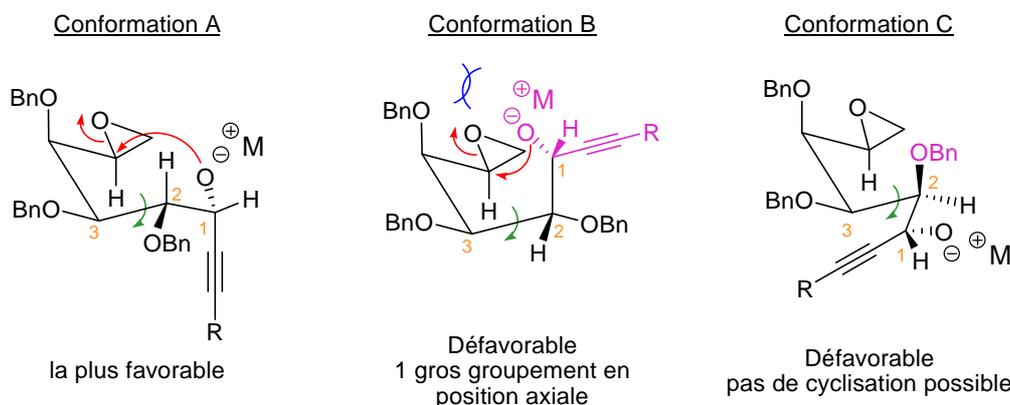
engendre de nombreux sous-produits dans ce cas (Entrée 5). Un alcyne plus fonctionnalisé a été testé et donne majoritairement le produit 1,2-*syn* souhaité avec un rendement modeste (Entrée 6).

Le cas le plus notoire est l'entrée 4 : l'acétylène de zinc conduit presque exclusivement à l'alcool 1,2-*syn* attendu avec un excellent rendement. Ce résultat est très intéressant car le groupement TMS peut être remplacé, par la suite, par un autre type de chaîne.^{58e}

b- Synthèse sélective d' α -C-(alcyne)-Galactosides par une réaction tandem efficace^{59b}

L'étude modèle a permis de déterminer les conditions idéales pour accéder majoritairement voire exclusivement à l'alcool intermédiaire 1,2-*syn* **8**. Comme les additions d'alcyne sur les 1,2-époxyaldéhydes sont hautement régiosélectives selon la voie A⁶² (Cf. Schéma 30), l'application de la stratégie à l'époxyaldéhyde **1** semble possible. De plus l'état de transition pré-chaise de l'alcoolate intermédiaire **2** est assez favorable à sa cyclisation sur l'époxyde (Schéma 36). Le conformère A possède la majorité des substituants en position équatoriale et l'alcoolate peut réagir sans difficulté selon un mécanisme de type S_N2 (anti-périplanarité respectée) avec l'époxyde pour donner l' α -D-Galactoside correspondant.

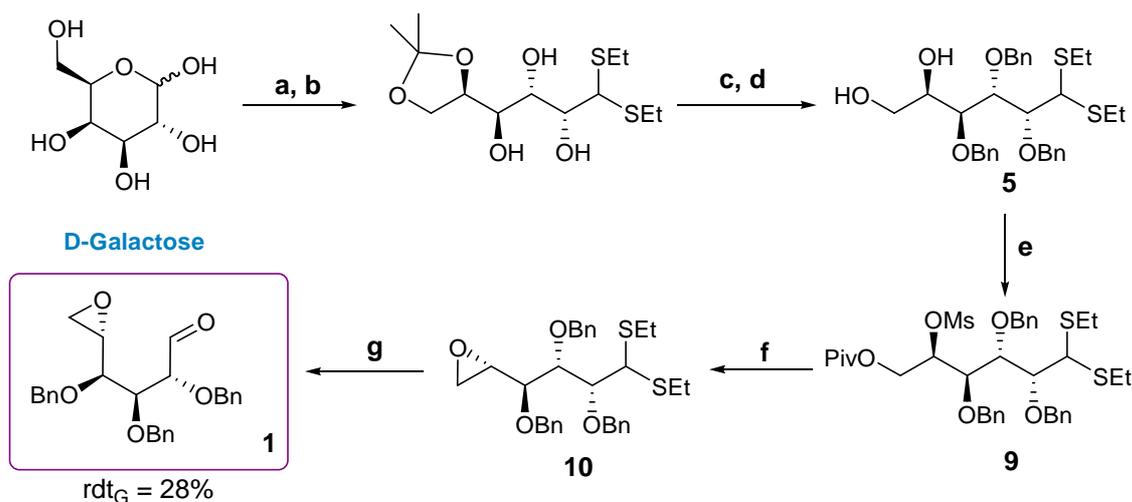
Schéma 36 : Etats de transitions autour de la liaison C2-C3 de l'alcoolate intermédiaire 2



L'époxyaldéhyde **1** est également préparé à partir du diol **5**⁶⁰ en quatre étapes (Rendement global de 28% sur les 8 étapes à partir du D-Galactose) (Schéma 37).

⁶² (a) Demin P. M., Vasil'eva L. L., Lapitskaya M. A., Belosludtev Y. Y., Myagkova G. I., Pivnitskii K. K. *Bioorg. Khim.* **1990**, *16*, 1125; (b) Tichowsky I., Lett R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4003; (c) Shahi S. P., Koike K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2525

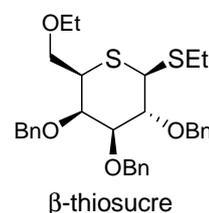
Schéma 37 : Synthèse de l'époxyaldéhyde **1** à partir du D-Galactose



a) EtSH, HCl 12N; b) (CH₃)₂C(OCH₃)₂, PPTS, acétone; c) NaH, BnBr, DMF; d) AcOH 75% aq., 60°C, (63% 4 étapes); e) (i) ^tBuCOCl, Pyridine, CH₂Cl₂; (ii) MsCl, DMAP; f) KOH, MeOH/H₂O 99:1; g) I₂, CaCO₃, THF/H₂O 7:3 (45% 4 étapes)

Il est à noter dans cette synthèse que la protection de l'alcool primaire par un groupement pivaloyl, suivie de la protection de l'alcool secondaire par un groupe mésyl, s'effectuent en un seul pot. L'époxyde **10** est obtenu très proprement par saponification de l'ester suivie d'une cyclisation spontanée de l'alcoolate sur le carbone mésylé en milieu méthanol aqueux. Sans purification sur colonne chromatographique, il est engagé dans la déprotection du dithioacétal par le diiode en milieu tamponné.

Remarque : Dans les premiers essais effectués, l'époxyde isolé **10** était parasité par un composé non identifié. Nos investigations ont montré qu'il s'agissait du β-thiosucre correspondant à la cyclisation d'un soufre sur l'époxyde suivi d'un transfert du groupe éthyle porté par le soufre sur l'alcoolate nouvellement formé. Les détails de nos études ainsi que la valorisation de ce thiosucre seront développées au Chapitre D de ce manuscrit.

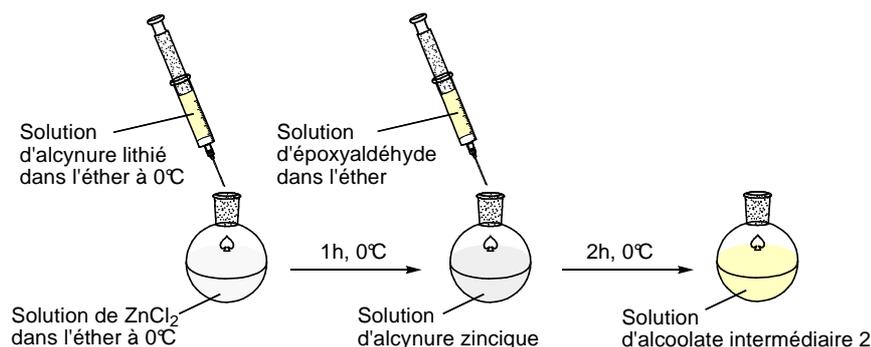


La réaction de couplage a été effectuée dans les conditions définies dans l'étude modèle :

- 7 équivalents d'une solution étherée de dichlorure de zinc préalablement fondu sous vide
- 3,5 équivalents d'alcynure lithié (R = Ph), ajoutés à la solution de dichlorure de zinc à 0°C
- 1 équivalent d'époxyaldéhyde **1**, additionné sur la solution d'alcynure zincique à 0°C (Schéma 38)

Il est remarquable que le dichlorure de zinc est introduit en plus grand excès que ne le recommande l'étude modèle. L'idée est d'utiliser le caractère acide de Lewis du dichlorure de zinc en excès pour activer l'ouverture de l'époxyde et stimuler la cascade de réactions.

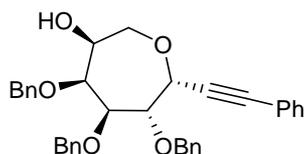
Schéma 38 : Protocole pour effectuer l'addition nucléophile



Après deux heures de réaction à 0°C, l'analyse par CCM indique la formation presque exclusive d'un produit plus polaire que l'époxyaldéhyde **1**, correspondant à l'alcoolate intermédiaire 1,2-*syn* **2** attendu. La poursuite de l'agitation pendant 24 heures à température ambiante fournit 55% de l' α -C-Galactoside **3** souhaité. Les analyses spectroscopiques montrent un doublet à 5,07 ppm, possédant une constante de couplage $^3J_{1,2} = 5,6$ Hz, caractéristique de la configuration α des C-Galactosides.^{58e} L'absence de β -C-Galactoside indique que la procédure est hautement régio- et stéréosélective. Cependant, l'étape de cyclisation de la réaction tandem n'est pas complète car 14% d'alcool intermédiaire sont récupérés.

Remarque : Une épimérisation a été observée en milieu acide (CSA) lors de différentes tentatives de cyclisation de l'alcool intermédiaire **2** isolé. 64% d' α,β -C-glycosides dans un rapport diastéréoisomérique 1,5/1 ont été isolés en milieu acide, et 58% dans un rapport 3/1 en milieu basique. Ce dernier conduit également à 24% d'un composé à sept chaînons résultant de l'ouverture de l'époxyde par l'alcoolate du côté le moins substitué (Schéma 39).

Schéma 39 : Sous-produit à 7 chaînons



Pour accélérer la seconde étape de la stratégie, plusieurs expériences ont été réalisées.

- 1) L'élévation de la température à 35°C pendant 24 heures n'a permis aucune évolution des rendements
- 2) L'ajout de divers additifs pour activer l'époxyde a alors été testé : une solution 1M de dichlorure de zinc dans le THF, le tétra-*isopropoxy*-titane $Ti(O^iPr)_4$ et le bromure de lithium. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 0,25-0,3 équivalent de bromure de lithium. L' α -C-Galactoside **3** est alors isolé avec 73% de rendement sans trace de composé β .

En possession des conditions optimales pour synthétiser des α -C-Galactosides, la procédure a été appliquée à divers alcynes (Schéma 40, Tableau 5).

Schéma 40 : Alcynylation de l'époxyaldéhyde **1** avec divers alcynures zinciques

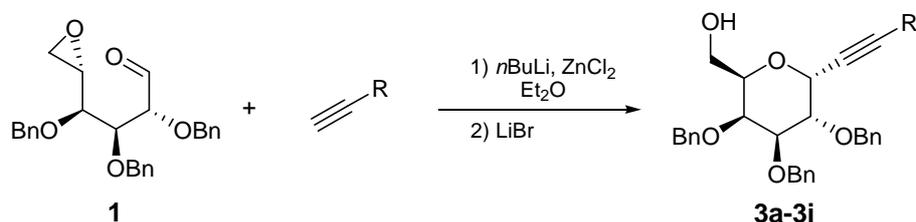
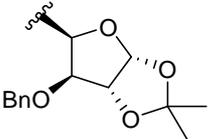
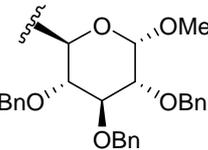
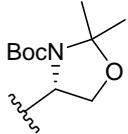


Tableau 5 : Alcynylation de l'époxyaldéhyde **1** avec divers alcynures zinciques

Entrée	R	Produit	Rendement (%)
1	Ph	3a	73
2	<i>n</i> -C ₃ H ₇	3b	69
3	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	3c	63
4	TMS	3d	62
5	CH ₂ OTBS	3e	69
6	C(=CH ₂)CH ₃	3f	73
7		3g	70
8		3h	55
9		3i	48

Les alcynes contenant une chaîne alkyle ont fourni de bons rendements. De plus, ils conduisent sélectivement au composé α attendu (Tableau 5, Entrées 2 et 3). Par contre l'acétylène du cas TMS s'est montré décevant puisque la sélectivité et le rendement sont moindres. De plus, pour la première fois, une quantité significative de β -C-Galactoside (12%) a été isolée (Entrée 4). Les analyses spectroscopiques montrent une constante de couplage $^3J_{1,2} = 9,5$ Hz, caractéristique de la configuration β des C-Galactosides.^{14b}

La stratégie a été étendue à des alcynes plus élaborés (Entrées 7 à 9). Ces alcynes ont été préparés selon les procédures connues dans la littérature.⁶³ La réaction avec le dérivé du D-Xylose est achevée au bout de 6 heures à température ambiante et donne uniquement l' α -C-disaccharide avec un très bon rendement de 70% (Entrée 7). La réaction avec l'alcyne dérivé du D-Glucose est moins efficace et fournit l' α -C-Galactoside correspondant avec un rendement de 55% (Entrée 8). Enfin, les composés aminés peuvent également être utilisés dans notre méthode puisque la réaction avec un dérivé d'amino-alcool propargylique conduit à l' α -C-Galacto-amino-alcool désiré avec un rendement de 48% (Entrée 9).

c- Conclusion

Notre laboratoire a développé une stratégie efficace pour synthétiser sélectivement, en un seul pot, des α -C-Galactosides plus ou moins complexes. La séquence de deux étapes impliquant l'addition d'un alcynure métallé sur un époxyaldéhyde chiral suivie d'une cyclisation de l'alcoolate formé sur la fonction époxyde, est hautement régio- et stéréosélective.

A la vue de ces résultats très intéressants obtenus dans le cas du D-Galactose, il m'a été confié de tester la stratégie NOÉ sur d'autres sucres, tel que le D-Mannose.

2) Stratégie NOÉ : Accès aux C-Mannosides ?

Dans ce paragraphe, la série D-Mannose sera exploitée de façon analogue aux travaux menés dans le cas du D-Galactose. Cette famille de dérivés se comporte de manière étonnante et cinq points particuliers seront discutés :

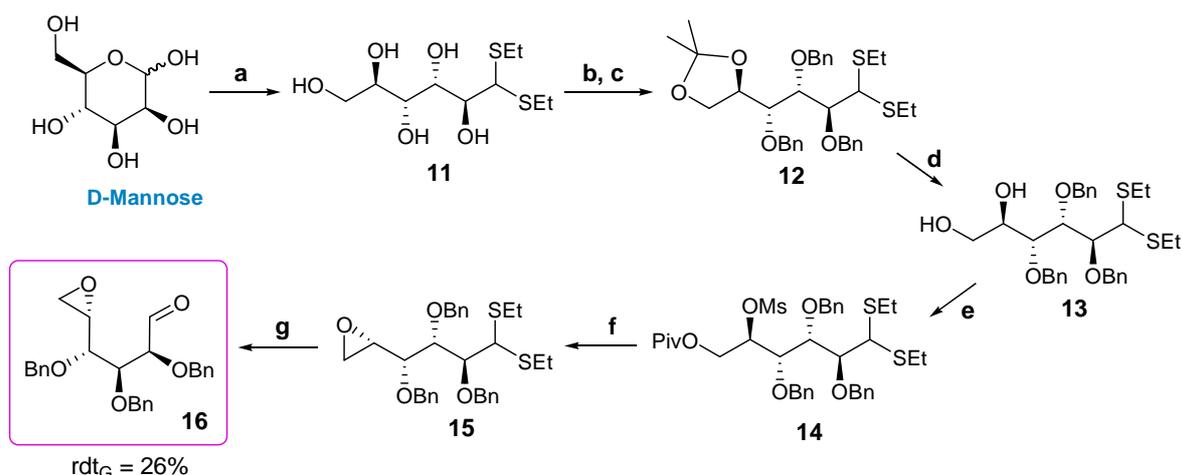
- a- Sous-produits inattendus lors de la première attaque nucléophile
- b- Conformations défavorables
- c- Doute sur la structure des produits cyclisés
- d- Seconde étape activée en milieu acide : accès à des dérivés furaniques
- e- Cas des C-D-Mannosyltryptophanes

Introduction : Rôle du zinc

La synthèse de l'époxyaldéhyde **16** issu du D-Mannose (8 étapes, rendement global de 26%) est effectuée selon le même mode opératoire que dans le cas du D-Galactose (Schéma 41).

⁶³ (a) Kakinuma K. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 2089; (b) Rouzaud D., Sinaÿ P. G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 1353; (c) Reginato G., Mordini A., Degl'Innocenti A., Caracciolo M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8275

Schéma 41 : Synthèse de l'époxyaldéhyde 16 à partir du D-Mannose

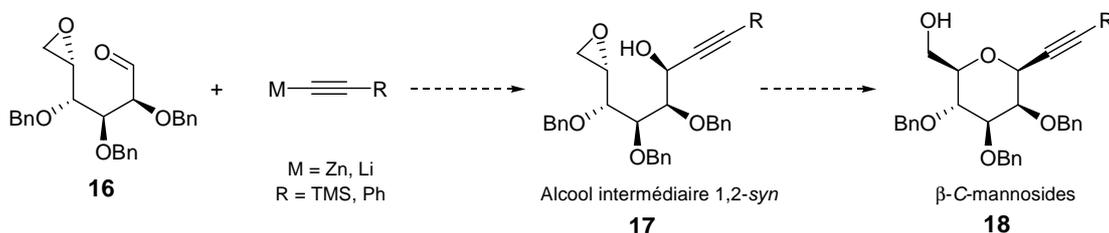


a) EtSH, HCl 12N; b) (CH₃)₂C(OCH₃)₂, PPTS, acétone; c) NaH, BnBr, DMF; d) AcOH 75% aq., 60°C, (66% 4 étapes); e) (i) ^tBuCOCl, Pyridine, CH₂Cl₂; (ii) MsCl, DMAP; f) KOH, MeOH/H₂O 99:1; g) I₂, CaCO₃, THF/H₂O 7:3 (40% 4 étapes)

L'application de la stratégie NOÉ à l'époxyaldéhyde 16 devrait conduire, cette fois, aux β-C-Mannosides correspondants (Schéma 42). Il est à noter que l'équipe d'Ullas s'intéresse à ce genre de composés pour leur potentiel inhibiteur de la sélectine.⁶⁴

Dans un premier temps, nous avons donc étudié le comportement de cet époxyaldéhyde en présence de certains alcyures auparavant utilisés dans le cas du D-Galactose (Schéma 42).

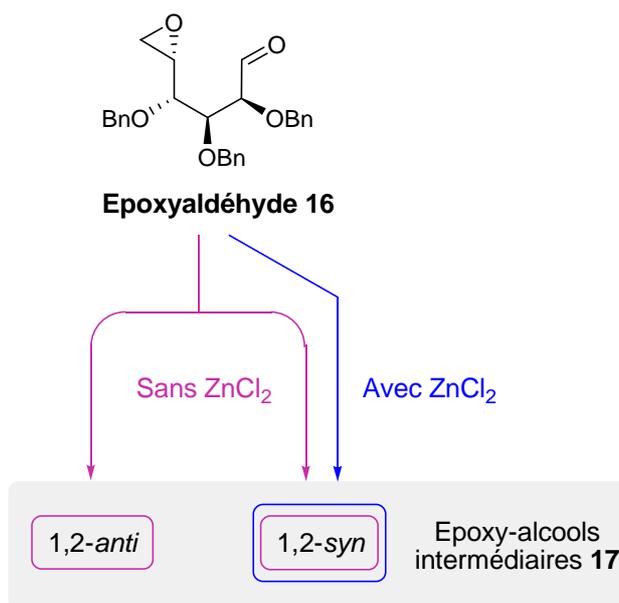
Schéma 42 : Application de la stratégie NOÉ à l'époxyaldéhyde 16



Pour déterminer l'induction du zinc dans cette série D-Mannose, nous avons testé deux types de réactions : une manipulation sans dichlorure de zinc qui nous servira de témoin, et une manipulation avec dichlorure de zinc, tout en conservant les proportions précédemment définies pour l'époxyaldéhyde, l'alcyne, la base (*n*BuLi) et le bromure de lithium (Schéma 43).

⁶⁴ Kaila N., Chen L., Thomas IV B. E., Tsao D., Tam S., Bedard P. W., Camphausen R. T., Alvarez J. C., Ullas G. *J Med. Chem.* **2002**, 45, 8, 1563

Schéma 43 : Deux types de réactions testés



🔗 Sans $ZnCl_2$:

Les analyses spectroscopiques de l'époxy-alcool intermédiaire isolé **17** (rendement de 68%) montrent la présence de deux diastéréoisomères dans un rapport 1/1. Ceci démontre bien que le lithium n'apporte aucune sélectivité lors de l'addition nucléophile, ce qui est un comportement tout à fait attendu.

🔗 Avec $ZnCl_2$:

La même réaction conduite en présence de dichlorure de zinc et stoppée rapidement (après 3 heures) par l'ajout d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, fournit, cette fois-ci, l'époxy-alcool intermédiaire **17** sous forme d'un seul diastéréoisomère. Ce résultat prometteur, indicateur de l'effet chélatant du zinc, nous a encouragés à tester la cascade NOÉ. Toutefois, dans nos tests, nous avons isolé, en quantité non négligeable, plusieurs sous-produits non rencontrés précédemment avec le D-Galactose, et la cyclisation *in situ* semble beaucoup plus délicate (Tableau 6). Des produits cyclisés ont été observés en faible quantité, nommés produit cyclisé **19** (haut Rf) et produit cyclisé **20** (bas Rf). Leurs structures seront discutées dans le paragraphe c-.

Tableau 6 : Premiers tests de la stratégie NOÉ en série D-Mannose

Entrée	R	Sel de Zinc puis ajout de LiBr	Rendement Alcool intermédiaire 1,2-syn 17	Rendement sous-produits	Rendement Produit cyclisé 19	Rendement Produit cyclisé 20
1	TMS	ZnCl ₂ (2 éq.)	-	15 % (A1) 12 % (A2)	6 %	20 %
2	Ph	ZnCl ₂ (2 éq.)	-	23-26 % (A3)	9 -11 %	27 - 40 %
3		ZnCl ₂ (1 éq.)	37 %	33 % (A3)	< 1 %	11 %
4		ZnCl ₂ (1 éq.) (sans ajout de LiBr)	71 %	-	-	-

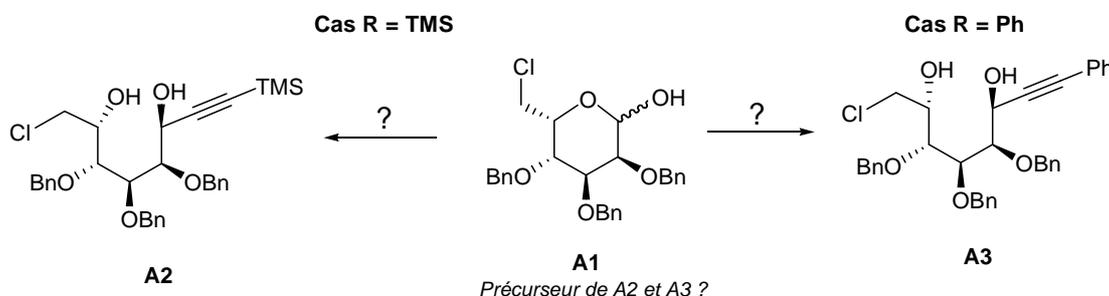
a- Sous-produits inattendus lors de la première attaque nucléophile

L'époxyaldéhyde possède trois sites électrophiles dont le plus réactif semble être l'aldéhyde comme dans le cas du D-Galactose (Cf. Schéma 30).

Cependant dans le cas du triméthylsilylacétylène (Entrée 1), nous avons isolé un produit **A1**⁶⁵ (15%) résultant de l'attaque d'un chlorure sur l'époxyde suivie d'une cyclisation sur l'aldéhyde pour former un hémiacétal, et un composé **A2** (12%) obtenu par addition du chlorure sur le carbone 6 du sucre et de l'attaque de l'alcynure sur l'aldéhyde. Dans le cas du phénylacétylène (Entrée 2), un produit **A3** (~ 25%) issu de l'attaque du chlorure sur l'époxyde et de l'addition nucléophile de l'alcynure sur l'aldéhyde, a été observé. Il ne nous paraît pas évident, ici, de définir un ordre préférentiel d'attaque entre l'époxyde et l'aldéhyde, le composé **A1** pouvant être le précurseur commun de **A2** et de **A3** (Schéma 44).

Il est donc remarquable que, dans la série D-Mannose, le contre-anion chlorure issu de l'excès de dichlorure de zinc (~ 2 équivalents par rapport à l'alcynure) se montre nucléophile vis-à-vis de l'époxyde.

Schéma 44 : Sous-produits observés



⁶⁵ Ce composé existe dans la littérature mais en série D-Glucose : (a) Larabi M.-L., Frechou C., Demailly G. *Carbohydrate Lett.* **1996**, 2, 1, 61; (b) Motawia M. S., Marcussen J., Moeller B. L. *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, 14, 9, 1279

Afin de limiter la formation de ces sous-produits, nous avons décidé de reprendre nos tests en diminuant, cette fois, la quantité de dichlorure de zinc (< 1 éq.) (Tableau 6, Entrée 3). Les résultats de cette réaction nous indiquent que nous avons à nouveau isolé le produit **A3**, en pourcentage significatif (33%), mais aussi une certaine quantité d'alcool intermédiaire 1,2-*syn* **17** (37%) car très peu de produits cyclisés ont été détectés. Ces dernières conditions expérimentales ne limitent pas la formation de sous-produit, elles auraient plutôt tendance à freiner la cyclisation.

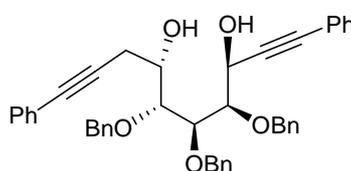
Pour éviter la participation de l'anion chlorure, nous avons remplacé le dichlorure de zinc par le triflate de zinc ($Zn(OTf)_2$) anticipant que le contre-anion triflate est moins nucléophile que l'ion chlorure. Comme attendu, aucune addition d'un groupement triflate sur l'époxyde ou sur l'aldéhyde n'a été observée, mais un autre type de sous-produit **A4** (28%) a été isolé résultant d'une seconde attaque de l'alcyne zincique sur le carbone 6 portant l'époxyde (Tableau 7 et Schéma 45). Ce dérivé zincique n'est donc pas un bon candidat pour notre étude.

Tableau 7 : Expérience effectuée avec le triflate de zinc

<i>R</i>	<i>Sel de Zinc puis ajout de LiBr</i>	<i>Rendement Alcool intermédiaire 1,2-syn 17</i>	<i>Rendement sous-produits</i>	<i>Rendement Produit cyclisé 19</i>	<i>Rendement Produit cyclisé 20</i>
Ph	$Zn(OTf)_2$ (2 éq.)	14 %	28 % (A4)	-	6 %

Schéma 45 : Sous-produit A4 en présence de triflate de zinc

Cas R = Ph



A4

Les manipulations effectuées en présence de triflate de zinc et de dichlorure de zinc en moindre quantité confirment nos doutes sur la lenteur de la deuxième phase de la cascade NOÉ in situ. En effet, les sites électrophiles étant similaires dans les deux cas D-Galactose et D-Mannose, leurs réactivités n'auraient pas été intrinsèquement modifiées. Par conséquent, les additions nucléophiles sur l'époxyde ne sont pas dues à une augmentation de la réactivité du site électrophile mais au fait que la cyclisation intramoléculaire sur l'époxyde est très lente in situ. Ceci conduit ainsi à la formation des sous-produits observés.

*Nous avons alors décidé d'effectuer la stratégie NOÉ en isolant volontairement l'alcool intermédiaire 1,2-*syn* **17** dès l'observation de la conversion totale de l'aldéhyde par*

CCM. Ainsi l'époxy-alcool 17b, obtenu avec un rendement de 71% (Tableau 6, Entrée 4), se trouvera isolé des nucléophiles indésirables. Cet époxy-alcool intermédiaire sera utilisé par la suite dans une étude approfondie de la deuxième étape de cyclisation.

Remarque : Il serait intéressant à l'avenir de cristalliser l'époxy-alcool intermédiaire (par exemple grâce à un groupement nitrobenzoate) et d'effectuer des Rayons X pour valider sa configuration 1,2-syn.

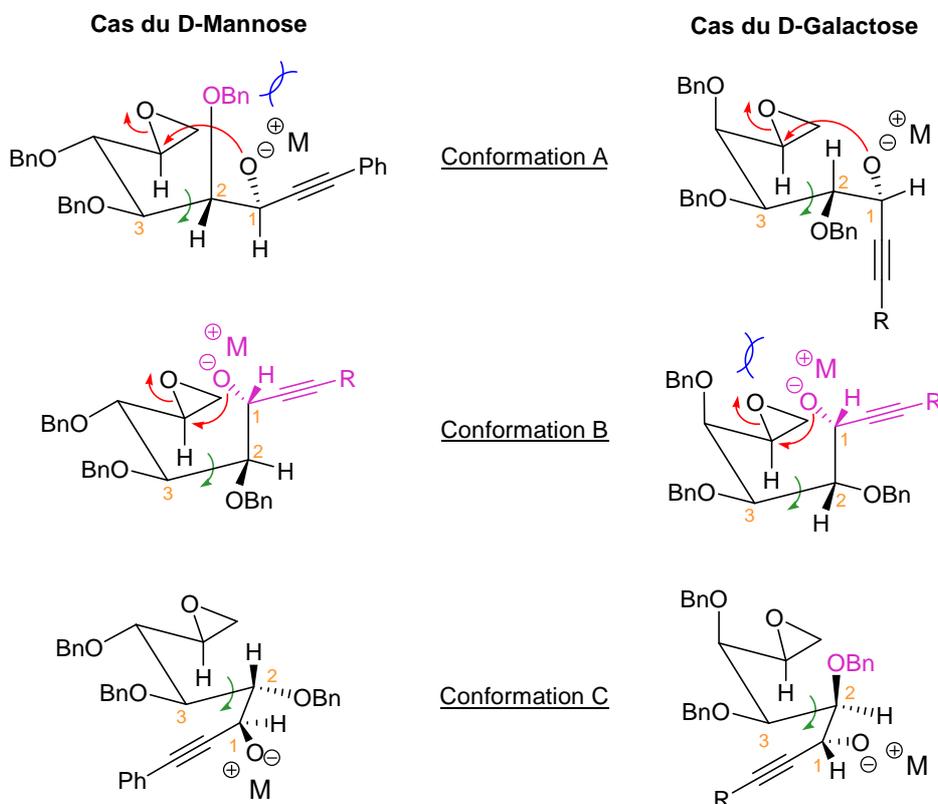
b- Conformations défavorables

En étudiant l'état de transition, on constate que, quelle que soit la conformation adoptée, la cyclisation semble plus défavorable que dans le cas du D-Galactose. Rappelons les deux conditions à remplir pour induire une cyclisation :

- les substituants les plus encombrants doivent occuper les positions équatoriales
- l'alcoolate formé doit pouvoir réagir avec le site électrophile sans difficulté (anti-périplanarité).

Trois conformations décalées sont possibles autour de la liaison C2-C3 (Schéma 46).

Schéma 46 : Etude de l'état de transition favorisant la cyclisation, comparaison avec l'alcoolate intermédiaire obtenu dans le cas du D-Galactose



Le conformère A ne satisfait pas à la première condition. En effet, le groupement benzyl du carbone 2 est en position axiale et perturbe stériquement la cyclisation de l'alcoolate positionné dans la bonne conformation pour réagir avec l'époxyde.

Les mêmes remarques sont valables pour le conformère B mais cette fois c'est le groupement propargylique qui se trouve en position axiale.

Tous les groupements encombrants sont en position équatoriale dans le conformère C. Cependant l'alcoolate n'est plus dans une position favorable pour cycliser avec l'époxyde. Cette dernière conformation, certainement la plus stable, est stérile pour une cyclisation à 6 chaînons.

Sur ces trois conformations possibles, la conformation A semble la plus favorable à la cyclisation de l'alcoolate 1,2-syn intermédiaire 17b sur l'époxyde mais la gêne stérique rend cette attaque nucléophile lente et difficile.

c- Doute sur la structure des produits cyclisés

Quelle que soit la nature de R, nous avons isolé deux produits cyclisés, la RMN nous indiquant que le CH₂ caractéristique de l'époxyde n'était plus présent. Les composés ont été facilement séparés par chromatographie sur gel de silice. Au premier abord, nous pensions avoir synthétisé minoritairement l' α -C-D-mannoside (Produit cyclisé **19**) et majoritairement le β -C-D-mannoside (Produit cyclisé **20**). En isolant un dérivé de type α , le premier réflexe était de suspecter une baisse de la sélectivité impliquant alors une mauvaise chélation du zinc. Cependant la première étape (addition nucléophile) ayant abouti à un seul diastéréoisomère **17** (Tableau 6, Entrée 4), la seule hypothèse plausible restait une épimérisation ayant lieu lors de la seconde étape (ouverture de l'époxyde).

En analysant les données spectroscopiques des deux produits obtenus (spectrométrie de masse, caractérisation par RMN), nous avons constaté :

- qu'il existe des discordances dans les constantes de couplage attendues
- que nous n'avons conservé que deux groupements benzyles sur les trois initialement présents.

Analyse de la littérature

Selon les constantes de couplages reportées dans la littérature (Cf. Annexe A), $J_{1,2}$ et $J_{2,3}$ observées pour la conformation 4C_1 doivent être petites et $J_{3,4}$ doit être grande, que les produits soient α ou β . Par contre, dans l'autre conformation 1C_4 , $J_{1,2}$ devrait être grande et $J_{2,3}$ et $J_{3,4}$ plus petites pour le composé α et pour le composé β toutes les constantes doivent être petites (Schéma 47 et Tableau 8).

Remarque : Nous avons volontairement choisi de ne représenter que ces conformations chaises parmi les autres conformations existantes.

Schéma 47 : Constantes de couplages J à observer attentivement

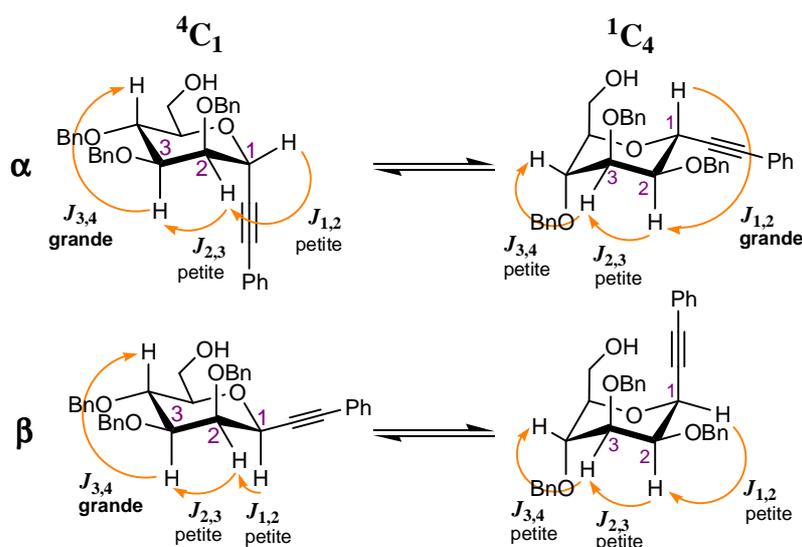


Tableau 8 : Constantes de couplages J remarquables

	Conformation 1C_4			Conformation 4C_1		
	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$
α -C-D-mannosyl	petite	petite	grande	grande	petite	petite
β -C-D-mannosyl	grande	petite	petite	petite	petite	petite

Analyse de nos produits

Les produits majoritaires **20** ne nous donnent pas satisfaction car, dans le cas de $R = Ph$, la constante $J_{1,2}$ est anormalement élevée. Le produit ne semble pas correspondre à un composé β quelle que soit la conformation de la chaise (Tableau 9).

Nous intéressants aux produits minoritaires **19** obtenus, les constantes $J_{1,2}$ et $J_{2,3}$ observées restent faibles or la constante $J_{3,4}$ ne satisfait pas à nos attentes. Elle est trop petite pour correspondre à un composé α (Tableau 9).

Tableau 9 : Constantes de couplages J obtenues

	R = TMS		R = Ph	
	Produit cyclisé 19a	Produit cyclisé 20a	Produit cyclisé 19b	Produit cyclisé 20b
$J_{1,2}$	3.8 Hz	n.d.	3.4 Hz	8 Hz
$J_{2,3}$	2.4 Hz	n.d.	2,4 Hz	2,1 Hz
$J_{3,4}$	2.1 Hz	n.d.	2.4 Hz	n.d.

Ces données génèrent un doute quant à la nature de la cyclisation obtenue. De plus la perte d'un groupe benzyl nous éloigne de nos attentes.

La question essentielle est : quand a lieu la déprotection du groupement benzyl, avant ou après la cyclisation sur l'époxyde et par quel mécanisme ?

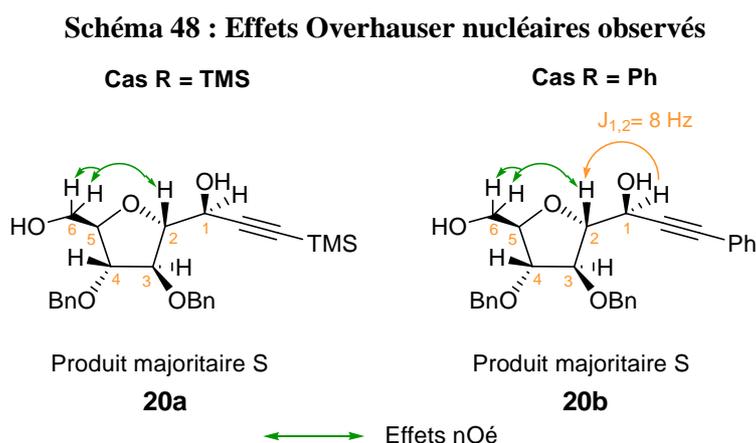
♦ En se référant aux travaux de P. Sinaÿ et coll.⁶⁶ sur le D-Glucose, il est constaté que les alcools protégés sur le carbone 2 du sucre subissent une déprotection en présence de triisobutyl-^{66a} ou triméthylaluminium.^{66b} Par conséquent, la présence de dichlorure de zinc pourrait jouer le même rôle que les sels d'aluminium ce qui expliquerait cette déprotection à l'issue de la cyclisation à 6 chaînons.

♦ Si la déprotection s'effectue avant la cyclisation, alors, dans ce cas, la conformation A devient plus favorable pour une cyclisation de l'alcoolate propargylique sur l'époxyde car il n'y a plus de gêne stérique due au benzyl. Mais le nouvel alcoolate, formé lors de la débenzylation, peut lui aussi s'ajouter sur l'époxyde d'après la conformation C, favorable à une cyclisation à 5 chaînons impliquant cet oxygène en position équatoriale (Cf. Schéma 46). Comme nous obtenons deux produits, il est possible que ces deux réactions soient compétitives.

Cependant, on observe un effet Overhauser nucléaire entre les protons H6 et H2 (le cas TMS n'est pas exploitable car les protons H2, H3 et H5, ayant des déplacements chimiques très proches, l'effet Overhauser nucléaire est moins probant que dans le cas d'un Ph). Ceci n'est possible que si nos deux produits existent sous la forme furanique (Schéma 48) !

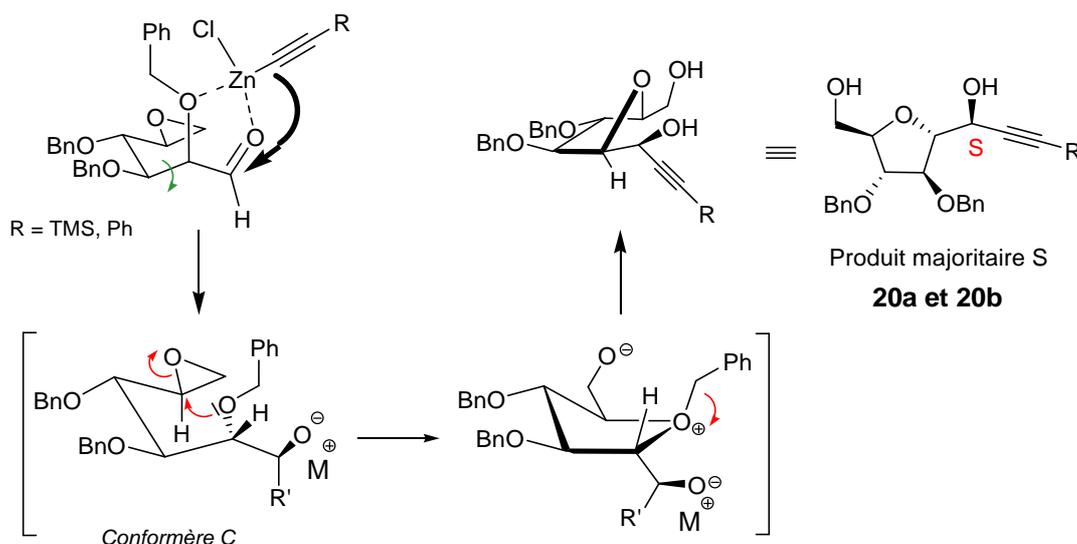
Ainsi, nous pensons que la débenzylation est la conséquence de la cyclisation de l'oxygène porté par le carbone 2 sur l'époxyde (mécanisme possible selon la conformation C, même lorsque l'alcool est protégé) (Schéma 49). Le départ du groupement benzyl est, sans doute, favorisé par les ions chlorures et les sels métalliques présents dans le milieu.

Cette débenzylation est d'autant plus surprenante que nous n'observons pas de transfert de benzyl sur l'alcoolate propargylique ou sur l'alcoolate issu de l'ouverture de l'époxyde. Les éléments présents dans le milieu ne doivent pas favoriser ce transfert, souvent observé (Cf. Chapitre D).



⁶⁶ (a) Lecourt T., Herault A., Pearce A.J., Sollogoub M., Sinaÿ P. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 12, 2960; (b) Jia C., Pearce A.J., Blériot Y., Zhang Y., Zhang L.-H., Sollogoub M., Sinaÿ P. *Tetrahedron: Asymm.* **2004**, 15, 4, 699

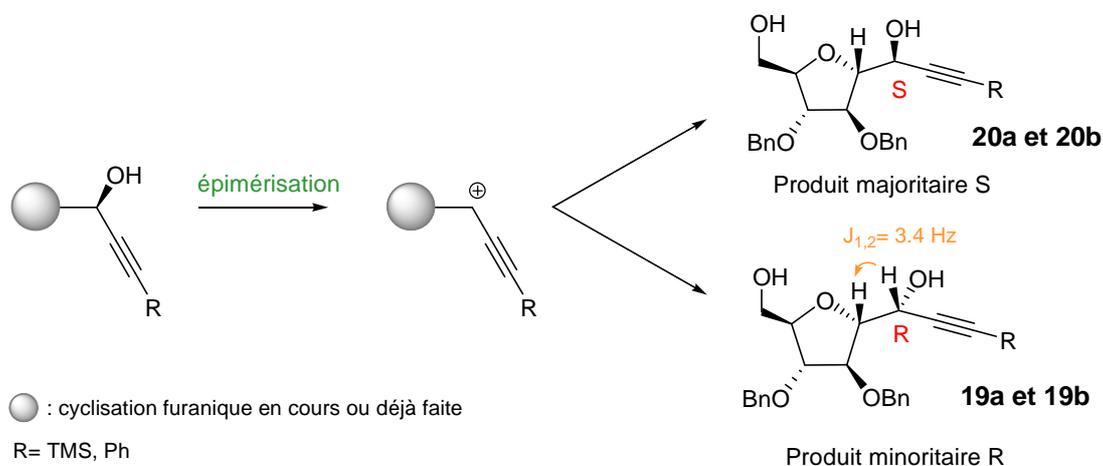
Schéma 49 : Proposition de mécanisme pour la cyclisation sous la forme furanique



La débenzylation en position 2 survient probablement lors de la cyclisation et nos observations sur les constantes de couplage remettent fortement en cause la forme pyranique. Seules les analyses par effets Overhauser nucléaires peuvent nous renseigner sur la structure de nos produits.

L'obtention de deux produits cyclisés **20** (identiques à ceux observés lors de la réaction en l'absence de zinc) est, alors, le signe d'un mélange de diastéréoisomères au niveau de l'alcool propargylique. Sachant que l'époxy-alcool intermédiaire **17b** isolé (Tableau 6, Entrée 4) n'est constitué que d'un seul diastéréoisomère, une épimérisation ultérieure a donc eu lieu. Celle-ci est probablement due au milieu acide généré par le dichlorure de zinc (Schéma 50).

Schéma 50 : Epimérisation de l'alcool propargylique 17

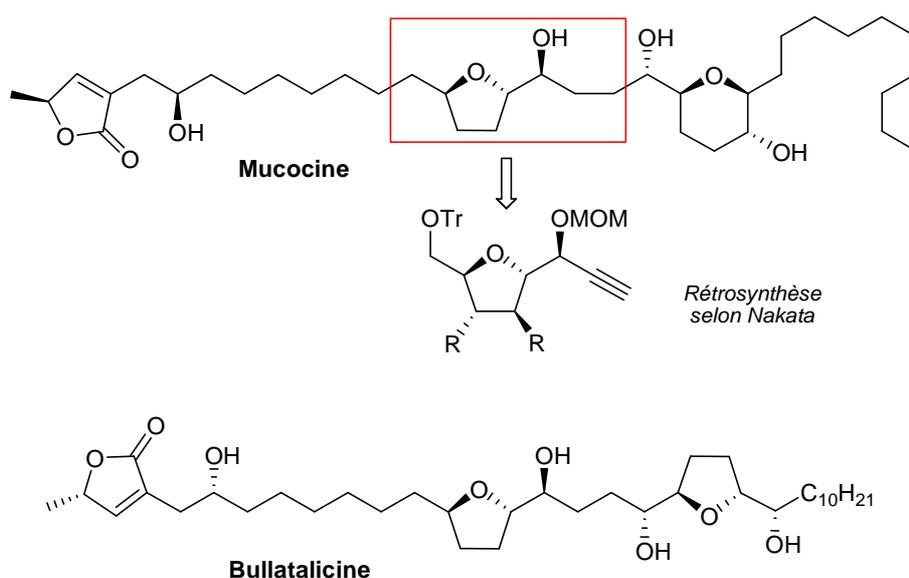


d- Seconde étape activée en milieu acide : accès à des dérivés furaniques

Disposant de l'époxy-alcool intermédiaire 1,2-*syn* **17b**, obtenu avec un rendement de 71% (Cf. Tableau 6, Entrée 4), nous avons décidé d'effectuer la cyclisation sur l'époxyde en milieu acide (ajout de 0,7 éq. d'acide camphor-sulfonique à une solution d'époxy-alcool dissous dans le dichlorométhane). Cette réaction conduit, à notre grande surprise, à quatre produits séparables chromatographiquement: les deux furanes déjà identifiés (21% de **S (20b)** et 18% de **R (19b)**) et deux autres composés moins polaires que nos furanes, et correspondant aux pyranes **18b** initialement attendus (Composés possédant trois benzyles selon la spectrométrie de masse, et RMN semblable aux C-Galactosides) (rendement global de 16%).

La stratégie NOÉ possède maintenant une autre corde à son arc : la synthèse stéréosélective de dérivés α -hydroxylés furaniques. Ces composés sont des synthons très intéressants notamment pour la synthèse de la mucocine, un agent antitumoral ou encore la bullatalicine (Schéma 51).⁶⁷

Schéma 51 : Mucocine et Bullatalicine



La cyclisation en milieu acide ne permet pas d'améliorer les rendements en composés furaniques. Ils sont obtenus en plus faible quantité que lors des réactions menées in situ. A l'heure actuelle, les meilleurs résultats sont observés lors de la réaction en cascade à l'aide de 2 équivalents de dichlorure de zinc (jusqu'à 40% de rendement pour le

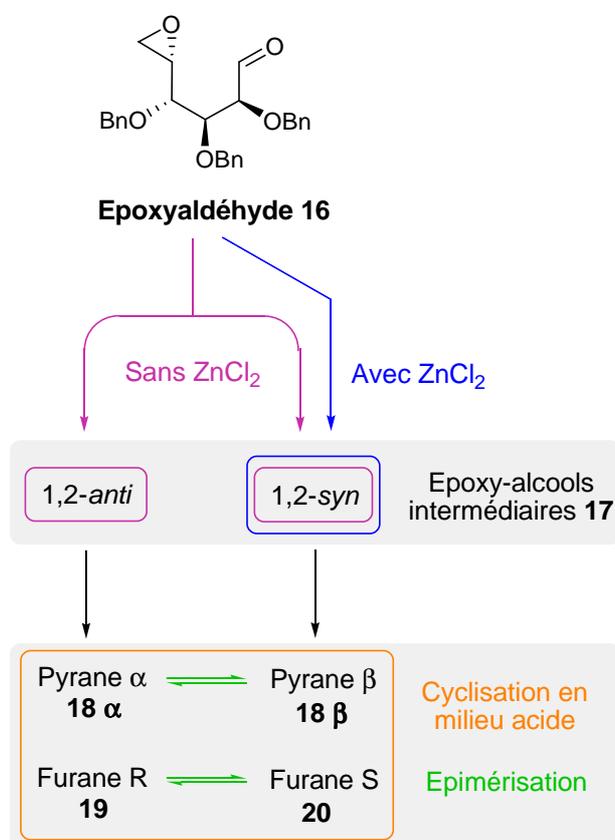
⁶⁷ (a) Takahashi S., Nakata T. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 16, 5739; (b) Gesson J.-P., Renoux B., Tranoy I. *Tetrahedron* **1998**, 54, 6739

furane 20b) (Cf. Tableau 6, Entrée 2). Cette cascade *in situ* pourrait être améliorée en piégeant l'excès d'ions chlorure sous forme de sels.

L'activation en milieu acide nous permet, toutefois, d'isoler deux composés non furaniques, en cours d'analyse. D'autres conditions basiques (KHMDs par exemple) devront également être testées pour améliorer soit la formation des furanes, soit l'accès aux composés pyraniques β initialement souhaités.

Au vue de toutes ces études nous ne sommes pas étonnés de la diversité des produits observés et le schéma suivant résume le comportement des dérivés alcynylés de la série D-Mannose (Schéma 52).

Schéma 52: Diversités des produits obtenus dans le cas du D-Mannose

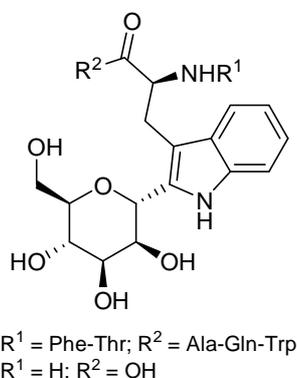


e- Cas des C-D-Mannosyltryptophanes

Parallèlement à notre étude précédente mettant en jeu divers alcynes, nous avons testé la stratégie NOÉ avec des dérivés indoliques afin d'accéder à des α -C-2-D-Mannosyltryptophanes (Schéma 53). Ce projet s'effectue en collaboration avec l'équipe du Pr. Janos Sapi et du Dr. Stéphane Gérard.⁶⁸

Depuis l'identification de ces composés, les C-2-D-Mannosyltryptophanes ont été détectés dans les récepteurs d'interleukine-12,⁶⁹ de mucines,⁷⁰ ou encore de properdine⁷¹... Actuellement, les synthèses de ces C-2-D-Mannosyltryptophanes et de leurs dérivés sont intéressantes pour éclaircir leurs rôles biologiques très peu connus.

Schéma 53 : α -C-2-D-mannosyltryptophane et ses dérivés



La littérature ne décrit que deux méthodes de synthèse d' α -C-2-D-mannosyltryptophanes et une méthode pour les β -C-2-D-mannosyltryptophanes (Schéma 54). Ito et coll. ont imaginé l'incorporation sélective d'un indole lithié fonctionnalisé sur l'1,2-anhydro-D-mannose en présence d'éthérate de trifluorure de bore pour obtenir l' α -C-2-D-mannosyltryptophane (6 étapes, rendement de 23% à partir du couplage).⁷² L'équipe d'Isobe a travaillé sur la méthode de Castro pour synthétiser la partie indolique.⁷³ En 11 étapes, ils obtiennent 3% d' α -C-2-D-mannosyltryptophane. La même méthode a été appliquée à la série β ⁷⁴ (10 étapes, 6% de rendement global) mais également aux séries D-Glucose et D-Galactose (α et β).

⁶⁸ Augé C. *Synthèses en série tryptophane : Dipeptides à visée anti-angiogénique et dérivés C-2-mannosylés* **2006**, Thèse de doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, mention Pharmacie

⁶⁹ Doucey M.-A., Hess D., Bloomers M. J. J., Hofsteenge J. *Glycobiology* **1999**, 9, 435

⁷⁰ Perez-Vilar J., Randell S. H., Boucher R. C. *Glycobiology* **2004**, 14, 325

⁷¹ Hartmann S., Hofsteenge J. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 28569

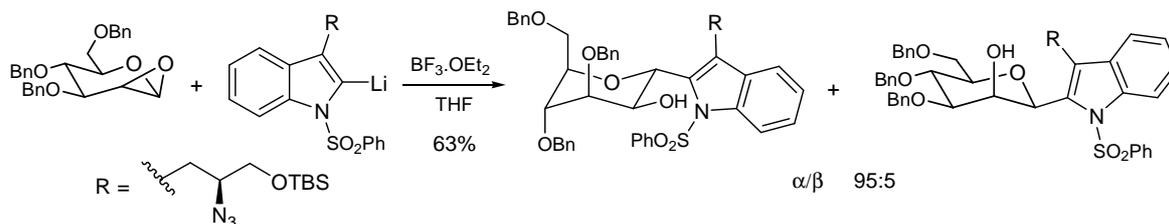
⁷² (a) Manabe S., Ito Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9754; (b) Manabe S., Marui Y., Ito Y. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 6, 1435

⁷³ (a) Nishikawa T., Ishikawa M., Wada K., Isobe M. *Synlett* **2001**, 945; (b) Nishikawa T., Koide Y., Kajii S., Wada K., Ishikawa M., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 687

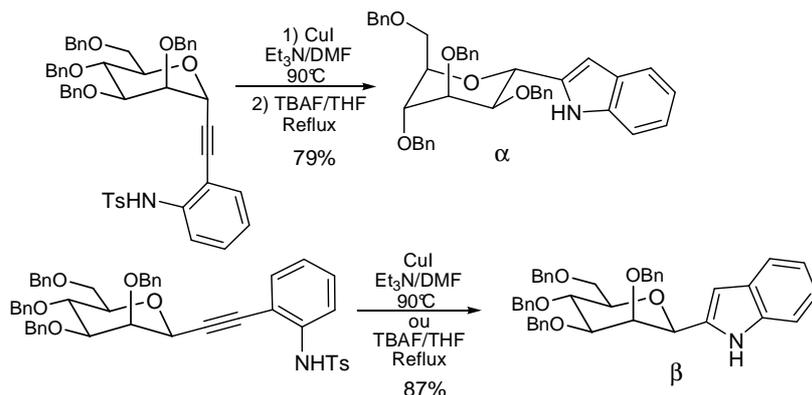
⁷⁴ Nishikawa T., Koide Y., Kanakubo A., Yoshimura H., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1268

Schéma 54 : Réactions clé pour la synthèse de C-2-mannosyltryptophanes

Réaction clé d'Ito :



Réaction clé d'Isobe (méthode de Castro) :

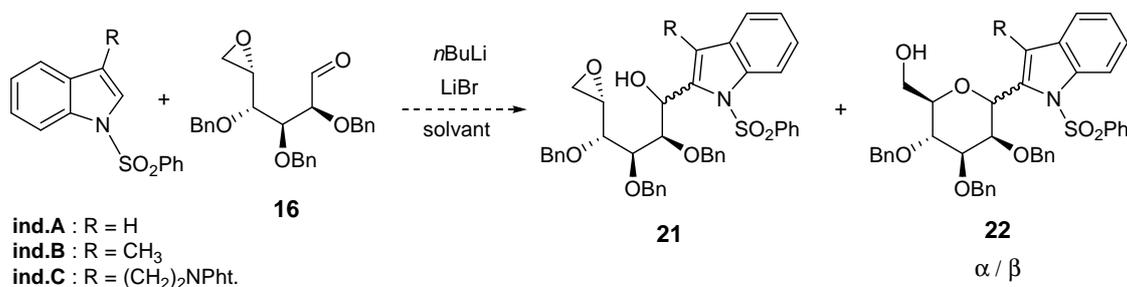


Ici, nous ne devons pas utiliser de dérivés du zinc car ils favoriseraient la formation de β -C-D-mannosyltryptophane. Les dérivés du titane ou du bore sont des métaux auxquels nous devons songer afin d'induire la sélectivité α . Toutefois, nous avons souhaité travailler, d'abord, sans sel métallique ajouté pour observer le comportement des indoles dans ce type de réaction.

Nous avons testé trois types d'indoles A, B et C (notés **ind.A**, **ind.B** et **ind.C**). Nos premiers essais ont été réalisés en suivant la procédure NOÉ : le lithien est formé à une température bien contrôlée, puis l'aldéhyde **16** est additionné progressivement au milieu ; enfin le bromure de lithium est ajouté et le mélange est porté à température ambiante (Schéma 55).

Selon les substrats, nous avons dû adapter ces conditions de réaction, notamment la proportion des réactifs, la température et le solvant.

Schéma 55 : Addition d'indoles lithiés sur l'époxyaldéhyde issu du D-Mannose - Schéma général

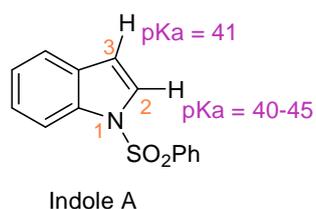


▪ Cas de l'indole A

En se basant sur les études effectuées sur le D-Galactose et le D-Mannose, le solvant choisi est l'éther. Mais rapidement nous avons observé un problème de solubilité. Le THF nous a alors semblé être un meilleur candidat pour dissoudre l'indole et ses dérivés.

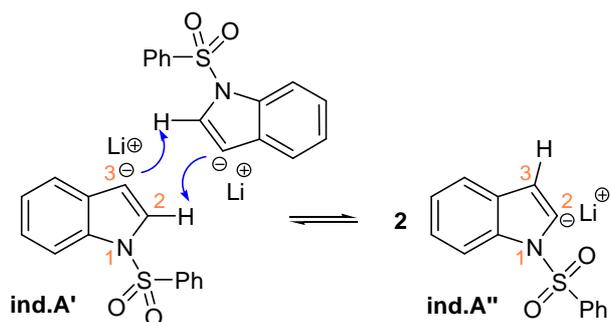
Les premières difficultés apparaissent lors de la formation du lithien en position 2 de l'indole A. En effet, cet indole possède deux sites pouvant être déprotonés : les positions 2 et 3. Selon les pKa, notre base, le *n*-butyllithium, peut déprotoner les deux positions (Schéma 56).⁷⁵

Schéma 56 : pKa de l'indole A



Pour accéder favorablement au lithien désiré en position 2, nous avons appliqué la méthode de Gribble.⁷⁶ Par une variation précise des températures du bain (T=-78°C puis T=0°C puis retour à T=-78°C), le 1-phénylsulfonyl-3-lithioindole **ind.A'** formé subit une transposition pour conduire à l'indole lithié **ind.A''** en position 2, plus stable thermodynamiquement, au cours de la remontée en température. Un mécanisme intermoléculaire nous paraît le plus plausible (Schéma 57). Ce changement est, de plus, favorisé par la solubilisation dans le THF et la présence d'un groupement arylsulfonyle.⁷⁷

Schéma 57 : Transposition de l'indole lithié (**ind.A'**)



Après addition de l'époxyaldéhyde sur l'anion **ind.A''**, nous observons la formation de nombreux produits difficilement isolables, ceci malgré le soin apporté à la déprotonation. L'analyse

⁷⁵ (a) Buttery C. D., Jones R. G., Knight D. W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1993**, 13, 1425; (b) Sundberg R. J., Broome R., Walters C. P., Schnur D. *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, 807; (c) Shen K., Fu Y., Li J.-N., Liu L., Guo Q.-X. *Tetrahedron* **2007**, 63, 7, 1568

⁷⁶ Saulnier M. G., Gribble G. W. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 5, 757

⁷⁷ Sundberg R. J., Parton R. L. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 163

par spectrométrie de masse de deux produits majoritaires nous indique la présence de composés couplés, avec et sans déprotection du groupement SO₂Ph sur l'azote de l'indole.

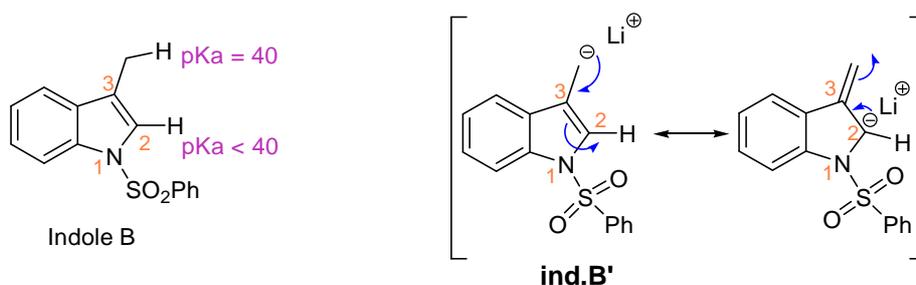
L'utilisation de cet indole n'est pas aisée car le couplage peut concerner les positions 2 ou 3 de l'indole. Quatre produits de type « époxy-alcool » peuvent alors se former. De plus, si la cascade de réaction a lieu alors quatre produits supplémentaires de type « C-D-mannosyl-indole » peuvent être observés. Cette multitude de possibilités nous incite à effectuer nos tests d'addition sur des indoles déjà fonctionnalisés en position 3, ce qui est, de plus, favorable à une synthèse convergente.

D'autre part, les quantités d'époxyaldéhyde utilisées sont à revoir. Sachant que les proportions d'indole sont trois fois plus élevées que celles de l'époxyaldéhyde, le nucléophile en excès pourrait également attaquer les deux sites de l'époxyde, comme nous l'avons précédemment observé avec les ions chlorures.

▪ Cas de l'indole B

Les pKa de l'indole B sont peu différents de ceux de l'indole A. Toutefois, la déprotonation en position 2 semble plus favorable car son pKa a diminué.⁷⁵ Une déprotonation du méthyl en position 3 est toujours possible car son acidité reste compatible avec la base utilisée, mais la stabilisation de l'anion formé par mésomérie le rend moins nucléophile (Schéma 58).

Schéma 58 : pKa de l'indole B-Stabilisation par mésomérie de l'anion allylique ind.B'



Pour déterminer les proportions idéales de réactifs pour cette réaction, nous avons effectué une gamme de tests :

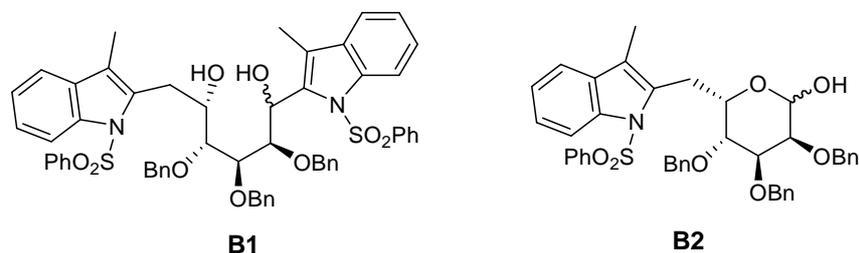
1) L'indole est en large excès par rapport à l'époxyaldéhyde (0,3 éq. d'aldéhyde, 0,95 éq. de base et 1 éq. d'indole B)

Cet essai a confirmé nos craintes de réactions secondaires. En effet, parmi les composés présents, nous avons isolé majoritairement deux produits dont la formation est favorisée par la remontée en température du bain (Schéma 59) :

- un composé **B1** peu polaire, résultant de l'attaque de l'indole lithié **ind.B'** en position 2 sur les fonctions aldéhyde et époxyde (rendement de 11%).

- un composé **B2** issu de l'attaque de l'indole sur l'époxyde suivie de la formation d'un hémiacétal sur l'aldéhyde (rendement de 13%)

Schéma 59 : Sous-produits isolés lors de la détermination des conditions idéales de réaction

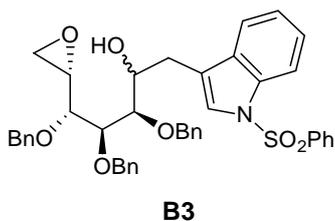


Ces proportions relatives ne sont pas adaptées pour l'addition nucléophile d'un indole sur notre époxyaldéhyde.

2) L'aldéhyde est en léger excès par rapport à l'indole (1,2 éq. d'aldéhyde contre 1 éq. d'indole B et de base : conditions de Gribble⁷⁶)

Ce deuxième test fut plus concluant car, en l'absence de bromure de lithium, nous avons isolé l'intermédiaire réactionnel souhaité **21** (rendement < 38%). Selon les analyses par RMN, un seul diastéréoisomère semble présent. Toutefois, nous n'avons pu recourir à la détermination de la configuration par les esters de Mosher car il est parasité par des traces du sous-produit **B3**. Celui-ci résulte de l'attaque du lithien, issu de la déprotonation du méthyle de l'indole, sur l'aldéhyde (Schéma 60). Par conséquent, nous ne pouvons définir de rendement précis. De plus, nous isolons toujours une certaine quantité (17%) de composé **B2**.

Schéma 60 : Sous-produit B3 observé



Les quelques tests de cyclisation *in situ* que nous avons effectués en parallèle, ont montré qu'en présence de bromure de lithium, aucune évolution du milieu réactionnel n'est observée. Nous avons constaté toutefois que la remontée à température ambiante génère une faible dégradation du système.

Nous avons également pensé à utiliser le dichlorure de zinc comme acide de Lewis pour favoriser une cyclisation plus efficace qu'en présence de bromure de lithium. Une solution de dichlorure de zinc, préalablement fondu et dissous dans le THF, a été additionnée au milieu à -78°C. Cette fois, un nouveau produit ne correspondant pas aux produits et sous-produits connus selon la RMN, a été mis en évidence. Ce résultat est encourageant car la spectrométrie de masse nous fournit

une masse moléculaire identique au composé **22** attendu si la stratégie NOÉ est efficace. D'autres analyses (notamment des effets Overhauser nucléaires) sont actuellement en cours pour déterminer clairement la structure de ce composé.

*Les tests de cyclisation in situ sont plus délicats que dans le cas du D-Galactose. Les nouveaux produits sont isolés en faible quantité, parasités par de la dégradation et la conversion de l'indole n'est pas quantitative (50 à 67%). De plus, ces conditions ne sont pas à notre avantage car nous ne pouvons recycler l'époxyaldéhyde **16** en excès, contrairement à l'indole **B**. Les analyses spectroscopiques nous indiquent que l'époxyaldéhyde récupéré n'est plus suffisamment pur pour être à nouveau utilisé dans une réaction de couplage malgré la purification sur gel de silice. Sachant que sa synthèse demande beaucoup d'attention et de temps, il est préférable de définir des conditions réactionnelles dans lesquelles il sera utilisé en défaut.*

3) L'indole est en léger excès par rapport à l'aldéhyde (0,66 éq. d'aldéhyde, 0,95 éq. de base et 1 éq. d'indole **B** : conditions de Ito^{72(a)})

Nous avons retenu les conditions de ce troisième essai car la réaction, effectuée à basse température (-78°C), conduit proprement à un seul intermédiaire réactionnel **21** avec un rendement, cependant modeste, de 48%. En effet, il n'est pas parasité par le sous-produit **B3** et la formation des autres sous-produits semble moindre. Cependant, ces conditions réactionnelles ne limitent pas la quantité d'indole récupérée (quasiment 50% par rapport au nombre de moles d'indole engagées initialement).

*La synthèse de l'alcool α -indolique **21** est laborieuse. Le nButyllithium n'est sans doute pas la base la mieux adaptée pour déprotoner sélectivement l'indole **B**. Nous devons songer à utiliser de préférence le diisopropylamide de lithium (LDA) ou encore une base de type « amidure de magnésium ».⁷⁸*

Les tests de cyclisation *in situ* n'ayant pas porté leurs fruits, la cyclisation en deux étapes semble encore une fois plus judicieuse dans la série D-Mannose. Nous avons testé deux conditions :

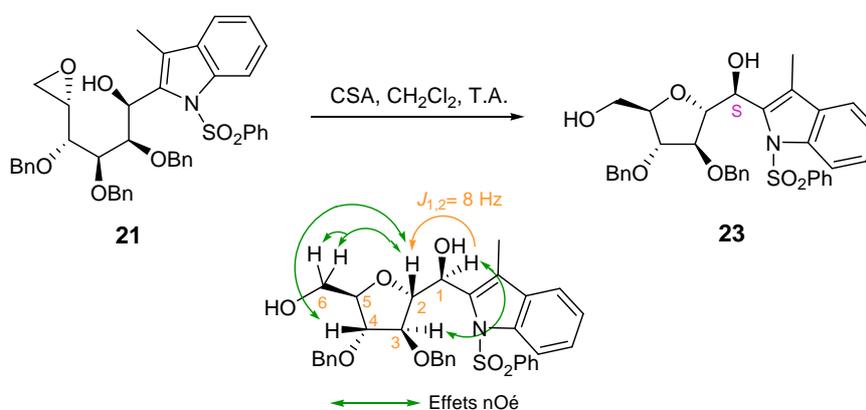
- L'époxy-alcool **21**, dissous dans le DMF, est déprotoné à basse température (0°C) par de l'hydrure de sodium (0,8 éq.). Après plus de 72h à température ambiante, aucun nouveau composé n'a été observé, et seulement 46% d'alcool intermédiaire ont été récupérés.

⁷⁸ Kondo Y., Yoshida A., Sakamoto T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 2331

- L'acide camphor-sulfonique permettait, dans l'étude précédente, de cycliser les alcools propargyliques en cycles à 5 et 6 chaînons. Ces conditions appliquées à l'alcool intermédiaire α -indolique **21** conduit étonnamment à un seul composé (rendement de 53-66%). La spectrométrie de masse nous indique à nouveau la perte d'un groupement benzyl et les analyses par RMN (constantes de couplage et effets Overhauser nucléaires) confirment la formation d'un composé furanique (Schéma 61). Par analogie avec le composé **20** de l'étude précédente, la grande constante de couplage $J_{1,2}$ laisserait supposer plutôt une configuration S correspondant à une addition 1,2-*syn* de l'indole lithié **ind.B**' sur l'aldéhyde. Ceci doit cependant être confirmé par les esters de Mosher.

Schéma 61 : Cyclisation de l'alcool α -indolique **21** par le CSA

Identification par Effets Overhauser Nucléaires



Ce dérivé, inconnu dans la littérature, a été entièrement caractérisé.

Des conditions basiques devront bien sûr être testées afin d'espérer accéder aux cycles à 6 chaînons désirés.

Par curiosité, nous avons tenté de synthétiser l'indole zincique⁷⁹ (Schéma 62) pour étudier son comportement en présence de l'époxyaldéhyde. Nos deux tentatives ont été vouées à l'échec, aucune réaction n'a été observée. Nous ne pouvons dire si l'absence de réaction est due à une faible réactivité de l'indole zincique ou non, car rien ne nous prouve qu'il ait été correctement formé *in situ*. Le plus surprenant dans cette manipulation, est le désintéressement des ions chlorures pour l'époxyaldéhyde **16**, car aucun produit de type **A1** n'a été observé.

Schéma 62 : Indole B zincique



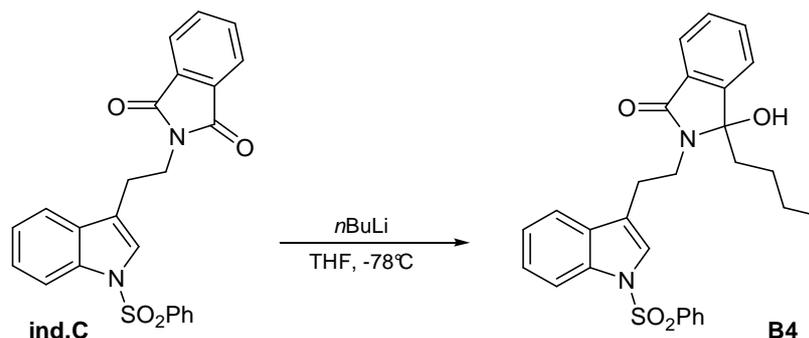
⁷⁹ Danieli B., Lesma G., Martinelli M., Passarella D., Peretto I., Silvani A. *Tetrahedron* **1998**, 54, 14081

L'indole **B** nous a fourni des résultats plus concrets et surtout plus surprenants que l'indole **A** non substitué. Mais la déprotonation sélective en position 2 est toujours délicate. C'est pourquoi il faudra revenir sur le choix de la base. Les rendements de cette étude restent faibles et ceci est peut-être dû à l'indole **B** lui-même. En effet, Ito a également obtenu des résultats décevants avec ce même indole (rendement de 39%, diastéréosélectivité pour le C-D-mannosyl-indole α/β 87:13).^{72(a)}

▪ Cas de l'indole **C**

Disposant d'un indole plus fonctionnalisé, nous avons tenté d'appliquer la méthode retenue dans le cas de l'indole **B**. Cette fois, les difficultés n'étaient pas dues aux pKa des C-H mais à la réactivité du *n*butyllithium vis-à-vis d'un carbonyle du groupement phtalimide. En effet, nous avons isolé un composé hautement cristallin **B4** (rendement de 38%) résultant de l'alkylation d'un des deux carbonyles du groupement phtalimide (Schéma 63).

Schéma 63 : Réaction secondaire entre la base et l'indole **C**



Un second produit moins polaire a également été isolé. Selon les analyses RMN préliminaires, ce composé semble avoir subi une double alkylation sur la partie phtalimide ainsi qu'une addition nucléophile de l'indole lithié sur l'aldéhyde. D'autres analyses sont actuellement en cours pour définir clairement sa structure.

Cette nouvelle réaction secondaire liée, cette fois, directement à la base remet d'autant plus en question son utilisation.

Les études faites sur l'indole **B** ont mené, dans un premier temps, à l'alcool intermédiaire **21** souhaité puis à la formation d'un composé **23**, inconnu de la littérature, possédant un cycle à 5 chaînons. Mais plusieurs difficultés limitent l'utilisation de cet indole dans notre étude. Celle-ci doit être orientée vers des indoles dont les pka sont plus adaptés à nos conditions de réaction et possédant un groupement en position 3 facilement fonctionnalisable. Ainsi, pour les prochaines recherches, il serait judicieux de synthétiser d'autres indoles substitués, par exemple, par un groupement triméthylsilyle ou vinyle.

f- Conclusion sur le cas D-Mannose

L'application de la stratégie NOÉ à l'époxyaldéhyde 16 dérivé du D-Mannose s'est révélée plus délicate que dans le cas du D-Galactose. La première étape, l'addition de deux types de nucléophiles très différents, l'un alcynyle peu encombré, l'autre hétéroaromatique assez imposant, conduit aux alcools intermédiaires 1,2-syn (17 et 21) correspondants avec des rendements moyens à très satisfaisants. Les difficultés les plus sévères sont rencontrées au cours de la seconde étape. La cyclisation de l'alcoolate formé sur l'époxyde est gênée par la configuration du groupement benzyl porté par l'hydroxyle du carbone 2. La cyclisation privilégiée conduit alors à des composés à 5 chaînons.

III) Conclusions et Perspectives

Notre étude sur l'alcynylation d'aldéhydes chiraux nous a permis d'aborder diverses réactivités et différents problèmes.

*Une méthode simple et hautement stéréosélective basée sur une addition nucléophile suivie d'une ouverture intramoléculaire d'un époxyde (NOÉ) a été développée. L'utilisation du dichlorure de zinc s'est révélée fort efficace pour conduire très favorablement aux alcools intermédiaires propargyliques 1,2-syn attendus dans les séries D-Galactose et D-Mannose. La cyclisation *in situ*, dans le cas du D-Galactose, fournit l'analogue α -C-Galactosidique désiré. Par contre, cette deuxième étape présente plus de difficultés pour le D-Mannose ; celle-ci n'est d'ailleurs pas effectuée *in situ* sous peine d'obtenir différents sous-produits. Les états de transition possibles de l'alcoolate intermédiaire 17 ne sont pas favorables à son attaque sur l'époxyde, mais ils le sont pour l'attaque de l'hydroxyle protégé en position 2 sur l'époxyde pour conduire aux furanes α -hydroxylés. Ce phénomène est particulier au D-Mannose car ce genre de dérivés furaniques a également été observé lors de l'addition de l'alcool 1,2-syn α -indolique 21, obtenu en l'absence de dichlorure de zinc (!) et préalablement isolé, sur l'époxyde en milieu acide.*

Tous ces résultats sont rassemblés dans le schéma 64.

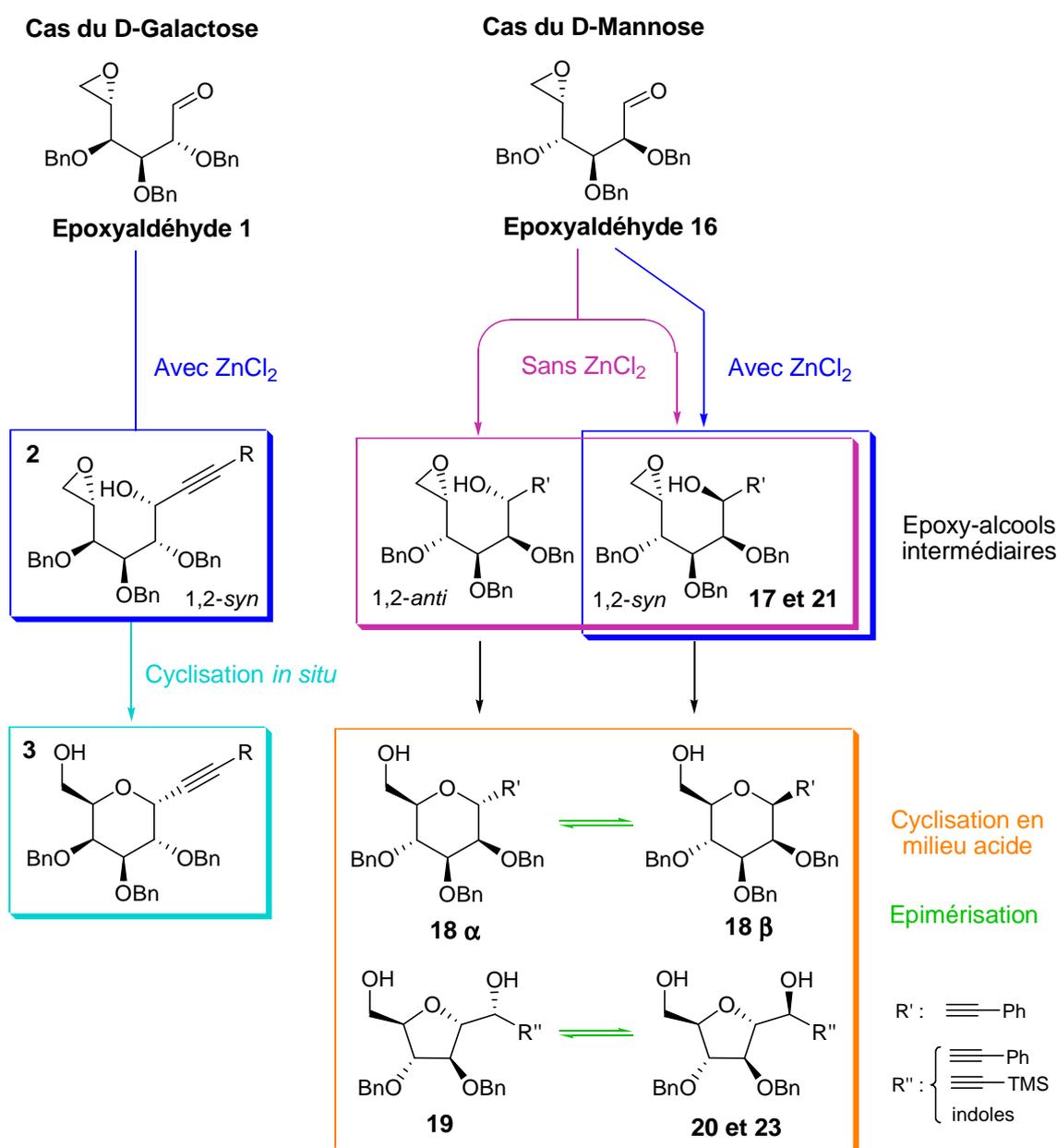
Beaucoup de travail doit encore être accompli pour cerner toutes les difficultés rencontrées dans le cas du D-Mannose et accéder favorablement aux α - et aux β -C-Mannosides. Nous souhaitons, à l'avenir, tester la stratégie sur les pentoses afin de

synthétiser des C-furanosides ou encore des C-nucléosides. La synthèse de l'époxyaldéhyde issu du D-Arabinose est actuellement en cours (Cf. Chapitre D-II).

Notre stratégie nous permettant d'accéder aux α -C-(alcynyl)-Galactosides, nous l'avons appliquée à la synthèse d'analogues C-Galactosidiques d'une substance biologiquement active : le KRN 7000.

Cette application fait l'objet d'un dossier de valorisation. C'est pourquoi certaines informations ne seront pas données dans la suite de ce manuscrit.

Schéma 64 : La stratégie NOÉ testée sur deux hexoses



CHAPITRE B : APPLICATION DE LA STRATEGIE NOÉ A LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES C-GLYCOSIDIQUES D'UN COMPOSE BIOLOGIQUEMENT ACTIF : LE KRN 7000..... 73

I) LE KRN 7000	73
1) Origine du KRN 7000.....	73
a- Découverte des Agélasphines	75
b- Etude des relations structure-activité	76
2) Activités remarquables <i>in vivo</i> du KRN 7000.....	78
a- Potentiel d'activité très diversifié.....	78
b- Interactions biologiques des α -GalCer	79
3) Analogues remarquables du KRN 7000.....	80
II) SYNTHÈSES CONNUES DE L'ANALOGUE C-GLYCOSIDIQUE DU KRN 7000.....	86
1) Les α -C-GalCer	86
a- Brevet déposé par H. Tomiyama et coll. (Société pharmaceutique Kirin).....	86
b- Première synthèse de Franck et coll.....	88
c- Deuxième synthèse de Franck et coll.....	88
d- Synthèse d'Annoura et coll.....	89
e- Synthèse de Wipf et Pierce	90
f- Activités biologiques de l'analogue C-Galactosidique du KRN 7000	91
2) Les β -C-GalCer.....	92
3) Autres analogues C-Galactosidiques intéressants.....	93
4) Notre inscription dans cette course aux analogues C-Galactosidiques du KRN 7000.....	93
III) COURSE AUX ANALOGUES C-GLYCOSIDIQUES DU KRN 7000.....	95
1) Détermination des affinités essentielles avec l'environnement cellulaire et des motifs structuraux à envisager pour induire une activité biologique optimale.....	95
a- Interactions physico-chimiques entre le KRN 7000 et le CD1d	95
b- Comportement dynamique du glycolipide avec le CD1d	105
2) Schéma rétrosynthétique à l'aide du programme QUIRAL.....	112
a- Description du logiciel	112
b- Analyse de notre molécule cible par le programme.....	113
IV) SYNTHÈSE D'UN ANALOGUE C-GLYCOSIDIQUE PARTICULIER DU KRN 7000 SELON NOTRE STRATEGIE NOÉ.....	113
1) Rétrosynthèse.....	113
2) Synthèse (1 ^{ère} partie)	113
3) Synthèse (2 ^{ème} partie).....	113

4) Premiers essais de purification par la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)	114
a- Principe de la CPC	114
b- Grandeurs chromatographiques	116
c- Caractéristiques importantes en CPC	119
d- Essais de purification effectués sur notre analogue	121
V) CONCLUSIONS	122

CHAPITRE B :

Application de la stratégie NOÉ à la synthèse

d'analogues C-glycosidiques d'un composé

biologiquement actif : le KRN 7000

I) Le KRN 7000

1) Origine du KRN 7000

Les invertébrés marins sont connus pour être une source importante de composés potentiellement bioactifs.⁸⁰ Durant ces trois dernières décennies, la recherche de composés naturels marins a permis d'identifier de nombreuses molécules chimiquement et biologiquement intéressantes, comme l'acide kaïnique, l'acide okadaïque, la térodotoxine ou la palytoxine...

L'océan constitue une véritable pharmacothèque. En effet, les éponges arrivent en tête du palmarès des activités biologiques, suivies des cinq autres phyla les plus importants : cnidaires, algues rouges, algues brunes, ascidies et mollusques. Bien qu'encore très peu de médicaments soient issus d'organismes marins, plusieurs substances sont actuellement testées en clinique, notamment comme agents anticancéreux (Tableau 10). Ces quelques molécules sont susceptibles de conduire à de nouveaux médicaments dans les cinq prochaines années.⁸¹

Les éponges constituent la plus riche source de cérébrosides bioactifs avec une remarquable diversité chimique.⁸² Ces cérébrosides constituent la plus grande sous-classe de la famille des sphingolipides.⁸³ Très largement identifiés et isolés dans la nature (organismes mammifères et marins, plantes, levures...), les sphingolipides sont composés de trois sous-unités distinctes (Schéma 65) :

- une tête polaire (sucre, disaccharide, phosphate, sulfate...)
- une chaîne acyle grasse
- une chaîne sphingosine plus ou moins fonctionnalisée et reliée à la chaîne acyle par une fonction amide

⁸⁰ (a) Higa T., Tanaka J., Ohtani I. I., Musman M., Roy M. C., Kuroda I. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 3, 589; (b) Simmons T. L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P., Gerwick W. H. *Mol Cancer Ther.* **2005**, 4, 2, 333; (c) Sipkema D. *Cultivation of Marine Sponges: From Sea to Cell* **2003**, thèse (Hollande); (d) Hirsch S., Kashman Y. *Tetrahedron* **1989**, 45, 12, 3897

⁸¹ (a) Editorial *Pathologie Biologie* **2004**, 52, 1; (b) Kornprobst J.-M. *Les médicaments de la mer* <http://www.bioaqua.net/mnp/Documents/informacion-cientifica/Les%20medicaments%20de%20la%20mer.pdf>

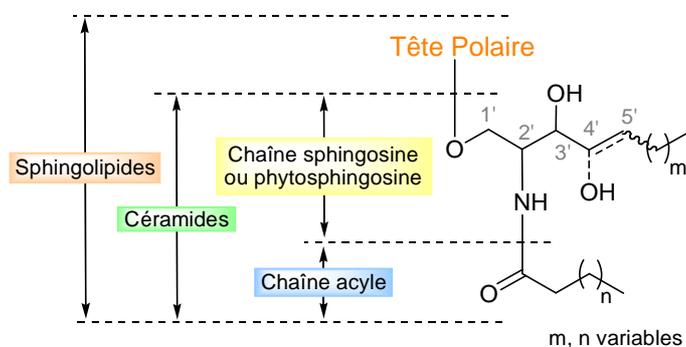
⁸² Tan R. X., Chen J. H. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 509

⁸³ Howell A. R., So R. C., Richardson S. K. *Tetrahedron* **2004**, 60, 11327

Tableau 10 : Exemples de molécules d'origine marine en phases d'essais cliniques

Dénomination	Essai Clinique	Origine	Activité	Classe Chimique
Bryostatine 1	Phase II	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoaire)	Anticancéreux (mélanome)	Macrolide
Déshydrodidemnine B (Aplidine)	Phase II	<i>Aplidium albicans</i> (Ascidie)	Antiviral Antiprolifératif	Depsipeptide Macrocyclique
Didemnine B	Phase II	<i>Trididemnum solidum</i> (Ascidie)	Anticancéreux	Depsipeptide macrocyclique
Dolastatine 10	Phase II	<i>Dolabella auricularia</i> (Mollusque)	Anticancéreux	Tétrapeptide
Ecteinascidine 743	Phase II	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (Ascidie)	Anticancéreux (agent alkylant)	Alcaloïde
Squalamine	Phase II	<i>Squalus acanthias</i> poisson (Requin)	Anticancéreux Antibiotique	Aminostérol sulfaté
Discodermolide	Phase I	<i>Discodermia dissoluta</i> (Eponge)	Anticancéreux Immuno- suppresseur	Macrolide
GST-21	Phase I	<i>Amphiporus lactifloreus</i> (Némerte)	Maladie d'Alzheimer Schizophrénie	Alcaloïde (anabaséine)
IPL-567	Phase I	<i>Petrosia contignata</i> (Eponge)	Anti-inflammatoire	Stéroïde
KRN 7000	Phase I	<i>Agelas mauritiana</i> (Eponge)	Anticancéreux	Glyco- sphingolipide
Cryptophycine	Phase pré-clinique	<i>Nostoc</i> sp. (Cyanobactérie)	Anticancéreux	Depsipeptide macrocyclique
Isohomohalichondrine B	Phase pré-clinique	<i>Lissodendoryx</i> sp. (Eponge)	Anticancéreux	Polyéther macrolide
Kahalalide	Phase pré-clinique	<i>Elysia/bryopsis</i> (Mollusque/algue verte)	Anticancéreux Antiviral	Depsipeptide macrocyclique
Mycaperoxyde	Phase pré-clinique	<i>Mycale</i> sp. (Eponge)	Antiviral	Peroxyterpène

Schéma 65 : Structure des sphingolipides



Sphingosine: double liaison en 4'-5'
Phytosphingosine: groupe hydroxyle en position 4'

Notre équipe s'est intéressée à ce genre de composés et plus particulièrement à l' α -Galactosylcéramide (α -GalCer) nommé KRN 7000. D'origine synthétique et possédant des propriétés antitumorales prometteuses (Cf. Tableau 10), il résulte de l'étude des relations structure-activité d'une série de composés d'origine marine, les Agélasphines.⁸⁴

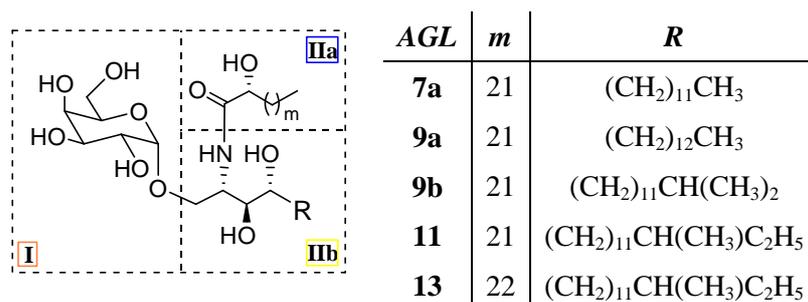
a- Découverte des Agélasphines

Les Agélasphines (AGLs) ont été isolées d'une éponge japonaise, *Agelas mauritianus* (ci-contre), récoltée dans les parages d'Okinawa au Japon, en 1993.⁸⁵



Un échantillon lyophilisé de l'éponge a été extrait par un mélange chloroforme/méthanol. Puis le résidu est à nouveau extrait, par les mélanges acétate d'éthyle/eau et méthanol/eau. Une succession de chromatographies sur gel de silice a permis d'isoler une fraction intéressante dont les constituants ont pu être séparés par CLHP. Les Agélasphines **AGL-7a**, **-9a**, **-9b**, **-11** et **-13** ont alors été identifiées (Schéma 66).

Schéma 66 : Cinq premières Agélasphines identifiées



Les analyses (RMN ¹H et ¹³C, IR, Spectrométrie de masse...) des composés isolés et de leurs produits de méthanolyse ont permis de déterminer les structures de ces Agélasphines. Celles-ci, et notamment les configurations, ont pu être confirmées lors de la synthèse totale d'**AGL-9a**.⁸⁶ Les Agélasphines sont donc des glycosphingolipides possédant une tête polaire D-Galactose commune (Carré **I**), la liaison anomérique de configuration α l'associant à une partie céramide (**II**). Celle-ci est constituée d'une chaîne α -hydroxylée amide variable (**IIa**) et d'une phytosphingosine également variable (**IIb**). Il est à noter que le caractère α pour ce type de composés n'est pas habituellement le plus fréquemment observé.

Ces différents composés ont fait preuve d'une importante activité antitumorale *in vivo* chez des souris infectées par des cellules cancéreuses de type B16.⁸⁷ Ils possèdent également des propriétés

⁸⁴ Morita M., Motoki K., Akimoto K., Natori T., Sakai T., Sawa E., Yamaji K., Koezuka Y., Kobayashi E., Fukushima H. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2176

⁸⁵ Natori T., Koezuka Y., Higa T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 35, 5591

⁸⁶ Akimoto K., Natori T., Morita M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 35, 5593

⁸⁷ Natori T., Morita M., Akimoto K., Koezuka Y. *Tetrahedron* **1994**, 50, 2771

immunostimulantes *in vitro* en induisant une réponse lymphocytaire mixte. Enfin, leur toxicité aiguë est réduite (LD₅₀ > 10 mg/kg chez le rat). Ces différentes caractéristiques ont conduit les chercheurs à considérer les Agélasphines comme des agents anti-tumoraux prometteurs. Une étude des relations structure-activité a donc été menée dans le but d'identifier le composé possédant les meilleures propriétés thérapeutiques.

b- Etude des relations structure-activité⁸⁴

Plusieurs analogues des Agélasphines ont été synthétisés afin d'étudier l'influence des modifications structurales sur l'activité du composé.

☞ Dans un premier temps, les longueurs des chaînes phytosphingosine et acyle ont été variées et la présence ou non des hydroxyles de la partie céramide a été discutée (Tableau 11).

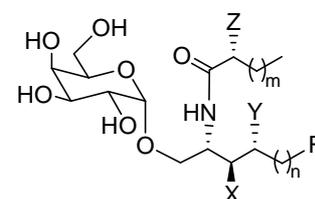


Tableau 11 : Analogues des Agélasphines synthétisés et testés

Entrée	Composé	X	Y	Z	R	m	n	A	B	(A x B).10 ³	C
1	AGL-535	H	H	H	CH ₃	21	13	40,7	90	3,7	
2	AGL-509	OH	OH	OH	CH ₃	21	6	46,2	196	9,1	
3	AGL-544	OH	H	H	CH ₃	17	13	53,1	177	9,4	
4	AGL-536	OH	H	H	CH ₃	15	13	78,1	155	12,1	
5	AGL-525	OH	OH	H	CH ₃	21	13	65,0	198	12,9	
6	AGL-517	OH	H	H	CH ₃	11	13	54,2	249	13,5	
7	AGL-550	OH	OH	OH	CH ₃	23	15	92,8	153	14,2	
8	AGL-549	OH	OH	OH	CH ₃	23	14	72,3	221	16,0	
9	AGL-548	OH	OH	OH	CH ₃	23	13	92,8	203	18,8	382
10	AGL-543	OH	H	H	CH ₃	19	13	56,9	378	21,5	
11	AGL-502	OH	OH	OH	CH(CH ₃) ₂	21	11	86,8	282	24,5	
12	AGL-510	OH	OH	OH	CH ₃	21	10	94,1	330	31,1	
13	AGL-506	OH	H	OH	CH ₃	21	13	81,3	397	32,3	
14	AGL-519	OH	OH	OH	CH ₃	21	12	82,4	520	42,8	
15	AGL-512	OH	OH	OH	CH ₃	21	13	57,9	1060	61,4	
16	AGL-514	OH	H	H	CH ₃	21	13	68,9	1115	76,8	
17	AGL-518	OH	H	OH	CH ₃	23	13	-	-		210
18	AGL-582	OH	OH	H	CH ₃	23	13	53,8	-		398

A - inhibition de la croissance de la tumeur (%)

B - stimulation de la prolifération des lymphocytes (à 1 ng/mL sur des cellules de rate de souris, % par rapport au contrôle)

C - stimulation de la prolifération des lymphocytes (à 1 ng/mL sur du sang humain, % par rapport au contrôle)

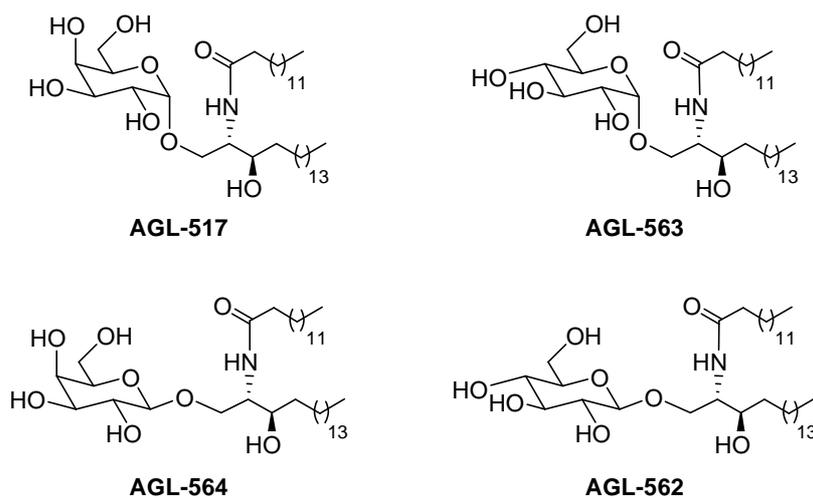
La détermination de la capacité de ces composés à prolonger la durée de vie des souris infectées par des cellules de mélanome B16, ainsi que leur effet sur la prolifération des lymphocytes dans un test de réaction lymphocytaire mixte, a conduit à des résultats très intéressants :

- ↪ La présence d'une ramification en bout de chaîne sur la partie phytosphingosine n'a pas d'influence significative sur l'activité de l'Agélasphine (Entrée 11),
- ↪ Par contre la longueur de cette chaîne tient une place importante dans l'activité du composé car celle-ci augmente avec la longueur de la chaîne, avec un optimum pour $n = 13$ (Entrées 14 et 15),
- ↪ Sur les trois positions X, Y, Z, seul un hydroxyle en position X sur la sphingosine semble nécessaire à une bonne activité (Entrées 1, 3, 13, 15, 16). Toutefois la prolifération des lymphocytes est favorisée en présence des deux hydroxyles X et Y. L'hydroxyle Z influence peu cette augmentation et devient alors superflu. (Entrées 9, 17, 18),
- ↪ Même remarques que pour la chaîne sphingosine, la longueur de la chaîne acyle joue un rôle marquant dans l'activité notamment pour $m = 21$ (Entrées 3, 10, 12, 13, 14) mais surtout pour $m = 23$ (Entrées 17, 18).

Ces tests ont permis de relier l'activité biologique de ces analogues à des éléments structuraux importants de la partie céramide.

✂ Afin de déterminer l'influence, cette fois, de la partie osidique et notamment de la configuration du centre anomérique, les synthèses des composés β -Galactocéramides (**AGL-564**) et α - et β -Glucocéramides (**AGL-563** et **AGL-562** respectivement) ont été entreprises (Schéma 67).⁸⁸

Schéma 67 : α,β -Galactocéramides et α,β - Glucocéramides



⁸⁸ Kobayashi E., Motoki K., Yamagushi Y., Uchida T., Fukushima H., Koezuka Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 615

Plusieurs tests biologiques ont été effectués : activité antitumorale *in vivo* sur des cellules B16 chez la souris, aptitude *in vitro* à stimuler l'activité des cellules NK du système immunitaire, stimulation de la prolifération des cellules de la rate...

Tous ces tests convergent vers la même activité :

- Les α -Galacto- et α -Glucocéramides sont nettement plus réactifs que leurs analogues β ,
- Le motif D-Galactose induit de meilleurs résultats que le motif D-Glucose.

Remarque : les mêmes tests ont été réalisés sur la série D-Mannose, mais celle-ci reste inactive.

Toutes ces recherches ont conduit à considérer l'Agélasphine AGL-582 comme étant le meilleur candidat à des essais cliniques. Développé par la société japonaise Kirin Brewery, le KRN 7000 (ou AGL-582) est constitué d'une unité D-Galactose de configuration α liée à un céramide dihydroxylé dont les longueurs de chaîne lui confèrent une activité optimale.

2) Activités remarquables in vivo du KRN 7000

a- Potentiel d'activité très diversifié

Le KRN 7000 s'est avéré efficace *in vivo* contre plusieurs types de cellules tumorales (hépatiques, pulmonaires...),⁸⁹ contre la malaria,⁹⁰ la tuberculose^{90c} et les maladies auto-immunes (diabète, lupus...)⁹¹ (Cf. Annexe D).⁹² Il a également été montré que les souris guéries par ce traitement avait acquis une immunité spécifique contre la tumeur. Par contre *in vitro*, sa cytotoxicité contre ces mêmes cellules tumorales est négligeable. En réalité, le KRN 7000 n'est pas directement cytotoxique envers les cellules infectées. Son rôle est d'activer les cellules T de l'immunité contre les

⁸⁹ (a) Nakagawa R., Motoki K., Ueno H., Iijima R., Nakamura H., Kobayashi E., Shimosaka A., Koezuka Y. *Cancer Res.* **1998**, 58, 1202; (b) Nakagawa R., Serizawa I., Motoki K., Sato M., Ueno H., Iijima R., Nakamura H., Shimosaka A., Koezuka Y. *Oncol. Res.* **2000**, 12, 51; (c) Fuji N., Ueda Y., Fujiwara H., Toh T., Yoshimura T., Yamagishi H. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 3380, (d) Kobayashi E., Motoki K., Uchida T., Fukushima H., Koezuka Y. *Oncol. Res.* **1995**, 7, 529; (e) Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Sato H., Kondo E., Harada M., Koseki H., Nakayama T., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 5690; (f) Cretney E., Takeda K., Yagita H., Glaccum M., Peschon J. J., Smyth M. J. *J. Immunol.* **2002**, 168, 1356; (g) Hayakawa Y., Rovero S., Forni G., Smyth M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 16, 9464

⁹⁰ (a) Hansen D. S., Siomos M.-A., de Koning-Ward T., Buckingham L., Crabb B. S., Schofield L. *Eur. J. Immunol.* **2003**, 33, 2588; (b) Gonzalez-Aseguinolaza G., Van Kaer L., Bergmann C. C., Wilson J. M., Schmeig J., Kronenberg M., Nakayama T., Taniguchi M., Koezuka Y., Tsuji M. *J. Exp. Med.* **2002**, 195, 617; (c) Chackerian A., Alt J., Perera V., Behar S. M. *Inf. Immunol.* **2002**, 70, 6302

⁹¹ (a) Singh A. K., Yang J.-Q., Parekh V. V., Wei J., Wang C.-R., Joyce S., Singh R. R., Van Kaer L. *Eur. J. Immunol.* **2005**, 35, 1143; (b) Duarte N., Stenstrom M., Sampino S., Bergman M.-L., Lundholm M., Holmberg D., Cardell S. L. *J. Immunol.* **2004**, 173, 3112; (c) Hong S., Wilson M. T., Serizawa I., Wu I., Singh N., Naidenko O. V., Miura T., Haba T., Scherer D. C., Wei J., Kronenberg M., Koezuka Y., Van Kaer L. *Nature Med. (N.Y., NY, U.S.A.)* **2001**, 7, 1052; (d) Falcon M., Facciotti F., Ghidoli N., Monti P., Olivieri S., Zaccagnino L., Bonifacio E., Casorati G., Sanvito F., Sarvetnick N. *J. Immunol.* **2004**, 172, 5908

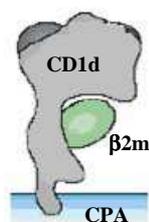
⁹² Yu K. O. A., Porcelli S. A. *Immunol. Lett.* **2005**, 100, 42

cellules infectées. De par cette capacité, cet α -GalCer est devenu un outil très utilisé tant en recherche fondamentale que thérapeutique comme agent pharmacologique et à ce jour, deux essais cliniques de phase I en cancérologie ont été publiés.⁹³

b- Interactions biologiques des α -GalCer

Remarque : Cette partie sera développée plus profondément dans le Chapitre C concernant les tests biologiques.

L' α -GalCer et autres α -Glycocéramides activent le système immunitaire contre les tumeurs et le « rééduquent » pour lutter contre les maladies auto-immunes ou pathogéniques. Leurs cibles d'action sont les cellules TNK (Cellules T Natural Killer). Le KRN 7000 est présenté à ces cellules par une protéine, nommée CD1d, associée à une β 2-microglobuline (β 2m). L'ensemble est véhiculé par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (cellules dendritiques, macrophages...) (Figure ci-dessous).⁹⁴

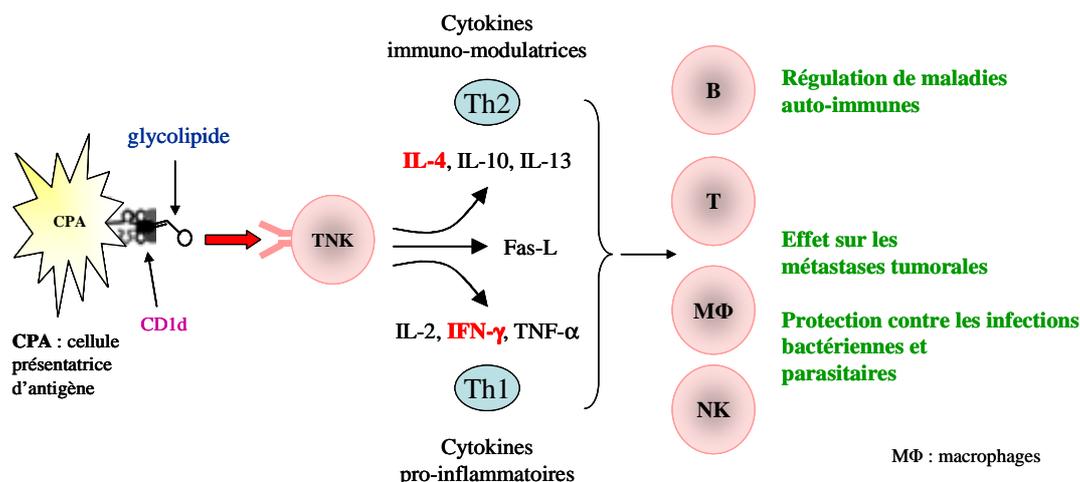


Lorsque l'affinité du glycolipide pour les récepteurs des cellules TNK est efficace, alors ces cellules produisent diverses molécules très actives, les cytokines. Parmi ces cytokines, les Interférons- γ (IFN- γ) et les interleukines-4 (IL-4) sont remarquables et induisent chacune deux réponses immunitaires spécifiques, dites Th1 et Th2 (respectivement). Après l'activation en cascade d'autres cellules de l'immunité (Cellules B, macrophages...), la réponse Th1 permet de lutter contre les tumeurs, tandis que la réponse Th2 concerne le traitement des maladies auto-immunes (Schéma 68).

⁹³ (a) Giaccone G., Punt C. J. A., Ando Y., Ruijter R., Nishi N., Peters M., von Blomberg B. M. E., Scheper R. J., van der Vliet H. J. J., van den Eertwegh A. J. M., Roelvink M., Beijnen J., Zwierzina H., Pinedo H. M. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 3702; (b) Nieda M., Okai M., Tazbirkova A., Lin H., Yamaura A., Ide K., Abraham R., Juji T., Macfarlane D. J., Nicol A. J. *Blood* **2004**, 103, 383

⁹⁴ Moody B. B. *Nature Reviews Immunology* **2005**, 5, 387

Schéma 68 : Activation des cellules TNK par un α -GalCer



Le KRN 7000 produit ces deux cytokines dans les mêmes quantités. D'un point de vue thérapeutique, il serait intéressant de pouvoir induire préférentiellement l'une ou l'autre réponse. C'est pourquoi de nombreuses équipes à travers le monde se sont penchées sur la synthèse d'analogues pouvant favoriser telle ou telle réponse immunitaire. De plus, ayant, encore à l'heure actuelle, peu d'informations sur le mécanisme d'interaction biologique entre l' α -GalCer et son véhicule (CD1d), d'une part, et avec les récepteurs des cellules TNK, d'autre part, plusieurs analogues sont destinés à ces recherches uniquement.

3) Analogues remarquables du KRN 7000

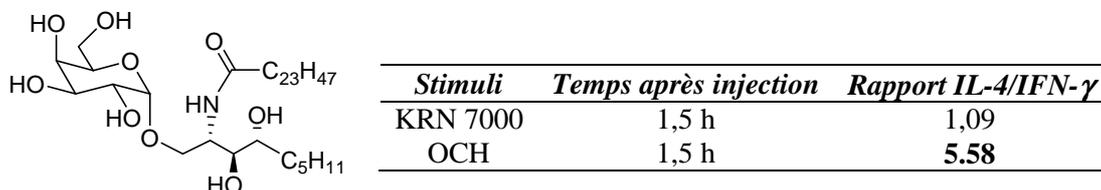
Nous avons vu précédemment que l'étude des relations structure-activité concernait les modifications effectuées sur les chaînes grasses (longueurs des chaînes et présence d'hydroxyles sur celles-ci) et sur la nature glycosidique de la tête polaire. Dans la course aux analogues bioactifs du KRN 7000, les modifications se sont portées sur :

- ↳ la longueur des chaînes phytosphingosine et acyle (raccourcissement)
- ↳ l'absence de l'hydroxyle Y sur la chaîne phytosphingosine (accès à des chaînes de type sphinganine)
- ↳ la présence de doubles liaisons ou de motifs aromatiques sur les chaînes grasses
- ↳ l'insertion de groupements plus ou moins fonctionnalisés sur les hydroxyles du D-Galactose

À partir de la structure établie du KRN 7000, un analogue ayant une chaîne phytosphingosine raccourcie à cinq carbones et une chaîne acyle tronquée de deux carbones a été synthétisé (Schéma 69).⁹⁵ Nommé **OCH**, ce composé induit une augmentation de la production d'IL-4 au détriment de celle des IFN- γ . Favorisant la réponse immunitaire Th2, OCH offre ainsi une protection contre les

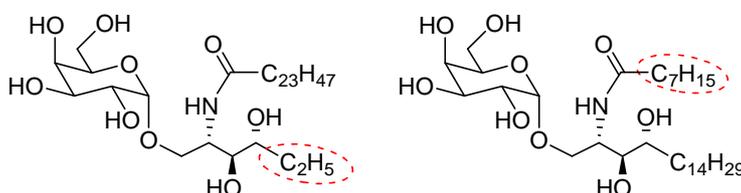
encéphalomyélites auto-immunes (EAE),⁹⁵ le diabète de type I^{96a} et l'arthrite induite par le collagène.^{96b}

Schéma 69 : Analogue OCH – Rapport IL-4/IFN- γ ⁹⁷



Dans la même lignée que l'OCH, une équipe américaine s'est concentrée à démontrer que plus la longueur d'une des deux chaînes grasses est courte, plus la production d'IL-4 augmente (Schéma 70).⁹⁸

Schéma 70 : Chaînes acyle et phytosphingosine tronquées



Ces résultats seraient dus à une plus faible stabilité du complexe α -GalCer/CD1d vis-à-vis du récepteur des cellules TNK. Les IFN- γ semblent requérir une plus longue stimulation que ne le demandent les IL-4.⁹⁷

Une autre équipe américaine s'est intéressée, cette fois, aux analogues sphinganines du KRN 7000 et de l'OCH afin de tester l'influence de la présence de l'hydroxyle Y sur la chaîne phytosphingosine (Schéma 71). Les résultats des essais *in vitro* confirment les données obtenues lors de l'étude structure-activité, ces produits n'ayant montré, en effet, aucune amélioration dans la production des cytokines par rapport à leurs analogues parents.^{99a}

⁹⁵ (a) Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T. *Nature* **2001**, 413, 531; (b) Berkers C., Ovaas H. *Trends in Pharmacological Sciences* **2005**, 26, 5, 252

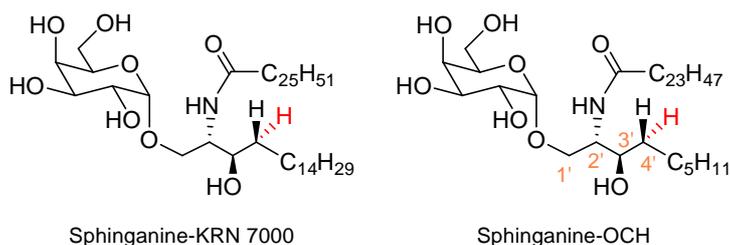
⁹⁶ (a) Mizuno M., Masumura M., Tomi C., Chiba A., Oki S., Yamamura T., Miyake S. *J. Autoimmun.* **2004**, 23, 293; (b) Chiba A., Oki S., Miyamoto K., Hashimoto H., Yamamura T., Miyake S. *Arthritis Rheum.* **2004**, 50, 305

⁹⁷ Oki S., Chiba A., Yamamura T., Miyake S. *J. Clin. Invest.* **2004**, 113, 11, 1631

⁹⁸ Goff R. D., Gao Y., Mattner J., Zhou D., Yin N., Cantu (III) C., Teyton L., Bendelac A., Savage P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13602

⁹⁹ (a) Ndonge R. M., Izmirian D. P., Dunn M. F., Yu K. O. A., Porcelli S. A., Khurana A., Kronenberg M., Richardson S. K., Howell A. R. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10260; (b) Sidobre S., Hammond K. J. L., Bénazet-Sidobre L., Maltsev S. D., Richardson S. K., Ndonge R. M., Howell A. R., Sakai T., Besra G. S., Porcelli S. A., Kronenberg M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 12254

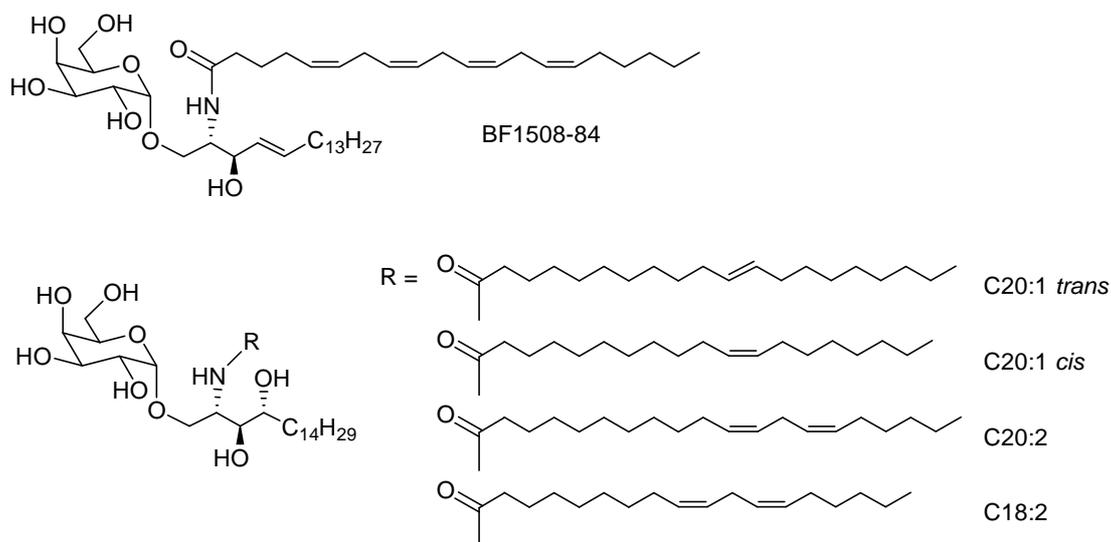
Schéma 71: Analogues sphinganine du KRN 7000 et de l'OCH



Il est à noter que l'hydroxyle X en position 3' est, quant à lui, primordial car son absence entraîne une perte totale de l'activité.^{99b}

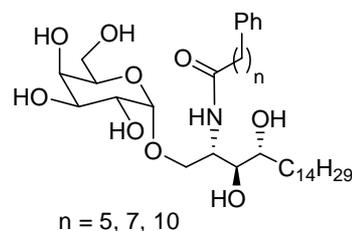
Les analogues possédant des doubles liaisons de configuration Z ou E sur leurs chaînes grasses ont montré une faculté à produire majoritairement des IL-4 en quantité similaire voire supérieure au KRN 7000 (Schéma 72).¹⁰⁰

Schéma 72 : Analogues insaturés



L'introduction d'un groupement aromatique en bout de la chaîne acyle permet de multiplier quasiment par quatre la production d'IFN- γ par rapport au KRN 7000 (Schéma 73).¹⁰¹ Ces résultats récents sont les premiers de ce genre dans la catégorie des O-glycosides et montrent qu'il est possible d'induire majoritairement des cytokines pro-inflammatoires (Th1) en limitant la production de cytokines immuno-modulatrices (Th2).

Schéma 73 : Analogues aromatiques



¹⁰⁰ Yu K. O. A., Im J. S., Molano A., Dutronc Y., Illarionov P. A., Forestier C., Fujiwara N., Arias I., Miyake S., Yamamura T., Chang Y.-T., Besra G. S., Porcelli S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 9, 3383

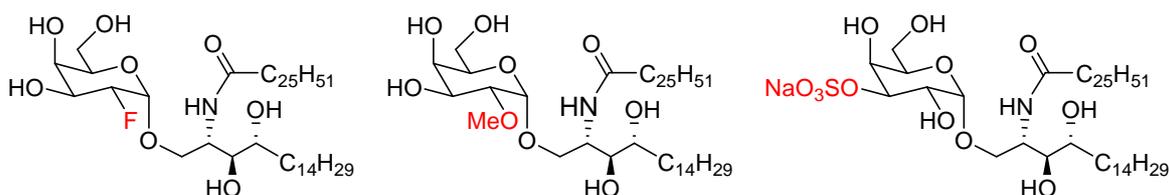
¹⁰¹ Fujio M., Wu D., Garcia-Navarro R., Ho D. D., Tsuji M., Wong C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9022

☞ Pour définir les hydroxyles réactifs du D-Galactose, ceux-ci ont été substitués par divers groupements : fluor, méthoxy, sulfate, sucre, trisaccharide, chaîne amide...

Des études ont montré que l'hydroxyle en position C2 du sucre joue un rôle important dans l'activité. En effet, lorsque cet alcool est remplacé par un atome de fluor ou par un groupement méthoxy (Schéma 74), le KRN 7000 connaît une baisse importante de son activité *in vivo*.¹⁰²

Contrairement à l'hydroxyle en position 2, celui en position 3 n'a aucune influence sur l'activité, l'analogue sulfaté en cette position n'améliorant pas significativement les résultats obtenus pour le KRN 7000.¹⁰³

Schéma 74 : Analogues peu réactifs



Si un motif glycosidique est fixé sur les hydroxyles en C2, C3 ou C4, alors ces analogues subissent, d'abord, une coupure *in vivo* du sucre supplémentaire, avant d'induire une activité similaire au KRN 7000 (Schéma 75). La molécule semble « se démasquer » avant de pouvoir interagir, ce qu'elle ne pouvait faire avec les groupements fluor, méthoxy et sulfate. Par contre, l'analogue disaccharidique (et trisaccharidique iGb3)¹⁰⁴ substitué en position 6 stimule les cellules TNK sans subir d'hydrolyse.¹⁰⁵ Ce démasquage ne paraît pas nécessaire car le sucre fixé est également un D-Galactose, qui mime alors le D-Galactose de l' α -Galcer.

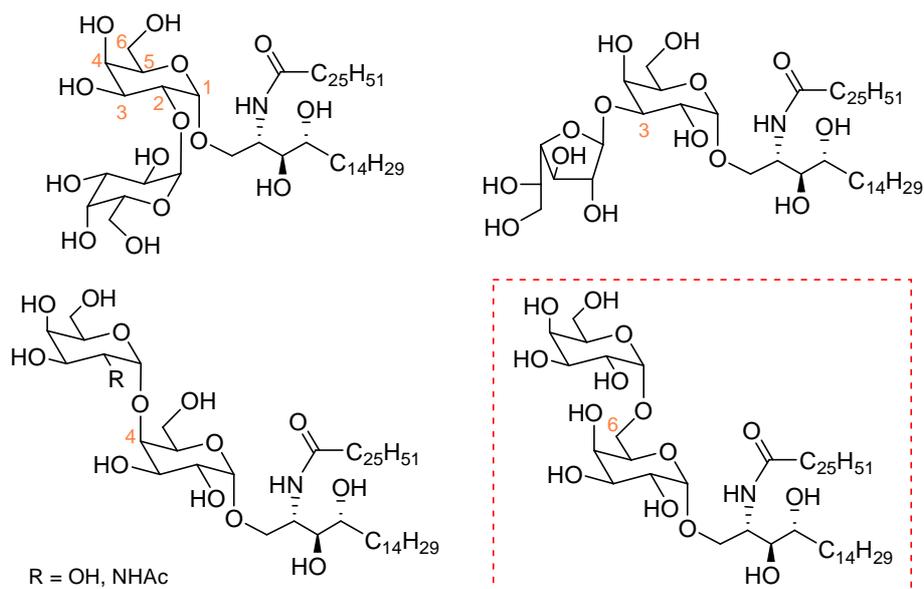
¹⁰² (a) Barbieri L., Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Basilico N., Mondani M., Taramelli D. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3279; (b) Barbieri L., Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Aru E., Parapini S., Taramelli D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 468

¹⁰³ Xing G.-W., Wu D., Poles M. A., Horowitz A., Tsuji M., Ho D. D., Wong C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2907

¹⁰⁴ (a) Xia C., Yao O., Schümann J., Rossy E., Chen X., Zhu L., Zhang W., De Liberoc G., Wang P. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2195; (b) Savage P. B., Teyton L., Bendelac A. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 771

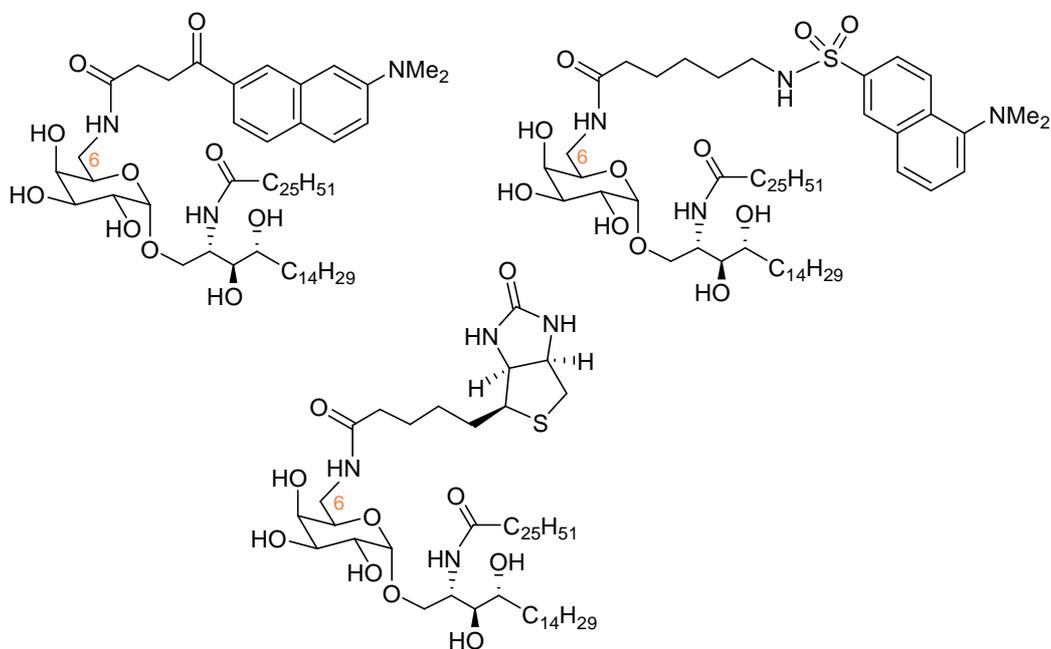
¹⁰⁵ (a) Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H., Taniguchi M. *Science* **1997**, 278, 1626; (b) Prigozy T. I., Naidenko O., Qazba P., Elewaut D., Brossay L., Khurana A., Natori T., Koezuka Y., Kulkarni A., Kronenberg M. *Science* **2001**, 291, 664; (c) Zhou D., Mattner J., Cantu (III) C., Schrantz N., Yin N., Gao Y., Sagiv Y., Hudspeth K., Wu Y.-P., Yamashita T., Tenenberg S., Wang D., Proia R. L., Lavery S. B., Savage P. B., Teyton L., Bendelac A. *Science* **2004**, 306, 1786

Schéma 75 : Analogues disaccharidiques



L'équipe de Zhou s'est intéressée à la synthèse d'amides possédant des fluorophores, telle que la biotine, sur la position 6 du D-Galactose. Ces analogues stimulent bien les cellules TNK, avec une activité similaire au KRN 7000. Actuellement, ce genre de composés est utilisé pour étudier les interactions de l' α -GalCer avec son véhicule, le CD1d (Schéma 76).^{105c, 106}

Schéma 76 : Analogues amides en position 6



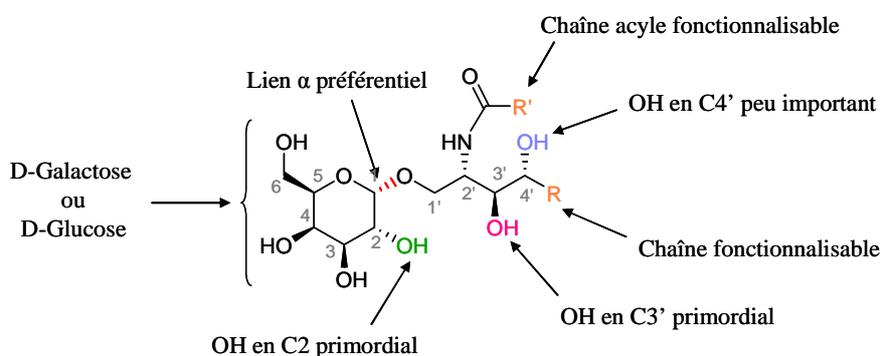
¹⁰⁶ (a) Zhou X. T., Forestier C., Goff R. D., Li C., Teyton L., Bendelac A., Savage P. B. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1267;
 (b) Vo-Hoang Y., Micouin L., Ronet C., Gachelin G., Bonin M. *Chem. Bio. Chem.* **2003**, 4, 27

Ces quelques analogues nous fournissent énormément de renseignements sur les structures idéales à envisager (Tableau 12). Des modifications structurales sont nécessaires pour améliorer l'activité mais certains éléments comme l'hydroxyle en position 2 du sucre et celui en position 3' de la phytosphingosine doivent être conservés (Schéma 77). De plus, de nombreux points, concernant les interactions biologiques entre l' α -GalCer et son véhicule ou avec les récepteurs des cellules de l'immunité, restent encore flous. D'autres analogues doivent donc être synthétisés pour définir la structure idéale pour une activité ciblée vers l'une ou l'autre réponse immunitaire et pour déterminer clairement les mécanismes biologiques mis en jeu *in vivo*. Ces deux axes de recherche sont étroitement liés.

Tableau 12 : Modifications structurales efficaces

Modifications structurales	Effets engendrés
Raccourcissement de la longueur des chaînes grasses	↗ IL-4 (Th2)
Insertion de doubles liaisons	↗ IL-4 (Th2)
Insertion d'un groupement aromatique en bout de la chaîne acyle	↗ IFN- γ (Th1)

Schéma 77 : Eléments importants



Tous ces analogues ont néanmoins un point faible : la liaison anomérique. Certainement sensible aux glycosidases *in vivo*, une modification structurale concernant la nature de cette liaison est à tester. Ainsi, les analogues α -C-Galactocéramides (α -C-GalCer) ont vu le jour et se sont révélés être des composés extrêmement intéressants biologiquement.

II) Synthèses connues de l'analogue C-glycosidique du KRN 7000

La relation structure-activité effectuée sur l'éponge *Agelas mauritanus* a permis de cibler les familles de glycosides induisant une certaine activité biologique. Pour améliorer cette activité, les chimistes ont d'instinct pensé à synthétiser l'analogue C-glycosidique. Les synthèses de ces analogues sont peu nombreuses et très récentes. Actuellement, il en existe cinq. Certaines sont originales, courtes et séduisantes, d'autres plus longues, semblant peu fiables et ne permettant pas d'orienter facilement et rapidement la synthèse vers d'autres analogues plus fonctionnalisés.

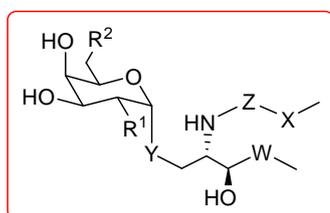
Remarque : Toutes ces publications, hormis une, décrivent des tests biologiques qui seront évoqués dans ce paragraphe et plus développés dans le chapitre C de ce manuscrit.

1) Les α -C-GalCer

a- Brevet déposé par H. Tomiyama et coll. (Société pharmaceutique Kirin)¹⁰⁷

Ce brevet protège tous les dérivés glycolipidiques possédant la structure suivante (Schéma 78) et pouvant avoir une activité antitumorale et immunostimulatrice.

Schéma 78 : Structure des dérivés glycolipidiques protégés par le brevet



W : chaînes contenant 9 à 17 carbones avec ou sans insaturations et groupement hydroxyle
X : chaînes contenant 11 à 25 carbones avec ou sans insaturations et groupement hydroxyle
Y : $(\text{CH}_2)_a\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_b$, $(\text{CH}_2)_a$, $\text{S}(\text{O})_{0-2}\text{CH}_2$, NHCH_2 , avec a, b = 0-5
Z : CO, SO₂
R¹ : OH, NH₂, NHAc
R² : CH₂OH, CO₂H, CH₂OCH₂CO₂H, CH₂OSO₃H

Il se compose de trois parties : la première concerne les dérivés C-glycosidiques, la seconde modifie la nature de la liaison anomérique (soit soufrée, soit azotée) et la troisième décrit les tests pharmacologiques.

Remarque : Seules les premières et troisièmes parties seront traitées, la seconde étant peu et mal développée dans le brevet ne sera pas abordée.

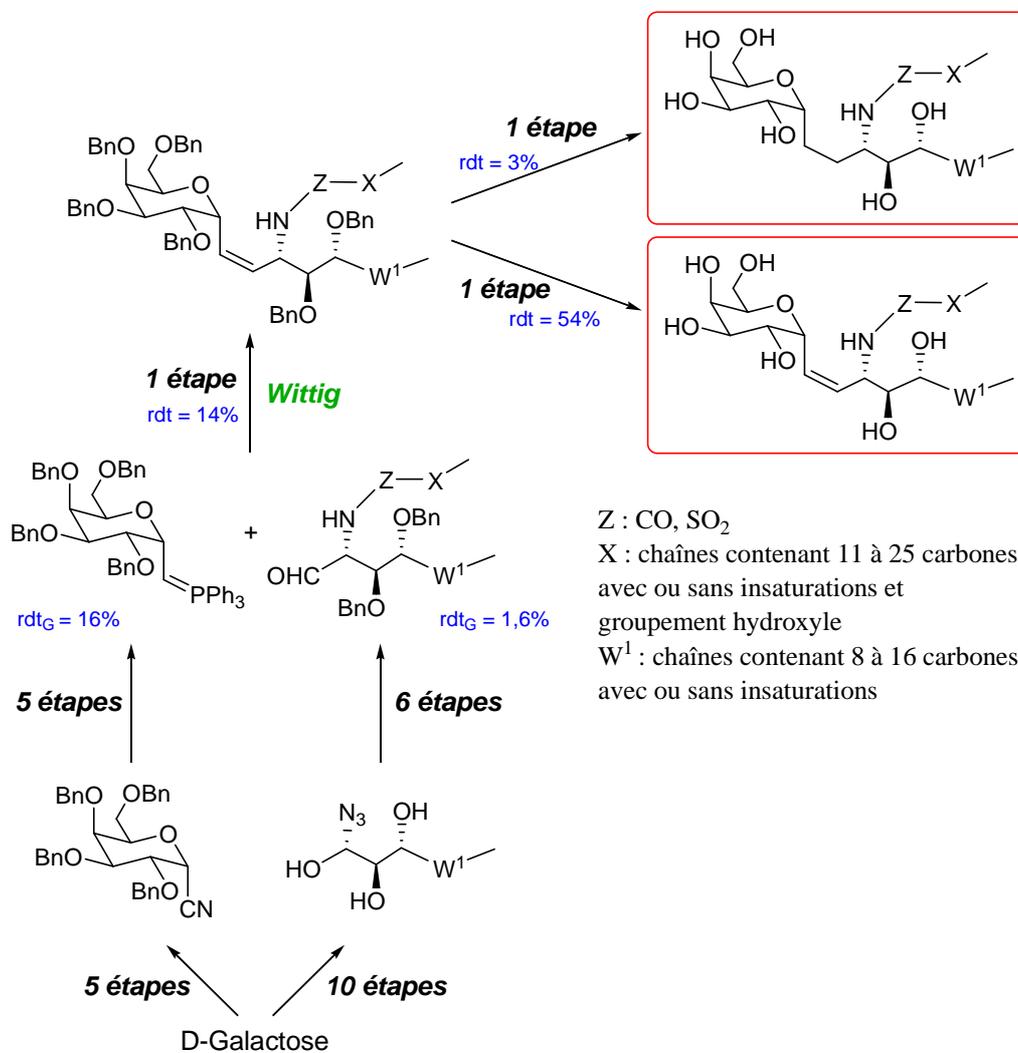
La voie synthétique (Schéma 79) permettant l'accès aux C-glycosides repose sur la réaction de Wittig comme étape clé (une deuxième voie est citée mais aucune partie expérimentale n'est fournie).

¹⁰⁷ Tomiyama H., Yanagisawa T., Nimura M., Noda A., Tomiyama T. JP 2001/354666, 2002; Chem. Abst. 2002, 136, 37901x; US Patent Appl. 2002/0032158 A1, 14 Mars, 2002

Plusieurs inconvénients sont à noter :

- Cette voie de synthèse est longue (18 étapes), son rendement global est très faible (~0,00007%), et notamment ceux des deux dernières étapes (14% pour la réaction de Wittig et 3% pour l'étape de déprotection totale),
- Cette méthode s'est avérée non reproductible,¹⁰⁸
- Le composé final est contaminé par de nombreuses substances empêchant sa purification exhaustive,¹⁰⁸
- Toutes les modifications structurales (diverses longueurs de chaînes, nature de la chaîne acyle...) s'effectuent en amont du couplage C-glycosidique, ceci constituant un handicap pour une production rapide de nombreux analogues. De plus, les variations structurales en position 6 du sucre ne sont possibles que sur les molécules finales totalement déprotégées.

Schéma 79 : Schéma synthétique conduisant aux analogues C-glycosidiques (Brevet)



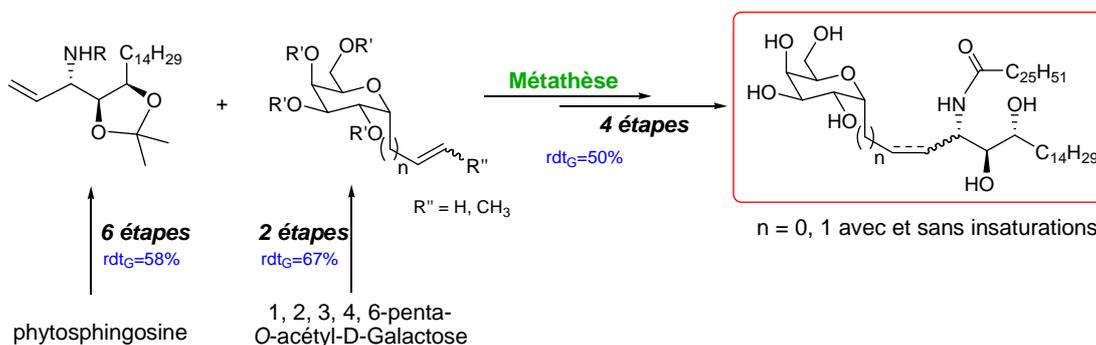
¹⁰⁸ Note 7 dans la référence 58e (*Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 5043)

b- Première synthèse de Franck et coll.^{58d, 109}

Cette voie de synthèse est intéressante tant par son nombre d'étapes (11) que par son rendement global (~29%). De plus, elle permet l'accès à un nouveau type d'analogue contenant une insaturation comme bras espaceur entre le D-Galactose et le céramide. L'étape clé est la réaction de métathèse qui conduit au glycolipide voulu avec un très bon rendement (72%) (Schéma 80).

Toutefois cette stratégie utilise directement la phytosphingosine comme produit de départ. Cette chaîne grasse ne peut donc être modifiée par la suite, ce qui rend impossible la généralisation de la méthode à d'autres composés. De plus, son coût (73,00 \$ pour 25 mg chez Avanti Polar Lipids, Inc.) très élevé est un frein pour une application à grande échelle. La solution est de synthétiser cette phytosphingosine à partir de la L-Sérine, mais il faut compter 6 étapes supplémentaires ce qui alourdit la synthèse.

Schéma 80 : Schéma synthétique conduisant aux analogues C-glycosidiques du KRN7000 avec et sans insaturations



Cette synthèse est très attrayante mais le coût des sphingosines est un inconvénient majeur.

c- Deuxième synthèse de Franck et coll.^{58d, 110, 111}

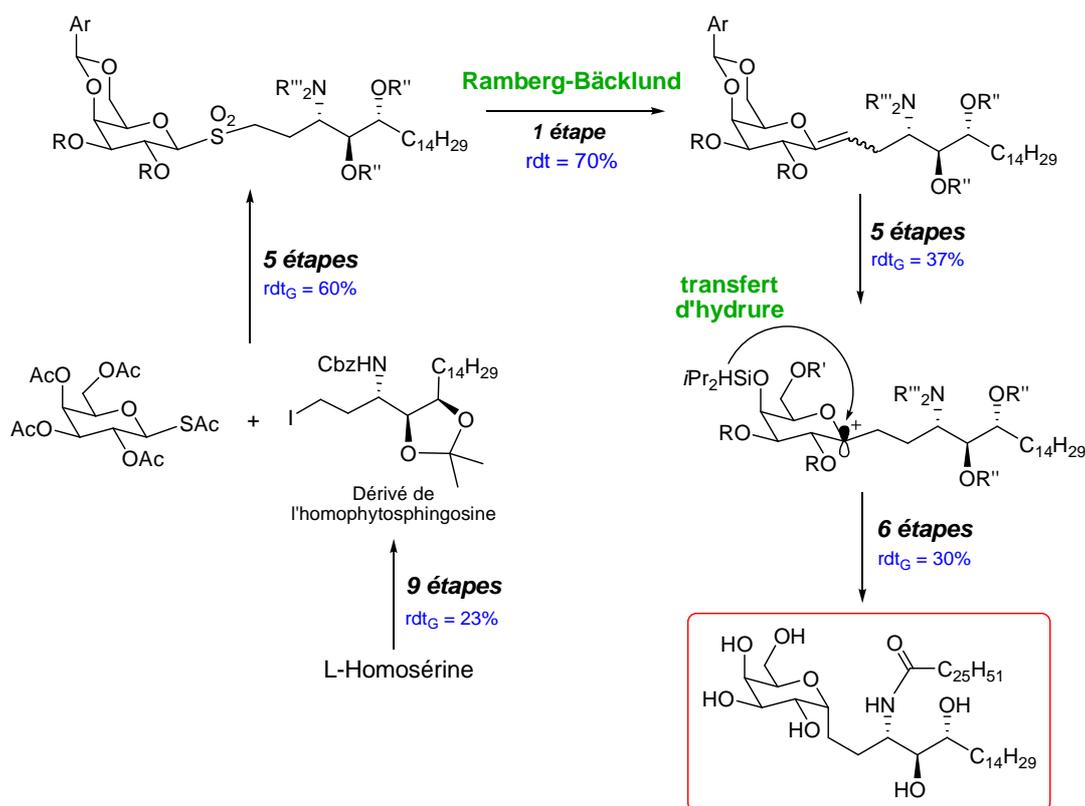
Cette synthèse repose sur deux étapes clé : la réaction de Ramberg-Bäcklund qui permet d'obtenir la liaison C-glycosidique, et une réaction mettant en jeu un transfert d'hydrogène menant à l'analogue α souhaité (Schéma 81).

¹⁰⁹ Tsuji M., Franck R. W., Yang G., Chen G., Synthetic C-glycolipid and its use for treating cancer infectious diseases and autoimmune disease, *US Patent WO 03/105769 A2*, **2003**

¹¹⁰ Yang G., Schmiege J., Tsuji M., Franck R. W. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2004**, *43*, 3818

¹¹¹ Tsuji M., Franck R. W., Chen G., Novel synthetic C-glycolipids, their synthesis and use to treat infections, cancer and autoimmune disease, *US Patent WO 2005/102049 A1*, **2005**

Schéma 81 : Schéma synthétique conduisant aux analogues C-glycosidiques (Franck)



Plusieurs inconvénients sont à signaler :

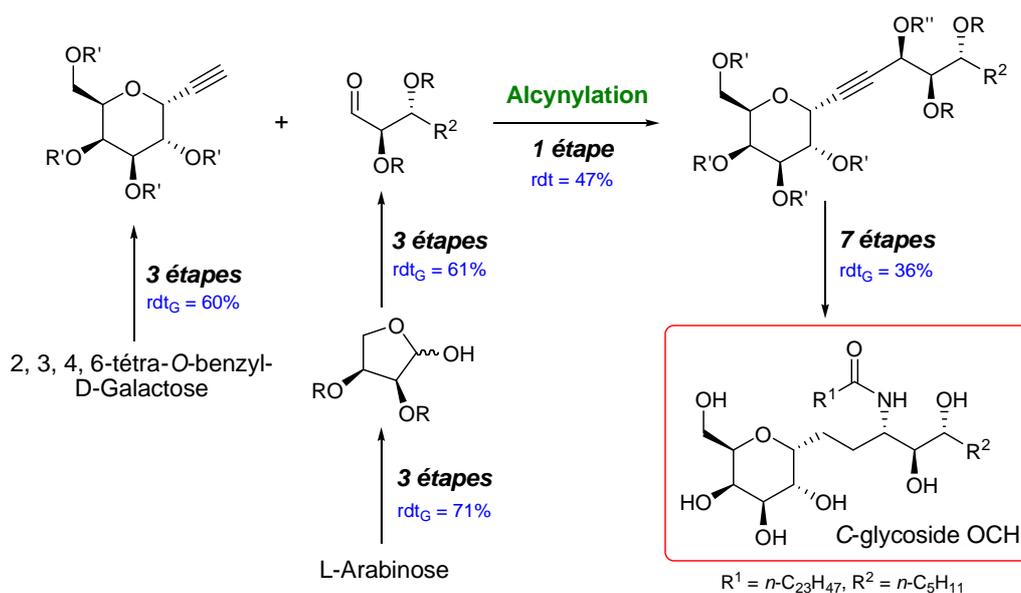
- Cette voie synthétique est longue (26 étapes) et son rendement global est faible (~1%).
- La seconde étape clé est limitante car elle conduit également à 15% d'un composé cyclique non utilisable pour la suite de la synthèse.
- La fonctionnalisation de la partie lipidique s'effectue très tôt dans le schéma rétrosynthétique (5^{ème} étape), ce qui limite la production rapide de divers analogues.

Cette synthèse permet cependant d'individualiser la position 6 du D-Galactose.

d- Synthèse d'Annoura et coll.^{58e}

Cette méthode repose sur l'addition d'un alcynure sur l'aldéhyde de type sphingolipidique. Le C-glycoside désiré (analogue de l'OCH) est ainsi obtenu en 14 étapes avec un rendement satisfaisant de 7,3%. Les précurseurs du couplage sont obtenus à partir de sucres commerciaux peu coûteux (48,50 € les 250 mg de dérivé du D-Galactose chez Acros et 37,30 € les 25g de L-Arabinose chez Sigma-Aldrich). L'étape du couplage reste toutefois très limitante car la réaction n'est pas stéréosélective. Les deux diastéréoisomères sont observés et isolés par chromatographie sur gel de silice. Seulement 47% de l'alcool ayant la configuration voulue est obtenu, 30% du second diastéréoisomère est isolé et 15% d' α -éthynyl-galactopyranose n'ont pas été convertis (Schéma 82).

Schéma 82 : Schéma synthétique conduisant aux analogues C-glycosidiques OCH



*e- Synthèse de Wipf et Pierce*¹¹²

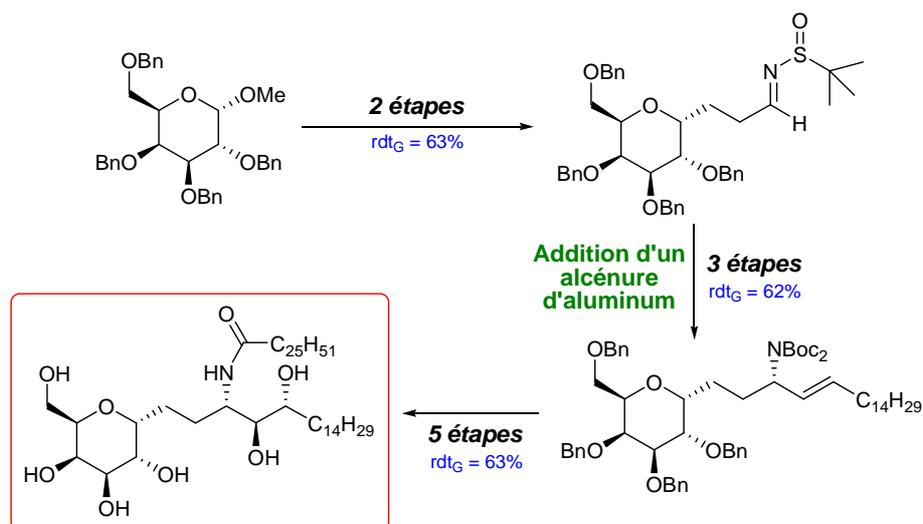
Les synthèses décrites précédemment ont un point commun. Ce sont toutes des synthèses convergentes. La stratégie développée par Wipf et Pierce implique, cette fois, une synthèse linéaire. Cette méthode est efficace car en peu d'étapes (10), elle nous conduit à l'analogue désiré avec un excellent rendement global (25%) (Schéma 83).

Toutefois seule la série amide peut être exploitée, cette voie ne permet pas de modifier la nature du lien entre les deux chaînes grasses.

Second inconvénient, les auteurs ont utilisé le 1-O-méthyl-2,3,4,6-O-Benzoyl- α -D-galactopyranose commercial ayant un certain coût (66,40 € le gramme chez Acros).

¹¹² Wipf P., Pierce J. G. *Org.Lett.* **2006**, 8, 15, 3375

Schéma 83 : Schéma synthétique linéaire (Wipf et Pierce)



f- Activités biologiques de l'analogue C-Galactosidique du KRN 7000

Plusieurs types de tests pharmacologiques ont été effectués sur cet analogue. *In vitro*, *in vivo* et à plus faibles doses, il s'est révélé être un candidat plus efficace que le KRN 7000 lui-même, notamment dans la production d'IFN- γ . Il en résulte que l'analogue C-glycosidique du KRN 7000 est environ 1000 fois plus actif contre la malaria^{110, 113} et 100 fois plus contre les métastases^{110, 114} que son parent.

Les tests préliminaires effectués sur l'analogue C-glycosidique de l'OCH ont montré une certaine réactivité de celui-ci du même ordre que son analogue parent (augmentation de la production d'IL-4 *in vivo*).^{58c}

Remarque : Cf Chapitre C pour plus de détails sur les tests biologiques effectués et résultats obtenus.

Cette forte activité confère à l'analogue C-galactosidique une propriété remarquable. Il est le premier analogue C-glycosidique à être plus réactif que son parent. Ces résultats très prometteurs rendent sa synthèse ainsi que celles de ses analogues très motivantes. Or les méthodes actuellement décrites présentent plusieurs inconvénients majeurs rendant difficile une production à l'échelle d'un gramme de ce composé et de ses dérivés (Tableau 13).

¹¹³ Gonzalez-Aseguinolaza G., de Oliveira C., Tomaska M., Hong S., Bruan-Romero O., Nakayama T., Taniguchi M., Bendela A., Van Kaer L., Koezuka Y., Tsuji M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8461

¹¹⁴ Schmiege J., Yang G., Franck R. W., Tsuji M. *J. Exp. Med.* **2003**, 198, 1631

L'émergence de cet analogue C-galactosidique n'en est qu'à ces débuts. De nombreuses recherches doivent encore être effectuées pour améliorer les stratégies de synthèses et définir des analogues adéquats pour des traitements thérapeutiques.

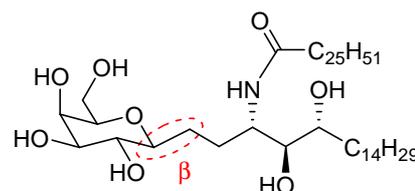
Tableau 13 : Inconvénients et avantages des synthèses existantes

<i>Synthèses</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
Brevet	- synthèse convergente	- synthèse longue et non reproductible - rendement très faible - modifications structurales limitées et peu accessibles
Franck (I)	- synthèse courte et convergente (10 étapes) - bon rendement global (29%) - accès à des analogues insaturés entre le motif sucre et le céramide	- utilisation de phytosphingosines commerciales (coût important) - modifications structurales sur les chaînes limitées et peu accessibles
Franck (II)	- synthèse convergente	- synthèse longue (26 étapes) - rendement faible - étape clé limitante avec formation d'un sous-produit inutilisable - fonctionnalisation en début de synthèse
Annoura	- analogue C-OCH - synthèse courte et convergente (14 étapes) - rendement satisfaisant (7,3%)	- étape clé non stéréosélective et conversion non totale
Wipf et Pierce	- synthèse courte (10 étapes) - rendement correct (25%)	- synthèse linéaire - fonctionnalisation seulement possible sur les chaînes grasses - accès uniquement aux séries amide - produit de départ coûteux

2) Les β -C-GalCer

Les analogues β étudiés pour des études structure-activité s'étaient révélés moins actifs, voire inactifs. Or leurs analogues C-galactosidiques ont montré un certain potentiel anti-tumoral (Schéma 84).¹¹⁵ A l'avenir, ces composés devront faire l'objet d'une plus grande attention.

Schéma 84 : Analogue β -C-Galactocéramide



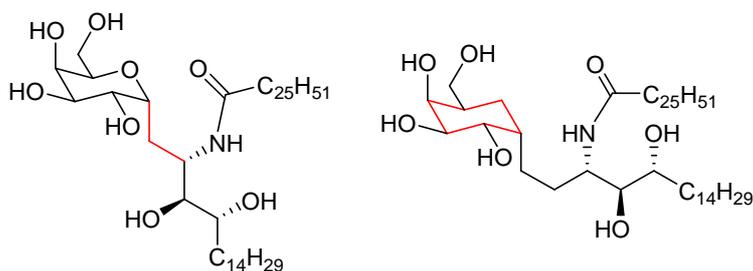
¹¹⁵ Chaulagain M. R., Postema M. H. D., Valeriote F., Pietraszkewicz H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7791

3) Autres analogues C-Galactosidiques intéressants

Récemment deux nouveaux analogues ont été synthétisés (Schéma 85) :

- Le premier est tronqué d'un carbone entre le motif D-Galactose et la partie céramide. Les tests effectués ont montré que ce composé induit une forte production des cytokines IFN- γ favorisant une réponse Th1.¹¹⁶
- Le second composé est un carbagalactose pouvant mimer l' α -C-GalCer *in vivo*.¹¹⁷ A ce jour, aucune publication n'a démontré une activité biologique pour cet analogue.

Schéma 85 : Analogues C-Galactocéramides nouvellement synthétisés



4) Notre inscription dans cette course aux analogues C-Galactosidiques du KRN 7000

Afin d'appréhender au mieux les paramètres impliqués dans l'activité et la synthèse de tels dérivés, nous avons constitué un réseau appelé « Réseau KRN 7000 » (Schéma 86), où trois niveaux de compréhension, études et mises au point, nous semblent essentiels :

A) au niveau modélisation moléculaire : afin de définir les meilleurs analogues susceptibles d'interagir avec la structure CD1d, il est essentiel d'identifier : (a) tous les acides aminés du CD1d impliqués dans la reconnaissance cellulaire, ainsi que le comportement du CD1d vis-à-vis du ligand glycolipidique (contribution de Manuel Dauchez, Cf. Chapitre B-III-1b), (b) les fonctions chimiques des substrats glycosidiques à prendre en considération en vue d'améliorer leur activité potentielle (contribution d'Eric Hénon, Cf. Chapitre B-III-1a)

B) au niveau synthèse et purification des analogues C-Glycosidiques : après avoir mis au point une nouvelle stratégie offrant un accès au squelette constitutif (α -C-galactosides), approche indispensable (contribution de Stéphane Guillaume, Cf. Chapitre A-II-1), les cibles α -Galactosylcéramides ont été obtenues selon une approche convergente et généralisable (contribution d'Aline Banchet). Ces dérivés

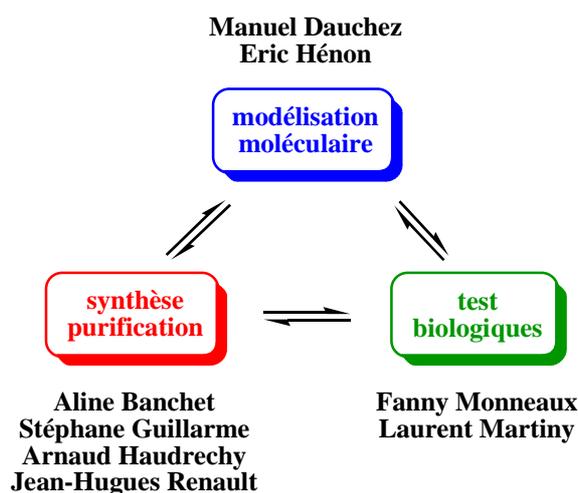
¹¹⁶ Lu X., Song L., Metelitsa L. S., Bittman R. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, 7, 1750

¹¹⁷ Yu S.-H., Park J.-J., Chung S.-K. *Tetrahedron: Asymm.* **2006**, 17, 3030

sont purifiés par des méthodes douces spécialement conçues pour eux (contribution de Jean-Hugues Renault, Cf. Chapitre B-IV-4)

C) au niveau « tests biologiques » : devant la diversité des activités des α -Galactosylcéramides (ceci à des doses infimes de l'ordre du nanomolaire parfois), des mises au point de tests spécifiques sont primordiaux (contributions de Fanny Monneaux et de Laurent Martiny, Cf. Chapitre C-III).

Schéma 86 : Notre « Réseau KRN 7000 »



<i>Noms</i>	<i>Fonctions</i>	<i>Université/Lieu de rattachement</i>
Manuel Dauchez	Professeur	Université de Reims Champagne-Ardenne
Eric Hénon	Maître de Conférences HDR	Université de Reims Champagne-Ardenne
Stéphane Guillaume	Maître de Conférences	Université du Maine
Jean-Hugues Renault	Maître de Conférences HDR	Université de Reims Champagne-Ardenne
Fanny Monneaux	Chargée de Recherche	Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Strasbourg (UPR 9021)
Laurent Martiny	Professeur	Université de Reims Champagne-Ardenne

Grâce à ce réseau de collaborations, ma thèse couvre de nombreux domaines interdisciplinaires. Ces trois années ont été une réelle chance pour moi de pouvoir m'impliquer dans la modélisation moléculaire, d'utiliser une méthode de purification originale et de concrétiser les travaux effectués en synthèse organique par des tests immunologiques.

III) Course aux analogues C-glycosidiques du KRN 7000

1) Détermination des affinités essentielles avec l'environnement cellulaire et des motifs structuraux à envisager pour induire une activité biologique optimale

L'objectif de ces recherches est de cibler la structure à synthétiser pour induire une activité optimale et sélective pour une réponse immunitaire donnée. Nous devons donc comprendre le comportement de l' α -GalCer KRN 7000 au sein du milieu biologique qui l'accueille, et pour cela s'intéresser d'une part aux affinités physico-chimiques avec les cellules qui le transportent (protéine CD1d pour ce glycoside), et d'autre part au mécanisme d'action du glycoside en relation avec les cellules du système immunitaire (cellules TNK, Cf. Chapitre C). Ci-joint, en Annexe B, la liste des acides aminés rencontrés dans l'étude suivante.

a- Interactions physico-chimiques entre le KRN 7000 et le CD1d

Le CD1d est une protéine constituée d'une partie C-terminale possédant essentiellement des feuillettes, et d'une partie N-terminale, structurellement plus complexe, caractérisée par deux hélices α formant une mâchoire et surmontant un plancher de six feuillettes β plissés (Cf. Vue 1, p.97). Cette structure est homologue aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II, à l'exception des deux poches hydrophobes notées A' et C' constituant une cavité dans la partie N-terminale.^{118a} La poche A' est une large cavité semi-circulaire incurvée ; la poche C', plus courte est orientée d'abord verticalement puis s'étire en direction de l'extrémité C-terminale de l'hélice α -1 (Schéma 87).

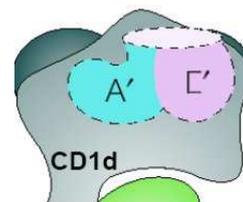


Schéma 87 : Structure du CD1d

A partir des données apportées par la cristallisation,¹¹⁸ le complexe CD1d humain/ α -GalCer révèle une structure organisée en:

- 2 hélices α -1 et α -2 formant une mâchoire et maintenant la tête polaire du ligand à l'extérieur de la protéine
- 2 poches hydrophobes accueillant les chaînes lipidiques de l' α -GalCer

Les premiers travaux ont donc porté sur la détermination des interactions physicochimiques entre l' α -GalCer et le CD1d à trois niveaux : (a) interaction tête polaire/CD1d (liaisons par pont

¹¹⁸ (a) Koch M., Stronge V. S., Shepherd D., Gadola S. D., Mathew B., Ritter G., Fersht A.R., Besra G. S., Schmidt R. R., Jones E. Y., Cerundolo V. *Nat. Immunol.* **2005**, 6, 8, 819; (b) Zazonc D. M., Cantu (III) C., Mattner J., Zhou D., Savage P. B., Bendelac A., Wilson I. A., Teyton L. *Nat. Immunol.* **2005**, 6, 8, 810

hydrogène); (b) interaction chaînes/mâchoire (liaisons par pont hydrogène); (c) interaction chaînes/poches (interactions de Van der Waals et aromatiques).

Dans le cadre de futures synthèses d'analogues, nous avons ensuite cherché à identifier la position « idéale » d'une double liaison dans les chaînes grasses en vue de stabiliser le ligand dans la protéine.

Eric Hénon, chimiste théoricien, s'est penché sur ce sujet en utilisant les logiciels :

- AMBER (mécanique et dynamique moléculaire)¹¹⁹
- VMD (Visual Molecular Dynamics) (Beckman Institute, Urbana, IL., USA)¹²⁰
- GAUSSIAN (chimie quantique)¹²¹
- MOLDEN (éditeur moléculaire et visualisation de résultats Gaussian)¹²²
- BABEL (logiciel de chimie permettant, entre autres, l'ajout d'hydrogènes)¹²³

Avant l'examen des liaisons par pont hydrogène et les simulations par dynamique moléculaire, une opération est nécessaire pour indiquer la position des hydrogènes du ligand. En effet, les atomes d'hydrogène étant « absents » de la structure cristallographique récupérée, il faut les ajouter *a posteriori* (BABEL). Le choix du positionnement des hydrogènes est basé sur l'état d'hybridation des atomes qui les portent. Cela implique une part d'arbitraire uniquement pour les hydrogènes des fonctions alcools (rotation possible autour des liaisons C-O). Cependant le choix effectué est sans conséquence pour les simulations en dynamique moléculaire (comprenant toujours une phase de minimisation d'énergie puis d'équilibrage). En ce qui concerne l'identification des liaisons par pont hydrogène entre un H du ligand et un hétéroatome de la protéine, nous nous sommes aussi appuyés sur la distance entre les deux atomes lourds formant l'extrémité du pont.

¹¹⁹ Case D. A., Darden T. A., Cheatham (III) T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Merz K. M., Pearlman D. A., Crowley M., Walker R. C., Zhang W., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Wong K. F., Paesani F., Wu X., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Mathews D. H., Schafmeister C., Ross W. S., Kollman P. A.

¹²⁰ <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

¹²¹ Gaussian 03, Revision C.02, Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery (Jr.) J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A. *Gaussian, Inc.*, Wallingford CT, **2004**

¹²² G.Schaftenaar and J.H. Noordik, "Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures", *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **14** (2000) 123

¹²³ <http://openbabel.sourceforge.net/wiki/>

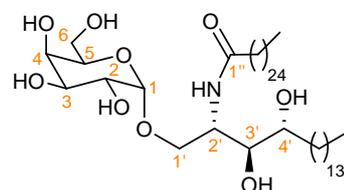
Les modes de représentation visuelle choisis sont les suivants (Vue 1) :

- le CD1d est représenté en mode ruban de couleur mauve,
- les atomes de l' α -GalCer sont définis par les couleurs : rouge (oxygène), bleu foncé (azote), gris (hydrogène), bleu clair (carbone et liaison),
- les résidus des acides aminés interagissant avec l' α -GalCer seront mis en évidence grâce à une couleur orange,
- les liaisons par pont hydrogène apparaîtront en noir,
- les résidus aromatiques hydrophobes au voisinage du ligand sont représentés en mode CPK bleu foncé.

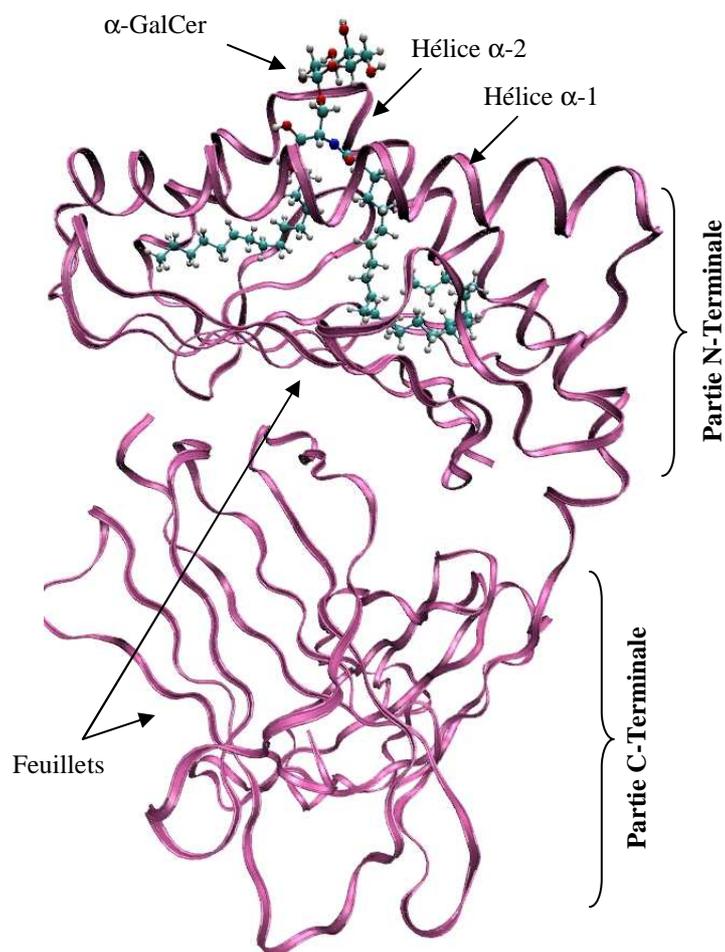
A noter que :

- des molécules d'eau (non représentées) modélisent le milieu environnant la protéine pour nos recherches en dynamique moléculaire,

- la numérotation des carbones de l' α -GalCer est rappelée ci-contre :



Vue 1 : α -GalCer associé au CD1d



Interaction tête/CD1d (Liaison par pont hydrogène)

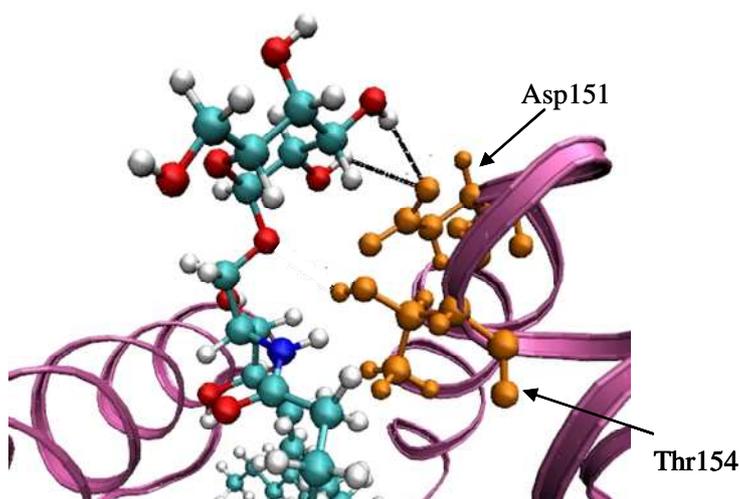
Dans un premier temps, notre intérêt s'est porté sur les interactions entre les acides aminés et les fonctions alcools du sucre. L'examen de la structure cristallographique révèle deux interactions significatives entre la tête polaire et un acide aminé de l'hélice α -2 (Vue 2) :

- l'hydrogène de l'hydroxyle en position C2 du sucre est associé à un oxygène de l'Asp151 (longueur de la liaison = 2,49 Å)
- l'hydrogène de l'hydroxyle en position C3 du sucre est associé au même oxygène de l'Asp151 (longueur de la liaison = 2,21 Å)

Les simulations par dynamique moléculaire, effectuées sur le calculateur ROMEO,¹²⁴ montrent que ces interactions demeurent (longueur moyenne inférieure à 2 Å) et contribuent à conserver l'orientation du sucre par rapport aux deux hélices α . Cet aspect est probablement un critère important dans la reconnaissance cellulaire.

D'après la distance (2,42 Å, structure cristallographique) entre l'oxygène anomérique et l'hydrogène de la Thr154 portée par l'hélice α -2, on pourrait penser qu'il existe une liaison hydrogène entre ces deux atomes. Cependant l'angle de liaison n'est pas favorable (angle de 105° éloigné de la valeur 180° idéale) et des simulations de dynamique moléculaire ne signalent pas de rapprochement entre les atomes pour former concrètement une liaison par pont hydrogène (distance moyenne de 3,8 Å). Ce résultat est favorable à l'insertion d'analogues C-Galactosidiques dans le CD1d, sans risquer de perdre une liaison hydrogène nécessaire.

Vue 2 : Interaction entre le CD1d et la tête polaire de l' α -GalCer

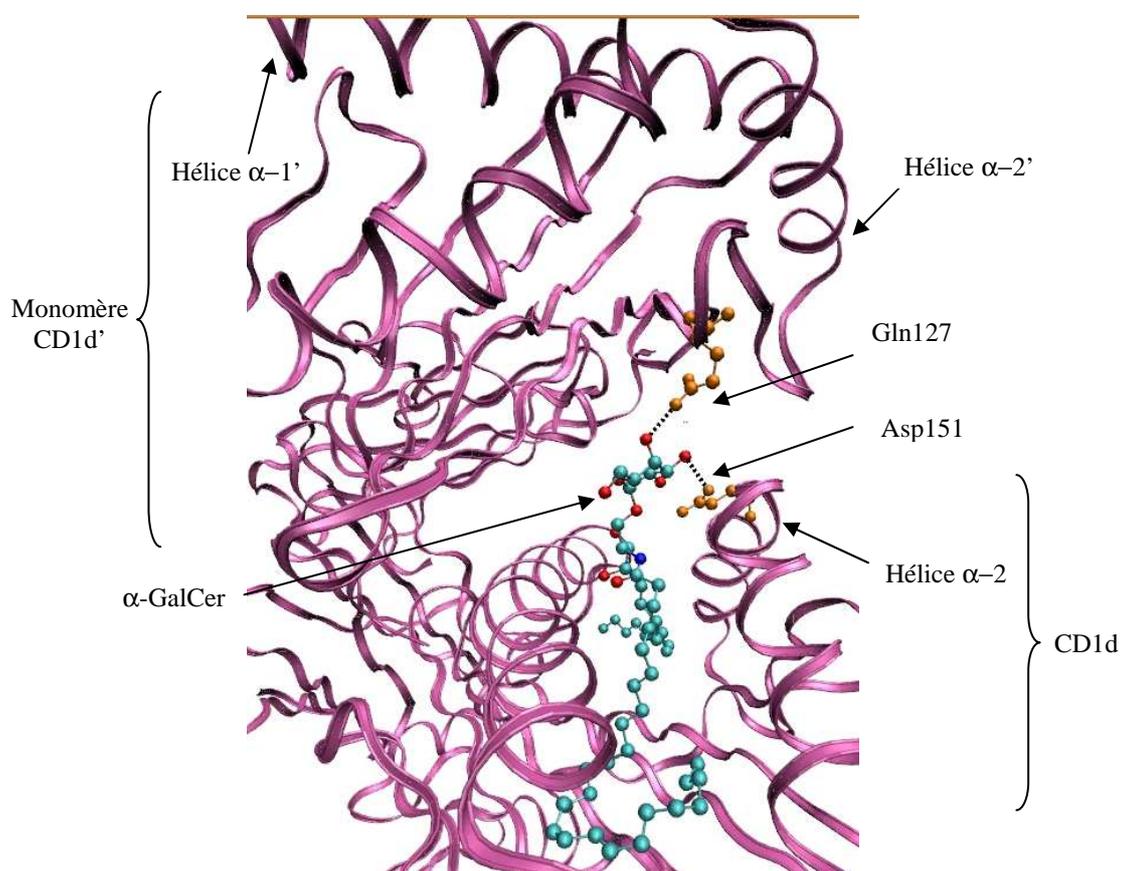


Ces résultats sont conformes aux travaux de Koch et coll.^{118a} et nous montrent que la tête polaire de l' α -GalCer est uniquement maintenue par l'hélice α -2.

¹²⁴ <http://www.romeo2.fr>

Par ailleurs, l' α -GalCer est, en fait, cristallisé avec deux molécules de CD1d. Dans le dimère, seul un monomère contient le ligand dans son site actif. Le deuxième monomère (vide en son site actif) vient se placer en vis-à-vis de la tête polaire de l' α -GalCer. Si nous nous intéressons aux interactions de la tête polaire avec ce monomère vide, on observe, dans la structure cristallographique (ligand sans hydrogènes), que le résidu Gln127 porté par l'hélice α -2' (Vue 3) est très proche de la tête du ligand. En effet, des distances respectivement de 2,61 Å et de 3,18 Å seulement séparent l'azote (Gln127) des oxygènes des hydroxyles du sucre en position C4 et C3. Cela implique l'existence très probable d'une ou plusieurs liaisons hydrogène entre les hydroxyles C3 et C4 et le groupe amino de la glutamine. Dans l'hypothèse où le monomère vide mime la présence d'un récepteur, ces résultats suggèrent un rôle actif des deux hydroxyles dans l'acte de reconnaissance cellulaire.

Vue 3 : Interaction entre le CD1d' (monomère) et la tête polaire de l' α -GalCer

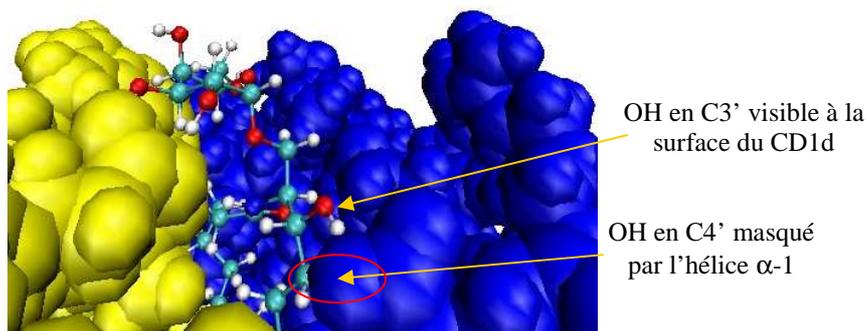


Interaction chaînes latérales/mâchoire du CD1d (Liaison par pont hydrogène)

Contrairement à la chaîne acyle, la seconde chaîne lipidique présente deux fonctions alcool, en position 3' et 4', remarquables par:

- leur topologie vis-à-vis de l'hélice α -1. En effet, on observe que l'hydroxyle en position 3' est orienté vers le haut de l'hélice α -1 alors que l'alcool porté par le carbone 4' est incliné vers le bas de cette même hélice (Vue 4) et semble moins accessible à la surface du CD1d.

Vue 4 : Topologie des hydroxyles de la chaîne phytosphingosine vis-à-vis de l'hélice α -1

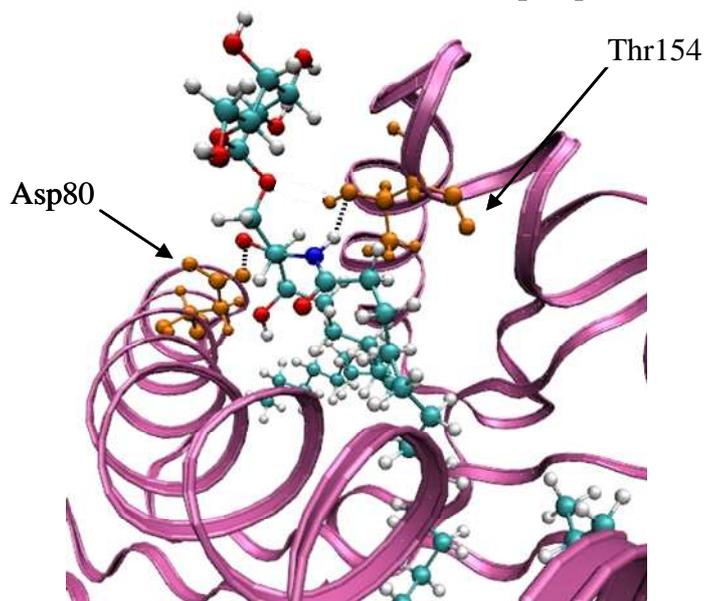


- leur possibilité de former des liaisons par pont hydrogène avec la mâchoire du CD1d. Une liaison hydrogène est observée entre l'Asp80 de l'hélice α -1 et l'hydrogène de l'hydroxyle en position 3' de la chaîne sphingosine (longueur de la liaison = 1,83 Å). Aucun acide aminé ne s'associe à l'hydrogène du second hydroxyle sphingolipidique (position 4') (Vue 5). Cependant en dynamique moléculaire, cet alcool (position 4') se rapproche de l'Asp80 et forme, lui aussi, une liaison par pont hydrogène stable dans le temps (longueur de la liaison ~ 2 Å).

La topologie entre les alcools C3' et C4' pourrait alors expliquer les résultats des tests biologiques n'ayant révélé aucune baisse de l'activité biologique⁸⁴ en l'absence de l'alcool en C4'. Ainsi la présence de cet alcool stabiliserait uniquement le ligand dans le CD1d et ne jouerait aucun rôle dans la reconnaissance extracellulaire.

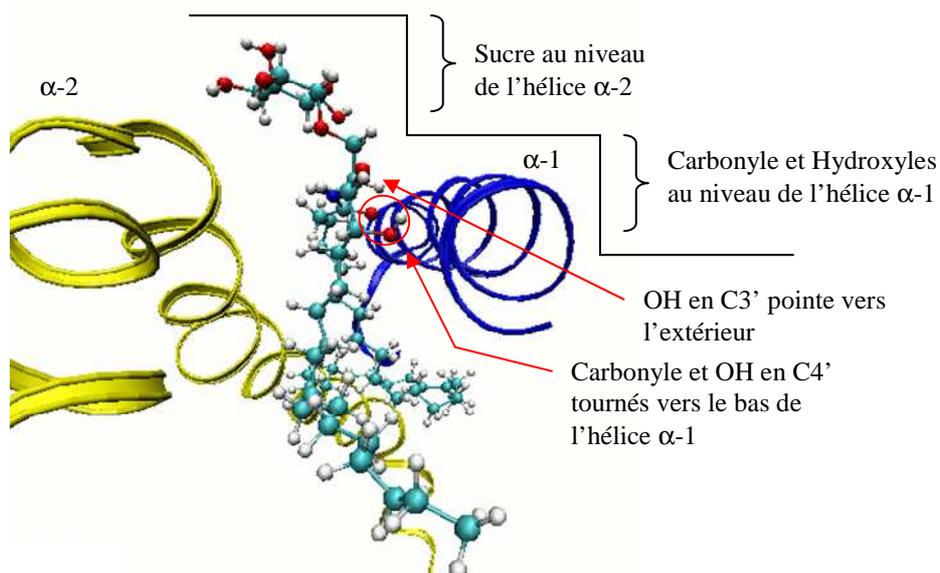
Concernant la chaîne acyle, la fonction hydroxyle de la Thr154 (hélice α -2) est liée à l'hydrogène « donneur » porté par l'azote de l'amide (longueur de la liaison = 1,74 Å) (Vue 5).

Vue 5 : Interaction entre le CD1d et les chaînes lipidiques de l' α -GalCer



Ces deux premières études nous montrent que les liaisons hydrogènes jouent le rôle d'« élastiques » en maintenant le ligand lipidique au sein du sillon défini par les deux hélices α et induisent une certaine orientation de la tête polaire. Ainsi, le complexe est caractérisé par deux niveaux définis par : les fonctions polaires des chaînes lipidiques (carbonyle de l'amide et hydroxyles) au niveau de l'hélice α -1 et le sucre au niveau de l'hélice α -2 (« Profil en escalier ») (Vue 6).

Vue 6 : « Profil en escalier » du complexe α -GalCer/CD1d



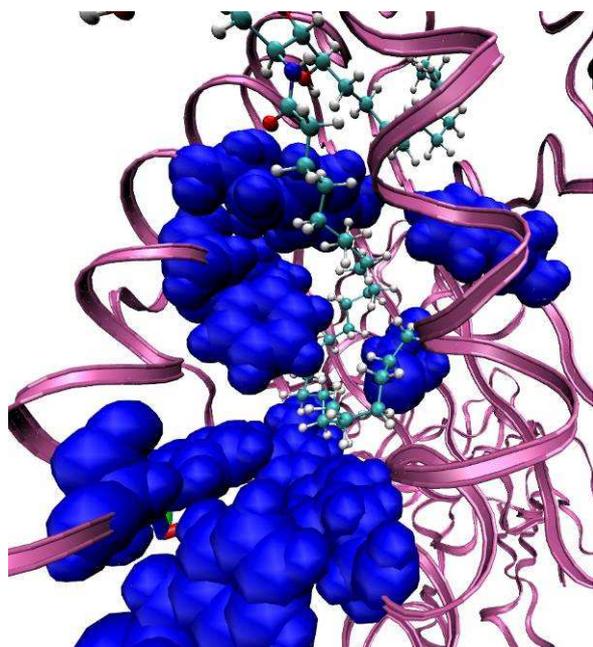
Interaction chaînes latérales/poches du CD1d (Interaction de Van der Waals)

Après avoir repéré toutes les liaisons hydrogène possibles, nous avons concentré notre attention sur l'affinité hydrophobe des chaînes latérales grasses pour les deux poches A' et C' du CD1d qui les piègent. L'équipe de Koch^{118a} a repéré trois acides aminés clés portant des entités aromatiques (Trp40, Phe70) et soufrée (Cys12) qui semblent être à l'origine de la boucle de la chaîne acyle dans sa poche A'. Si nous poussons l'idée plus loin, alors il est constaté que ces deux poches A' et C' sont en réalité tapissées d'acides aminés aromatiques formant un gant guidant les chaînes lipidiques à l'intérieur des poches.

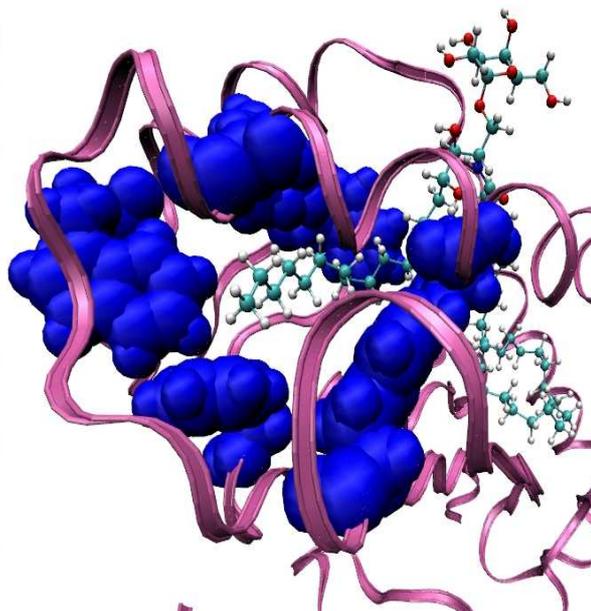
Dans la poche A', la chaîne acyle est entourée par les acides aminés His38, Phe58, Tyr73, Phe114, Phe169, Trp63 et ses virages sont imposés par les trois résidus aminés clés et le Trp63 (Vue 7).

Dans la poche C', la chaîne sphingosine est maintenue par six acides aminés aromatiques Phe18, Phe77, Phe84, Trp140, Trp131 et la Phe118 stoppant l'extrémité de la chaîne (Vue 8).

Vue 7 : Poche hydrophobe A' maintenant la chaîne acyle



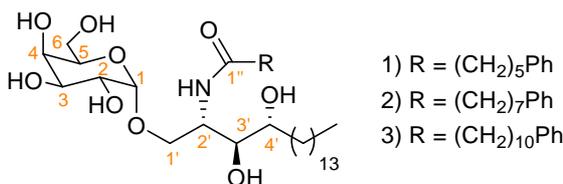
Vue 8 : Poche hydrophobe C' maintenant la chaîne sphingolipidique



Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus expérimentalement par l'équipe de Wong,¹⁰¹ qui a testé l'activité de trois analogues de l' α -GalCer, différenciés seulement par la longueur de la chaîne acyle possédant un groupe phényl terminal (Schémas 73 et 88). Les tests biologiques effectués sur ces composés ont démontré la faculté de ces produits à augmenter la production d'IFN- γ (Cf. Chapitre B-I-3). Ainsi ces interactions fortes seraient un atout pour sécréter préférentiellement ce genre de cytokines et induire une réponse immunitaire spécifique. La position du groupe phényl terminal de ces trois composés, coïncidant avec celle de deux résidus Tyr73 et Phe70, nous permet de penser que des interactions de nature aromatique (π -stacking) peuvent contribuer à stabiliser la chaîne acyle dans sa poche et, par là même, modifier l'efficacité du ligand.

Ces résultats nous montrent que l'insertion rationnelle de groupements hydrophobes sur les chaînes latérales devrait être bénéfique. Toutefois, la modification structurale ne doit pas entraîner un encombrement trop important car la capacité d'accueil de ces poches est apparemment limitée à 26 carbones pour la poche A' et à 18 pour la poche C'.¹¹⁸

Schéma 88 : Analogues aromatiques testés



🔗 Perspectives : analogues insaturés

Dans la même optique, nous avons imaginé d'insérer des liaisons insaturées ou des cyclopropanes (imitant ainsi les acides mycoliques¹²⁵). L'équipe de Porcelli¹⁰⁰ a noté une augmentation de la stimulation des cellules TNK pour deux analogues possédant des doubles liaisons Z sur les carbones 9''-10'' et 12''-13'' pour l'un, et sur les carbones 11''-12'' et 14''-15'' pour l'autre. Ces dérivés favorisent alors la production d'IL-4 (Cf. Chapitre B-I-3). A nouveau, ces insaturations se situent à proximité des deux résidus aromatiques cités précédemment (Tyr73 et Phe70), révélant leur importance dans la construction d'analogues potentiels. Ces tests confortent notre idée de déterminer les positions idéales pour insérer des insaturations.

Toutefois, Porcelli, dans son expérience, n'a pas cherché à conserver l'orientation naturelle de la chaîne acyle dans sa poche. En insérant des doubles liaisons Z (angles dièdres de 0°), l'auteur a bouleversé les angles dièdres originaux et par conséquent la disposition du restant de la chaîne acyle dans la poche. En effet, les angles dièdres naturels autour des liaisons insérées ne sont pas proches de 0° mais sont de 177° pour C8''-C9''-C10''-C11'' et 167° pour C11''-C12''-C13''-C14'' (premier analogue), et de 81° pour C10''-C11''-C12''-C13'' et 133° pour C13''-C14''-C15''-C16'' (second analogue). Par conséquent, on ne peut dire si la production d'IL-4 est favorisée par la présence de doubles liaisons ou par une désorganisation du ligand dans le CD1d impliquant une déstabilisation du complexe ligand/CD1d.

Il est à noter que les analogues de Wong se distinguent de ceux de Porcelli, dans la mesure, où le groupe phényle termine la chaîne acyle. Ainsi l'orientation du ligand dans sa poche est très peu modifiée.

Contrairement à Porcelli, notre idée est d'insérer des insaturations en modifiant le moins possible l'orientation des chaînes lipidiques dans leurs poches par rapport à la molécule naturelle. Pour cela, il faut rechercher dans la structure cristallisée les angles dièdres susceptibles de correspondre aux angles dièdres formés par des doubles liaisons (proches de 0° (alcène Z) ou de 180° (alcène E)).

Nous avons trouvé quatre possibilités qui correspondraient à des alcènes de type E : une sur la chaîne sphingosine et trois sur la chaîne acyle (Tableau 14).

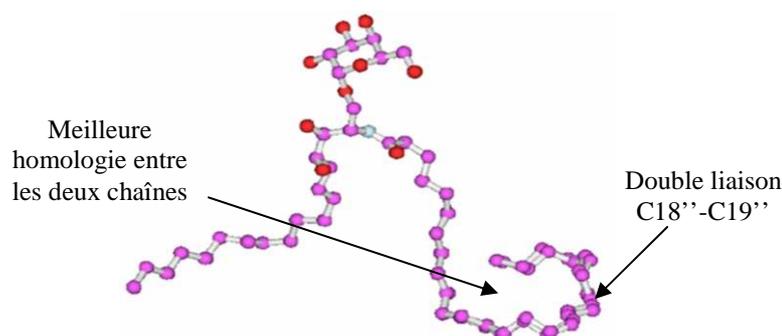
¹²⁵ (a) Al-Dulayymi J. R., Baird M. S., Mohammed H., Roberts E., Clegg W. *Tetrahedron* **2006**, 62, 20, 4851; (b) Al-Dulayymi J. R., Baird M. S., Roberts E., Deyselb M., Verschoor J. *Tetrahedron* **2007**, 63, 12, 2571; (c) Al-Dulayymi J. R., Baird M. S., Roberts E. *Chem. Commun.* **2003**, 228

Tableau 14 : Mesure des angles dièdres et des angles de valence pour déterminer la position de futures doubles liaisons

Position de la double liaison	Chaîne Sphingosine	Chaîne acyle		
	C8'-C9'	C9''-C10''	C12''-C13''	C18''-C19''
Angle dièdre naturel	168° (C7'-C8'-C9'-C10')	176° (C8''-C9''-C10''-C11'')	167° (C11''-C12''-C13''-C14'')	173° (C17''-C18''-C19''-C20'')
Modèle	M1	M2	M3	M4

Grâce au logiciel MOLDEN, quatre molécules ont été modélisées en imposant la valeur des angles sélectionnés à 180° pour les angles dièdres et 120° pour les angles de valence. La superposition de ces modèles à l'original, l' α -GalCer (M0 pris comme référence), montre que le modèle M4 correspond le mieux à la structure 3D du glycolipide (Schéma 89).

Schéma 89 : Superposition de M0 et M4



Les nouvelles données bibliographiques sur la cristallisation du CD1d humain avec son ligand nous apportent de nombreux éléments sur la structure géométrique de ce complexe. Le KRN 7000 possède des affinités remarquables avec le CD1d. Sa tête polaire est uniquement maintenue par l'hélice α -2, des liaisons hydrogène retiennent le « tronc » du glycolipide dans le sillon des deux hélices et deux poches hydrophobes accueillent les chaînes grasses. Les modifications structurales, les plus intéressantes, doivent être effectuées sur les chaînes latérales. Les motifs aromatiques et les doubles liaisons ont déjà prouvé leurs potentiels biologiques. Toutefois, il faut encore optimiser leur position idéale dans les poches hydrophobes et étudier le comportement d'autres motifs tels que les cyclopropanes grâce à la modélisation moléculaire.

b- Comportement dynamique du glycolipide avec le CD1d

Connaître les interactions du ligand dans son hôte constitue une première étape, mais il faut également s'intéresser au mécanisme d'insertion du glycolipide dans le CD1d. Les techniques de dynamique moléculaire et d'analyses des mouvements de grandes amplitudes doivent nous permettre de comprendre le comportement entre les deux protagonistes :

- la géométrie du CD1d permettant l'accueil de son ligand
- l'orientation du glycolipide pour une insertion correcte (repliement des chaînes grasses ...)

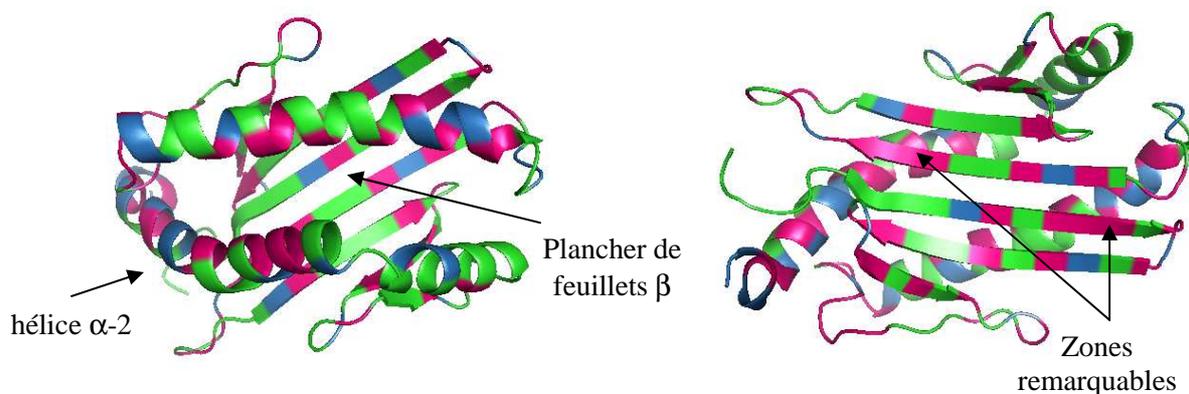
L'étude structurale du CD1d a été réalisée grâce aux logiciels de visualisation PyMol¹²⁶ et VMD.¹²⁰ Les simulations numériques proviennent d'AMBER¹¹⁹ et les mouvements de grandes amplitudes ont été réalisés en utilisant le serveur El Nemo (Elastic Network Modeling). Ces travaux ont été réalisés par Manuel Dauchez.

↳ A l'époque où les recherches ont débuté, la structure cristallographique du CD1d humain complexant son ligand n'était pas connue. Afin de modéliser le CD1d, nos premiers travaux ont été axés sur la comparaison des données cristallographiques du CD1d bovin et du CD1b humain.

Les structures tridimensionnelles de ces protéines sont très homologues. Elles sont constituées chacune d'une partie C-terminale possédant essentiellement des feuillets, et d'une partie N-terminale, structurellement plus complexe, caractérisée par deux hélices α formant une mâchoire et plusieurs brins β parallèles associés en un feuillet formant un plancher (Cf. Vue 1, p.97).

Les parties C-terminales sont complètement homologues (acides aminés, orientation des feuillets...), cette partie de la protéine sera volontairement omise dans les prochaines vues. Les parties N-terminales présentent, quant à elles, plusieurs différences (Vues 9 et 10).

Vue 9 : Mâchoires de la partie N-terminale Vue 10 : Plancher de la partie N-terminale



¹²⁶ Delano Scientific LLC 2006

En vert sont représentés les acides aminés communs à la fois au CD1d bovin et au CD1b humain, en bleu les acides aminés de structure comparable et en rouge les acides aminés non retrouvés dans le CD1b humain.

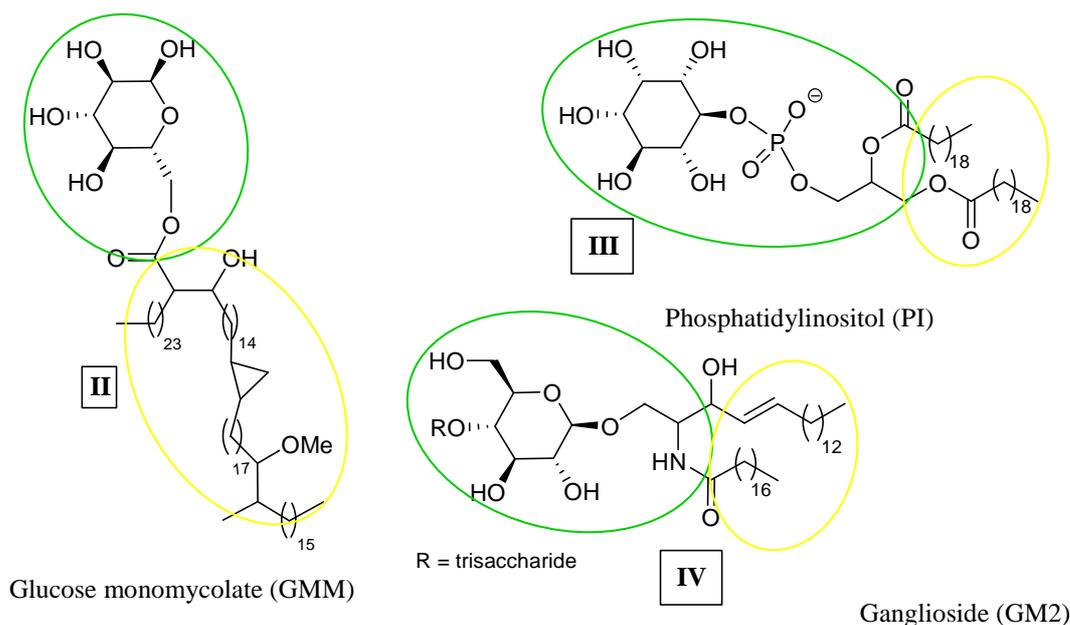
Les hélices α ne possèdent que quelques petites zones très différentes du CD1b. Par contre, deux grandes zones, non communes au CD1b, sont remarquables sur le plancher (Vues 9 et 10).

Sachant que chaque protéine CD1 a une relation privilégiée avec son ligand et que l' α -GalCer n'est reconnu que par le CD1d, nous pouvons penser que la stabilité du complexe CD1d/Ligand résulte, probablement, des interactions au niveau des zones remarquables de l'hélice α 2 et du plancher, soit là où un grand nombre d'acides aminés sont différents de ceux du CD1b.

Lorsque les données cristallographiques du CD1d humain ont été connues, les acides aminés essentiels à la stabilité du complexe CD1d/glycolipide ont pu être identifiés (Cf. Chapitre B-III-1a). Il apparaît qu'au sein de la mâchoire, les résidus homologues sont impliqués dans l'interaction. Le même constat est effectué sur le plancher β .

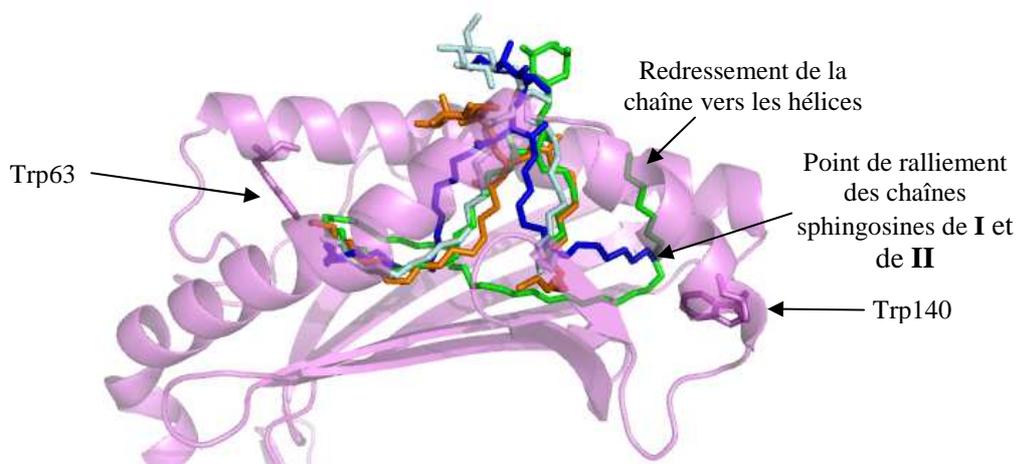
Dans un second temps, nous avons comparé le comportement de trois ligands antigéniques connus et présentés par les CD1 (b et d) à celui de l' α -GalCer impliqué dans le CD1d humain. Ces quatre ligands possèdent un squelette comparable avec chacun une tête polaire (zone verte) liée à de longues chaînes grasses (zone jaune) (Schéma 90).

Schéma 90 : Structures des ligands antigéniques étudiés



La visualisation, obtenue grâce au logiciel PyMol, nous renseigne sur l'orientation privilégiée des têtes polaires et sur l'enroulement des chaînes grasses au sein des poches hydrophobes (Vue 11). Le glucose monomycolate **II** est représenté en vert, le phosphatidylinositol **III** est en orange et le ganglioside (GM2) **IV** (tronqué exceptionnellement de sa partie trisaccharidique) est en gris (l' α -GalCer **I** reste en bleu). Les ligands **II** et **IV** sont reconnus, dans le milieu biologique, par les CD1b et **III** est associé soit au CD1b soit au CD1d selon la structure de sa tête polaire (trisaccharide contenant un D-Mannose dans le cas du CD1b).¹²⁷

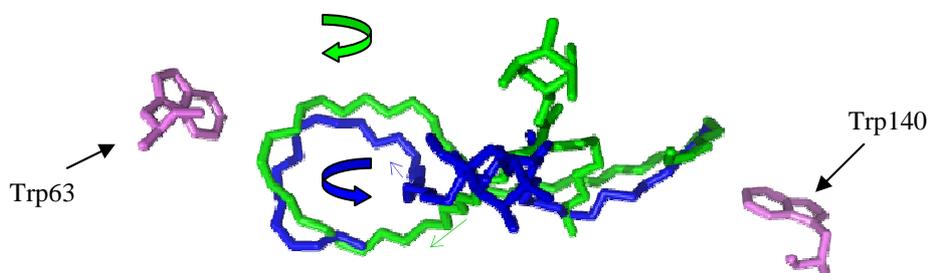
Vue 11 : Comportement des quatre ligands antigéniques dans le CD1d



Au niveau des poches hydrophobes, on observe un comportement particulier des chaînes lipidiques de l' α -GalCer par rapport à celles du glucose monomycolate **II** :

- la chaîne acyle de l' α -GalCer s'enroule dans le sens inverse par rapport à la chaîne du ligand **II** (Vue 12) mais le virage de chacune des deux chaînes est toujours imposé par le Trp63 (Vues 11 et 12).
- la partie sphingolipidique de l' α -GalCer ne suit pas la boucle formée par la deuxième chaîne lipidique du ligand **II**. Elle traverse la zone hydrophobe pour rejoindre cette chaîne à proximité du Trp140 (Vues 11 et 12).

Vue 12 : Comparaison des orientations des chaînes lipidiques entre **I et **II****



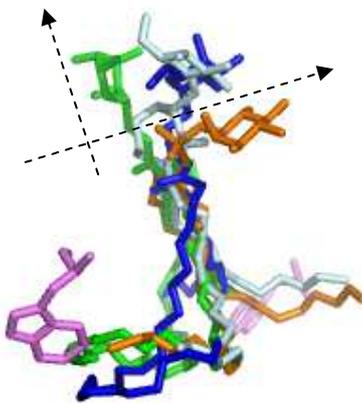
¹²⁷ Furneaux R. H., Landersjö C. L., McCullough J. L., Severn W. B. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1618

Sur les quatre ligands, le glucose monomycolate **II** est, en fait, le seul à enrayer l'une de ses chaînes dans le sens des aiguilles d'une montre. De plus, sa chaîne la plus longue quitte, faute de place, la poche hydrophobe pour s'orienter vers les hélices (Cf. Vue 11).

Hormis la position de la chaîne acyle, le comportement de l' α -GalCer n'est pas analogue à ceux du ganglioside **IV** et du phosphatidylinositol **III**. Pourtant ce dernier est reconnu par les CD1d. Chaque ligand possède donc une spécificité propre pour être reconnu et accepté par son hôte.

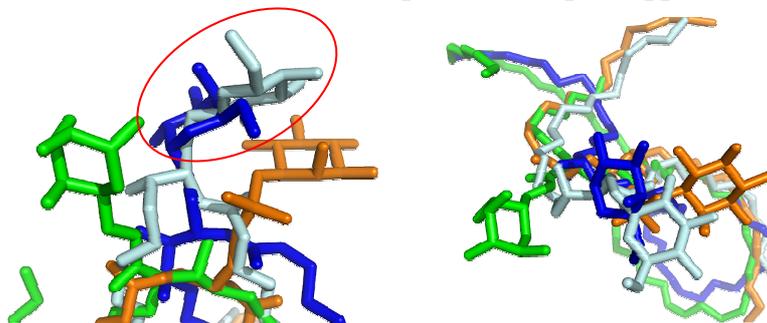
Au niveau des têtes polaires, on constate que le phosphatidylinositol **III** est plus ancré dans le sillon que les trois autres ligands (Vues 11 et 13). Ceci est probablement dû aux interactions du groupement phosphate avec les acides aminés de l'hélice α -2. Par contre, le glucose monomycolate **II** est orienté perpendiculairement au sillon. La conformation plane de l'ester et les liaisons hydrogène engagées avec la protéine doivent imposer cette orientation.

Vue 13 : Inclinaison des têtes polaires des quatre ligands



Le ganglioside **IV** est le seul ligand dont l'orientation de la tête polaire est similaire à celle de l' α -GalCer (Vue 14).

Vue 14 : Orientation des têtes polaires de I par rapport à IV



Cette comparaison nous apporte des renseignements supplémentaires sur l'ancrage des chaînes lipidiques et sur le basculement de la tête polaire dans le sillon des hélices.

- *Les chaînes grasses se logent toutes dans les zones hydrophobes mais leur direction et leur enroulement différent selon le ligand et notamment selon la longueur des chaînes.*
- *L'orientation des têtes polaires varie selon l'affinité polaire du ligand avec la protéine. Par exemple, le groupement phosphate attire fortement la tête polaire vers l'intérieur du sillon, ce qui doit la rendre moins accessible vis-à-vis d'un récepteur.*

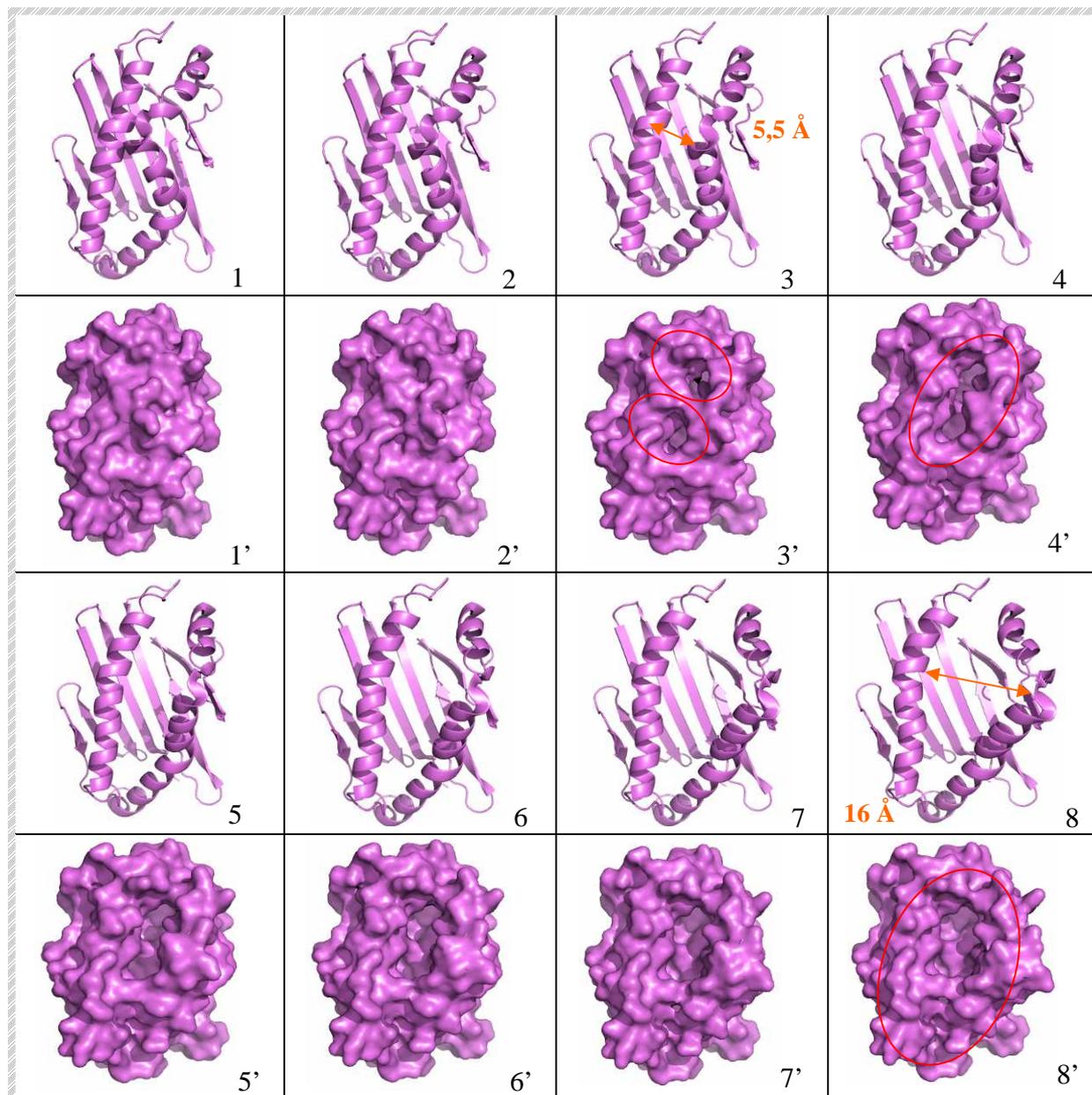
Cette simulation nous montre également que la protéine et les ligands n'ont pas de conformations rigides comme une clé doit être parfaitement adaptée à sa serrure. Le ligand sait imposer ses longues chaînes dans la protéine et celle-ci oriente les têtes polaires en tissant un réseau de liaisons hydrogène avec les groupements polaires présents. Ce dernier point est important pour la présentation du ligand à un récepteur de cellules impliquées dans des phénomènes immunitaires.

↪ Les CD1 et les ligands antigéniques ont chacun leurs exigences physico-chimiques qui justifient l'intérêt de la présence d'une protéine pour un ligand et vice-versa. Mais au-delà de cet intérêt, le CD1 et le ligand doivent sûrement faire des concessions sur leur conformation pour pouvoir interagir de façon optimale. Ainsi les chaînes lipidiques s'orientent-elles correctement avant d'entrer dans la protéine ou celle-ci « grignote-t-elle » le ligand qui s'installe au fur et à mesure de sa capture ?

Ce mécanisme étant, à l'heure actuelle, très peu connu, nous nous sommes intéressés au mouvement du CD1d en l'absence de ligand.

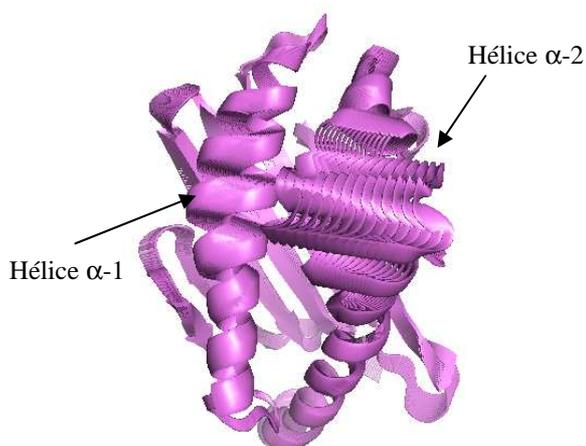
Nous avons observé, grâce au serveur El Nemo, une ouverture de la protéine (sans la présence du ligand) laissant apparaître une cavité qui se referme par la suite. Le mouvement s'articule autour des hélices α comparables à une grosse mâchoire (Vue 15).

Vue 15 : Etude de l'ouverture-fermeture du CD1d (en mode ruban et en mode surface)



Vue 16 : Mouvement global des hélices

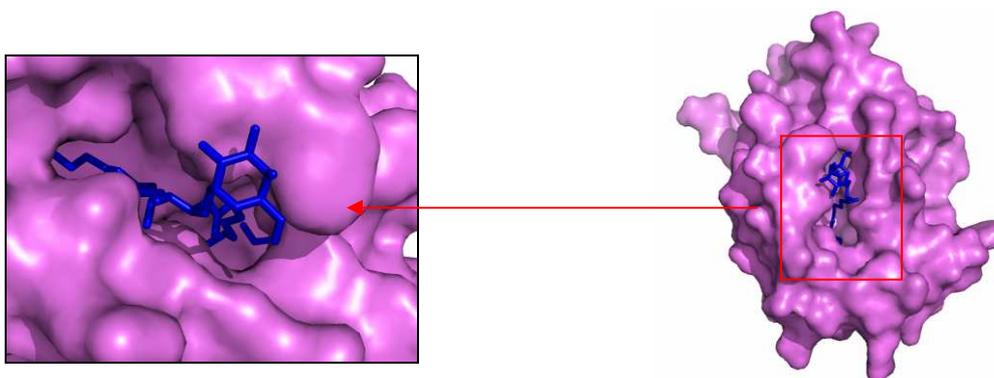
Le mode ruban nous permet de voir le mouvement des hélices. En réalité, l'hélice α -1 bouge très peu, c'est l'hélice α -2 qui possède la plus grande amplitude de mouvement, de 5,5 Å (image 3) à 16 Å (image 8), et qui effectue le mouvement de mâchoire (Vue 16).



La cavité est observée grâce au mode surface. Les deux poches hydrophobes sont visibles dès l'image 3'. Puis les mâchoires s'écartent pour dévoiler une grande cavité (image 8') de 16 à 20 Å de profondeur.

Les images 4 et 4' correspondent à l'état de la protéine observé en cristallographie lorsqu'elle contient le ligand (vue 17).

Vue 17 : Image 4' avec le ligand dans la cavité



L'étude du mouvement du CD1d est très intéressante. Elle nous montre la capacité de la protéine à se mouvoir pour présenter sa cavité. L'amplitude de mouvement de l'hélice α -2 est impressionnante.

On peut alors imaginer que l'orientation des chaînes grasses doit probablement s'effectuer simultanément à l'insertion du ligand lorsque le CD1d est dans son état le plus ouvert (images 8 et 8'). Puis l'hélice α -2 se « clipse » par liaisons hydrogènes entre les chaînes lipidiques, reposant sur le plancher hydrophobe, et la tête polaire du glycolipide qui est ainsi exposée au récepteur des cellules impliquées dans des phénomènes immunitaires.

Nous pouvons également supposer que si le ligand possède au préalable une conformation proche de celle qu'il adopte dans le CD1d, alors le complexe Ligand/CD1d est prêt à interagir rapidement avec les cellules impliquées dans des phénomènes immunitaires.

Les premières recherches et simulations effectuées par Manuel Dauchez et Eric Hénon constituent une avancée dans la compréhension du mécanisme d'insertion du ligand dans la protéine. Ces résultats soutiennent considérablement le projet global visant à accéder à divers analogues possédant des insaturations ou des motifs rigides tels qu'un cyclopropane, et de synthétiser de façon rationnelle de nouveaux analogues C-Galactosidiques.

A partir de toutes nos observations sur ce projet, un nouveau type d'analogue nous est alors paru évident à synthétiser et nous avons déposé un dossier de valorisation. Dans les prochains chapitres de ce manuscrit de thèse, certains paragraphes ont été supprimés pour respecter la confidentialité du dossier. Quelques généralités ont été conservées pour informer le lecteur sur l'ensemble de nos démarches synthétiques, de purification et de tests biologiques.

2) Schéma rétrosynthétique à l'aide du programme QUIRAL

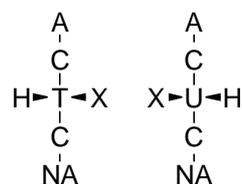
Le Pr. Arnaud Haudrechy et le Dr. Jean-Marc Nuzillard ont développé un programme informatique, QUIRAL, analysant les structures 3D des molécules organiques cibles pour identifier le(s) sucre(s) pouvant être utilisé(s) comme précurseur(s) initial(ux) dans diverses synthèses.^{128, 129} Ce programme propose également des procédés pour préparer des sucres rares et/ou chers dont les centres chiraux coïncident avec ceux de la molécule cible.

a- Description du logiciel (Cf. Annexe C)¹²⁸

Voici quelques définitions utiles pour se familiariser avec le programme :

- C[#] désigne un carbone lié à deux atomes de carbone, un atome d'hydrogène et un atome X, où X peut être un atome d'oxygène, d'azote, de soufre ou un halogène
- Q-sugar est un aldose contenant de p = 3 à 6 atomes de carbone et n = p-2 atomes C[#] adjacents
- A (Anomeric) représente le carbone aldéhydique et NA (Non Anomeric) indique l'alcool primaire
- T et U qualifient la configuration des atomes de carbone C[#] : T correspond au centre chiral R et U au centre chiral S (Schéma 91). Les configurations des carbones chiraux de Q-sugar seront données par une succession de T et de U à compter du C[#] lié au carbone aldéhydique (exemple : pour le D-Glucose, on écrira « TUTT »)

Schéma 91 : Définition des configurations T et U des atomes C[#] (représentation selon Fischer)



¹²⁸ Nuzillard J.-M., Haudrechy A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2311; Quiral est téléchargeable sur <http://www.univ-reims.fr/LSD/JmnSoft/Quiral>

¹²⁹ Nuzillard J.-M., Banchet A., Haudrechy A. *J. Chem. Inf. and Mod.* **2007**, 47, 5, 1979

Il faut noter que lorsque l'atome X, lié au carbone C[#], n'est pas un oxygène, alors sa configuration est automatiquement inversée car l'introduction de cet atome X requiert la plupart du temps une réaction de substitution qui change la configuration.

Le programme tient compte également du fait que le synthon clé (« Q-target ») adapté à la molécule cible ne soit pas trop onéreux ou qu'il puisse être synthétisé facilement. Plusieurs procédés (« Q-reactions ») sont alors proposés pour résoudre ce problème synthétique :

- l'inversion d'un seul C[#] (réaction de Mitsunobu, par exemple)
- l'inversion de deux centres adjacents C[#] (formation et ouverture d'époxyde)
- l'échange des fonctions A et NA
- la coupure de la liaison C-C portant la fonction A ou NA
- l'addition d'un atome de carbone à l'une des extrémités A ou NA. Pour cette dernière réaction, la formation éventuelle d'un nouveau centre chiral C[#] avec une configuration T ou U est envisagée.

b- Analyse de notre molécule cible par le programme

☞ Le logiciel identifie les groupes d'atomes de carbone C[#] de l'analogue imaginé, dessiné dans le logiciel ChemDraw 3D, puis dresse la liste de Q-targets possibles parmi les 8 pentoses et les 16 hexoses. Seuls les ensembles contenant plus de trois atomes C[#] seront retenus pour l'analyse.

Détails de l'analyse confidentiels

IV) Synthèse d'un analogue C-glycosidique particulier du KRN 7000 selon notre stratégie NOÉ

1) Rétrosynthèse *Détails confidentiels*

2) Synthèse (1^{ère} partie) *Détails confidentiels*

3) Synthèse (2^{ème} partie) *Détails confidentiels*

A l'issue de la synthèse, nous avons choisi d'utiliser une technique peu usitée pour purifier notre analogue. En effet, des travaux récents¹³⁰ ont montré que la CPC se révèle

¹³⁰ (a) Foucault P. A. dans *Centrifugal Partition Chromatography*, Chromatographic Science Series 68, New York: Marcel Dekker, Inc., **1994**; (b) Marchal L., Intes O., Foucault A., Legrand J., Nuzillard J.-M., Renault J.-H. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1005, 51

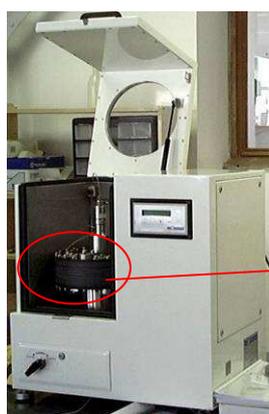
être une technique performante pour la purification de mélanges de lipides polaires glycosylés ou non.

4) Premiers essais de purification par la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)^{131, 132}

a- Principe de la CPC

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)¹³³ est une technique de chromatographie liquide-liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles, préparées par mélange de 2, 3 (ou plus) solvants et/ou solutions. Une phase liquide est maintenue stationnaire dans la colonne (le rotor) par un champ de forces centrifuge constant. Ce champ de force est généré par la mise en rotation de la colonne contenant des cellules de partage, ces dernières étant reliées entre elles par des conduits de section inférieure à celle des cellules de partage. L'autre phase liquide dite mobile est pompée au travers de la phase stationnaire (Figure 1). Les solutés sont séparés en fonction de leurs coefficients de partage respectifs.

Figure 1 : Descriptif de l'appareil de CPC



Appareil



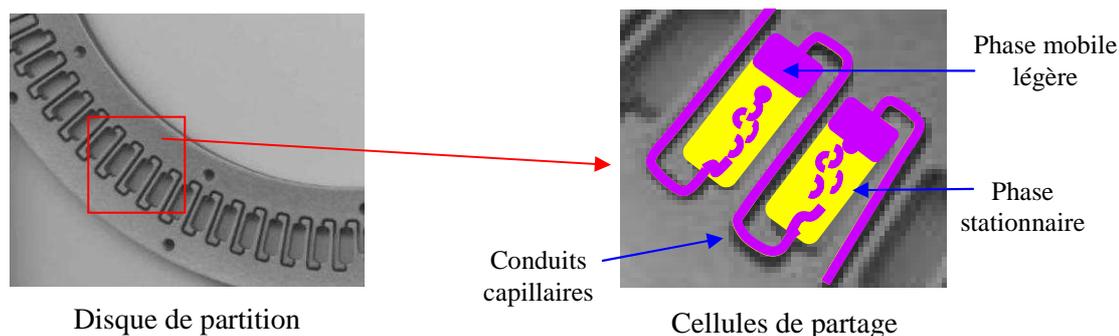
Rotor « sandwich »
(Superposition de disques de partition)

¹³¹ La CPC se trouve au Laboratoire Extraction, Isolement et Structures de Produits Naturels, FRE CNRS 2715 à l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de Reims.

¹³² Toribio A. *Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt* 2007, Thèse de doctorat, mention Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne

NDL : Grand merci à Alix Toribio et à Jean-Hugues Renault pour leur aide dans ce projet.

¹³³ Murayama W., Tobayashi Y., Kosuge Y., Yano H., Nunogaki Y., Nunogaki K. *J. Chromatogr.* **1982**, 239, 643



Avantages :

Cette méthode versatile et très simple d'utilisation présente, entre autres, plusieurs avantages :

- l'absence de support solide implique qu'il n'y a pas d'absorptions irréversibles des solutés
- la dégradation et la dénaturation des produits sont alors limitées
- l'échantillon injecté peut être entièrement récupéré par évaporation des solvants, même en cas d'échec de la séparation
- plusieurs modes de développement peuvent être utilisés (élution (isocratique ou gradient), déplacement (échange d'ions,¹³⁴ pH-zone refining¹³⁵ ...))
- il est possible d'inverser une ou plusieurs fois le rôle des phases au cours de l'expérience (mode dual)¹³⁶
- le développement d'appareils industriels permet à présent d'envisager la purification à grande échelle de divers composés (ions, composés inorganiques, composés organiques chiraux ou achiraux...)¹³⁷

Inconvénients :

Les inconvénients de ce système résident dans l'utilisation de solvants au sein d'une machine en rotation. En effet, l'appareillage doit être étanche pour éviter toutes fuites de solvants, et être robuste et hermétique pour résister à l'augmentation de la perte de charge¹³⁸ dans la colonne en rotation.

¹³⁴ Maciuk A., Renault J.-H., Margraff R., Trébuchet P., Zèches-Hanrot M., Nuzillard J.-M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 21, 6179

¹³⁵ Renault J.-H., Nuzillard J.-M., Le Crouérou G., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Le Men-Olivier L. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *849*, 421 et références citées

¹³⁶ Delannay E., Toribio A., Boudesocque L., Nuzillard J.-M., Zèches-Hanrot M., Dardennes E., Le Dour G., Sapi J., Renault J.-H. *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1127*, 45

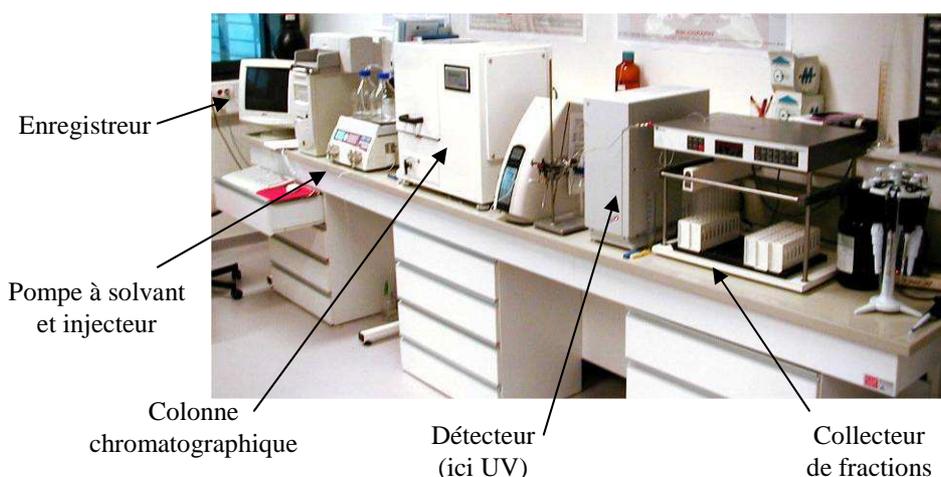
¹³⁷ Margraff R., Intes O., Renault J.-H., Garret P. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2005**, *28*, 1893

¹³⁸ La perte de charge ΔP prend en compte la différence de pression à l'entrée et à la sortie de la colonne. Van Buel M. J., Van der Wielen L. A. M., Luyben K. C. A. M. *Pressure drop in Centrifugal Partition Chromatography* dans *Centrifugal Partition Chromatography*, Ed. Foucault A. P., New York : Marcel Dekker Inc., **1995**, 51

Par ailleurs, l'injection des composés à purifier impose l'emploi de systèmes de solvants solubilisant parfaitement l'échantillon. Dans le cas contraire, les analytes de l'échantillon cristallisant ou apparaissant sous la forme d'un précipité, peuvent contaminer la pompe et/ou la colonne. De plus, les échantillons contenant des produits fortement tensioactifs peuvent entraîner une « désaturation » du système de solvants biphasiques et perturber les expériences de CPC.^{130b}

Les chaînes chromatographiques utilisées en CPC sont composées des éléments usuels d'une chaîne chromatographique préparative classique : une pompe à solvants, un injecteur (ou un échantillonneur), une colonne chromatographique, un détecteur, un enregistreur et un collecteur de fractions (Figure 2).

Figure 2 : Chaîne de CPC présente au laboratoire



La colonne chromatographique qui a servi à réaliser nos tests de purification est un FCPC200 de capacité volumique de 200 mL, contenant un rotor (vitesse de rotation 800-1600 tr/min) formé par l'empilement de 20 disques en Acier Inox dans lesquels sont gravées 1320 cellules de partage. Cet appareil est commercialisé par Kromaton Technologies (Angers).¹³⁹

b- Grandeurs chromatographiques

Coefficients de distribution K_D

Le partage d'un composé entre deux phases dépend essentiellement des facteurs propres à sa diffusion (concentration, température, solubilité, polarité...). Le physicien et chimiste allemand Nernst a introduit, en 1891, le coefficient de distribution K_D comme une constante physique caractéristique d'une substance donnée en chromatographie de partage. K_D^X est alors défini par le rapport des concentrations d'un soluté X dans la phase supérieure et dans la phase inférieure d'un système biphasique à l'équilibre lorsque ce soluté est dilué dans le système.

¹³⁹ Kromaton Technologies *Caractéristiques des FCPC* <http://www.kromaton.com/page1.htm> [consulté le 03/11/2006]

$$K_D^X = \frac{C_{sup}^X}{C_{inf}^X} \text{ ou } K_D^X = \frac{C_{stat}^X}{C_{mob}^X} \text{ (Equation 1)}$$

avec : K_D^X : coefficient de la distribution de la substance X
 C_{sup}^X : concentration de X dans la phase liquide supérieure
 C_{inf}^X : concentration de X dans la phase liquide inférieure
 C_{mob}^X : concentration de X dans la phase mobile
 C_{stat}^X : concentration de X dans la phase stationnaire

L'équilibre thermodynamique correspondant s'écrit : $X_{sup} \Leftrightarrow X_{inf}$ ou $X_{stat} \Leftrightarrow X_{mob}$

Volume de rétention V_r^X

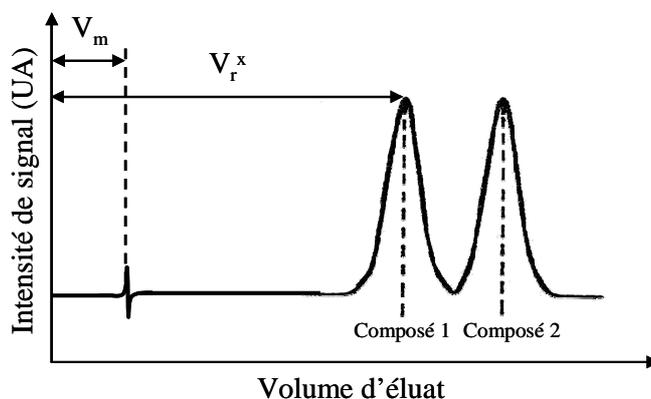
Lors du processus chromatographique, les différents solutés X émergent de l'appareil CPC suivant un ordre défini, après un volume de rétention V_r^X tel que :

$$V_r^X = V_{mob} + K_D^X V_{stat} \text{ (Equation 2)}$$

avec : V_r^X : volume de rétention de la substance X
 V_{mob} : volume occupé par la phase mobile dans la colonne
 V_{stat} : volume occupé par la phase stationnaire dans la colonne

La représentation graphique de l'élution d'un composé dans des conditions de linéarité exprimée en concentration en fonction du temps ou en fonction du volume de l'effluent est une courbe de distribution typiquement gaussienne (Figure 3). La mesure de la concentration peut s'effectuer par la mesure de l'absorbance, de la fluorescence... En combinant les données fournies par le chromatogramme (Figure 3) et l'équation 2, il est possible d'accéder assez rapidement au coefficient de distribution de chaque analyte.

Figure 3 : Chromatogramme obtenu après un développement par élution d'un composé X



Il est à noter qu'un coefficient de distribution des composés à séparer dont la valeur se rapproche de 1 sera préférentiellement recherché en mode de développement par élution en CPC. En

mode de développement par déplacement, un coefficient de distribution soit très grand soit très petit sera nécessaire au processus chromatographique.

Taux de rétention de phase stationnaire S_f

De façon pratique, le pourcentage de rétention de phase stationnaire $S_f^{\%}$ peut être obtenu indirectement par la mesure du volume de phase stationnaire V_m chassée de la colonne à la suite de la mise en équilibre. Il est alors calculé par la formule suivante (Equation 3):

$$S_f^{\%} = \frac{(V_{col} - V_m)}{V_{col}} \times 100 \quad (\text{Equation 3})$$

avec : V_m : volume de phase stationnaire chassée de la colonne lors de la mise en équilibre

V_{col} : volume total de colonne

De manière générale, en CPC, le taux de rétention de phase stationnaire en début d'expérience doit être supérieur à 60% du volume de colonne pour que les séparations soient correctes.

La sélectivité α

Le facteur de sélectivité α caractérise la différence de rétention entre deux composés à séparer. Il est défini par le rapport des coefficients de partage respectifs de deux solutés élués consécutivement (Equation 4).

$$\alpha = \frac{K_D^2}{K_D^1} \quad (\text{Equation 4})$$

avec : K_D^1 : coefficient de partage du composé 1

K_D^2 : coefficient de partage du composé 2

et $K_D^2 > K_D^1$

Les phases mobile et stationnaire, élaborées par l'expérimentateur en fonction du problème de séparation à résoudre, sont à l'origine du facteur de sélectivité. La CPC possède généralement un facteur de sélectivité plus important qu'en chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée.

Le nombre de plateaux théoriques

La CPC possède un nombre de plateaux théoriques N moyen (~500) alors que la CLHP à polarité de phases inversée présente généralement un nombre important de plateaux théoriques (>1000). Mais ce problème est contourné par un facteur de sélectivité important en CPC et relativement faible en CLHP en phases inverses.

La résolution R_s

La résolution permet d'apprécier la qualité de la séparation de deux composés élués consécutivement. Elle définit le désenchevêtrement de deux pics consécutivement élués. Elle est calculée à partir de la relation suivante (Equation 5):

$$R_s = \frac{(V_r^2 - V_r^1)}{(W_2 - W_1)} \times 2 \quad (\text{Equation 5})$$

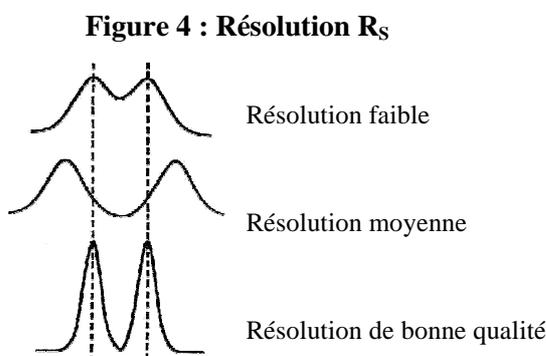
avec : V_r^1 : volume de rétention du composé 1

V_r^2 : volume de rétention du composé 2

W_1 : largeur à la base du pic d'élué du composé 1

W_2 : largeur à la base du pic d'élué du composé 2

Ainsi, plus les pics seront dissociés sur le chromatogramme, meilleur sera leur facteur de résolution (Figure 4).



c- Caractéristiques importantes en CPC

▲ Le débit de pompage de la phase mobile et la vitesse de rotation de la colonne sont des paramètres essentiels en CPC. En effet, le facteur de séparation est d'autant plus grand que le transfert de masse, intervenant lors de la mise en contact des phases dans les cellules, est important. Or le transfert de masse dépend du taux de rétention de la phase stationnaire S_f mais également du type d'écoulement de la phase mobile. Il existe des jets grossiers linéaires ou ondulés accolés aux parois des cellules, des jets grossiers curvilignes, des jets fins sinués et variqueux et des jets atomisés.¹⁴⁰ Ce dernier est le type de jet généralement recherché. Il correspond à des débits et une vitesse de rotation élevés.

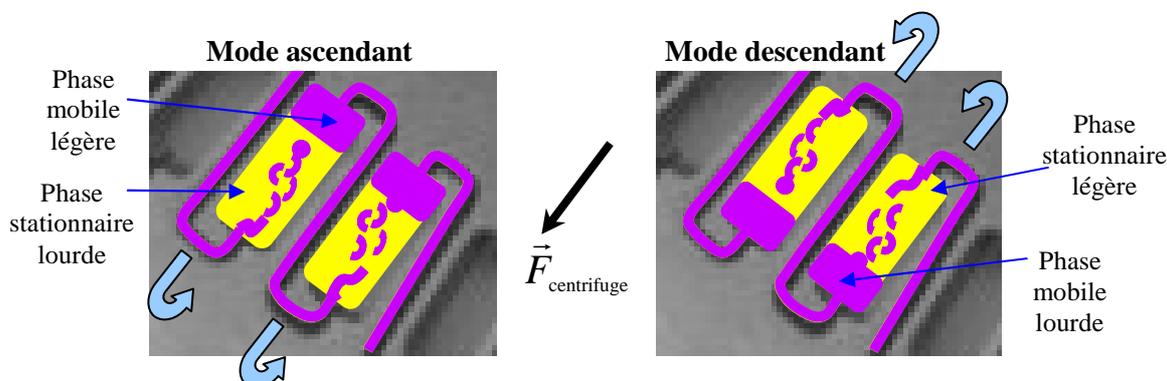
▲ Une vanne de commutation de modes (ascendant ou descendant) permet de choisir le rôle de chaque phase lors des expériences. Il est ainsi possible que la phase initialement mobile devienne la phase stationnaire ou *vice et versa*. L'expérience se déroule, alors, en mode dual.

La phase mobile est qualifiée d'ascendante lorsqu'elle est pompée dans la cellule à contre sens de la force centrifuge (mode ascendant).

¹⁴⁰ Marchal L., Foucault A., Patissier G., Rosant J. M., Legrand J. J. *Chromatogr. A.* **2000**, 869, 339-352

La phase mobile est qualifiée de descendante si elle traverse la phase stationnaire dans le sens du champ de force centrifuge (mode descendant) (Figure 5).

Figure 5 : Modes ascendant et descendant en CPC



▲ On distingue trois modes de développement : le mode frontal, le mode par élution et le mode par déplacement.¹⁴¹

↳ Dans le mode frontal, les solutés sont injectés dans la colonne de façon continue jusqu'à ce que la phase stationnaire soit saturée. Ainsi, le soluté le moins retenu (ayant saturé le plus rapidement la phase stationnaire) est « élué » et récolté pur tandis que les autres sont récupérés sous forme de mélanges. Le but de cette technique est d'obtenir principalement des informations analytiques sur la composition du mélange de départ. Ce mode n'est appliqué que depuis récemment à la CPC pour une application en mode continu (True Moving Bed).^{141b}

↳ Dans le mode par élution, la force motrice conduisant à la séparation de chaque espèce chimique visée est la force éluante de la phase mobile. Ainsi, la sélection de la phase mobile dépend des propriétés intrinsèques des composés ciblés (constante diélectrique, force ionique...). Il faut également tenir compte des facteurs propres à la diffusion des molécules au sein du milieu (concentration, température...) modifiant leur mobilité. Deux méthodes caractérisent ce mode de développement : (i) l'élution isocratique, (ii) le gradient d'élution.

(i) Dans la première méthode, la plus utilisée en CPC, la composition de la phase mobile reste inchangée durant le processus chromatographique. Dans ce cas, le composé ayant le moins d'affinité avec la phase stationnaire sera élué en premier. La réussite de ce mode repose sur deux stratégies pour choisir un bon système de solvants :¹⁴²

¹⁴¹ (a) Chovin P. *Théories et techniques de la chromatographie d'absorption dans Chromatographie en chimie organique et biologique*, Ed. Lederer E., **1959**, 1; (b) Couillard F., Foucault A., Durand D. Patent FR2856933

¹⁴² (a) Marston A., Hostettmann K. *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1112*, 181; (b) Foucault A. P., Chevotot L. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *808*, 3; (c) Renault J.-H., Nuzillard J.-M., Intes O., Maciuk A. *Solvents systems* Chap.3 dans *Countercurrent Chromatography-The Support-Free Liquid Stationary Phase*, Amsterdam: Elsevier Science B. V., Ed. Berthod A., **2002**, 49; (d) Foucault A. P. *Solvent systems in Centrifugal Partition Chromatography* dans *Centrifugal Partition Chromatography*, New York: Marcel Dekker, Inc., Ed. Foucault A. P., **1995**, 71; (e) Maciuk A. *Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : application à l'isolement de substances naturelles* **2005**, Thèse de Doctorat, mention Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne

- Utilisation d'un solvant « pont » solubilisant parfaitement les solutés dans un mélange binaire biphasique caractérisé par un important écart de polarité (ex : MeOH dans le mélange CHCl₃/Eau ou Acétone dans le mélange Méthyl-*isobutyl*cétone/Eau)

- Utilisation de gammes de solvant obtenues par un mélange de 4 à 5 solvants différents. Ces gammes permettent de travailler sur une large plage de polarité : gamme OKA (*n*-Hexane/MeOH/*n*-BuOH/Eau), gamme ARIZONA-Margraff (*n*-Hept/AE/MeOH/Eau), gamme acétone (*n*-Hept/Toluène/Acétone/Eau)

(ii) Contrairement au mode d'élution isocratique, dans le mode gradient d'élution, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'expérience. La composition de la phase stationnaire reste, quant à elle, inchangée.^{130a, 142c, 143} Les systèmes de solvant contenant de l'acétate d'éthyle, de l'eau ou du *n*-butanol sont de bons candidats pour cette méthode.

↳ Le principe général du mode de développement par déplacement repose sur les interactions mutuelles des différents composés impliqués dans le processus chromatographique. Ainsi, on distingue des « échangeurs » (échange ionique...), des analytes (espèces ionisées ou ionisables), des « retenueurs » (maintiennent les analytes dans la phase stationnaire), des « déplaceurs » (entraînent les analytes vers la phase mobile). Ce mode est adapté aux composés ioniques ou ionisables et donc ne peut être envisagé dans le cadre de la purification des composés synthétisés dans le cadre de ce travail de thèse.

Ainsi parmi toutes ces techniques, le mode de développement par élution isocratique semble le plus adapté à notre glycoside. La réussite de la séparation dépend alors essentiellement du choix du système de solvants et du comportement du composé dans l'appareil.

d- Essais de purification effectués sur notre analogue

Détails confidentiels

La CPC est une méthode de chromatographie originale. La qualité de la purification dépend essentiellement:

- *de l'élaboration d'un système de solvants fiable sur le plan de la solubilité et de la constante de distribution K_D*
- *du comportement du composé à purifier dans l'appareil en rotation*

¹⁴³ Renault J.-H., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Le Men-Olivier L., Durand A., Foucault et al. *J. Chromatogr. A.* **1997**, 763, 345

Les premiers essais de purification sur notre analogue sont très encourageants. D'autres tests devront être faits pour valider le système de solvants élaboré et pour définir les meilleurs paramètres de l'appareil (débit, vitesse de rotation) pour la purification.

V) Conclusions

Depuis l'étude des relations structure-activité, il y a 12 ans, les différentes recherches effectuées sur le KRN 7000 et divers analogues par de nombreux laboratoires, ont permis :

- de cerner plusieurs caractéristiques fondamentales pour l'activation des cellules de l'immunité par ces composés : liaison anomérique α , présence des hydroxyles en position 2 du sucre et en position 3' sur la chaîne phytosphingosine, association au CD1d dans le milieu biologique

- de définir quelques modifications structurales notoires pour induire préférentiellement un certain type de réponse immunitaire : longueur de chaînes tronquée, insertion de doubles liaisons, insertion d'aromatiques en bout de chaîne, analogue C-glycosidique

Ainsi, les analogues que nous souhaitons synthétiser doivent, à la fois, répondre aux critères structuraux fondamentaux et améliorer la relation CD1d/ligand/récepteur pour influencer le potentiel biologique vers l'une ou l'autre des deux réponses immunitaires pouvant être induites.

Pour définir quels types d'interactions sont indispensables à l'ancrage du glycolipide dans le CD1d, nous avons fait appel à la modélisation et à la dynamique moléculaires. Ces recherches nous ont permis de prendre conscience de la complexité du système CD1d/KRN 7000. En effet, il faut, à la fois, étudier les interactions existantes lorsque l' α -GalCer est dans le CD1d, et comprendre le mode d'ancrage (et de sortie) du ligand dans cette protéine, afin de synthétiser des analogues possédant des éléments structuraux adéquats pour ces deux phénomènes.

Ces axes de recherche ont pu être abordés grâce aux données cristallographiques fournies par la littérature. Ainsi, nous avons constaté :

- la présence de liaisons par pont hydrogène maintenant le sucre et les hydroxyles de la chaîne grasse au sein du sillon formé par les hélices α du CD1d. Nous devons

garder le maximum de ces liaisons en place pour maintenir correctement nos analogues dans le CD1d.

- *une orientation contrôlée des chaînes grasses dans les poches hydrophobes du CD1d. Nos analogues doivent alors établir des interactions hydrophobes avec ces poches par la présence de groupements insaturés.*
- *un incrément original de la partie polaire de l' α -GalCer dans le CD1d sous la forme d'un « escalier », dévoilant une orientation particulière de certains hydroxyles favorisant probablement la reconnaissance du complexe par le récepteur des cellules TNK. Nous pensons que la structure des analogues C-glycosidiques conserve ou se rapproche de cette orientation particulière.*
- *un mouvement de mâchoire, de grande amplitude, créée par les hélices α du CD1d lorsqu'il ne contient pas de ligand. Ceci nous amène à penser qu'il peut être profitable que le ligand présente, préalablement, la forme qu'il possède dans la protéine.*

Tous ces éléments sont importants pour élaborer une stratégie de synthèse facilitant l'accès à de nombreux analogues.

Grâce à la stratégie NOÉ, nous avons pu synthétiser un nouveau type d'analogue C-glycosidique du KRN 7000. La purification d'un tel composé est réalisée par chromatographie de partage centrifuge (en cours d'optimisation).

Le nouveau composé a été confié à un laboratoire d'immunologie pour connaître son potentiel biologique.

CHAPITRE C : ASPECTS BIOLOGIQUES ET TESTS IMMUNOLOGIQUES SUR NOTRE ANALOGUE.....	127
I) INTERACTIONS CD1d/α-GALCER/CELLULES TNK.....	127
1) L'immunité	127
2) Les lymphocytes impliqués dans la reconnaissance des antigènes	128
3) Les CD1 et leurs ligands glycolipidiques	130
4) Interaction CD1d/Antigène/récepteur des cellules TNK	131
5) Production de cytokines.....	135
a) Propriétés générales	136
b) Différents types de cytokines.....	136
c) Production de cytokines en présence de ligands glycolipidiques.....	138
d) Activation des autres cellules de l'immunité par les cytokines libérées	140
II) APPLICATION DE LA RECONNAISSANCE DES GLYCOLIPIDES PAR LES LYMPHOCYTES CD1d-RESTREINTS EN IMMUNOTHERAPIE	142
III) TESTS IMMUNOLOGIQUES SUR LE NOUVEL ANALOGUE	144
1) Introduction.....	144
2) Capacité du ligand à activer les cellules TNK <i>ex vivo</i>	145
a) Protocole expérimental	145
b) Tests effectués <i>ex vivo</i>	146
3) Capacité du ligand à activer les cellules TNK <i>in vivo</i>	146
a) Protocole expérimental	146
b) Résultats obtenus	146
IV) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	146

CHAPITRE C :

Aspects biologiques et

Tests immunologiques sur notre analogue

Remarque : Ci-joint en annexe D une liste de définitions de certains termes rencontrés dans ce chapitre. Ils seront soulignés en pointillé dans le texte.

I) Interactions CD1d/ α -GalCer/Cellules TNK¹⁴⁴

1) L'immunité¹⁴⁵

La réponse immunitaire fait intervenir deux types de mécanismes intimement liés:

◆ ***l'immunité naturelle*** non spécifique, appelée encore immunité innée ou naïve. Elle comprend les cellules polynucléaires, les monocytes, les macrophages, les cellules NK (*Natural Killer*) et ses cellules dendritiques issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et constitue la première ligne de défense contre les pathogènes.

◆ ***l'immunité acquise*** spécifique adaptative portée par les lymphocytes (globules blancs). Après phagocytose de l'intrus (pathogène) par les cellules dendritiques, celles-ci exposent à leur surface des fragments de molécules issues de ce dernier afin d'informer les lymphocytes sur sa nature (bactéries, champignons, virus, parasites). Après identification, les lymphocytes émettent des signaux spécifiques au profil des cellules étrangères induisant une réaction immunitaire la plus appropriée à leur élimination. L'activation de certains lymphocytes conduit à la production de molécules chimiques, appelées cytokines.

Lorsque l'immunité acquise connaît des troubles d'organisation (maladies autoimmunes) ou se trouve dépassée par une prolifération trop rapide des cellules infectées par rapport à la réponse immunitaire engendrée (tumeur, infections bactériennes ou parasitaires), alors la santé de l'individu est mise en péril. Aujourd'hui de nombreux espoirs reposent sur les glycosphingolipides pour aider le système

¹⁴⁴ Germain J.-P. Thèse Vétérinaire : *Revue bibliographique de la molécule présentatrice d'antigènes : CD1d. Etude in vitro de la production d'interleukines par les kératinocytes de l'homme après oligomérisation de cette protéine transmembranaire* **2006**, École Nationale Vétérinaire de Lyon

NDL : Cette thèse m'a essentiellement servi de support pour rédiger ce paragraphe (explications, modèles de schémas, nombreuses références bibliographiques). Merci à Jean-Philippe Germain.

¹⁴⁵ (a) Weinman S., Méhul P. *Toute la biochimie* **2004**, DUNOD éd.; (b) Jeannin P., Chevaller A., Renier G., McIlroy A. *Cours d'immunologie (PCEM II)* **2003-2004**, Faculté de médecine d'Angers

immunitaire à se « rééduquer » et à lutter efficacement contre les pathogènes.

2) Les lymphocytes impliqués dans la reconnaissance des antigènes

Les lymphocytes sont des petites cellules monospécifiques car ils ne portent qu'un seul type de récepteur spécifique à un antigène donné. Ils acquièrent ce récepteur dans les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse). Appelés lymphocytes naïfs à ce stade, ils sont véhiculés par le sang et les voies lymphatiques jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, muqueuses) où ils sont susceptibles de rencontrer leur antigène. Ils sont alors activés et peuvent assurer leur fonction.

Trois familles de lymphocytes sont impliquées dans la reconnaissance d'antigène :

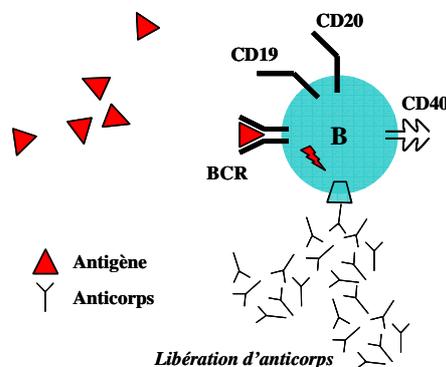
- les lymphocytes B
- les lymphocytes T, eux-mêmes divisés en deux sous-populations : les lymphocytes auxiliaires (*Helper*) T_H et les lymphocytes cytotoxiques T_C
- les lymphocytes TNK, lymphocytes T particuliers possédant certaines caractéristiques des cellules NK

◆ Les lymphocytes B, générés dans la moelle épinière, sont identifiés par leurs marqueurs spécifiques CD19 et CD20.

Les lymphocytes B luttent contre les infections à développement extracellulaire en reconnaissant directement l'antigène par le biais de leur BCR (*B-cell receptor*) et en produisant des anticorps spécifiques se fixant à la protéine de surface de la molécule à éliminer (Schéma 92).

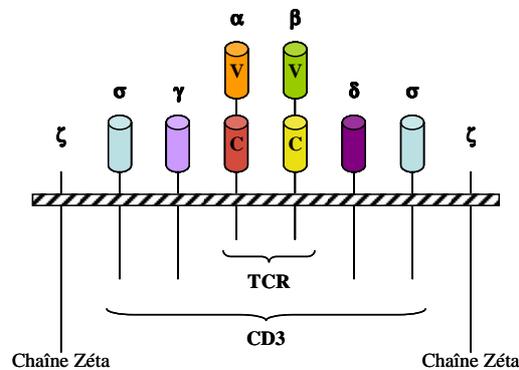
La molécule CD40 présente à la surface des lymphocytes B leur permet d'interagir avec une population de lymphocytes T activés. Ce mode d'action entraîne une expansion clonale des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant d'anticorps ou en lymphocytes B mémoires (Cf. Schéma 94).

Schéma 92 : Lymphocytes B



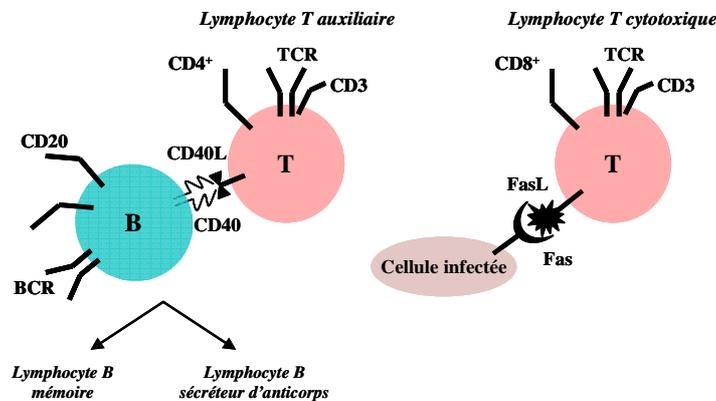
◆ Les lymphocytes T, générés dans le thymus, sont reconnaissables par leur marqueur spécifique CD3.¹⁴⁶ Ce marqueur est associé au TCR et est indispensable à la transduction du signal induite par le TCR (Schéma 93).

Schéma 93 : TCR et marqueur CD3



Des marqueurs précisent également la sous-population à laquelle ils appartiennent : CD4⁺ pour les lymphocytes T auxiliaires, CD8⁺ pour les lymphocytes T cytotoxiques. La présence du corécepteur CD40L sur les lymphocytes T auxiliaires leur permet d'interagir avec d'autres cellules de l'immunité tels que les lymphocytes B quiescents. Quant aux lymphocytes cytotoxiques, ils peuvent entre autre interagir avec les cellules infectées par le biais des récepteurs FasL-Fas (Schéma 94).

Schéma 94 : Lymphocytes T



Les lymphocytes T luttent contre les agressions des pathogènes à développement intracellulaire. En effet, ils ne peuvent reconnaître que les fragments de molécules de l'intrus présentées par une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Celle-ci possède à sa surface soit des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et/ou de classe II, soit un cluster de différenciation de type 1 (CD1) de structure analogue aux molécules du CMH mais

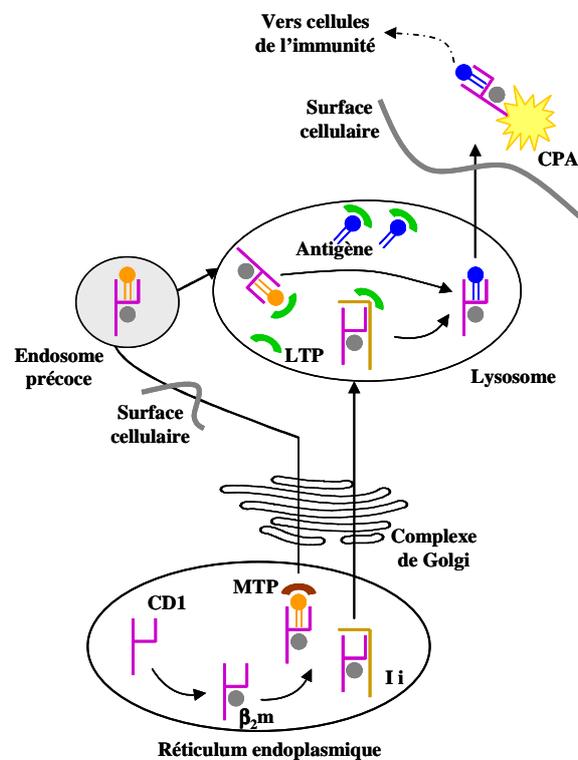
¹⁴⁶ www.answers.com/topic/cd3-immunology.

possédant deux poches hydrophobes idéales pour accueillir des chaînes lipidiques (Cf. Chap.B-III).¹⁴⁷
C'est à ce type de protéines que les glycolipides sont associés.

3) Les CD1 et leurs ligands glycolipidiques

Les protéines CD1 sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Leurs sillons sont, alors, soit chargé par un phospholipide du soi non-antigénique à l'aide de la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), soit bloqué par une chaîne invariante, notée Ii, complexée à une molécule du CMH II. Ces molécules « chaperon » protègent le CD1 jusqu'à ce qu'il rencontre un ligand antigénique endogène (tel que iGb3) ou étranger (α -GalCer par exemple) apportés par les LTP (*Lipid Transfer Proteins*) dont les saposines. Les CD1 portant un phospholipide sont orientés vers la surface de la cellule, puis dans les endosomes précoces et enfin dans les lysosomes où ils peuvent accueillir dans leurs sillons un antigène. Les autres CD1 sont, eux, conduits directement vers les lysosomes. A ce stade, les LTP catalysent l'extraction des lipides « chaperon » en se fixant à leur tête hydrophile. Ce même procédé est appliqué pour, cette fois, introduire l'antigène correspondant à la classe du CD1, dans la protéine devenu libre. Enfin, le complexe CD1/Glycolipide est porté jusqu'à la surface cellulaire (Schéma 95) de la cellule présentatrice d'antigène et il est prêt à interagir avec les cellules de l'immunité.¹⁴⁴

Schéma 95 : Formation du complexe antigène/CD1



¹⁴⁷ (a) Gadola S. D., Zaccari N. R., Harlos K., Shepherd D., Castro-Palomino J. C., Ritter G., Schmidt R. R., Jones E. Y., Cerundolo V. *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 721; (b) Zeng Z., Castaño A. R., Segelke B. W., Stura E. A., Peterson P. A., Wilson I. A. *Science* **1997**, 277, 339

Il existe cinq classes de molécules CD1 : a, b, c, e (groupe I), d (groupe II), spécifiques d'un antigène donné (Tableau 15).¹⁴⁸ Ces protéines CD1 sont présentes dans de nombreuses espèces mammifères et notamment chez l'Homme. Toutefois le groupe I des CD1 n'a pas été identifié chez la souris ni le rat, alors que l'on retrouve le CD1d (groupe II) chez les rongeurs.¹⁴⁹ Cette particularité est d'autant plus notoire que les CD1d humain et murin sont très homologues et reconnaissent tous deux l' α -GalCer.¹⁵⁰ Ainsi le CD1d murin est largement utilisé dans de nombreux tests biologiques mettant en jeu des glycolipides de ce type.

Tableau 15 : Antigènes lipidiques présentés par les molécules de CD1

<i>Antigène</i>	<i>Restriction CD1</i>
Glucose monomycolate (GMM)	CD1b
Lipoarabinomannane	CD1b
Mannosides phosphatidylinositols	CD1b
Hexosyl-1-phosphoisoprenoïde	CD1c
α -GalCer	CD1d
Glycosyles phosphatidylinositols (GPI)	CD1d
Ganglioside 1 (GM1)	CD1c
Sulphatide	CD1a, b, c

L'antigène α -GalCer est présenté, par les CD1d, à une famille particulière de lymphocytes, les lymphocytes TNK, possédant un récepteur TCR approprié à ce type d'antigènes.

4) Interaction CD1d/Antigène/récepteur des cellules TNK

Le TCR se présente comme une protéine transmembranaire hétérodimérique dont les chaînes polypeptidiques α et β sont reliées entre elles par un pont disulfure. Chaque chaîne possède un domaine N-terminal variable, noté V, et un domaine C-terminal constant, noté C (Schéma 96).^{145a} On distingue deux types de TCR chez les lymphocytes TNK : ¹⁵¹

- l'un possède une chaîne $V\alpha$ invariante (inv), $V\alpha 24-J\alpha 18$, le plus souvent associée à $V\beta 11$ (homologues des segments murins $V\alpha 14-J\alpha 18$ et $V\beta 8$). Le lymphocyte est dit TNKinv.
- l'autre est un récepteur plus « universel », le lymphocyte est dit TNK diversifié.

¹⁴⁸ Gadola S. D., Karadimitris A., Zaccai N. R., Salio M., Dulphy N., Sheperd D., Jones E. Y., Cerundolo V. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2003**, 358, 875 et références correspondantes

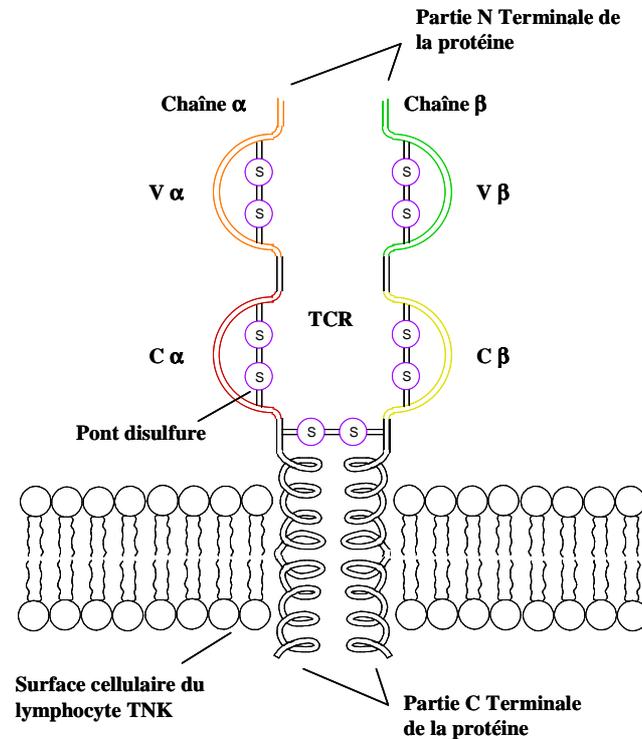
¹⁴⁹ Rhind S. M. *Vet. Pathol.* **2001**, 38, 611

¹⁵⁰ (a) Brossay L., Chioda M., Burdin N., Koezuka Y., Casorati G., Dellabona P., Kronenberg M. *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 1521; (b) Kawano T., Tanaka Y., Shimizu E., Kaneko Y., Kamata N., Sato H., Osada H., Sekiya S., Nakayama T., Taniguchi M. *Int. Immunol.* **1999**, 11, 881; (c) Spada F. M., Koezuka Y., Porcelli S. A. *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 1529

¹⁵¹ Behar S. M., Cardell. S. *Semin. Immunol.* **2000**, 12, 551

Trois zones notoires du TCR forment des régions particulièrement impliquées dans la reconnaissance et la liaison avec l'antigène (CDR *complementarity determining region*) (Cf. Schémas 98 et 99).

Schéma 96 : Structure du TCR d'une cellule TNK



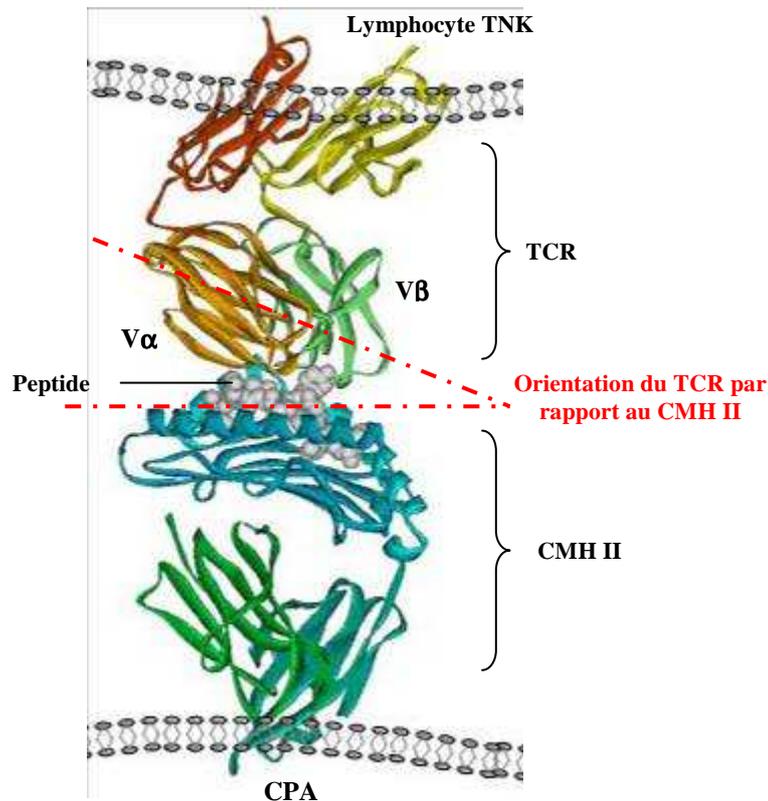
Le ligand synthétique α -GalCer active les lymphocytes TNKinv mais pas les autres cellules TNK. De plus, cette activation n'est possible qu'en présence de CD1d. En effet, aucune activité lymphocytaire n'est observée en l'absence de CD1d ou de lymphocytes TNKinv.¹⁵²

Dans l'attente de la cristallisation d'un complexe trimoléculaire CD1d/Antigène/Récepteur, les expériences de mutagenèse effectuées prouvent que le TCR entre, à la fois, en contact direct avec la tête polaire de l'antigène et avec le sommet du CD1d. Les relations identifiées de la chaîne TCR β avec des acides aminés situés à l'extrémité C-terminale de l'hélice α -1 sont compatibles avec une orientation du TCR en diagonale par rapport à l'axe longitudinal de CD1d.^{118b} Ce comportement est analogue à celui du TCR des cellules T conventionnelles vis-à-vis du complexe peptide/CMH II (Schéma 97).^{118b, 153}

¹⁵² (a) Burdin N., Brossay L., Kronenberg M. *Eur. J. Immunol.* **1999**, 29, 2014; (b) Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S. H., Beavis A., Koezuka Y., Bendelac A. *J. Immunol.* **1999**, 163, 4647; (c) Singh N., Hong S., Scherer D. C., Serizawa I., Burdin N., Kronenberg M., Koezuka Y., Van Kaer L. *J. Immunol.* **1999**, 163, 2373

¹⁵³ (a) Maynard J., Petersson K., Wilson D. H., Adams E. J., Blondelle S. E., Boulanger M. J., Wilson D. B., Garcia I. K. *C. Immunity* **2005**, 22, 81; (b) www.bio.puc.cl/.../research/dwelltime.htm.

Schéma 97 : Orientation du TCR par rapport au CMH II^{153b}



Les chaînes α et β du TCR surplomberaient respectivement la poche A' et la poche C' du CD1d, les deux boucles hypervariables CDR3 α et β se rejoignant au-dessus du centre du sillon. Vu que la poche A' est fermée par des interactions entre les deux hélices, les boucles CDR1 α et CDR2 α n'ont pas accès à l'antigène et ne « voient » que le CD1d. De même, pour la poche de C' renfermant la chaîne sphingosine, aucun contact ne semble possible entre les CDR 1 et 2 du TCR β et l'antigène. En revanche, CDR3 α interagit avec la tête polaire de l' α -GalCer, et notamment avec les hydroxyles en position 2 et 4 du D-Galactose (Schémas 98 et 99).¹⁵³

La forte corrélation observée lors des expériences de transfection entre la réactivité de l' α -GalCer et l'expression de la chaîne V α 14-J α 18 quelque soit la chaîne β utilisée, soutient le fait que c'est principalement le TCR α des lymphocytes TNKinv qui reconnaît cet antigène.¹⁵⁴ Cependant l'exacte topographie des interactions CD1d/lipide/TCR doit encore être précisée, notamment pour définir le rôle de la boucle CDR 3 β .

¹⁵⁴ (a) Gumperz J. E., Roy C., Makowska A., Lum D., Sugita M., Podrebarac T., Koezuka Y., Porcelli S. A., Cardell S., Brenner M. B., Behar S. M. *Immunity* **2000**, *12*, 211; (b) Gui M., Li J., Wen L. J., Hardy R. R., Hayakawa K. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 6239

Schéma 98 : Régions de reconnaissance et de liaison (CDR)

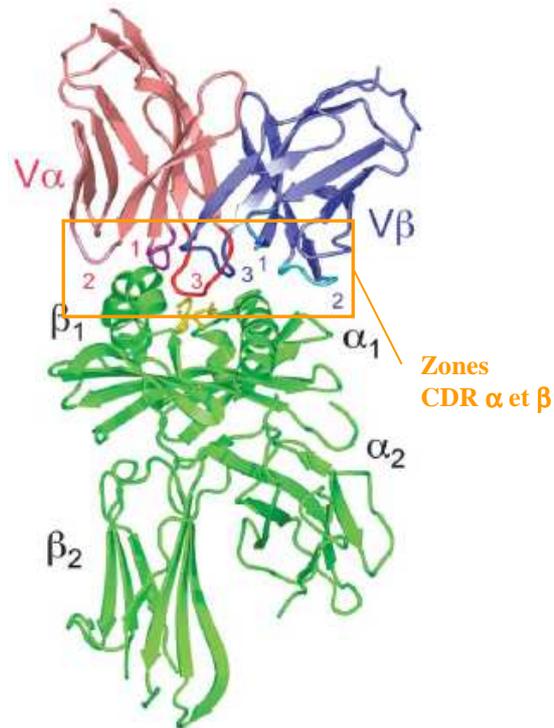
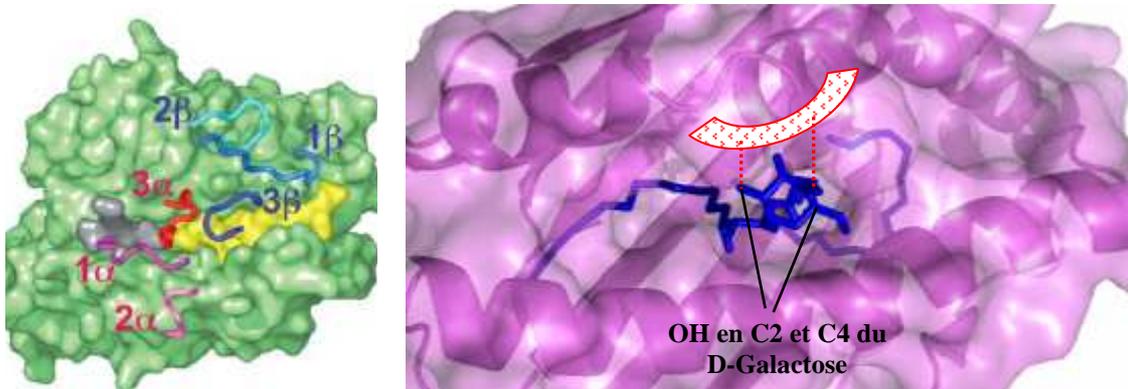


Schéma 99 : Interaction entre CDR 3 α et la tête polaire du glycolipide



En gris : Poche A' contenant la chaîne acyle
En jaune : Poche C' contenant la chaîne sphingosine

Selon les études biophysiques, l'interaction du TCR des lymphocytes TNKinv avec le complexe α -GalCer/CD1d se distingue de celle des TCR conventionnels avec le complexe peptides/CMH par :

↪ une affinité de la liaison très forte. Evaluée par la technique de résonance plasmonique de surface utilisant un flux de TCR solubles sur des CD1d immobilisés chargés de lipides, la constante de dissociation à l'équilibre (KD) est comprise entre 30 et 350 nM.¹⁵⁵ Ces constantes traduisent une demi-vie du complexe TCR/ α -GalCer/CD1d très longue (variant de 85 à 230 s) et une liaison beaucoup plus forte que celle des TCR conventionnels avec l'association CMH/peptide.

↪ un mode de reconnaissance de type clé-serrure. En effet, la thermodynamique suggère ce mode car l'interaction du TCR avec les antigènes glycolipidiques, présentés par le CD1d, est indépendante de la température. Ceci est en faveur d'un mécanisme rigide, ne nécessitant pas d'accommodation de la part du TCR des lymphocytes TNKinv, contrairement à ce qui est observé avec les TCR conventionnels restreints par le CMH.^{155b, 156}

Autre caractéristique des lymphocytes T CD1d-restreints (humains et murins), leur capacité à sécréter, dans les minutes suivant l'activation antigénique et sans expansion clonale préalable, de grandes quantités de cytokines amorçant diverses réponses immunitaires.

5) Production de cytokines^{144, 145b, 157}

Les cytokines sont des substances solubles, de type protéique ou glycosylé, synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Avec les hormones et les neuromédiateurs, ce sont des molécules essentielles à la communication de nos cellules. Leur sécrétion est déclenchée par le contact d'une cellule de l'immunité avec un antigène, par le biais d'un récepteur spécifique, ou par une autre cytokine. Lorsqu'une cytokine se lie à son récepteur, elle entraîne à l'intérieur de la cellule, une cascade d'évènements métaboliques (activation d'enzymes, formation d'ARN messenger...) qui déclenche ou modifie l'activité d'une catégorie de cellules. Les cytokines suscitent ainsi un réseau complexe de relations entre toutes les cellules impliquées dans les défenses immunitaires.

Le terme « cytokine » fut introduit en 1974 par Stanley Cohen. En quelques décennies, les cytokines ont connu une explosion d'intérêt dans les domaines de la recherche et de la médecine. Il a

¹⁵⁵ (a) Schofield L., McConville M. J., Hansen D., Campbell A. S., Fraser-Reid B., Grusby M. J., Tachado S. D. *Science* **1999**, 283, 225; (b) Sidobre S., Hammond K. J., Benazet-Sidobre L., Maltsev S. D., Richardson S. K., Ndongye R. M., Howell A. R., Sakai T., Besra G. S., Porcelli S. A., Kronenberg M. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 12254; (c) Sidobre S., Naidenko O. V., Sim B. C., Gascoigne N. R., Garcia K. C., Kronenberg M. *J. Immunol.* **2002**, 169, 1340; (d) Sim B. C., Holmberg K., Sidobre S., Naidenko O., Niederberger N., Marine S. D., Kronenberg M., Gascoigne N. R. *Immunogenetics* **2003**, 54, 874

¹⁵⁶ Cantu (III) C., Benlagha K., Savage P. B., Bendelac A., Teyton L. *J. Immunol.* **2003**, 170, 4673

¹⁵⁷(a) <http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>; (b) <http://www.actions-traitements.org/spip.php?mot166>; (c) The cytokines web (images 3D de cytokines) http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytweb/; (d) Dictionnaire des cytokines <http://www.copewithcytokines.de/>

été mis en avant l'implication des cytokines dans les processus liés à l'embryogenèse, la reproduction, la gestation, l'hématopoïèse, la réponse immunitaire, l'inflammation. Mais les cytokines contribuent aussi à des situations pathologiques comme : auto-immunité, cancer, maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde, psoriasis, etc.), hépatites virales, l'infection par le VIH... Les cytokines peuvent aussi être utilisées comme agents thérapeutiques (G-CSF pour faciliter la reconstitution hématologique...) ou comme cibles (TNF dans maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde...).

a) Propriétés générales

Les cytokines sont sécrétées brièvement et sur courte distance.

Leurs actions sur les cellules-cibles dépendent de plusieurs facteurs : état de différenciation de la cellule-cible, disposition de co-facteurs dans le microenvironnement.

Leur production n'étant pas continue, elle nécessite donc un signal d'activation.

Les deux propriétés fondamentales des cytokines sont :

- la redondance : une même activité biologique, dans une cellule donnée, peut être provoquée par des cytokines différentes.
- la pléiotropie : une cytokine donnée peut entraîner des activités biologiques variées sur sa cellule-cible, ou agir sur des cellules-cible différentes.

Quatre modes d'action sont connus pour les cytokines :

- ◆ activité autocrine : action locale sur des cellules du même type que la cellule productrice
- ◆ activité paracrine : action locale sur un autre type de cellule que la cellule productrice
- ◆ activité endocrine : action à distance sur la cellule-cible
- ◆ activité juxtacrine : action sur une cellule en contact avec la cellule productrice

b) Différents types de cytokines

Ils existent plusieurs familles de cytokines :

❖ Interleukines (IL) : c'est un groupe de médiateurs chimiques sécrétés par plusieurs cellules de l'immunité, agissant positivement ou négativement sur celles-ci par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Leur action se fait en cascade dans un environnement proche de leur sécrétion. Elles stimulent la croissance des lymphocytes, permettent la prolifération et la différenciation des cellules et participent aux stimuli immunitaires.

❖ Chimiokines ou Chémokines : elles définissent l'ensemble des cytokines de faible poids moléculaire ayant toute en commun un pouvoir chimiotactique. Il existe plus de 40 chimiokines habituellement divisées en familles selon que les résidus de cystéine, qu'elles contiennent, sont adjacents –cys–cys– ou séparés par un autre acide aminé –cys–X–cys– ou par trois acides aminés, cys–XXX–cys.

❖ Interférons (IFN): On distingue les interférons de type I : IFN- α et IFN- β , sécrétés par diverses cellules de l'organisme, notamment par les macrophages pour les IFN- α , et les fibroblastes pour l'IFN- β ; et les interférons de type II : IFN- γ , sécrété par les lymphocytes T activés et les cellules NK. Les interférons de type I ont une activité antivirale. Ils protègent les cellules contre les infections virales en induisant la synthèse de diverses protéines, notamment des enzymes qui inhibent la réplication virale. Ils stimulent l'activité des macrophages et des cellules NK et augmentent l'expression des molécules du CMH de classe I. L'interféron γ agit en se fixant sur des récepteurs spécifiques membranaires qui activent la synthèse de diverses protéines. Il protège les cellules contre les infections virales, stimule l'activité phagocytaire des macrophages, la maturation des lymphocytes T et B, etc...

❖ Les facteurs nécrotiques de tumeurs "tumor necrosis factor" (TNF) : Ce sont des médiateurs de l'immunité innée car leur sécrétion ne nécessite pas l'intervention d'un antigène. Ils ont, entre autres, un effet anti-tumoral et anti-infectieux par stimulation de l'activité phagocytaire des leucocytes. Cependant, le TNF semble être le principal responsable du choc septique et être impliqué dans le développement de la maladie de Crohn, de l'athérosclérose, de l'insuffisance cardiaque et semble jouer un rôle important dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde.

❖ Les facteurs stimulant de colonie "Colony stimulating factors" (CSF) : Ce sont des cytokines jouant un rôle dans l'hématopoïèse, mais aussi dans l'activation des leucocytes matures.

❖ Les facteurs stimulant la croissance "Transforming growth factors" (TGF) : Ils concernent les facteurs de croissance impliqués dans la cicatrisation et le contrôle négatif de l'inflammation.

Les cytokines peuvent être classées en différentes catégories selon les activités biologiques qu'elles exercent :

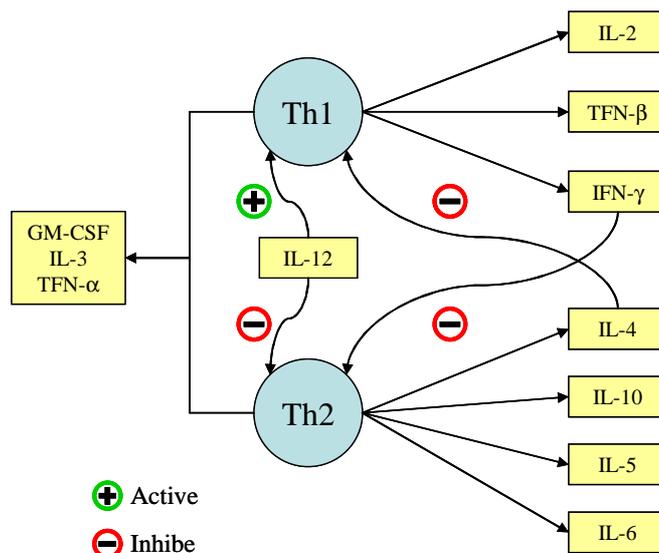
- Les cytokines **pro-inflammatoires** (IFN- γ , IL-2 et -3, TNF- β , GM-CSF..) déclenchent une réponse de type **Th1** responsable d'une immunité à médiation cellulaire telle qu'une activation des lymphocytes cytotoxiques T_C, une réaction d'hypersensibilité retardée.

- Les cytokines **immuno-régulatrices** (IL-3, -4, -5, -10 et -13...) déclenchent une réponse de type **Th2** responsable d'une immunité à médiation humorale telle qu'une activation des lymphocytes B avec production de certaines immunoglobulines et d'anticorps.

- Les cytokines **effectrices** (IFN, TNF...) assurent la défense de l'organisme vis-à-vis des agents infectieux et des cancers.

Il est important de signaler que l'IFN- γ inhibe l'IL-4 et inversement (Schéma 100).

Schéma 100 : Inhibition de Th1/Th2 et inversement



c) Production de cytokines en présence de ligands glycolipidiques

La reconnaissance du complexe α -GalCer/CD1d par le TCR des cellules TNK implique la sécrétion rapide des cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-4 par les lymphocytes TNK, ainsi que de l'IL-12 par la cellule présentatrice d'antigène (CPA). L'IL-12, en synergie avec l'IFN- γ libéré par les TNKinv permet l'activation des cellules NK qui deviennent alors la principale source d'IFN- γ sérique.¹⁵⁸ Le dosage de l'IL-12 permet de déterminer le taux d'activation des cellules TNKinv.

Cependant, comment les lymphocytes TNKinv exercent-ils une activité immunologique efficace en libérant à la fois des cytokines de type 1 (telles que l'IFN- γ , l'IL-2, le TNF- α) et de type 2 (telles que les IL-4, 5 et 13) qui peuvent avoir des effets antagonistes?

Le profil de cytokines synthétisées est déterminé par la qualité du signal délivré par le TCR aux TNKinv. Par analogie avec les réponses des lymphocytes T conventionnels, une corrélation entre la longueur des chaînes lipidiques de l'antigène et le profil cytokinique sécrété a été mise en évidence suite à la synthèse d'analogues de l' α -GalCer aux chaînes lipidiques tronquées.^{98, 159} Ainsi, l'analogue OCH, dont la base phytosphingosine possède 9 carbones (vs 18 carbones pour l' α -GalCer) induit, *in vivo*, chez la souris, un biais Th2 de la réponse des lymphocytes TNKinv. Le complexe OCH/CD1d semble moins stable et, par conséquent, induit un signal médié par le TCR de plus courte durée.¹⁶⁰ De même, le variant à chaîne acyle tronquée et insaturée en C20:2 (isomères Z sur les carbones 11-12 et

¹⁵⁸ Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S. H., Beavis A., Koezuka Y., Bendelac A. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 4647

¹⁵⁹ KO Y., Im J. S., Molano A., Dutronc Y., Illarionov P. A., Forestier C., Fujiwara N., Arias I., Miyake S., Yamamura T., Chang Y. T., Besra G. S., Porcelli S. A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**, *102*, 3383

¹⁶⁰ (a) Oki S., Chiba A., Yamamura T., Miyake S. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1631; (b) Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T. *Nature* **2001**, *413*, 531

14-15) (vs C26:0 pour l' α -GalCer) est un agoniste des TNKinv aussi puissant que l' α -GalCer pour la synthèse d'IL-4 mais n'induit pas la production d'IFN- γ d'où, là encore, une réponse Th2 favorisée.¹⁵⁹

Par contre, l'analogue α -C-GalCer induit une réponse Th1 et un ratio IFN- γ /IL-4 largement augmenté par rapport à l' α -GalCer.¹⁶¹ L' α -C-GalCer, résistant à l'hydrolyse *in vivo*, est, à ce titre, supposé former un complexe plus stable avec le CD1d et interagir plus longuement avec le TCR. Nous avons vu, également, que la présence d'un groupe phényl terminal, sur une chaîne acyle comportant 10 carbones (C10:Ph), multiplie quasiment par 4 la production d'IFN- γ .¹⁰¹

(Tableau 16 récapitulatif)

Tableau 16 : Antigènes glycolipidiques et réponses immunitaires induites

Nom	Structure	Réponse immunitaire induite	INF- γ	IL-4	Balance
α -GalCer		Th1/Th2	→	→	
OCH		Th2	✓	↗↗	
C20:2 (Z)		Th2	→	→↗	
C10:Ph		Th1	↗↗↗	✓	
α -C-GalCer		Th1	↗↗↗	✓	

La « balance » de cytokine marquant l'une ou l'autre réponse immunitaire dépend, donc, de deux paramètres agissant simultanément :

↳ l'interaction entre le ligand et son hôte, le CD1d : stabilisation/déstabilisation dans les poches hydrophobes, tête polaire sensible ou peu sujette à l'hydrolyse *in vivo*...

¹⁶¹ Schmieg J., Yang G., Franck R. W., Tsuji M. *J. Exp. Med.* **2003**, 198, 1631

↪ l'affinité entre le récepteur et le complexe ligand/CD1d : axe de présentation favorable, accès aisé à la tête polaire facilitant la reconnaissance...

d) Activation des autres cellules de l'immunité par les cytokines libérées

Les lymphocytes TNK exercent une activité immuno-modulatrice via leur capacité à activer en cascade de nombreux types cellulaires dont les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les cellules NK, les lymphocytes T et B (Schéma 101, page suivante).

↪ Réponse Th1 : activation des cellules de l'immunité par des cytokines pro-inflammatoires.

Cette réponse induit une forte activation des cellules cytotoxiques telles que :

- les macrophages (MΦ) (phagocytose amorcée)
- les lymphocytes T_C (lyse directe des cellules infectées)
- les cellules NK (production d'INF-γ et procédé cytotoxique engendré)

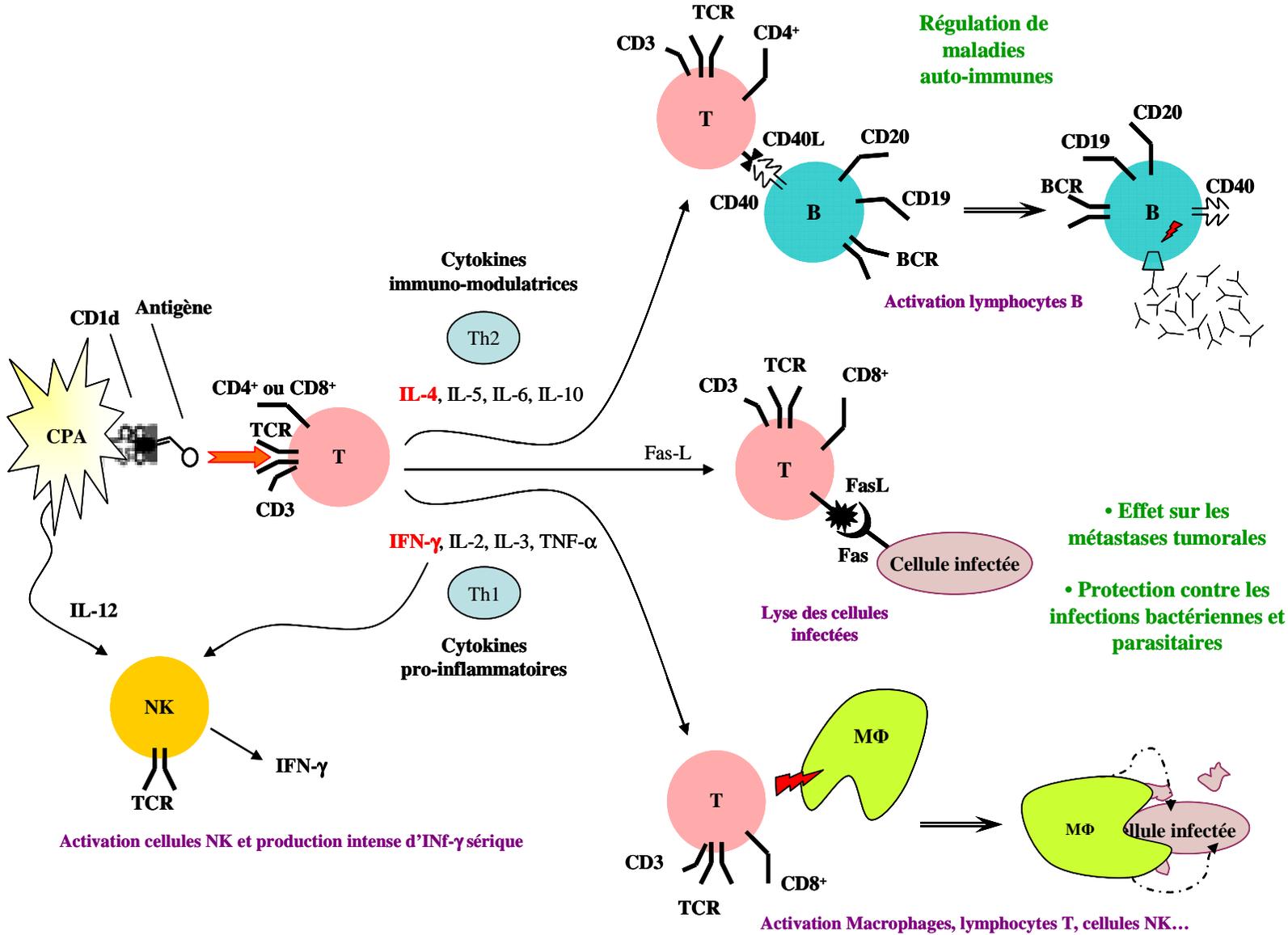
↪ Réponse Th2 : activation des cellules de l'immunité par des cytokines immuno-modulatrices.

Cette réponse induit une forte activation des cellules de l'immunité adaptative en particulier les lymphocytes B, activés préalablement par les lymphocytes T auxiliaires.

Ces interactions cellulaires expliquent les vagues de cytokines détectées dans le sérum des souris après injection d'α-GalCer. On observe successivement : un pic d'IL-4, essentiellement produite par les TNKinv, atteint 2 heures (H2) après l'injection, puis l'IL-12, issue des diverses CPA, culmine à H6 et enfin, un pic d'INF-γ, surtout issu des cellules NK, culminant à H24.¹⁶² Ce fait est d'autant plus remarquable que l'α-GalCer n'est pas un antigène issu de la fragmentation d'un pathogène par les macrophages. Ce glycolipide ne semble n'avoir pour but que de mobiliser le système immunitaire contre des intrus.

¹⁶² Parekh V. V., Singh A. K., Wilson M. T., Olivares-Villagomez D., Bezbradica J. S., Inazawa H., Ehara H., Sakai T., Serizawa I., Wu L., Wang C. R., Joyce S., Van Kaer L. *J. Immunol.* **2004**, 173, 3693

Schéma 101 : Activation des cellules de l'immunité après reconnaissance du glycolipide



II) Application de la reconnaissance des glycolipides par les lymphocytes CD1d-restreints en immunothérapie

L'importance du rôle des cellules TNK dans la reconnaissance d'antigène glycolipidique, a, aujourd'hui, été démontré dans de nombreuses maladies : diabète, scléroses multiples, inflammation, lupus, hépatites auto-immunes, allergie, tumeurs cancéreuses, infections virales ou bactériennes, etc...¹⁶³ Cependant, il reste encore beaucoup d'incertitudes sur le mode de fonctionnement des lymphocytes TNK et sur la régulation des cytokines sécrétées.

L'analogue C-glycosidique et le composé OCH ont été les premiers à perturber l'équilibre cytokinique du KRN 7000, en induisant préférentiellement une réponse Th1, pour le premier, et une réponse Th2, pour le second (Tableau 17).

Tableau 17 : Dates de publication des synthèses des analogues notoires du KRN 7000

<i>Analogues</i>	<i>Date des premières publications</i>	<i>Réponse Immunitaire</i>
OCH	2001	Th2
α -C-GalCer	2002	Th1
C20 :2 (insaturations Z)	2005	Th2
C10 :Ph	2006	Th1

Ils se sont fait connaître par leurs effets sur la malaria et les tumeurs pulmonaires.

Les premiers tests publiés par la société Kirin dans leur brevet de 2002,¹⁰⁷ ont montré que :

- *in vitro*, on observe une éventuelle synthèse de l'ADN par les lymphocytes pancréatiques murins (réponse immunitaire positive) en présence de l'analogue C-Galactosidique. Les résultats obtenus nous indiquent qu'à une concentration d'1 ng/mL, il augmente la production de cet ADN de 54%.
- *in vivo*, sur des cellules pulmonaires murines infectées par le mélanome B16, il inhibe plus de 65% des métastases lorsqu'il est injecté par intraveineuse à une dose d'1 μ g/mL.

Ces tests nous indiquent que l'analogue C-glycosidique a un potentiel pharmacologique certain, notamment à très faibles doses. Ceci est d'autant plus important que nous pouvons émettre des doutes quant à la pureté du produit obtenu à partir de ce brevet.

¹⁶³ (a) Yu K. O. A., Porcelli S. A. *Immunol. Lett.* **2005**, *100*, 42; (b) van der Vliet H. J. J., Molling J. W., von Blomberg B. M. E., Nishi N., Kölgen W., van den Eertwegh A. J. M., Pinedo H. M., Giaccone G., Scheper R. J. *Clin. Immunol.* **2004**, *112*, 8; (c) Sköld M., Behar S. M. *Infect. Immunol.* **2003**, *71*, 10, 5447; (d) Hammond K. J. L., Godfrey D. I. *Tissue Antigens* **2002**, *59*, 353

L'équipe de Franck a approfondi ces recherches sur les métastases pulmonaires tout en étudiant l'effet de l' α -C-GalCer sur des souris infectées par la malaria. Là encore, à très faibles doses (1 ng), l'analogue induit toujours une inhibition de la production d'ARN par les cellules infectées par la malaria, alors que son parent n'est quasiment plus actif, à cette dose. Il en résulte que l'analogue C-glycosidique est 1000 fois plus actif que son parent KRN 7000 contre la malaria et 100 fois plus contre les métastases (Schémas 102 et 103).¹¹⁰

Schéma 102 : Activité de l' α -C-GalCer envers des cellules infectées par la malaria

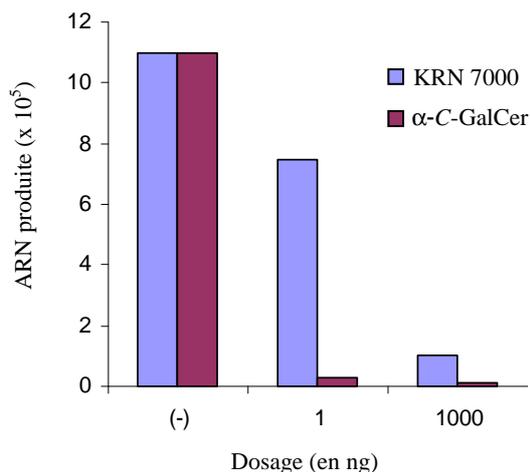
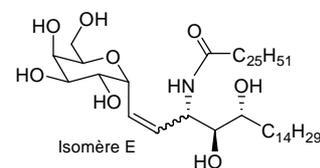


Schéma 103 : Activité de l' α -C-GalCer envers des tumeurs pulmonaires murines

	Dose d'injection de GalCer				GalCer testé
	Témoin	1 ng	10 ng	100 ng	
					α -GalCer
					α -C-GalCer

Cette activité contre la malaria est également retrouvée avec les analogues possédant une insaturation E entre le D-Galactose et les chaînes lipidiques (Cf ci-contre). Ces composés activent mieux les cellules TNK (plus forte production d'IL-12) que l' α -C-GalCer, mais



engendre une plus faible production d'INF- γ . Toutefois le rapport INF- γ /IL-4 reste tout de même deux fois supérieur à celui du KRN 7000.^{111, Erreur ! Signet non défini.164}

¹⁶⁴ (a) Chen G., Chien M., Tsuji M., Franck R. W. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, 7, 1017; (b) Franck R. W., Tsuji M. *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 692

Les premiers tests biologiques sur l'analogue C-glycosidique de l'OCH, aux chaînes lipidiques tronquées, ont permis de montrer qu'il était capable, comme son parent, d'induire une augmentation de la production d'IL-4 *in vivo* chez des souris de type C57BL/6.^{58e} Cette étude nous montre que la longueur des chaînes semble être un facteur plus déterminant dans la production de cytokines immuno-régulatrices, mais qu'une liaison C-Galactosidique ne paraît avoir aucune influence sur ce fait.

Remarque : ci-joint en annexe D, un tableau récapitulatif des activités du KRN 7000, de l'OCH et de l' α -C-GalCer.^{163a}

Il est évident que de nombreux analogues doivent être synthétisés pour améliorer leurs activités in vivo et déterminer les mécanismes d'action biochimiques du tri-complexe CD1d/Antigène/TCR. Mais les difficultés synthétiques et surtout la durée extrêmement longue pour mettre au point un médicament (~10-15 ans), nous incite à réfléchir et à utiliser toutes les ressources possibles pour synthétiser rationnellement les analogues les plus prometteurs.

L'équipe d'immunologie du laboratoire « Immunologie et Chimie Thérapeutiques » à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) de Strasbourg a effectué des tests sur l'analogue que nous avons synthétisé, sous le contrôle de Véronique Parietti (Doctorante) et de Fanny Monneaux, afin de déterminer d'éventuels effets de notre ligand sur le développement des maladies auto-immunes systémiques.

III) Tests immunologiques sur le nouvel analogue

1) Introduction

Les maladies auto-immunes résultent d'une rupture de tolérance au soi. Le maintien de cette tolérance implique des mécanismes centraux et périphériques notamment assurés par l'induction de cellules régulatrices telles que les lymphocytes T « natural killer » (TNK). Des modifications numériques et/ou fonctionnelles de cette population cellulaire pourraient être la cause de la rupture de tolérance au soi. L'équipe d'immunologie a entrepris l'analyse numérique et fonctionnelle de ces cellules T régulatrices au cours de maladie auto-immunes rhumatismales systémiques comme le lupus érythémateux disséminé (LED) et la polyarthrite rhumatoïde (PR), dans des modèles murins et chez des patients (grâce à une collaboration étroite avec les services de Rhumatologie des hôpitaux de Strasbourg). Les résultats tendent à montrer un défaut numérique et/ou fonctionnel des cellules TNK

chez la souris auto-immune MRL/lpr et les patients auto-immuns. Des études dans des modèles murins ont montré qu'il est possible de contrecarrer la déficience numérique et fonctionnelle des cellules TNK en les activant *in vivo* avec l' α -GalCer.

Cette équipe prévoit donc d'étudier l'effet des analogues C-glycosidiques sur le développement des maladies auto-immunes systémiques. La reconnaissance des analogues par les lymphocytes TNK dans un contexte CD1d restreint est étudiée par des tests *ex vivo*, permettant la sélection des meilleurs analogues pour une étude *in vivo* de leur potentiel thérapeutique. L'ensemble de ces tests ont été mis en place au laboratoire d'Immunologie, et tous les outils (Anticorps anti-CD1d bloquant, tétramères, tests ELISA pour le dosage des cytokines) nécessaires à leur réalisation sont disponibles.

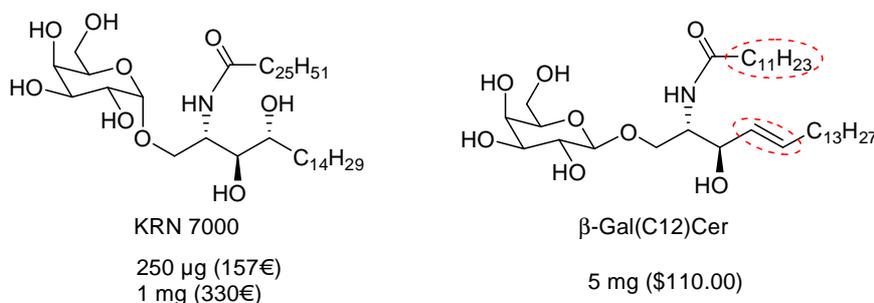
Nous avons achevé la synthèse de notre analogue fin novembre 2006. Il a été fourni à l'équipe d'immunologie courant décembre 2006, après sa purification sur gel de silice. Les analyses spectrométriques ont montré que l'échantillon de notre composé était de pureté très moyenne. Les séries de tests *ex vivo* et *in vivo* ont, tout de même, été lancés dans la but de détecter, tout d'abord, une quelconque activité ou cytotoxicité de notre analogue envers les cellules de l'immunité.

2) Capacité du ligand à activer les cellules TNK ex vivo

a) Protocole expérimental

- ⊕ Le ligand est dissous dans le DMSO pour obtenir un échantillon de concentration 2mg/mL.
- ⊕ Les splénocytes des souris naïves BALB/c sont cultivés en présence de quantités croissantes du ligand (de 0,02 à 20 μ g/mL).
- ⊕ Les contrôles internes sont effectués avec deux ligands synthétiques : l' α -GalCer (commercialisé par Alexis Biochemicals par l'intermédiaire d'Axxora)¹⁶⁵ et le β -Gal(C12)Cer (commercialisé par Avanti Polar Lipids),¹⁶⁶ dont leur efficacité à induire une réponse cellulaire spécifique des cellules TNK est déjà reconnu (Schéma 104).

Schéma 104 : Ligands de contrôle



¹⁶⁵ <http://www.axxora.com/>

¹⁶⁶ <http://www.avantilipids.com/>

⊕ La prolifération cellulaire est mesurée après trois jours de culture par incorporation de thymidine tritiée (mesure de la radioactivité incorporée par les cellules pendant l'activation). Les quantités de cytokines (IL-4 et IFN- γ) sont déterminées par le test ELISA dans les surnageants récoltés après 30h de culture.

⊕ Afin de déterminer si la reconnaissance des ligands est restreinte à la molécule CD1d, les cultures ont été réalisées en absence ou en présence d'anticorps anti-CD1d bloquant. Ils rendent alors impossible la présentation du ligand par la molécule CD1d au TCR invariant du lymphocyte TNK.

b) Tests effectués ex vivo

Détails confidentiels

3) Capacité du ligand à activer les cellules TNK in vivo

a) Protocole expérimental

Le ligand est injecté par voie intra-péritonéale à des souris naïves BALB/c (2 souris par ligand). Le taux de cytokines sériques (IL-4 et IFN- γ) a été détecté à différents temps après l'injection.

b) Résultats obtenus

Détails confidentiels

IV) Conclusions et perspectives

Les tests immunologiques sur ce nouvel analogue nous ont fourni des informations très intéressantes.

Prochainement, nous souhaitons, également, tester le composé sur des tumeurs cancéreuses, au laboratoire de Biochimie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, sous le contrôle de Laurent Martiny.

Cette équipe travaille sur l'étude des mécanismes mis en jeu dans les interactions entre les cellules cancéreuses et leur environnement, avec un intérêt tout particulier pour l'étude des interactions entre cellule et matrice extracellulaire d'une part, cellule et médicament d'autre part, ou la combinaison de ces trois partenaires.

Ils se consacrent essentiellement à l'étude de la régulation des cascades protéolytiques dans la matrice extracellulaire en situation tumorale avec en particulier la caractérisation et l'étude des propriétés anti-protéasiques et plus généralement anti-tumorales.

La mise au point de stratégies thérapeutiques nouvelles et efficaces de régulation de la protéolyse est particulièrement d'actualité et le contrôle spécifique de l'activité protéolytique représente donc une approche de grand intérêt.

Actuellement, ils contribuent à l'identification précise des voies de signalisation modulées par les α -GalCer dans le contexte tumoral et de déterminer si ces molécules sont capables de moduler les activités protéolytiques matricielles et l'invasion tumorale. Par ailleurs, l'étude des voies de signalisation liées à l'apoptose retient particulièrement leur attention.

Des approches *in vivo* seront mises au point dans le but de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et de mettre au point des stratégies alternatives capables de contourner la résistance aux agents anti-tumoraux. Sera également testé la capacité de ces molécules à moduler *in vivo* le potentiel métastatique de différentes lignées cellulaires tumorales.

CHAPITRE D : SYNTHÈSE DE THIOSUCRES.....	151
I) ACCÈS AUX THIOSUCRES DÉRIVÉS DU D-GALACTOSE ET DU D-MANNOSE	152
1) Série D-Galactose.....	152
2) Série D-Mannose.....	157
II) APPROCHE SYNTHÉTIQUE DU MOTIF CYCLIQUE DU SALACINOL ET DU KOTALANOL	160
1) Introduction.....	160
2) Rétrosynthèse.....	161
3) Discussion.....	161
III) CONCLUSION.....	167

CHAPITRE D : Synthèse de Thiosucres

Lors de notre course à la synthèse d' α -C-alcynyl-glycosides en série D-Galactose, nous avons été surpris par la stabilité du composé époxy-dithioacétal **10** formé (Cf. Chapitre A-II-1). La présence simultanée sur sa structure d'une partie potentiellement nucléophile, les soufres, et d'une moitié électrophile, la fonction époxyde, rendent ce composé remarquable. Ce type de dérivés époxy-dithioacétal acycliques sont d'autant plus intéressants qu'ils sont peu étudiés,¹⁶⁷ contrairement aux structures dithioacétales cycliques contenant un époxyde largement décrites dans la littérature.¹⁶⁸

Afin d'améliorer la synthèse de ce composé, nous avons déterminé des conditions pour accéder, d'une part, très proprement à notre époxy-dithioacétal **10** pour nos synthèses de C-glycosides et, d'autre part, à la synthèse de thiosucres pyraniques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en série D-Galactose.¹⁶⁹

¹⁶⁷ (a) Semmelhack M.F., Epa W.R., Cheung A.W.-H., Gu Y., Kim C., Zhang N., Lew W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 16, 7455; (b) Sunay U., Fraser-Reid B. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 44, 5335; (c) Meyers A.I., Babiak K.A., Campbell A.L., Comins D.L., Fleming M.P., Henning R., Heuschmann M., Hudspeth J.P., Kane J.M., Reider P.J., Roland D.M., Shimizu K., Tomioka K., Walkup R.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 15, 5015 et références citées

¹⁶⁸ (a) Leung L.M.H., Boydell A.J., Gibson V., Light M.E., Linclau B. *Org. Lett.* **2005**, 7, 23, 5183; (b) Smith III A.B., Pitram S.M., Boldi A.M., Gaunt M.J., Sfougataki C., Moser W.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 47, 14435; (c) Smith III A.B., Pitram S.M., Fuertes M.J. *Org. Lett.* **2003**, 5, 15, 2751; (d) Shiono H., Mochizuki Y., Tsutsui H., Mikami Y., Morohoshi T., Mitsunobu O. *Synlett* **2003**, 6, 894; (e) Terauchi T., Terauchi T., Sato I., Tsukada T., Kanoh N., Nakata M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 15, 2649; (f) Gros P., Hansen P., Caubère P. *Tetrahedron* **1996**, 52, 48, 15147; (g) Krohn K., Boerner G. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 20, 6063; (h) Khandekar G., Robinson G.C., Stacey N.A., Thomas E.J., Vather S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1993**, 1507; (i) Golinski M., Vasudevan S., Floresca R., Brock C.P., Watt D.S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1, 55; (j) Adam G., Zibuck R., Seebach D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 20, 6176; (k) Sviridov A.F., Ermolenko M.S., Yashunsky D.V., Borodkin V.S., Kochetkov N.K. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 33, 3835; (l) Culshaw D., Grice P., Ley S.V., Strange G.A. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 47, 3835; (m) Ferrier R.J., Haines S.R. *Carbohydr. Res.* **1984**, 130, 135; (n) Ferrier R.J., Prasit P., Tyler P.C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1983**, 8, 1641; (o) Mori M, Chuman T., Kato K., Mori K. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 44, 4593; (p) Hungerbühler E., Naef R., Wasmuth D., Seebach D., Lossli H.-R., Wehrli A. *Helv. Chim. Acta* **1980**, 63, 7, 1960; (q) Senring B., Seebach D. *Liebigs Ann.* **1978**, 2044; (r) Seebach D., Willert I., Beck A.K., Gröbel B.-T. *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 2510; (s) Djerassi C., Batres E., Velasco M., Rosenkranz G. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 7, 1712

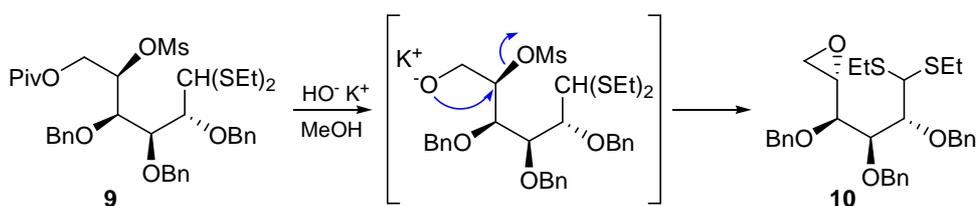
¹⁶⁹ Banchet A., Guillaume S., Haudrechy A. *Synlett* **2007**, 9, 1467

I) Accès aux thiosucres dérivés du D-Galactose et du D-Mannose

1) Série D-Galactose

Lors de nos premiers essais, le traitement du composé pivaloylé-mésylé **9** avec de la potasse dans le méthanol conduit à l'époxyde **10** désiré avec des rendements satisfaisant (> 65%, Schéma 105).

Schéma 105 : Synthèse du composé époxy-dithio **10**



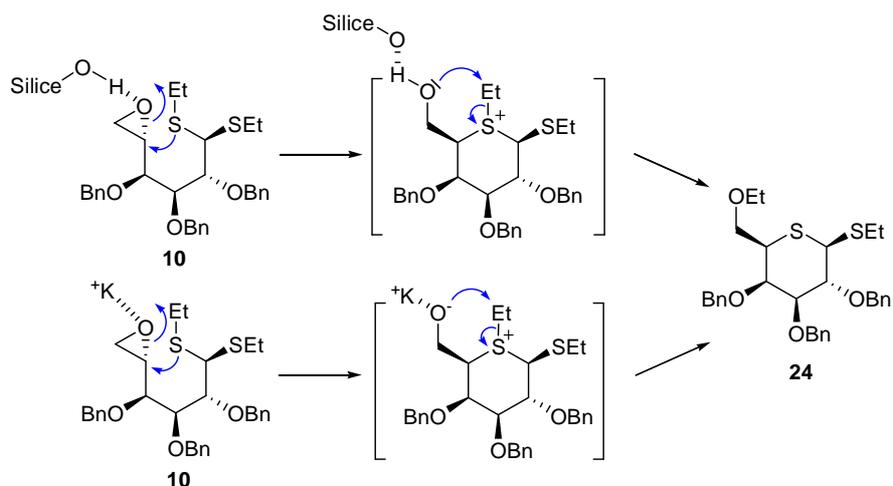
Mais nous avons été surpris que le rendement obtenu ne corresponde pas à nos attentes selon le contrôle très satisfaisant par CCM. De plus, l'époxy-dithioacétal est contaminé, pratiquement à chaque essai, par une petite quantité d'un produit non identifié. Il semble donc évident que la purification sur gel de silice est nuisible à l'obtention de **10**. Nous avons, en effet, observé que lorsque **10** est agité durant plusieurs heures en présence de silice dans l'éluant chromatographique (EP/AE 9/1), un nouveau produit apparaît et correspond au β -thiosucre **24**. Nous avons supposé que, sur la silice, l'activation de l'époxyde par une liaison hydrogène conduit à la formation d'un intermédiaire sulfonium, qui, après transfert intramoléculaire du groupement éthyle, donne le thiosucre **24** de configuration unique β (déterminée par ROESY) (Schéma 106). Le transfert d'un groupement alkyle d'un atome de soufre donneur vers un alkoxy est une réaction connue de la littérature¹⁷⁰ mais, à notre connaissance, elle n'a jamais été observée avec un dérivé d'un sucre.

Il est intéressant de noter que l'addition de triéthylamine (1%) à l'éluant chromatographique inhibe en partie la formation du thiosucre **24** (Cf. Tableau 18, Entrée H).

De plus, l'observation de ce composé **24**, en l'absence de purification, nous amène à penser que le cation potassique active lui aussi l'époxyde selon un mécanisme analogue à celui proposé précédemment (Schéma 106).

¹⁷⁰ Knipe A.C. *The Chemistry of the Sulphonium Group*, Stirling, C.J.M. Ed., John Wiley and Sons, New York, **1981**, 313

Schéma 106 : Synthèse d'un nouveau thiosucre 24



De plus amples investigations ont montrées que les composés **10** et **24** étaient obtenus dans différentes proportions lors de modifications mineures des conditions de la réaction (Tableau 18). Nous nous sommes intéressés, aussi bien, à la qualité du méthanol (CLHP ou non), qu'à la quantité et à la nature de la base, qu'au temps de réaction (Tableau 18, Entrées A-E).

Tableau 18 : Influence de la quantité d'eau sur la formation sélective de l'époxy-dithio **10**

Entrée	Conditions de réactions	Rapport 10 / 24 ^a	Rapport 10 / 24 ^a
		Avant purification sur gel de silice (rendement %)	Après purification sur gel de silice (rendement total %)
A	KOH pastilles (1.5 éq.), méthanol (CLHP) / 4h		3,4 : 1 (43)
B	KOH pastilles (2 éq.), méthanol (CLHP) / 3,5h		1 : 2,7 (61)
C	K ₂ CO ₃ (1.5 éq.), méthanol (CLHP) / 8h		2,1 : 1 (58)
D	K ₂ CO ₃ (2 éq.), méthanol (CLHP) / 4.5h		3,5 : 1 (52)
E	KOH plaques (2 éq.), méthanol (CLHP) / 2h		1,6 : 1 (56)
F	KOH plaques (écrasées, 2 éq.), méthanol / 2h	1 : 0 (86)	
G	KOH plaques (non écrasées, 2 éq.), méthanol + 1% eau / 2h	7,3 : 1 (87 / 13)	
H	KOH plaques (2 éq.), méthanol + 1% eau / 3h30	1 : 0 (90 / 0)	2 : 1 (61) 5,7 : 1 (67) ^b
I	KOH plaques (2 éq.), méthanol + 2% eau / 3h	1 : 0 (80 / 0)	
J	KOH pastilles (2 éq.), méthanol (CLHP) / 8h		0 : 1 (85)

a- les rapports sont déterminés par RMN

b- Et₃N (1%) utilisé comme co-éluant

Il est surprenant que le composé **24** soit obtenu majoritairement en présence de 2 équivalents de base (Entrée B). Ce résultat renforce l'idée que le cation potassique active l'ouverture de l'époxyde (Cf. Schéma 105). Il est à noter toutefois que l'utilisation de carbonate de potassium ne modifie pas significativement le rapport obtenu en présence d'1,5 équivalents de potasse.

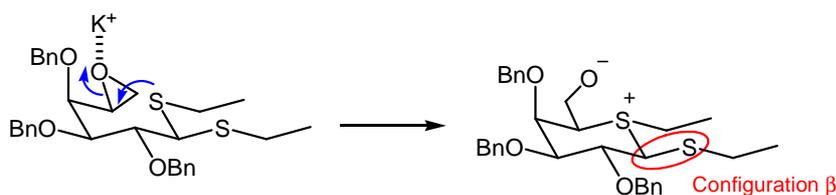
La qualité de la potasse fut, par la suite, remise en cause car certains lots donnent de meilleurs résultats (en faveur de **10**) que d'autres (Entrées B et E). Nous avons remarqué que lorsque qu'il était nécessaire d'écraser la potasse sous forme de pastilles, le rapport en faveur de **10** est excellent. Nous pensons alors qu'une humidification spontanée a lieu au cours de l'écrasement de la pastille. L'hypothèse que la présence d'eau dans le milieu améliorerait les résultats, est à rapprocher de la qualité du méthanol. En effet, les plus hauts rendements pour **10** sont obtenus lorsque l'on utilise des bouteilles de méthanol déjà ouvertes auparavant. Suspectant une responsabilité non négligeable de l'eau, nous avons ajouté une quantité contrôlée d'eau au système (Entrées G-I).

L'addition d'1 à 2% d'eau semble être la quantité idéale pour obtenir d'excellent rendement d'époxy-dithioacétal **10** sans purification nécessaire (Entrées H et I) car une purification sur gel de silice augmente significativement la proportion en thiosucré **24** (Entrée H). Avec 5 à 10% d'eau, seul **10** est observé mais une large quantité de composé pivaloylé-mésylé **9** est récupérée.

Si le cation potassium est nécessaire pour activer l'époxyde, il est fort probable que l'eau séquestre le cation inhibant ainsi la cyclisation du soufre. Dans nos réactions, 1% d'eau représente 2,5 équivalents d'excès par rapport au cation potassium. Cette quantité est largement suffisante pour complexer le cation et l'empêche d'avoir toute fonction activatrice.

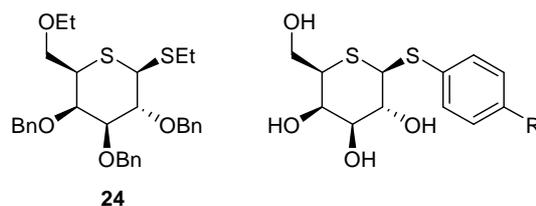
L'attaque stéréosélective d'un seul soufre sur l'époxyde peut être expliquée en regardant la conformation privilégiée de **10** pour laquelle le maximum de substituants sont en position équatoriale dans une conformation pré-chaîse (Schéma 107).

Schéma 107 : Explication pour la réactivité de l'époxy-dithio **10**



La formation de ce 5-thioaldopyranoside **24** est très intéressante et il peut être un synthon clé dans la synthèse d'anti-thrombotiques activant les inhibiteurs de la galactosyltransférase I (Schéma 108).

Schéma 108 : Analogie entre **24** et un 5-thioaldopyranoside bioactif



Toutefois, le transfert d'un groupement alkyle n'est pas idéal car la position 6 du sucre ne peut plus être modifiée par la suite. Le transfert d'un groupement benzyl, par exemple, est préférable ; pour cela il faut utiliser le benzyl mercaptan à la place de l'éthane thiol au début de notre synthèse. (Cette transposition sera testée lors de la synthèse du Salacinol, Cf. Chapitre D-II)

Nous avons mis au point un nouveau procédé permettant de synthétiser, soit un composé époxy-dithioacétal, soit un β-thiosucre (Tableau 18, Entrée J), selon des conditions de réaction plus ou moins anhydres.

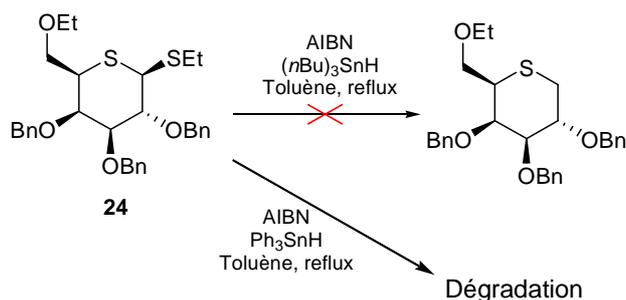
Nous avons souhaité appliquer cette méthodologie à d'autres sucres tels que le D-Mannose, pour la série pyranique, et le D-Arabinose, pour la série furanique, afin de savoir si le réarrangement peut être généralisé pour permettre ainsi l'accès à divers composés bioactifs tel que le Salacinol en série furanique.

En vue de la synthèse du Salacinol (Cf. Chapitre D-II), nous avons voulu tester une réaction de réduction anomérique du β-thiosucre **24** (le Salacinol ne possédant pas de groupement SR en α du sulfonium (Cf. Schéma 114)). Selon l'équipe de Pinto,¹⁷¹ il est possible de réduire, en une étape, le groupe S-Et par réaction radicalaire en ajoutant progressivement pendant 6 heures une solution de tri-*n*-butylétain et d'un initiateur de radicaux (AIBN) dans le toluène à une solution de thiosucre à reflux dans le toluène.

Malheureusement, cette méthode n'a pas porté ces fruits sur notre composé **24**. Nous avons essayé le même procédé avec un autre dérivé d'étain, le triphénylétain, mais sans succès. Dans le premier essai, nous avons récupéré entièrement le thiosucre **24** ; dans le deuxième cas, le produit s'est totalement dégradé (Schéma 109).

¹⁷¹ Svansson L., Johnston B.D., Gu J.-H., Patrick B., Pinto B.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10769

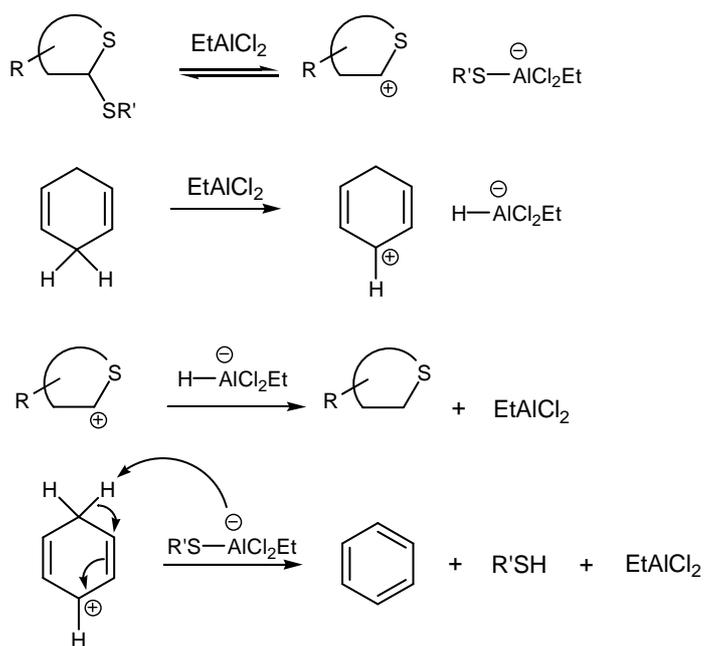
Schéma 109 : Tests de réduction du groupement S_{Et} en position anomérique



Dans l'avenir, nous envisageons de tester deux méthodes ioniques mettant en jeu des acides de Lewis et des donneurs d'hydrures :

- le triéthylsilane (donneur d'hydrure) en présence de diiodure de zinc (acide de Lewis) à 140°C¹⁷²
- le dichlorure d'éthylaluminium (acide de Lewis) en présence de 1,4-cyclohexadiène (donneur d'hydrure) à température ambiante¹⁷³ (Schéma 110)

Schéma 110 : Mécanisme plausible pour la réduction du thioacétal cyclique selon la méthode d'Ogawa



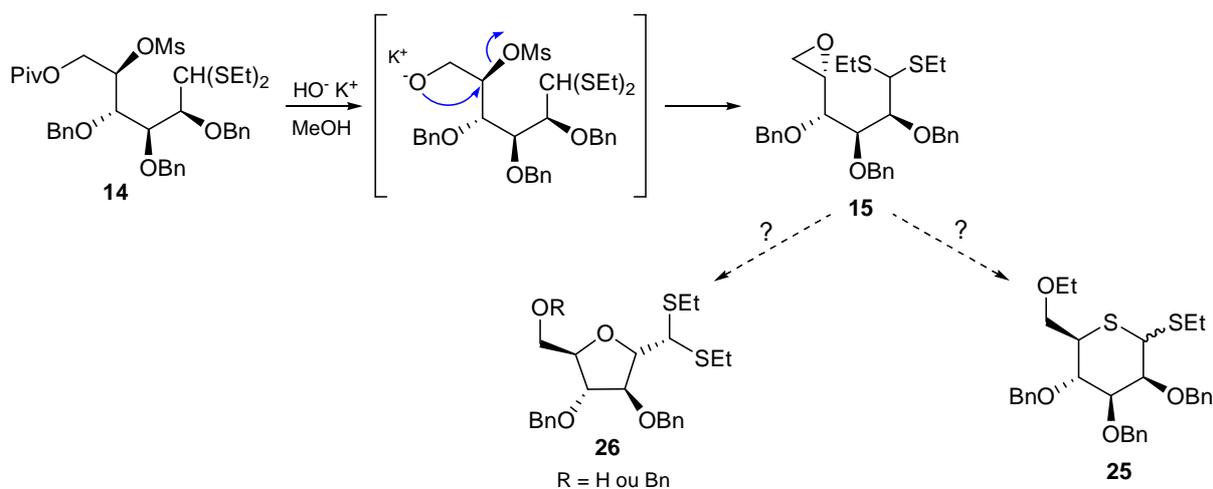
¹⁷² Kirilyuk B.A., Mel'nitskii I.A., Golub N.M., Kiladze T.K., Kantor E.A., Rakhmankulov D.L. *Zhurnal Organicheskoi Khimii* **1987**, 23, 9, 1981

¹⁷³ Ikeshita K.-I., Kihara N., Sonoda M., Ogawa A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3025

2) Série D-Mannose

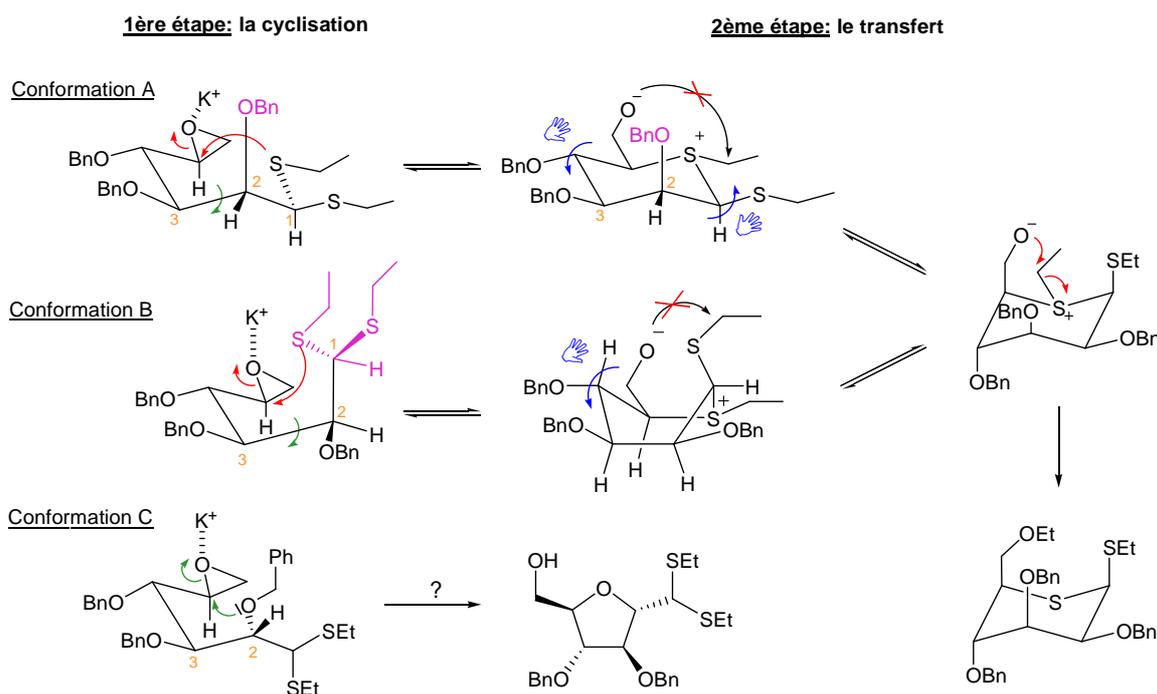
Disposant de composé pivaloylé-mésylé **14** issu du D-Mannose nous avons testé la méthodologie en milieu anhydre afin d'obtenir les thiosucres correspondant. Sachant que la conformation pré-chaïse, la plus favorable, du D-Mannose induit préférentiellement une cyclisation furanique avec l'hydroxyle protégé en position 2 (Cf. Chapitre A-II-2), nous nous attendons donc à rencontrer des difficultés similaires (Schéma 111).

Schéma 111 : Produits pouvant être formés lors de la réaction



Nos premiers essais ont été effectués avec 2,2 équivalents de potasse en plaques dans le méthanol de qualité CLHP. Après 8h de réaction, l'analyse par RMN du brut réactionnel nous montre la présence très majoritaire de l'époxo-dithioacétal **15** et de quelques traces d'un composé non identifiable à cet instant. Lorsque le brut est purifié sur gel de silice, la quantité du sous-produit observé augmente mais pas aussi significativement que dans le cas du D-Galactose. Comme nous le soupçonnions, la cyclisation (sous forme pyranique ou furanique) est lente et difficile. De plus cette difficulté augmente car, si la cyclisation à 6 chaînons a bien lieu, la conformation chaïse obtenue doit être favorable au transfert d'alkyle.

Schéma 112 : Etude des conformères favorables pour les deux étapes de la réaction



En étudiant l'état de transition (Schéma 112), on constate que :

- Dans le conformère A, le groupement benzyl du carbone 2 est en position axiale et perturbe stériquement la cyclisation du soufre positionné dans la bonne conformation pour réagir avec l'époxyde. Dans la deuxième étape, la conformation chaise 4C_1 obtenue ne permet pas le transfert du groupe alkyle. Or si l'équilibre conformationnel est en faveur du conformère 1C_4 alors la transposition peut avoir lieu.

- Le conformère B est moins favorable que A car, cette fois, c'est le groupement dithioacétal qui se trouve en position axiale, mais il peut toujours réagir avec l'époxyde pour conduire à l'intermédiaire zwitterionique dans une conformation de type bateau. Toutefois, l'alkyle le plus proche de l'alcoolate ne peut subir de transposition car le soufre auquel il appartient n'est pas activé. Par conséquent, seule la conformation 1C_4 est, à nouveau, favorable à cette transposition.

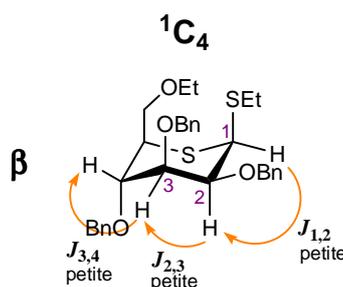
- Tous les groupements encombrants sont en position équatoriale dans le conformère C. Cependant le soufre n'est plus dans une position favorable pour réagir avec l'époxyde. Cette dernière conformation est donc stérile pour une cyclisation à 6 chaînons. Mais elle est très favorable pour la formation éventuelle de furanes.

Il est à noter que la configuration β semble très privilégiée. La configuration α est obtenue lorsqu'un seul des deux groupements SEt est en position équatoriale (rotation de 60° selon la liaison C1-C2).

Cette étude nous montre que c'est la conformation 1C_4 la plus défavorable du D-Mannose (majorité des substituants en position axiale) qui va permettre le transfert du groupement alkyle. Par conséquent pour déplacer l'équilibre conformationnel en sa faveur, nous avons décidé de chauffer le

système à 40°C, dans un premier temps. Après 4 heures de chauffage, nos analyses n'ont montré aucun changement majeur. Nous avons alors poursuivi notre étude en chauffant à 60°C. Après 2 heures, on observe sur CCM la formation d'un nouveau composé moins polaire. Après 12 heures, la dégradation est amorcée, on isole alors le composé nouvellement formé et un produit ayant le même rapport frontal que notre époxy-dithioacétal mais dont la révélation à l'anisaldéhyde semble différente. Les analyses spectroscopiques effectuées sur le premier composé n'ont malheureusement pas permis de l'identifier (la spectrométrie de masse nous indique qu'il ne s'agit pas du furane **26** résultant de la cyclisation de l'hydroxyle en position 2 du sucre sur l'époxyde). Par contre, le produit possédant le même rapport frontal que **15** correspond à un thiosucre **25** avec un rendement de 24%. Le spectre RMN corrobore d'ailleurs avec le spectre du β -thiosucre obtenu dans le cas du D-Galactose. Pour établir la configuration anomérique, nous nous sommes intéressés aux constantes de couplage $J_{1,2}$, $J_{2,3}$ et $J_{3,4}$. Dans notre cas, elles sont relativement petites et correspondent, selon nos remarques faites dans le Chapitre A-II-2 et dans l'annexe A, à la conformation β 1C_4 (Schéma 113). Nous distinguons également des traces du thiosucre de configuration α . Cette conformation surprenante doit être validée par des analyses nOe.

Schéma 113 : Constantes de couplages J observées



La formation de thiosucre à partir de l'époxy-dithioacétal issu du D-Mannose demande des conditions plus dures que dans le cas du D-Galactose. Hormis la nécessité d'utiliser le méthanol de qualité CLHP, la réaction doit être chauffée, au plus, à 60°C. Selon les analyses effectuées, nous obtenons, à nouveau, le thiosucre de configuration β très majoritairement. Ce composé est d'ailleurs remarquable pour sa conformation chaise 1C_4 peu commune (Cf. Annexe A) qui reste à être confirmée par analyses des effets nOe. Ces résultats, très encourageants, devront être optimisés pour limiter la dégradation et la formation du composé moins polaire, qui serait intéressant d'identifier également.

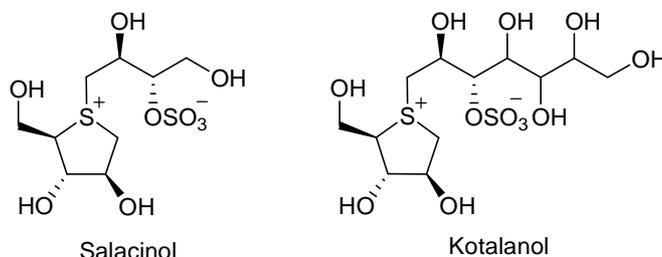
Cette nouvelle voie de synthèse, très prometteuse, de thiosucres pyraniques nous amène à envisager également la préparation de thiosucres furaniques tels que le Salacinol et ses dérivés.

II) Approche synthétique du motif cyclique du Salacinol et du Kotalanol

1) Introduction

Le Salacinol et le Kotalanol (Schéma 114) sont deux inhibiteurs de glycosidases extraits des racines et des tiges d'une plante sri lankaise *Salacia Reticulata*.¹⁷⁴ A l'origine, ces substances naturelles étaient utilisées dans le traitement des diabètes de type II au Sri Lanka et en Indes.¹⁷⁵ Aujourd'hui, un grand intérêt est porté à leur structure zwitterionique sulfonium-sulfate. En effet, grâce à la charge positive permanente sur l'atome de soufre et la forme du cycle, ces deux dérivés sont d'excellents candidats potentiels pour mimer l'ion oxacarbénium dans l'état de transition des réactions d'hydrolyses.¹⁷⁶

Schéma 114 : Structure du Salacinol et du Kotalanol



La littérature décrit de nombreuses synthèses de ces substances et de leurs diastéréoisomères¹⁷⁷ ainsi que des analogues séléniés (Blintol),¹⁷⁸ ammonium (ghavamiol)^{179, 177e} avec ou sans extension de la chaîne latérale.¹⁸⁰

Nous proposons ici une synthèse relativement courte du motif thiosucre (7-8 étapes) en se basant sur les travaux effectués en série pyranique.

¹⁷⁴ (a) Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G., Muraoka O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8367; (b) Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 1339; (c) Houston T.A., Blanchfield J.T. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 669; (d) Lillelund V.H., Jensen H.H., Liang X.F., Bols M. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 515

¹⁷⁵ Matsuda H., Morikawa T., Yoshikawa M. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 1301

¹⁷⁶ Kuntz D.A., Ghavami A., Johnston B.D., Pinto B.M., Rose D.R. *Tet. Asym.* **2005**, 16, 25

¹⁷⁷ (a) Yuasa H., Takada J., Hashimoto H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 34, 6615; (b) Ghavami A., Johnston B.D., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2312; (c) Kumar N.S., Pinto B.M. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 17, 2612; (d) Muraoka O., Yoshikai K., Takahashi H., Minematsu T., Lu G., Tanabe G., Wang T., Matsudab H., Yoshikawab M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 500; (e) Liu H., Sim L., Rose D.R., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 8, 3007

¹⁷⁸ (a) Ghavami A., Sadalpure K.S., Johnston B.D., Lobera M., Snider B.B., Pinto B.M. *Synlett* **2003**, 9, 1259; (b) Ghavami A., Johnston B.D., Maddess M.D., Chinapoo S.M., Jensen M.T., Svensson B., Pinto B.M. *Can. J. Chem.* **2002**, 80, 937; (c) Liu H., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2, 753

¹⁷⁹ Nasi R., Pinto B.M. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 2305

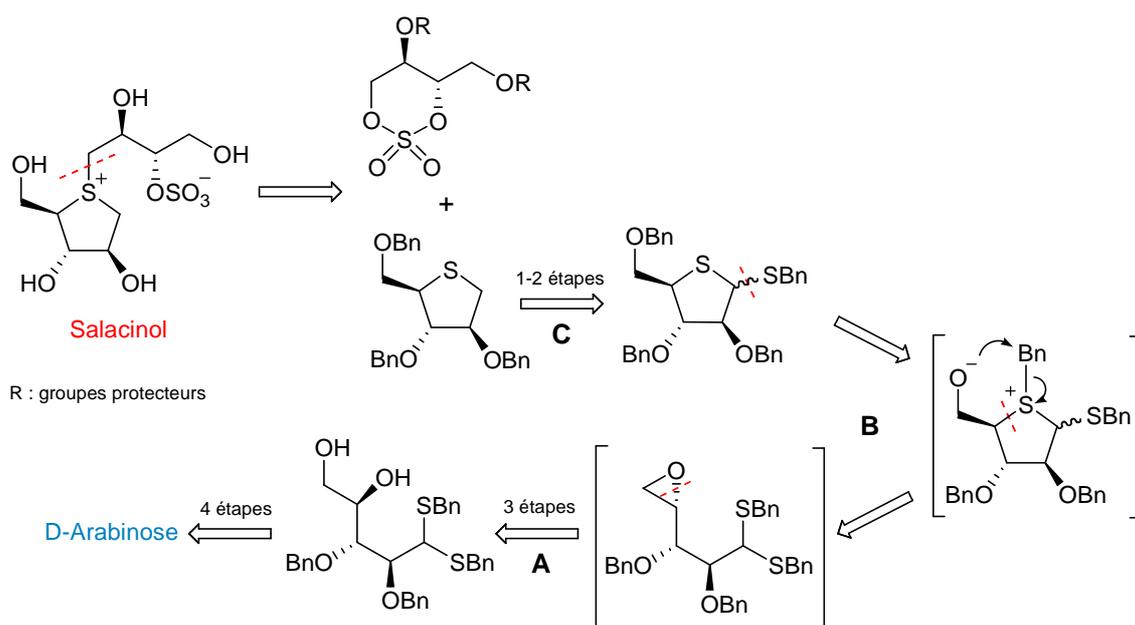
¹⁸⁰ Nasi R., Sim L., Rose D.R., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1, 180

2) Rétrosynthèse

Le schéma rétrosynthétique suivant présente les trois éléments clé de l'approche courte que nous envisageons (Schéma 115) :

- A : formation de l'époxyde précurseur de la cyclisation furanique anticipée.
- B : transfert du groupe benzyl présent sur le soufre, comme nous l'avons observé pour le groupe éthyle dans le cas du D-Galactose.
- C : réduction sélective du sulfure anomérique.

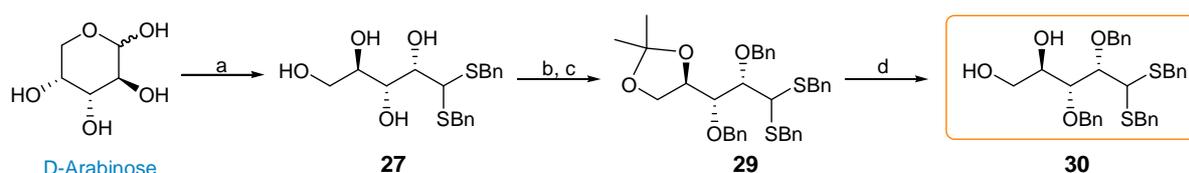
Schéma 115 : Approche rétrosynthétique du motif thiosucre du Salacinol



3) Discussion

Le diol **30**, précurseur de l'époxyde, est synthétisé en suivant le même schéma directeur défini dans les cas du D-Galactose et du D-Mannose. Cependant, cette fois l'éthane thiol est remplacé par le benzyl mercaptan pour protéger la fonction aldéhydique du D-Arabinose. Ce choix se révèle crucial étant donné que le groupe transféré dans l'étape B devra pouvoir en fin de synthèse, être déprotégé de la position 5. Le reste de la synthèse est analogue et le diol **30** est obtenu avec un rendement global de 68% (Schéma 116).

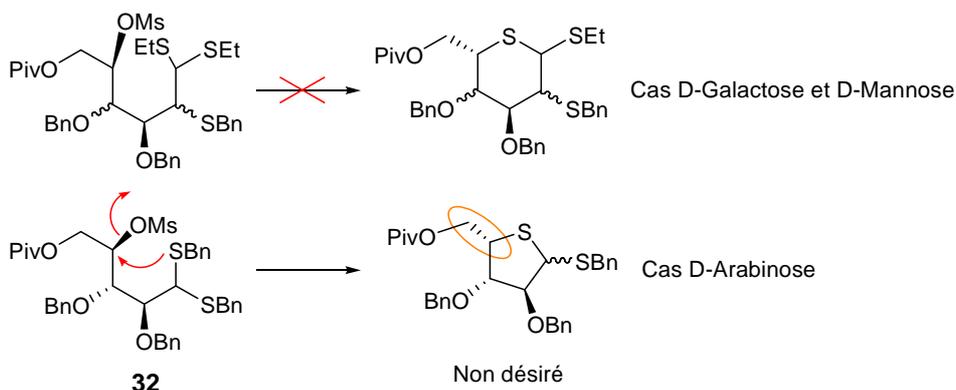
Schéma 116 : Synthèse du diol 45 précurseur de l'époxyde



a) BnSH, HCl 12N, 80% ; b) $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$, PPTS, acétone (obtention du composé **43**);
c) NaH, BnBr, $n\text{Bu}_4\text{NI}$, Imidazole, DMF (95% sur 2 étapes); d) AcOH 75% aq., 60°C, 90%

Dans les cas D-Galactose et D-Mannose, la suite Pivaloylation / Mésylation effectuée sur le diol s'était révélée judicieuse car aucune cyclisation spontanée à 6 chaînons sur le carbone mésylé n'avait été observée. Une stabilité analogue serait appréciable dans le cas du D-Arabinose car l'attaque directe du soufre sur la position mésylée fournirait la configuration inverse de celle nécessitée pour la synthèse du salacinol (Schéma 117) !

Schéma 117 : Autre cyclisation possible



Selon la littérature, la formation d'un cycle à 5 chaînons lors de l'attaque d'un soufre sur une fonction mésylée, nécessite des conditions assez dures. Les réactions sont effectuées à reflux du solvant (DMF ou pyridine), en présence d'activateurs iodés (NaI, TBAI) associés au carbonate de baryum et conduisent aux thiosucres correspondants avec d'excellents rendements (~94%).¹⁸¹ Ces informations sont encourageantes pour notre étude, par conséquent nous avons tenté notre chance.

Nous avons testé deux types de protection sur l'alcool primaire :

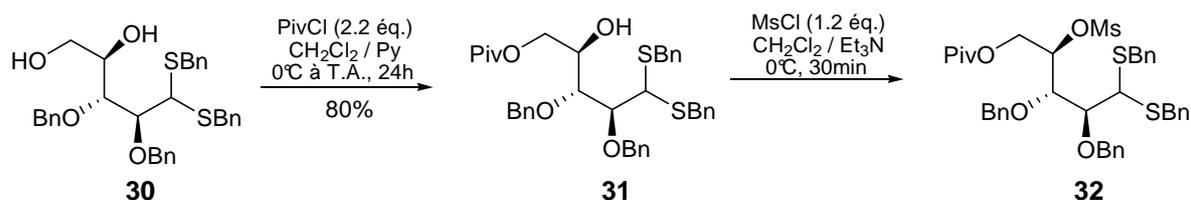
- le groupement pivaloyl (analogie avec les deux études précédentes)
- un groupement silylé encombrant : le *tert*-butyldiphénylsilyle. Ce groupe est intéressant car sa déprotection par le fluorure de *tétra*-nbutylammonium (par exemple) est une méthode différente des conditions basiques KOH/Méthanol décrites dans les cas D-Galactose et D-Mannose permettant d'atteindre l'époxyde.

► Dérivé pivaloylé

Notre méthode, en un seul pot, pour la protection du diol **30** par le chlorure de pivaloyl **31** puis par le chlorure de mésyle **32**, ne s'est pas révélée satisfaisante. Parmi les nombreux produits obtenus, la spectrométrie de masse nous indique la présence du thiosucre pivaloylé résultant de l'attaque d'un soufre sur le mésylate (Cf. Schéma 117). L'utilisation de la pyridine comme base pour la mésylation a été remise en cause et, par conséquent, nous avons effectué les deux étapes séparément (Schéma 118).

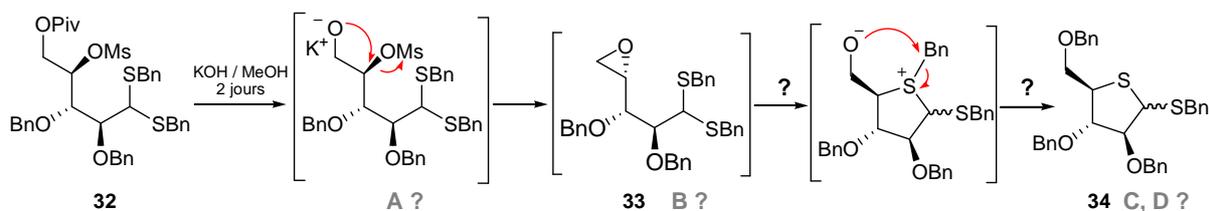
¹⁸¹ (a) Wirsching J., Voss J. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 691; (b) Jeong L.S., Moon H.R., Choi Y.J., Chun M.W., Kim H.O. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4821 et références citées

Schéma 118 : Synthèse du dérivé pivaloylé-mésylé 32



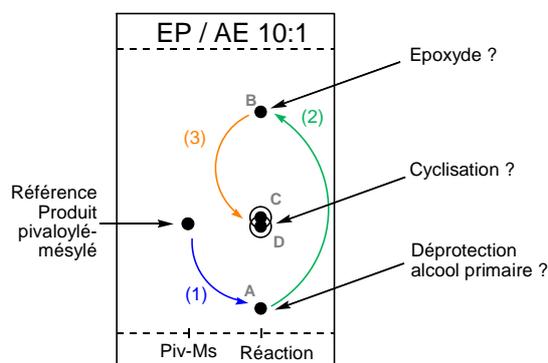
La protection de l'alcool primaire ne présente aucune difficulté et l'ester **31** obtenu est facilement chromatographiable. Lors de la mésylation effectuée à température ambiante, nous avons observé la formation d'un produit de plus haut Rf après une demi-heure de réaction. Cependant ce composé, très probablement le mésylate souhaité, est instable sur silice. En effet, à l'aide d'une plaque bidimensionnelle, vous voyons clairement apparaître un produit à Rf nul. La réaction est alors rapidement stoppée et le brut a été utilisé sans purification. Ce dernier a été placé dans les conditions KOH/Méthanol (CLHP) décrites afin d'observer la formation de l'époxyde **33** (Schéma 119).

Schéma 119 : Conditions KOH/Méthanol (CLHP)



Rapidement un produit très polaire **A** est visible à bas Rf, que nous supposons être l'alcool primaire déprotégé (voie 1 bleue). De manière concomitante, apparaît un composé peu polaire **B** (Rf assez élevé), parasité par un autre produit. Nous pensons qu'il s'agit de l'époxyde **33** (voie 2 verte). Après 2 jours, la réaction a finalement évolué vers deux autres composés **C** et **D** de Rf très proches (Rf ~0,4) (voies 3 orange) (Schémas 119 et 120).

Schéma 120 : Evolution de la réaction au cours du temps (CCM)



L'analyse des composés isolés par spectrométrie de masse n'a malheureusement pas permis de les identifier clairement.

Les informations que nous pouvons extraire de ces premiers résultats sont :

- la combinaison Pivaloyl-Mésyl ne se révèle pas aussi aisée à manipuler que dans les cas du D-Galactose et du D-Mannose. Le carbone portant le mésyle semble plus réactif que ne le laisse entendre la littérature pour des exemples analogues. La présence d'un l'ester (groupement pivaloyl en lieu et place du benzyl dans les références citées) accentue, sans doute par effet inductif, cette électrophilie. Ceci conforte l'idée d'utiliser un autre type de protection pour l'alcool primaire.

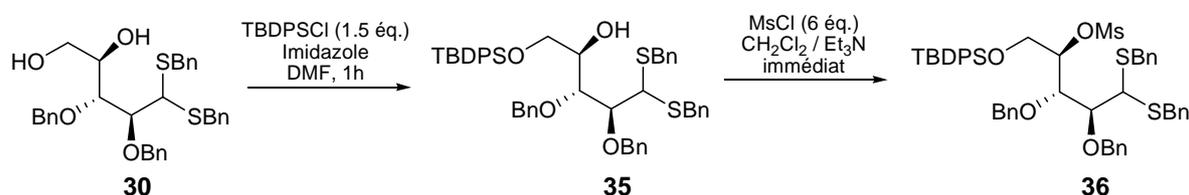
- L'époxyde sera probablement difficile à isoler car il est au cœur de la cascade de réactions.

Remarque : Afin de contourner les difficultés liées à la mésylation, nous avons tenté d'introduire un groupement tosyle sur l'alcool secondaire. Après trois jours de réaction (Chlorure de tosyle en présence de triéthylamine), aucune transformation n'a été observée, même après ajout de DMAP.

► Dérivé silylé

Le dérivé silylé **35** est obtenu quantitativement par réaction du chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle en présence d'imidazole sur le diol **30** dissous dans le DMF (Schéma 121)

Schéma 121 : Protection par un groupement silylé et mésylation

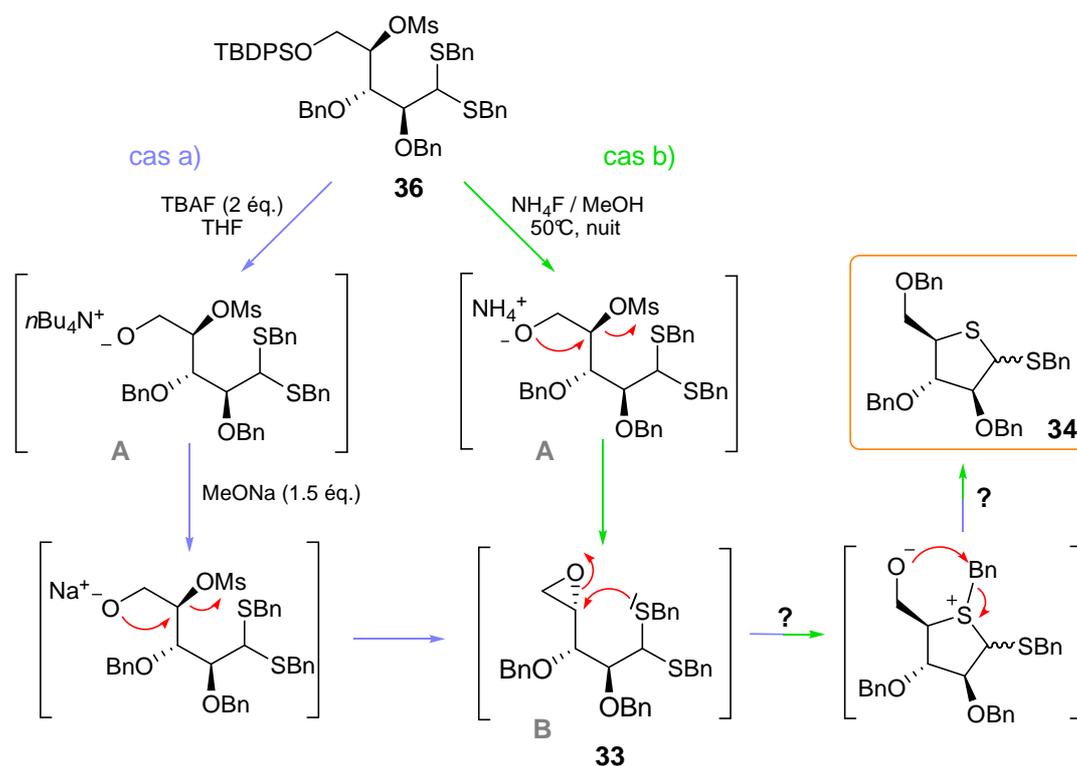


La mésylation conduit, cette fois, à un composé **36** plus aisé à manipuler qu'en série pivaloylée (peu de sous-produit à R_f nul observé). Toutefois, il ne sera pas chromatographié par mesure de précaution.

Deux méthodes de déprotection ont été testées pour démarrer la cascade formation d'époxyde-ouverture de l'époxyde vers le thiofurane désiré (Schéma 122). Le composé **36** est traité :

- soit par une solution 1M de TBAF dans le THF à température ambiante (cas a)
- soit par le fluorure d'ammonium dans le méthanol à 50°C (cas b)

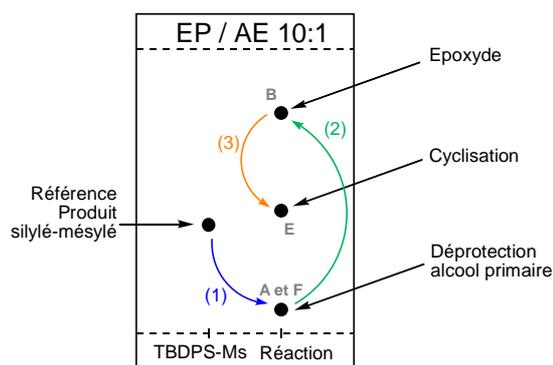
Schéma 122 : Deux méthodes de déprotection utilisées



Cas a) : TBAF comme agent déprotecteur

Une nouvelle fois, on observe rapidement la formation d'un produit très polaire. Celui-ci étant de Rf identique au composé **A** formé dans la réaction étudiée avec le groupement pivaloylé, il s'agit sans aucun doute de l'alcool primaire déprotégé car c'est un intermédiaire commun à ces deux réactions. Après plusieurs heures et concentration du milieu réactionnel, aucune évolution vers les produits précédemment observés n'a été constatée. Pour réactiver le système, nous avons ajouté 1,5 équ. de méthanolate de sodium comme le préconise la littérature dans certains cas avec des groupes TBS.¹⁸² Le produit **B** apparaît alors et donne par la suite un composé **E** dont le Rf coïncide avec les dérivés **C** et **D** observés précédemment (Schémas 120 et 123). La réaction est plus propre qu'avec les dérivés pivaloylés, mais elle n'est pas complète.

Schéma 123 : Evolution de la réaction au cours du temps (CCM)

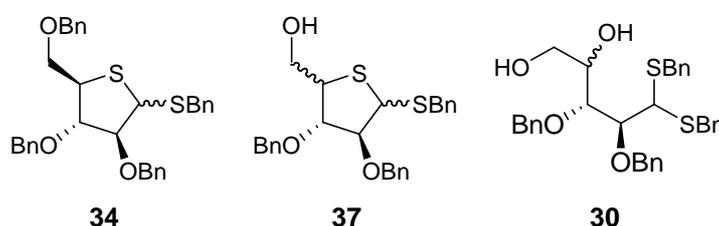


¹⁸² (a) Aguilard N., Moyano A., Pericas M.A., Riera A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 20, 3913; (b) Castejon P., Moyano A., Pericas M.A., Riera A. *Tetrahedron* **1996**, 52, 20, 7063; (c) Castejon P., Pasto M., Moyano A., Pericas M.A., Riera A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 17, 3919

Après séparation des produits **A** et **E** (il est à noter que nous n'isolons pas de produit **B**), les analyses spectrométriques nous informent que :

- Le produit **A** isolé est en réalité un mélange de diols **30** régénérés et pollués par différents composés non identifiés.
- Selon la RMN du proton, l'échantillon **E** correspond à un mélange des composés **34** et **37** ne possédant pas de fonction CH₂ typique d'un époxyde. Ces produits semblent donc avoir subi une cyclisation. Le transfert du groupement benzyl est observé pour le produit **34** obtenu majoritairement, mais pas pour **37** (Schéma 124). Ce dernier pourrait également résulter de la substitution directe du groupe mésyl par un des thiobenzyles...

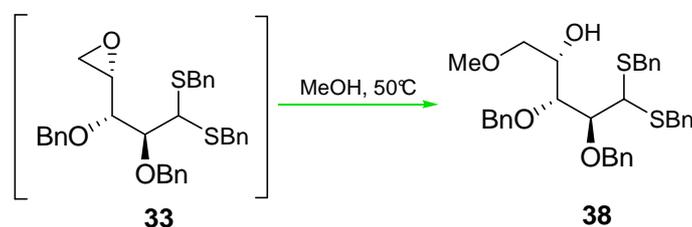
Schéma 124 : Produits **34**, **37** et **30** observés dans le cas a)



Cas b) : NH₄F comme agent déprotecteur

La déprotection du groupe silylé par le fluorure d'ammonium conduit, en toute logique, au composé **A** de bas Rf. Puis on observe la formation du produit **B** (très probablement l'époxyde **33**) puis d'un produit **G** (nommé **38**) dont le rapport frontal est très proche des composés **34** et **37**. Or les analyses effectuées ont montré que ce nouveau composé **38** résulte de l'addition du méthanol sur l'époxyde **33** (Schéma 125) ! Cette expérience est en accord avec la formation *in situ* de l'époxyde mais ne permet plus la cyclisation attendue. Pour éviter la formation de ce genre de produit, il faudra songer à utiliser d'autres solvants plus « inertes », tels que l'isopropanol ou le *tert*-butanol, et peut-être abaisser la température de réaction.

Schéma 125 : Addition du solvant sur l'époxyde **B**



L'approche du motif thiosucrose du Salacinol à partir du D-Arabinose est ambitieuse. Elle nécessite quatre cascades in situ car l'époxyde intermédiaire semble difficilement isolable :

- déprotection de l'alcool primaire

- formation de l'époxyde par substitution nucléophile de l'alcoolate généré sur le mésyle
- ouverture de l'époxyde par un des deux thiobenzyles
- transfert du groupement benzyl sur l'alcoolate primaire formé

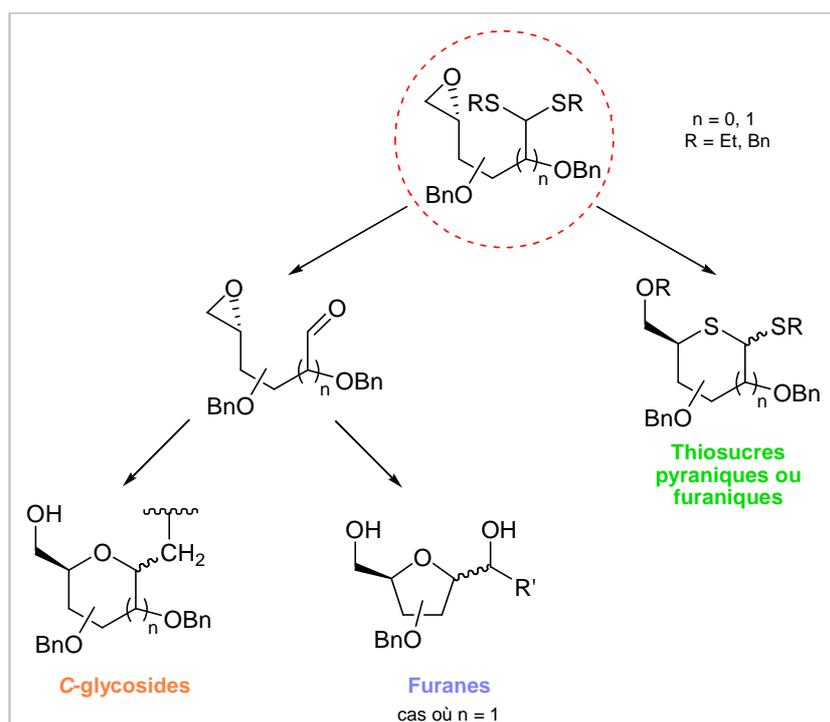
Les premiers essais nous montrent que la protection de l'alcool primaire par un groupement silylé est plus adéquate que celle impliquant un groupe pivaloyl. Plusieurs produits cyclisés ont été observés et nous encourageant à progresser avec les dérivés silylés et à améliorer notamment les conditions de réaction du cas b).

III) Conclusion

Qu'il soit isolé ou non, le composé époxy-dithioacétal est un véritable pivot pour divers projets synthétiques : synthèse de C-glycosides, de furanes, de thiosucres pyraniques et furaniques (Schéma 126).

Puis de sites nucléophiles, la présence de traces d'eau dans le milieu est essentielle pour sa préparation et sa stabilité vis-à-vis des réactions intramoléculaires possibles : addition nucléophile d'un soufre sur l'époxyde suivie d'un transfert du groupement alkyle porté par le soufre. L'étude de ces réactions secondaires nous a permis de les généraliser à d'autres sucres, le D-Mannose et le D-Arabinose et de les valoriser dans la synthèse de thiosucres au potentiel biologique notoire.

Schéma 126 : L'époxy-dithioacétal : pivot pour divers synthèses



CONCLUSION

Douze ans après l'étude des relations structure-activité, le KRN 7000 suscite énormément d'intérêts. Sa capacité à interagir avec les cellules TNK de l'immunité lui confère des propriétés immunostimulantes significatives. Parmi les différents analogues synthétisés à ce jour, qu'ils soient O- ou C-Glycosidiques, plusieurs possèdent également ce caractère immunostimulant et sont connus pour induire préférentiellement un certain type de réponses immunitaires. L'aboutissement des recherches consiste à synthétiser des analogues capables de provoquer une seule réponse immunitaire adaptée, soit au traitement des maladies auto-immunes (Th2), soit à celui des maladies pathogéniques (Th1).

Interpellés par le potentiel biologique (Th1) du composé C-glycosidique plus significatif que son parent, à très faibles doses, nous avons entrepris de synthétiser un nouvel analogue de ce type selon la stratégie NOÉ élaborée au laboratoire : addition Nucléophile-Ouverture de l'Époxyde, sachant qu'en série D-Galactose cette stratégie s'est révélée très efficace pour préparer des C-Galactosides plus ou moins fonctionnalisés en position anomérique.

Soumis à des tests immunologiques, notre analogue nous a apporté des informations très intéressantes.

Le projet « Synthèses d'analogues C-glycosidiques du KRN 7000 » est vaste, ambitieux et très motivant. Il m'a permis, durant ces trois années de thèse, de m'impliquer dans un réseau de collaborations regroupant divers domaines : modélisation moléculaire, chimie organique, méthode de purification originale, immunologie.

Forts du succès de la stratégie NOÉ avec un dérivé du D-Galactose, nous avons tenté d'appliquer cette méthode sur un autre sucre, le D-Mannose. Nous avons alors observé un comportement particulier de l'alcool 1,2-syn intermédiaire isolé, obtenu à l'issue de l'addition de nucléophiles de type acétyléniques et indoliques sur l'époxyaldéhyde dérivé du D-Mannose. Dans des conditions acides, une déprotection de l'hydroxyle en position 2 du sucre a lieu au profit d'une cyclisation à 5 chaînons sur l'époxyde intramoléculaire. Il est possible d'isoler, à la fois un mélange α,β -C-Mannosides et des

Conclusion

furanes dans le cas d'addition d'alcynures. Ainsi, les tests d'additions nucléophiles effectués sur l'époxyaldéhyde issu du D-Mannose ont permis de découvrir un autre aspect de la stratégie NOÉ : accès à des composés furaniques α -fonctionnalisés.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes également intéressés à une réaction secondaire perturbant la synthèse des époxydes des futurs substrats aldéhydiques. En effet, par son caractère nucléophile, un soufre peut s'additionner sur l'époxyde intermédiaire, pour donner un thiosucre. Ce phénomène est observable en série D-Galactose et D-Mannose, offrant une perspective dans le cas du D-Arabinose pour synthétiser le Salacinol.

PARTIES EXPERIMENTALES

Instrumentations et Solvants

Résonance Magnétique Nucléaire :

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^1H) et du carbone (RMN ^{13}C) ont été enregistrés dans le chloroforme deutérié (CDCl_3) sur des appareils Bruker AC 250 et AC 500 (respectivement 250 MHz (^1H) et 62,89 MHz (^{13}C), 500 MHz (^1H) et 125 MHz (^{13}C)) à l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de Reims Champagne-Ardenne. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au signal du chloroforme (7,26 ppm) et du TMS (0 ppm) pris comme références internes. Les constantes de couplages J déterminées sont exprimées en Hertz (Hz) et la multiplicité des signaux est symbolisée comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), dd (doublet de doublet), dt (doublet de triplet), ddd (doublet de doublet de doublet).

Les produits dérivés de sucre ont été nommés selon la nomenclature simplifiée des sucres.¹⁸³ Les autres produits ont été nommés selon la nomenclature définie par l'IUPAC. Cependant, dans un souci de simplification pour les comparaisons, nous avons attribué à chaque carbone une numérotation propre et différente de celle donnée par la nomenclature, afin de mieux apprécier l'évolution de leurs déplacements chimiques au cours de la synthèse.

L'attribution des protons et des carbones a été effectuée grâce aux corrélations 2D (HMOC et HMBC) dans les cas où cela a été possible.

Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse (SM) est effectuée sur un appareil Micromass Q-TOF micro (température de la source = 80°C, CV = 30). L'ionisation est obtenue par électrospray en mode positif. Les masses molaires sont exprimées en g/mol et le terme LRMS sera indiqué si l'analyse a été faite à basse résolution et HRMS si elle a été faite à haute résolution.

Analyses élémentaires :

Les analyses élémentaires ont été effectuées au service de microanalyse de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de Reims Champagne-Ardenne sur un appareil Flash EA 1112 series.

Spectrométrie infrarouge :

Les spectres infrarouge (IR) ont été réalisés sur un appareil à transformée de Fourier AVATAR 320 FT-IR soit sous forme de pastille au bromure de potassium, soit sous forme de film. Les nombres d'ondes ν sont exprimés en cm^{-1} .

¹⁸³ McNaught A. D. *Nomenclature of Carbohydrates*, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919

Parties expérimentales

Spectrométrie UV :

Les spectres UV ont été réalisés sur un spectrophotomètre KONTRON Instrument modèle UVIKON 941 plus. Les spectres sont traités par le logiciel UVS900Lite.

Pouvoirs rotatoires :

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer modèle 341 à lampe de sodium ($\lambda=589\text{nm}$, notée D). Ils sont notés comme suit :

$$[\alpha]_{\text{longueur d'onde}}^{\text{température}(\text{°C})} = \quad , \text{ (concentration en g/ml, solvant)}$$

Point de fusion :

Les points de fusion (PF) ont été déterminés en tube capillaire à l'aide d'un appareil Büchi 510.

Chromatographie :

L'évolution des réactions est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice MERCK ART 5554 DC ALUFOLIEN FIESELGEL 60PF₂₅₄. Les rapports frontaux sont notés R_f (éluant). Les produits sont révélés avec une lampe UV à 254 nm et avec l'un des réactifs suivants : solution d'acide phosphomolybdique, de permanganate de potassium, d'anisaldéhyde, solution de molybdate de césulfate d'ammonium.

La purification des produits est réalisée par chromatographie sur colonne sur gel de silice MERCK ART 9385 KIESELGEL 60 (0,040-0,063mm).

La purification par CPC est réalisée sur un appareil FCPC200 de capacité volumique de 200 mL, contenant un rotor (vitesse de rotation 800-1600 tr/min) formé par l'empilement de 20 disques en Acier Inox dans lesquels sont gravées 1320 cellules de partage. Ce prototype a été fourni par Kromaton Technologies (Angers).¹³⁹

Solvants et réactifs:

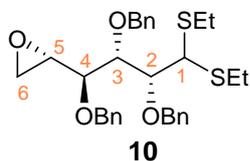
Les purifications des solvants et des réactifs ont été effectuées suivant les méthodes décrites par Perrin et Armarego :¹⁸⁴

- le tétrahydrofurane et l'éther diéthylique sont distillés sur sodium et benzophénone juste avant l'emploi
- le dichlorométhane, la pyridine et la triéthylamine sont distillés sur hydrure de calcium juste avant l'emploi
- le toluène et le N,N-diméthylformamide sont distillés sur hydrure de calcium et sont conservés sous argon
- le méthanol utilisé est de qualité CLHP

Toutes les réactions en milieu anhydre ont été réalisées sous atmosphère d'argon et avec une verrerie préalablement séchée à l'étuve et refroidie sous courant d'argon.

¹⁸⁴ Perrin D. D., Armarego W. L. F. *Purification of laboratory chemicals*, 3^{ème} Ed. Pergamon Press, 1988

Partie Expérimentale du Chapitre A

5,6-anhydro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-(diéthyl)dithioacétal-*L*-altro-hexose (10)Formule : C₃₁H₃₈O₄S₂ $\mathcal{M} = 538,221$ g/mol

Aspect: huile jaunâtre

Mode opératoire :

Le dérivé pivaloylé-mésylé [6-*O*-pivaloyl-5-*O*-méthylsulfonyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-(diéthyl)dithioacétal-*D*-galacto-hexose] **9** (1 éq., 120 mg, 0,17 mmol), dissous dans un mélange méthanol/eau 99:1 (1,7 mL) est traité à 0°C par de la potasse (2 éq., 19,7 mg, 0,34 mmol). La solution est agitée à température ambiante pendant 3h. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par de l'eau et de l'éther éthylique. La phase étherée est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée.

Rendement : 98 % (brut)**R_f** = 0,70 (EP/AE 80/20)**RMN ¹H** (CDCl₃, 500 MHz, δ, ppm) :

7,40-7,26 (m, 15H, 3 Ph)

4,94-4,73 (4 d, 4H, 2 CH₂-Ph, *J*=10,9 Hz et *J*=11,1 Hz)4,60 (2 d, 2H, CH₂-Ph, *J*=11,9 Hz)4,23 (dd, 1H, H4, *J*=3,4, 6,9 Hz)4,01 (dd, 1H, H3, *J*=4,0, 6,9 Hz)3,93 (d, 1H, H2, *J*=4,0 Hz)

3,45-3,34 (m, 2H, H1, H5)

2,80-2,55 (m, 6H, 2 CH₂-CH₃, 2 H6)1,20 (t, 6H, 2 CH₂-CH₃, *J*=7,3 Hz)**RMN ¹³C** (CDCl₃, 500 MHz, δ, ppm) :

138,6-138,1 (Cq Bn)

128,3-127,3 (CH Bn)

82,9 (C2)

82,3 (C4)

78,7 (C5)

75,6 (CH₂-Ph (C2))75,1 (CH₂-Ph (C3))72,3 (CH₂-Ph (C4))

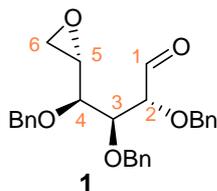
53,6 (C3)

50,7 (C1)

45,2 (C6)

25,4 (CH₂-CH₃)24,9 (CH₂-CH₃)14,5 (CH₂-CH₃)14,3 (CH₂-CH₃)**IR** (film, ν, cm⁻¹) : 3088, 3063, 3030, 2964, 2923, 2868, 1732, 1497, 1455, 1357, 1264, 1208, 1070, 846, 734, 698**HRMS** (m/z, ESI) : C₃₁H₃₈O₄S₂Na ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 561,2109 (calculé), 561,2107 (trouvé)

5,6-anhydro-2,3,4-tri-O-benzyl-L-altro-hexose (1)



Formule : $C_{27}H_{28}O_5$

$M = 432,194$ g/mol

Aspect: huile incolore cristallisant partiellement

Mode opératoire :

5,73 g de composé soufré **10** (1 éq., 10,6 mmol) sont dissous dans un mélange THF/H₂O 7:3 (V_{Tot} = 100 mL). 2,17 g de carbonate de calcium (2,05 éq., 21,7 mmol) et 5,52 g de diiode sublimé (2,05 éq., 21,7 mmol) sont additionnés par portions et alternativement au mélange. Après 40-50 min de réaction, quelques gouttes d'une solution de Na₂S₂O₃ 10% sont ajoutés. Le mélange est extrait par de l'eau et de l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10)

Rendement : 68 % (sur les 2 étapes)

R_f = 0,45 (EP/AE 80/20)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

9,68 (d, 1H, H1, *J*=1,4 Hz)

7,37-7,24 (m, 15H, 3 Ph)

4,69 (d, 1H, CH-Ph, *J*=11,8 Hz)

4,65-4,47 (m, 4H, 4 CH-Ph)

4,30 (d, 1H, CH-Ph, *J*=11,3 Hz)

4,04 (dd, 1H, H2, *J*=1,4, 4,3 Hz)

3,94 (dd, 1H, H3, *J*=4,3, 5,9 Hz)

3,73 (dd, 1H, H4, *J*=4,0, 5,9 Hz)

3,33-3,25 (m, 1H, H5)

2,71 (dd, 1H, H6b, *J*=2,7, 5,3 Hz)

2,64 (dd, 1H, H6a, *J*=3,8, 5,3 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

202,1 (C1)

138,6-137,5 (Cq Bn)

129,0-128,3 (CH Bn)

83,9 (C2)

80,9 (C4)

76,7 (C5)

74,3 (2 CH₂-Ph sur les positions 2 et 3)

73,9 (CH₂-Ph sur la position 4)

52,2 (C3)

45,0 (C6)

[α]_D²⁵ = + 17,8 (C = 1,0 g/mL, CHCl₃)

IR (film, ν, cm⁻¹) : 3088, 3062, 3031, 2874, 1732, 1497, 1454, 1090

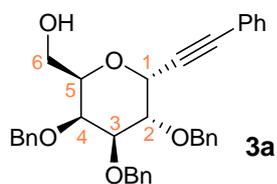
HRMS (m/z, ESI) : C₂₇H₂₈O₅Na (*M* + Na) = 455,1834 (calculé), 455,1836 (trouvé)

Remarque : Les produits de couplage suivants ont été préparés par le Dr Stéphane Guillaume au cours de son stage post-doctoral. Leurs analyses spectrales ont été insérées à ce manuscrit à titre d'information. Ces données sont disponibles dans les informations complémentaires de la publication correspondante.^{59b}

Mode opératoire général pour les alcynylations suivantes

L'alcyne, l'époxyaldéhyde, fraîchement purifié, et le bromure de lithium sont avant toute utilisation co-évaporés plusieurs fois au toluène puis séchés sous vide. L'alcynure de lithium est préparé par addition de n-butyllithium (0,9 équ.) à -78°C sur une solution d'alcyne (1 équ.) dans l'éther éthylique anhydre (0,49 mol/L). Le mélange est agité pendant 1h30 tout en laissant la température revenir à 0°C. Parallèlement le chlorure de zinc (1,9 équ.) est fondu sous vide puis dissous dans de l'éther éthylique anhydre (0,94 mol/L) à 0°C pendant 20 min. L'alcynure de lithium est, ensuite, ajouté progressivement à la solution de chlorure de zinc et le mélange est agité pendant 1h à 0°C. Puis une solution d'aldéhyde (0,29 équ.) dans l'éther éthylique anhydre (0,2 mol/L) est additionnée lentement. Le mélange est agité pendant 4h à 0-5°C. Enfin le bromure de lithium (1 équ.) est ajouté et le mélange réactionnel est agité 12h à température ambiante (T~23-26°C). La solution est diluée dans de l'eau et de l'éther éthylique. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée.

1-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-phénylacétylène



Formule : $C_{35}H_{34}O_5$

$\mathcal{M} = 534,241$ g/mol

Aspect: huile incolore

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (63,6 mg, 0,29 éq., 0,147 mmol) conduit au composé **3a** (57,2 mg, 0,107 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 73 %

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

7,45-7,26 (m, 20H, 4 Ph)

5,07 (d, 1H, H1, $J=5,6$ Hz)

4,98 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,7$ Hz)

4,90 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,7$ Hz)

4,85-4,72 (m, 3H, 3 CH-Ph)

4,66 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,5$ Hz)

4,19 (dd, 1H, H2, $J=5,6, 9,5$ Hz)

4,05-3,99 (m, 1H, H5)

3,96 (dd, 1H, H3, $J=2,9, 9,5$ Hz)

3,91 (d, 1H, H4, $J=1,1, 2,9$ Hz)

3,75 (dd, 1H, H6b, $J=6,5, 11,5$ Hz)

3,57-3,45 (m, 1H, H6a)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

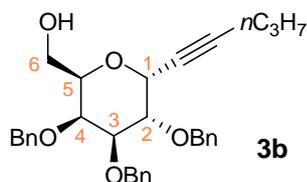
139,0, 138,9, 138,6, 132,4, 129,1, 129,0, 128,9, 128,8, 128,7, 128,5, 128,2, 128,1, 122,8, 88,9, 84,8, 80,2, 76,3, 75,1, 75,0, 74,4, 73,8, 73,3, 68,2, 62,7

$[\alpha]_D^{25} = +98,8^\circ$ ($C = 0,5$ g/mL, $CHCl_3$)

IR (film, v , cm^{-1}) : 3571, 3028, 2922, 2235, 1598, 1497, 1489, 1453, 1128

HRMS (m/z , ESI) : $C_{35}H_{34}O_5Na$ ($\mathcal{M} + Na$) = 557,2304 (calculé), 557,2295 (trouvé)

1-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-*n*-propylacétylène



Formule : C₃₂H₃₆O₅

\mathcal{M} = 500,256 g/mol

Aspect: huile incolore

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (59,2 mg, 0,29 éq., 0,137 mmol) conduit au composé **3b** (47,1 mg, 0,094 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 69 %

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

7,44-7,26 (m, 15H, 3 Ph)

4,97 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,7$ Hz)

4,91 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,7$ Hz)

4,87 (d, 1H, H1, $J=5,5$ Hz)

4,82-4,69 (m, 3H, 3 CH-Ph)

4,65 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,6$ Hz)

4,09 (dd, 1H, H2, $J=5,5, 9,5$ Hz)

3,99-3,85 (m, 3H, H3, H4, H5)

3,73 (dd, 1H, H6b, $J=6,6, 11,3$ Hz)

3,54-3,40 (m, 1H, H6a)

2,24 (dt, 2H, CH₂-CH₂-CH₃, $J=2,1, 7,1$ Hz)

1,60-1,47 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃)

0,98 (t, 3H, CH₂-CH₂-CH₃, $J=7,3$ Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

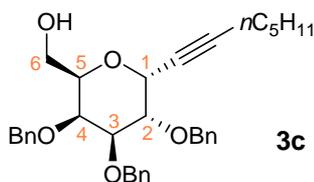
137,7, 137,4, 137,2, 127,6, 127,4, 127,3, 127,0, 126,7, 126,6, 88,1, 78,9, 74,7, 73,9, 73,6, 73,4, 72,5, 72,4, 71,8, 66,4, 61,3, 21,1, 19,8, 12,5

$[\alpha]_D^{25} = + 66,3^\circ$ (C = 0,55 g/mL, CHCl₃)

IR (film, v, cm⁻¹) : 3453, 3063, 3030, 2961, 2931, 2872, 1497, 1454, 1087

HRMS (m/z, ESI) : C₃₂H₃₆O₅Na (\mathcal{M} +Na): 523,2460 (calculé), 523,2474 (trouvé)

1-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-*n*-pentylacétylène



Formule : C₃₄H₄₀O₅

\mathcal{M} = 528,288 g/mol

Aspect: huile incolore

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (61,5 mg, 0,29 éq., 0,142 mmol) conduit au composé **3c** (47,0 mg, 0,089 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 63 %

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

7,43-7,26 (m, 15H, 3 Ph)

4,95 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,7$ Hz)

4,92-4,85 (m, 2H, 2 CH-Ph)

4,80-4,66 (m, 3H, H1, 2 CH-Ph)

4,63 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,5$ Hz)

4,08 (dd, 1H, H2, $J=5,5, 10,3$ Hz)

3,97-3,84 (m, 3H, H3, H4, H5)

3,72 (dd, 1H, H6b, $J=6,6, 11,3$ Hz)

3,53-3,40 (m, 1H, H6a)

2,24 (dt, 2H, CH₂-CH₂-CH₃, $J=1,9, 7,1$ Hz)

1,58-1,45 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃)

1,45-1,25 (m, 4H, CH₂-CH₂)

0,87 (t, 3H, CH₃, $J=7,1$ Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

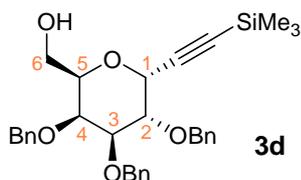
138,5, 138,2, 137,9, 128,4, 128,2, 127,3, 128,1, 128,0, 127,7, 127,5, 127,3, 89,1, 79,7, 75,5, 74,4, 74,1, 73,2, 72,5, 67,2, 62,1, 30,8, 28,1, 21,9, 18,6, 13,7

$[\alpha]_D^{25} = + 59,5^\circ$ (C = 0,4 g/mL, CHCl₃)

IR (film, v, cm⁻¹) : 3448, 3063, 3030, 2930, 2230, 1497, 1454, 1087

HRMS (m/z, ESI) : C₃₄H₄₀O₅Na (\mathcal{M} +Na): 551,2773 (calculé), 551,2775 (trouvé)

1-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-triméthylsilylacétylène



Formule : C₃₂H₃₈O₅Si

\mathcal{M} = 530,249 g/mol

Aspect: huile incolore

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (61,6 mg, 0,29 éq., 0,142 mmol) conduit au composé **3d** (44,0 mg, 0,083 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 62 %

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

7,43-7,27 (m, 15H, 3 Ph)	4,09 (dd, 1H, H2, $J=5,6, 9,5$ Hz)
4,95 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,7$ Hz)	3,95-3,80 (m, 3H, H3, H4, H5)
4,87 (d, 1H, H1, $J=5,6$ Hz)	3,72 (dd, 1H, H6b, $J=6,5, 11,3$ Hz)
4,86 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,7$ Hz)	3,53-3,40 (m, 1H, H6a)
4,80-4,70 (m, 3H, 3 CH-Ph)	0,18 (s, 9H, TMS)
4,65 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,5$ Hz)	

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

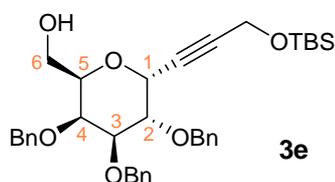
138,6, 138,2, 128,8, 128,6, 128,5, 128,4, 128,1, 127,9, 127,8, 127,7, 127,6, 100,5, 93,9, 79,3, 75,7, 74,6, 74,5, 73,9, 73,4, 72,7, 67,5, 62,3, 0,0

$[\alpha]_D^{25} = +63,7^\circ$ (C = 0,77 g/mL, CHCl₃)

IR (film, ν , cm⁻¹) : 3450, 3068, 3030, 2957, 2897, 2170, 1497, 1454, 1089

HRMS (m/z, ESI) : C₃₂H₃₈O₅SiNa (\mathcal{M} + Na): 553,2386 (calculé), 553,2397 (trouvé)

1-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)méthyl)-acétylène



Formule : C₃₆H₄₆O₆Si

\mathcal{M} = 602,306 g/mol

Aspect: huile jaunâtre

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (60,2 mg, 0,29 éq., 0,139 mmol) conduit au composé **3e** (57,9 mg, 0,096 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 69 %

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

7,42-7,28 (m, 15H, 3 Ph)	4,08 (dd, 1H, H2, $J=5,5, 9,5$ Hz)
4,96 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,5$ Hz)	3,98-3,88 (m, 3H, H3, H4, H5)
4,92-4,86 (m, 2H, H1, CH-Ph)	3,71 (dd, 1H, H6b, $J=6,5, 11,3$ Hz)
4,81-4,72 (m, 3H, 3 CH-Ph)	3,48 (dd, 1H, $J=5,2, 11,3$ Hz, H6a)
4,64 (d, 1H, CH-Ph, $J=11,5$ Hz)	0,91 (s, 9H, ^t Bu)
4,38 (d, 2H, CH ₂ OTBS, $J=1,9$ Hz)	0,12 (s, 6H, 2 CH ₃)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

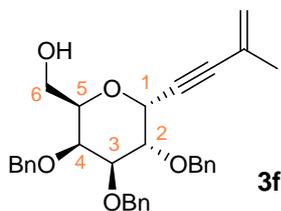
139,1, 138,7, 138,6, 129,1, 128,9, 128,8, 128,5, 128,3, 128,1, 128,0, 87,5, 80,7, 80,0, 76,0, 75,1, 75,0, 74,2, 74,0, 73,5, 67,8, 62,7, 52,3, 26,2

$[\alpha]_D^{25} = + 53,0^\circ$ (C = 0,8 g/mL, CHCl₃)

IR (film, v, cm⁻¹) : 3449, 3064, 3030, 2928, 2857, 1497, 1454, 1086

HRMS (m/z, ESI) : C₃₆H₄₆O₆SiNa (\mathcal{M} +Na): 625,2961 (calculé), 625,2963 (trouvé)

1-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-isopropénylacétylène



Formule : C₃₂H₃₄O₅

\mathcal{M} = 498,241 g/mol

Aspect: huile incolore

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (67,4 mg, 0,29 éq., 0,156 mmol) conduit au composé **3f** (56,5 mg, 0,113 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 73 %

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

7,44-7,24 (m, 15H, 3 Ph)	4,65 (d, 1H, CH-Ph, J =11,7 Hz)
5,34-5,30 (m, 1H, CH vinylique)	4,12 (dd, 1H, H2, J =5,5, 9,5 Hz)
5,28-5,24 (m, 1H, CH vinylique)	3,96-3,82 (m, 3H, H3, H4, H5)
4,97 (d, 1H, H1, J =5,5 Hz)	3,72 (dd, 1H, H6b, J =6,5, 11,3 Hz)
4,96 (d, 1H, CH-Ph, J =11,9 Hz)	3,40 (dd, 1H, H6a, J =3,9, 11,3 Hz)
4,87 (d, 1H, CH-Ph, J =11,9 Hz)	1,80 (s, 3H, CH ₃)
4,81-4,64 (m, 3H, 3 CH-Ph)	

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

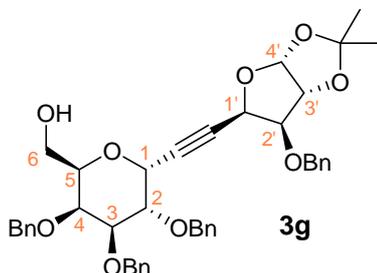
138,5, 138,4, 138,1, 128,6, 128,4, 128,3, 128,2, 127,9, 127,7, 127,6, 127,5, 126,1, 122,7, 89,5, 83,0, 79,6, 75,7, 74,5, 74,4, 73,7, 73,3, 72,7, 67,5, 62,1, 23,4

$[\alpha]_D^{25}$ = + 84,6° (C = 0,7 g/mL, CHCl₃)

IR (film, v, cm⁻¹) : 3449, 3088, 3063, 3030, 2921, 2884, 1612, 1497, 1454, 1090

HRMS (m/z, ESI) : C₃₂H₃₄O₅Na (\mathcal{M} +Na): 521,2304 (calculé), 521,2296 (trouvé)

3-O-benzyl-5,6-didésoxy-1,2-O-isopropylidène-6-C-(-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)- α -D-xylo-hex-5-ynofuranoside



Formule : $C_{43}H_{46}O_9$

$M = 706,314$ g/mol

Aspect: huile incolore

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (60,2 mg, 0,29 éq., 0,139 mmol) conduit au composé **3f** (68,7 mg, 0,097 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 70 %

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

7,40-7,23 (m, 20H, 4 Ph)	4,00 (d large, 1H, H4', $J=2,5$ Hz)
5,97 (d, 1H, H1', $J=5,5$ Hz)	3,96-3,78 (m, 3H, H3, H4, H5)
4,96-4,78 (m, 4H, H1, 3 CHPh)	3,63 (dd, 1H, H6b, $J=6,2, 11,5$ Hz)
4,77-4,64 (m, 5H, 5 CHPh)	3,40-3,34 (m, 1H, H6a)
4,56-4,48 (m, 2H)	1,48 (s, 3H, CH_3)
4,10 (dd, 1H, H2, $J=5,5, 9,7$ Hz)	1,30 (s, 3H, CH_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

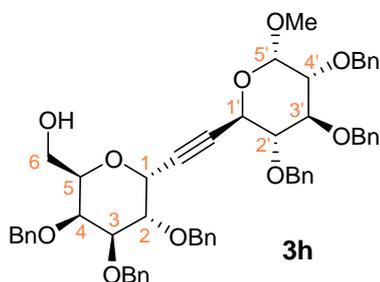
138,6, 138,2, 138,1, 137,5, 128,4, 128,3, 128,2, 127,8, 127,6, 127,5, 127,4, 112,4, 104,5, 83,3, 82,9, 82,6, 75,3, 74,7, 74,4, 73,7, 73,3, 73,0, 72,5, 70,8, 67,5, 62,1, 26,8, 26,1

$[\alpha]_D^{25} = + 67,2^\circ$ (C = 1,0 g/mL, $CHCl_3$)

IR (film, v, cm^{-1}) : 3474, 3063, 3030, 2988, 2933, 1497, 1454, 1077

HRMS (m/z, ESI) : $C_{43}H_{46}O_9Na$ ($M + Na$): 729,3040 (calculé), 729,3061 (trouvé)

Méthyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6,7-didésoxy-7-*C*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl) α -D-gluco-hept-6-ynopyranoside



Formule : $C_{56}H_{58}O_{10}$
 $M = 890,403$ g/mol
Aspect: huile incolore

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (40,5 mg, 0,29 éq., 0,094 mmol) conduit au composé **3h** (46,1 mg, 0,052 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 55 %

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

7,40-7,19 (m, 30H, 6 Ph)	4,08 (dd, 1H, H2, $J=5,9, 9,3$ Hz)
5,00-4,92 (m, 2H, 2 CHPh)	3,95-3,82 (m, 2H)
4,91-4,82 (m, 2H, 2 CHPh)	3,79-3,60 (m, 3H)
4,80-4,65 (m, 6H, 3 CH_2Ph)	3,56-3,45 (m, 2H)
4,64-4,53 (m, 3H, H1, 2 CHPh)	3,42 (s, 3H, OCH_3)
4,44 (d, 1H, H5', $J=9,5$ Hz)	3,40-3,35 (m, 1H)
4,43 (d, 1H, H1', $J=3,1$ Hz)	

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

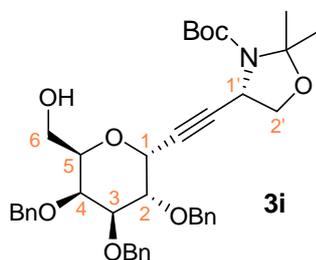
138,6, 138,5, 138,4, 138,1, 138,0, 137,9, 128,6, 128,5, 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,7, 127,6, 127,5, 127,3, 127,2, 98,6, 85,6, 82,3, 80,9, 80,5, 80,2, 79,1, 75,9, 75,3, 75,1, 74,4, 74,3, 73,8, 73,5, 73,3, 73,0, 67,4, 62,1, 61,8, 55,8

$[\alpha]_D^{25} = +47,7^\circ$ ($C = 0,6$ g/mL, $CHCl_3$)

IR (film, ν , cm^{-1}) : 3458, 3088, 3063, 3030, 2924, 1606, 1497, 1454, 1090

HRMS (m/z , ESI) : $C_{56}H_{58}O_{10}Na$ ($M+Na$): 913,3928 (calculé), 913,3909 (trouvé)

(4S)-4-[2-(2,3,4-tri-O-benzyl-D-galacto- α -C-pyranosyl)-1-éthynyl]-2,2-diméthylloxazolidine-3-carboxylate de *tert*-butyle



Formule : $C_{39}H_{47}NO_8$
 $M = 657,330$ g/mol
Aspect: huile jaunâtre

Mode opératoire :

Suivant la procédure de couplage, l'époxyaldehyde **1** (59,6 mg, 0,29 éq., 0,138 mmol) conduit au composé **3i** (43,2 mg, 0,066 mmol).

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-70/30)

Rendement : 48 %

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

7,40-7,27 (m, 15H, 3 Ph)	3,91-3,83 (m, 3H, H3, H4, H5)
4,96 (d, 1H, CHPh, $J=11,8$ Hz)	3,72 (dd, 1H, H6b, $J= 6,7, 11,6$ Hz)
4,91-4,83 (m, 2H, 2 CHPh)	3,55-3,40 (m, 1H, H6a)
4,80-4,55 (m, 5H, H1, H1', 3 CHPh)	1,45 (s, 9H, 3 CH_3 (BOC))
4,11 (dd, 1H, H2, $J=5,5, 9,5$ Hz)	1,40 (s, 3H, CH_3)
4,01 (dd, 2H, CH_2O (2'), $J=2,6, 6,3$ Hz)	1,28 (s, 3H, CH_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

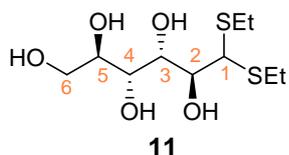
139,1, 138,8, 138,6, 129,0, 128,9, 128,8, 128,7, 128,4, 128,1, 127,9, 80,8, 76,1, 75,0, 74,2, 74,1, 73,4, 67,7, 49,1, 30,1, 28,8

$[\alpha]_D^{25} = + 76,9^\circ$ (C = 0,9 g/mL, $CHCl_3$)

IR (film, ν , cm^{-1}) : 3471, 3064, 3030, 2978, 2929, 1689, 1497, 1445, 1378, 1091

HRMS (m/z, ESI) : $C_{39}H_{47}NO_8Na$ ($M + Na$): 680,3199 (calculé), 680,3188 (trouvé)

1-(diéthyl)dithioacétal-D-manno-hexose (11)



Formule : C₁₀H₂₂O₅S₂

\mathcal{M} = 286,091 g/mol

Aspect : solide blanc

Mode opératoire :¹⁸⁵

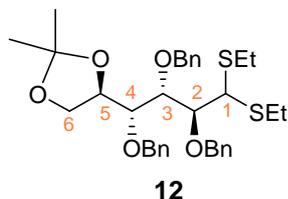
20 g de D-Mannose (1 éq., 70 mmol) sont dissous dans 20 mL d'acide chlorhydrique concentré (9 éq., 640 mmol). On ajoute doucement de l'éthanthiol (20 mL, 3,9 éq., 270 mmol). Le mélange est agité vigoureusement à la main. Après 5 minutes de réaction, l'augmentation de température est accompagnée d'un changement de couleur et d'une prise en masse. On ajoute de l'eau froide puis le solide est essoré.

Purification : recristallisation dans de l'éthanol à 95° à chaud

Rendement : 60 %

PF = 141-143°C

5,6-O-isopropylidène-2,3,4-tri-O-benzyl-1(diéthyl)dithioacétal-D-manno-hexose (12)



Formule : C₃₄H₄₄O₅S₂

\mathcal{M} = 596,263 g/mol

Aspect : huile jaunâtre collante

Mode opératoire :

26,65 g de pentaol **11** (1 éq., 93 mmol) sont dissous dans 370 mL d'acétone fraîchement distillée. Sont ajoutés 23,5 mL de 2,2-diméthoxypropane (2,04 éq., 190 mmol) et 2,2 g de PPTS (0,095 éq., 8,8 mmol). Au bout de 10 min, la solution est limpide et la réaction est stoppée par ajout d'une solution de NaHCO₃ saturée (contrôle CCM effectué avec EP/AE 1/1). Le mélange est évaporé puis le résidu est repris par 150 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est extraite 3 fois avec 20 mL de solution saturée de NaHCO₃. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées puis évaporées. Le brut obtenu est co-évaporé 3 fois au toluène.

Le triol est alors engagé dans la réaction de protection. Il est dissous dans 240 mL de DMF puis on ajoute à 0°C 16,8 g (2,6 éq., 242 mmol) d'hydrure de sodium non déshuilé (60% dans l'huile minérale) puis 55,3 mL (5 éq., 465 mmol) de bromure de benzyle. Une spatulée d'imidazole et de TBAI sont également incorporés au mélange. La réaction est agitée à température ambiante pendant 12h. L'excès de NaH est neutralisé par ajout de méthanol. Après évaporation, le résidu est repris par de l'éther et de l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 95/5)

Rendement : 73% (sur les deux étapes)

R_f = 0,33 (EP/AE 95/5)

¹⁸⁵ Levene P. A., Meyer G. M. *J. Biol. Chem.* **1927**, 74, 695

Parties expérimentales

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

7,40-7,20 (m, 15H, 3 Ph)
5,10 et 4,49 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C2, J=11,2 Hz)
4,70 et 4,55 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C3, J=11,6 Hz)
4,83 et 4,72 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C4, J=11,7 Hz)
4,39-4,30 (dd large, 1H, H5, J=6, 8 Hz)
4,25 (d, 1H, H1, J=1,7 Hz)

4,18 (dd, 1H, H2, J=1,7, 8,4 Hz)
4,03 (dd, 1H, H3, J=2,4, 8,4 Hz)
3,98 (dd, 1H, H4, J=2,4, 6 Hz)
3,97-3,86 (2 dd, 2H, 2 H6, J_{AX}=6 Hz, J_{BX}= 8 Hz, J_{AB}= 14 Hz)
2,80-2,52 (2q, 4H, 2 SCH₂-CH₃, J=7,4 Hz)
1,41 (s, 3H, CH₃ acétonide)
1,31 (s, 3H, CH₃ acétonide)
1,26-1,17 (2 t, 6H, 2 SCH₂-CH₃, J=7,4 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

139,1-138,8 (Cq Bn)
128,8-127,5 (CH Bn)
108,9 (Cq acétonide)
83,1 (C2)
81,7 (C3)
80,2 (C4)
76,6 (C5)

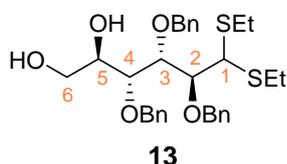
74,8-74,1 (3 CH₂-Ph)
67,1 (C6)
54,1 (C1)
27,7 et 27,6 (2 SCH₂-CH₃)
25,9 et 25,7 (2 CH₃ acétonide)
15,1 et 14,8 (2 SCH₂-CH₃)

LRMS (m/z, ESI) : C₃₄H₄₄O₅S₂Na (M + Na) = 619,2620 (calculé), 619,3 (trouvé)

Analyse Élémentaire :

Calculés : C = 68,42 %, H = 7,43 %, S = 10,74 % Trouvés : C = 68,42 %, H = 7,49 %, S = 10,76 %

2,3,4-tri-O-benzyl-1-(diéthyl)dithioacétal-D-manno-hexose (13)



Formule : C₃₁H₄₀O₅S₂

M = 556,232 g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

40,7 g d'alcool protégé **12** (1 éq., 68,3 mmol) sont dissous dans 230 ml d'acide acétique glacial et 80 ml d'eau. Le mélange est chauffé 3h à 60°C. Après évaporation et 3 co-évaporations avec du toluène, le résidu est repris par de l'éther et de l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 60/40)

Rendement : 90%

R_f = 0,50 (EP/AE 60/40)

Parties expérimentales

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

7,41-7,33 (m, 15H, 3 Ph)	4,17 (dd, 1H, H2, $J=3, 7$ Hz)
4,90 et 4,75 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C3, $J=12$ Hz)	3,94 (m, 1H, H5)
5,13 et 4,63 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C2, $J=11$ Hz)	3,83 (dd, 1H, H4, $J=3, 7$ Hz)
4,69 et 4,59 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C4, $J=12$ Hz)	3,78-3,75 (m, 1H, H6b)
4,35 (d, 1H, H1, $J=3$ Hz)	3,70-3,67 (m, 1H, H6a)
4,23 (dd, 1H, H3, $J=3, 7$ Hz)	3,10 (d, 1H, OH, $J=6$ Hz) (couplé avec H5)
	2,77-2,66 (m, 4H, 2 $\text{SCH}_2\text{-CH}_3$)
	2,29 (s large, 1H, OH)
	1,35-1,25 (m, 6H, 2 $\text{SCH}_2\text{-CH}_3$)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

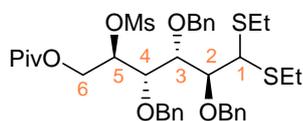
138,2-137,8 (Cq Bn)	73,6 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C4))
128,5-127,7 (CH Bn)	71,9 (C5)
83,5 (C2)	63,9 (C6)
78,6 (C4)	53,6 (C1)
78,4 (C3)	26,8 et 25,3 (2 $\text{SCH}_2\text{-CH}_3$)
74,9 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C2))	14,6 et 14,4 (2 $\text{SCH}_2\text{-CH}_3$)
74,2 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C3))	

LRMS (m/z, ESI) : $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{S}_2\text{Na}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 579,2310 (calculé), 579,2 (trouvé)

Analyse Élémentaire : (% calculés avec une molécule d'eau de cristallisation $\mathcal{M} = 574,242$ g/mol)

Calculés : C = 64,78 %, H = 7,37 %, S = 11,16 % Trouvés : C = 64,38 %, H = 7,13 %, S = 11,05%

6-*O*-pivaloyl-5-*O*-méthylsulfonyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-(diéthyl)dithioacétal-*D*-manno-hexose (14)



14

Formule : $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{O}_8\text{S}_3$

$\mathcal{M} = 718,267$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

10 g de diol **13** (1 éq., 18 mmol) sont dissous dans 15 ml de CH_2Cl_2 , 9,4 ml de pyridine (10 éq., 180 mmol) à 0°C. Le chlorure de pivaloyle (1,08 éq., 2,41 ml, 19,6 mmol) est additionné goutte à goutte. Après 3h de réaction, il n'y a plus de produit de départ et on additionne goutte à goutte au mélange de couleur jaune le chlorure de mésyle (1,2 éq., 1,67 ml, 21,6 mmol) puis 155 mg de DMAP (0,7 éq., 12,7 mmol). Après agitation pendant une nuit à température ambiante, la réaction est stoppée par 9 ml d'acide chlorhydrique 1N et diluée dans du CH_2Cl_2 et de l'eau. La phase organique est lavée par de la saumure, séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 95/5-90/10)

Rendement : 70 %

$R_f = 0,66$ (EP/AE 80/20)

Parties expérimentales

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz, δ, ppm) :

7,33-7,25 (m, 15H, 3 Ph)	4,52 (dd, 1H, H6b, <i>J</i> =5, 7 Hz)
5,18 (m, 1H, H5)	4,35 (dd, 1H, H6a, <i>J</i> =5, 7 Hz)
5,12 et 4,70 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C2, <i>J</i> =11,2 Hz)	4,25 (dd, 1H, H1, <i>J</i> =2,3 Hz)
4,88 et 4,71 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C3, <i>J</i> =11,2 Hz)	4,12-4,09 (m, 2H, H2, H4)
4,69 et 4,54 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C4, <i>J</i> =11,2 Hz)	4,00 (dd, 1H, H3, <i>J</i> =5, 7 Hz)
	2,72-2,61 (m, 4H, 2 SCH ₂ -CH ₃)
	1,24-1,21 (m, 6H, 2 SCH ₂ -CH ₃)

RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz, δ, ppm) :

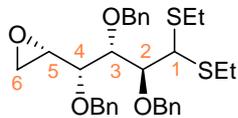
178,1 (C=O Piv)	74,3-74,2 (3 CH ₂ -Ph)
137,9-137,6 (Cq Bn)	62,8 (C6)
128,4-127,6 (CH Bn)	53,4 (C1)
83,2 (C2)	38,6 (CH ₃ Ms)
80,6 (C5)	27,2 (^t Bu Piv)
79,2 (C4)	26,9 et 25,2 (2 SCH ₂ -CH ₃)
78,7 (C3)	14,5 et 14,3 (2 SCH ₂ -CH ₃)

LRMS (m/z, ESI) : C₃₇H₅₀O₈S₃Na (*M* + Na) = 741,2660 (calculé), 741,3 (trouvé)

Analyse Élémentaire :

Calculés : C = 61,81 %, H = 7,01 %, S = 13,38 % Trouvés : C = 61,41 %, H = 7,21 %, S = 12,91%

5,6-anhydro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-(diéthyl)dithioacétal-*L*-gulo-hexose (15)



15

Formule : C₃₁H₃₈O₄S₂

M = 538,221 g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

2 g de composé pivaloylé-mésylé **14** (1 éq., 2,8 mmol) est dissous dans 28 ml de méthanol et 1% d'eau (0,28 ml). Le mélange est placé à basse température (~-3-5°C). 2 équivalents de potasse (314mg, 5,6 mmol) en plaque sont additionnés progressivement, puis la réaction est placée à température ambiante. Après 12h, le produit de départ n'est plus observé sur plaque CCM. Le mélange est alors évaporé à sec, puis le résidu est repris avec 20 ml d'eau et 150 ml d'éther. La phase aqueuse est à nouveau extraite par 30 ml d'éther. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées puis évaporées. Le brut réactionnel est utilisé tel quel dans la prochaine manipulation.

Rendement : 90% (brut)

R_f = 0,67 (EP/AE 80/20)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

7,38-7,05 (m, 15H, 3 Ph)	4,18-4,12 (m, 2H, H1, H2)
4,85 et 4,18 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C2, <i>J</i> =10,8 Hz)	3,89-3,79 (m, 1H, H3)
4,84 et 4,46 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C3, <i>J</i> =11,9 Hz)	3,22 (dd, 1H, H4, <i>J</i> =2, 7,3 Hz)
4,72 et 4,41 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C4, <i>J</i> =11,5 Hz)	3,17-3,08 (m, 1H, H5)
	2,73-2,50 (2 q, 4H, 2 SCH ₂ -CH ₃ , <i>J</i> =7,3 Hz)
	2,46-2,35 (m, 2H, H6)
	1,22-1,07 (2 t, 6H, 2 SCH ₂ -CH ₃ , <i>J</i> =7,3 Hz)

Parties expérimentales

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 250 MHz, δ , ppm) :

138,3-138,8 (Cq Bn)	54,4 (C5)
128,9-127,9 (CH Bn)	53,9 (C1)
82,3 (C2)	43,1 (C6)
81,0 (C3)	27,1 et 25,4 (2 $\text{SCH}_2\text{-CH}_3$)
80,8 (C4)	15,1 et 14,8 (2 $\text{SCH}_2\text{-CH}_3$)
75,3-72,0 (3 $\text{CH}_2\text{-Ph}$)	

$[\alpha]_D^{19} = -57,5$ ($C = 0,01096$ g/mL, CHCl_3)

IR (film, ν , cm^{-1}) : 3083, 3063, 3029, 2926, 1809, 1605, 1497, 1453, 1393, 1326, 1264, 1210, 1094, 695

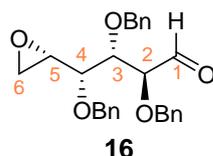
UV (ϵ en $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$):

$\epsilon_1 = 1138$ (CHCl_3 , $C = 0,002$ mol/L, $\lambda = 247$ nm, Abs = 2,275)

$\epsilon_2 = 134$ (CHCl_3 , $C = 0,002$ mol/L, $\lambda = 259$ nm, Abs = 0,268)

LRMS (m/z , ESI) : $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{S}_2\text{Na}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 561,2200 (calculé), 561,2 (trouvé)

5,6-anhydro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-L-gulo-hexose (16)



Formule : $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_5$

$\mathcal{M} = 432,194$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre épaisse

Mode opératoire :

875 mg de composé soufré **15** (1,63 mmol) sont dissous dans un mélange THF/ H_2O 7:3 ($V_{\text{Tot}} = 15$ ml). 325 mg de carbonate de calcium (2 éq., 3,25 mmol) et 838 mg de diiode sublimé (2 éq., 3,3 mmol) sont additionnés par portions et alternativement au mélange. Après 40-50 min de réaction, quelques gouttes d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10% sont ajoutées pour stopper la manipulation. Le mélange est extrait par de l'eau et de l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 93/7-90/10)

Rendement : 63% (sur les deux dernières étapes)

$R_f = 0,40$ (EP/AE 80/20)

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

9,74 (d, 1H, H1, $J=1,3$ Hz)	4,14 (dd, 1H, H2, $J=1,3, 3,6$ Hz)
7,42-7,19 (m, 15H, 3 Ph)	3,93 (dd, 1H, H3, $J=3,6, 4,7$ Hz)
4,82 et 4,56 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C4, $J=11,8$ Hz)	3,33-3,30 (ddd, 1H, H5, $J=2,7, 4,7, 7$ Hz)
4,68 et 4,53 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C3, $J=11,7$ Hz)	3,25 (dd, 1H, H4, $J=4,7, 7$ Hz)
4,65 et 4,49 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C2, $J=11,6$ Hz)	2,65 (t, 1H, H6b, $J=4,7$ Hz)
	2,52 (dd, 1H, H6a, $J=2,7, 4,7$ Hz)

Parties expérimentales

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

201,4 (C1)	73,3 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C3))
137,7-137,1 (Cq Bn)	73,1 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C2))
128,5-127,7 (CH Bn)	72,2 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C4))
83,4 (C2)	52,7 (C5)
80,8 (C3)	43,3 (C6)
80,5 (C4)	

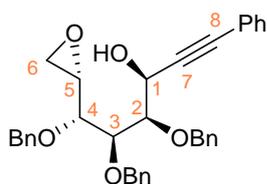
$[\alpha]^{20,5}_{\text{D}} = -40,9$ (C = 0,01046 g/mL, CHCl_3)

IR (film, ν , cm^{-1}) : 3445, 3088, 3063, 3030, 2870, 1737, 1732, 1605, 1586, 1497, 1454, 1393, 1253, 1209, 1090, 1028, 918, 851, 737, 697

UV (ϵ en $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): $\epsilon = 821,5$ (CHCl_3 , C = 0,002 mol/L, $\lambda = 258$ nm, Abs = 1,643)

LRMS (m/z, ESI) : $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 455,193 (calculé), 455,2 (trouvé)

1-(5,6-anhydro-2,3,4-tri-O-benzyl-L-gulo-hexose)-2-phénylacétylène (17b)



17b

Formule : $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{O}_5$

$\mathcal{M} = 534,241$ g/mol

Aspect : huile incolore

Mode opératoire :

L'époxyaldéhyde **11** est avant toute utilisation co-évaporé plusieurs fois au toluène puis séché sous vide. L'alcyne est préparé par addition de *n*-butyllithium (0,9 éq., 0,23 mL, 0,49 mmol) à -40°C sur une solution de phénylacétylène (1 éq., 60 μL , 0,55 mmol), fraîchement distillé et conservé sur MgSO_4 , dans l'éther diéthylique anhydre (1,9 mL, C=0,29 mol/L). Le mélange est agité pendant 2h tout en laissant la température revenir à 0°C . Parallèlement le dichlorure de zinc (0,94 éq., 70 mg, 0,51 mmol) est fondu sous vide puis dissous dans de l'éther diéthylique anhydre (0,6 mL, C=0,85 mol/L) à 0°C pendant 20 min. Puis l'alcyne de lithium est ajouté progressivement à la solution de dichlorure de zinc. Le mélange est agité pendant 1h à 0°C . Puis une solution d'aldéhyde **11** (0,29 éq., 69 mg, 0,16 mmol) dans l'éther diéthylique anhydre (0,9 mL, C=0,18 mol/L) est additionnée lentement. Le mélange est agité pendant 3h à $0\text{-}5^\circ\text{C}$. La solution est diluée dans l'éther diéthylique et une solution saturée de chlorure d'ammonium (2 mL) est ajoutée ainsi que 2 mL d'eau. La phase organique est extraite, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10)

Rendement : 71%

$R_f = 0,36$ (EP/AE 4/1)

Parties expérimentales

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

7,39-7,07 (m, 20H, 4 Ph)
4,86 et 4,50 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C4, J=11,9 Hz)
4,81 et 4,22 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C3, J=10,6 Hz)
4,80 (m, 1H, H1)

4,73 et 4,57 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C2, J=11,2 Hz)
3,99 (dd, 1H, H2, J=1,9, 8,6 Hz)
3,70 (dd, 1H, H3, J=1,9, 8,6 Hz)
3,21-3,11 (m, 2H, H4, H5)
2,88 (d, 1H, OH, J=10,1 Hz)
2,41-2,30 (m, 2H, H6)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

138,3-137,4 (Cq Bn)
131,7 (CH Ph)
129,1-127,4 (CH Bn)
122,6 (Cq Ph)
88,8 (C7)
85,7 (C8)
80,5 (C4)
80,4 (C2)

79,8 (C3)
75,1 (CH₂-Ph (C3))
75,0 (CH₂-Ph (C2))
72,0 (CH₂-Ph (C4))
62,3 (C1)
54,4 (C5)
43,0 (C6)

$[\alpha]_D^{20} = -3,8^\circ$ (C= 0,01 g/mL, CHCl₃)

UV (ε en Lmol⁻¹cm⁻¹): ε = 1674 (CHCl₃, C = 0,002 mol/L, λ = 261 nm, Abs = 3,349)

LRMS (m/z, ESI) : C₃₅H₃₄O₅Na (M + Na) = 557,2400 (calculé), 557,2 (trouvé)

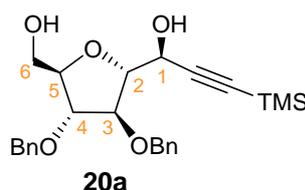
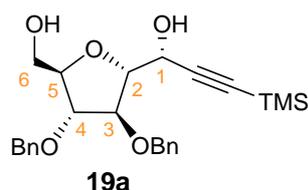
Analyse Élémentaire : (% calculés avec une molécule d'eau de cristallisation M = 552,251 g/mol)

Calculés : C = 76,12 %, H = 6,57 %

Trouvés : C = 76,55 %, H = 6,62 %

(R)-1-(3,4-di-O-benzyl-C-α-D-arabinofuranose)-2(triméthylsilylacétylène)méthanol (19a)

(S)-1-(3,4-di-O-benzyl-C-α-D-arabinofuranose)-2(triméthylsilylacétylène)méthanol (20a)



Formule : C₂₅H₃₂O₅Si

M = 440,202 g/mol

Aspect : huile jaunâtre épaisse

Mode opératoire :

L'époxyaldéhyde **16** et le bromure de lithium sont avant toute utilisation co-évaporés plusieurs fois au toluène puis séchés sous vide.

L'alcynure est préparé par addition de *n*-butyllithium (0,9 équ., 0,24 mL, 0,47 mmol) à -40°C sur une solution de triméthylsilylacétylène (1 équ., 74 μL, 0,52 mmol) dans l'éther diéthylique anhydre (1 mL, C=0,52 mol/L). Le mélange est agité pendant 1h30 tout en laissant la température revenir à 0°C. Parallèlement le dichlorure de zinc (1,9 équ., 162 mg, 1,19 mmol) est fondu sous vide puis dissous dans de l'éther diéthylique anhydre (1,15 mL, C=1 mol/L) à 0°C pendant 20 min. Puis l'alcynure de lithium est ajouté progressivement à la solution de dichlorure de zinc. Le mélange est agité pendant 1h à 0°C. Puis une solution d'aldéhyde (0,29 équ., 65 mg, 0,15 mmol) dans l'éther diéthylique anhydre (0,5 mL, C=0,3 mol/L) est additionnée lentement. Le mélange est agité pendant 4h à 0-5°C. Enfin le bromure de lithium (1,1 équ., 50 mg, 0,58 mmol) est ajouté et le mélange réactionnel est agité 12h à température ambiante (T~23-26°C). La solution est diluée dans de l'eau et de l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 88/12-60/40)

Rendement : 20% (**20a**) et 6% (**19a**)

R_f = 0,33 (EP/AE 1/1) (**20a**), 0,45 (EP/AE 1/1) (**19a**)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

20a

7,46-7,17 (m, 10H, 2 Ph)
4,70-4,46 (4 d, 4H, CH₂-Ph sur la position C3 et CH₂-Ph sur la position C4, *J*=11,7 Hz)
4,50 (m, 1H, H1)
4,23-4,14 (m, 3H, H2, H3, H5)
4,02 (d large, 1H, H4, *J*=1,6 Hz)
3,56-3,47 (ddd, 2H, H6, *J*_{AX}=3,8 Hz, *J*_{BX}= 5,5 Hz, *J*_{AB}= 11,9 Hz)
2,74 (s large, 1 H, OH)
2,07 (s large, 1 H, OH)
0,18 (s large, 3 H, TMS)

19a

7,48-7,22 (m, 10H, 2 Ph)
4,70 et 4,57 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C4, *J*=11,6 Hz)
4,62 (d, 1H, H1, *J*= 3,8 Hz)
4,62 et 4,56 (2 d, 2H, CH₂-Ph sur la position C3, *J*=11,7 Hz)
4,43 (dd, 1H, H3, *J*=2,1, 2,4 Hz)
4,36 (dd large, 1H, H5, *J*=3,2, 4,8 Hz)
4,31 (dd, 1H, H2, *J*=2,4, 3,8 Hz)
4,04 (dd, 1H, H4, *J*=2,1, 3,2 Hz)
3,77-3,62 (d large, 2H, H6, *J*= 5,3 Hz)
2,96 (d, 1H, OH, *J*= 5,3 Hz)
2,04 (s large, 1H, OH)
0,18 (s large, 3H, TMS)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

20a

137,5-137,4 (Cq Bn)
128,7-127,8 (CH Bn)
102,9 (C7)
91,9 (C8)
86,9 (C2)
84,3-84,2 (C3, C4, C5)
72,3 (CH₂-Ph (C4))
72,0 (CH₂-Ph (C3))
62,9 (C1)
62,8 (C6)
0 (CH₃ TMS)

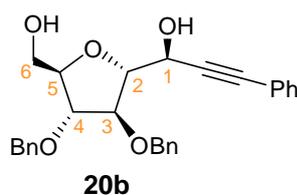
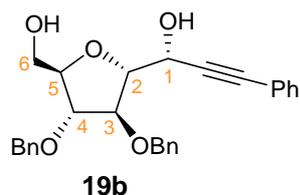
19a

137,5-137,3 (Cq Bn)
128,8-128,0 (CH Bn)
103,1 (C7)
92,1 (C8)
86,6 (C2)
85,1 (C5)
83,9 (C3 et C4)
72,3 (CH₂-Ph (C4))
72,2 (CH₂-Ph (C3))
64,3 (C1)
62,7 (C6)
0 (CH₃ TMS)

LRMS (m/z, ESI) : **19a** et **20a** C₂₅H₃₂O₅SiNa (*M* + Na) = 463,201 (calculé), 463,2 (trouvé)

(R)-1-(3,4-di-O-benzyl-C-α-D-arabinofuranose)-2-phénylacétylène-méthanol (19b)

(S)-1-(3,4-di-O-benzyl-C-α-D-arabinofuranose)-2-phénylacétylène-méthanol (20b)



Formule : C₂₈H₂₈O₅
M = 444,194 g/mol
Aspect : huile incolore

Mode opératoire :

L'époxyaldéhyde **16** et le bromure de lithium sont avant toute utilisation co-évaporés plusieurs fois au toluène puis séchés sous vide.

Parties expérimentales

L'alcynure est préparé par addition de *n*-butyllithium (0,9 éq., 0,25 mL, 0,48 mmol) à -40°C sur une solution de phénylacétylène (1 éq., 57 µL, 0,52 mmol), fraîchement distillé et conservé sur MgSO₄, dans l'éther diéthylique anhydre (1,9 mL, C=0,27 mol/L). Le mélange est agité pendant 2h tout en laissant la température revenir à 0°C. Parallèlement le dichlorure de zinc (2,1 éq., 185 mg, 1,36 mmol) est fondu sous vide puis dissous dans de l'éther diéthylique anhydre (1,5 mL, C=0,9 mol/L) à 0°C pendant 20 min. Puis l'alcynure de lithium est ajouté progressivement à la solution de dichlorure de zinc. Le mélange est agité pendant 1h à 0°C. Puis une solution d'aldéhyde (0,29 éq., 65 mg, 0,15 mmol) dans l'éther diéthylique anhydre (1 mL, C=0,15 mol/L) est additionnée lentement. Le mélange est agité pendant 3h à 0-5°C. Enfin le bromure de lithium (1 éq., 45 mg, 0,52 mmol) est ajouté et le mélange réactionnel est agité 12h à température ambiante (T~15°C). La solution est diluée dans l'éther diéthylique, une solution saturée de chlorure d'ammonium est ajoutée (2 mL), ainsi qu'1 mL d'eau. La phase organique est extraite, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-30/20)

Rendement : 27-41% (**20b**) et 9-11% (**19b**)

R_f = 0,34 (EP/AE 1/1) (**20b**), 0,47 (EP/AE 1/1) (**19b**)

RMN ¹H (CDCl₃, δ, ppm) :

20b (250 MHz)

7,46-7,19 (m, 15H, 3 Ph)
4,73 (d, 1H, H1, *J*=8 Hz)
4,64-4,48 (4 d, 4H, 2 CH₂-Ph, *J*=11,9 Hz)
4,28 (dd, 1H, H2, *J*=2,1, 8 Hz)
4,26-4,19 (m, 2H, H3, H5)
4,05 (m, 1H, H4)
3,79-3,67 (m, 2H, H6)

19b (500 MHz)

7,47-7,31 (m, 15H, 3 Ph)
4,83 (d, 1H, H1, *J*=3,4 Hz)
4,83-4,62 (2 d, 2H, CH₂-Ph, *J*=11,7 Hz)
4,64-4,58 (2 d, 2H, CH₂-Ph, *J*=11,6 Hz)
4,49 (t, 1H, H3, *J*=2,4 Hz)
4,42-4,33 (m, 2H, H2, H5)
4,13 (dd, 1H, H4, *J*=2,5, 2,9 Hz)
3,70-3,69 (m, 2H, H6)

RMN ¹³C (CDCl₃, δ, ppm) :

20b (250 MHz)

137,4 (Cq Bn)
132,0 (CH Ph)
128,8-127,9 (CH Bn)
122,2 (Cq Ph)
86,9 (C2)
86,6 (C7 et C8)
84,4 (C4)
84,2 (C3)
84,1 (C5)
72,3 (CH₂-Ph (C3))
71,9 (CH₂-Ph (C4))
63,0 (C1)
62,9 (C6)

19b (500 MHz)

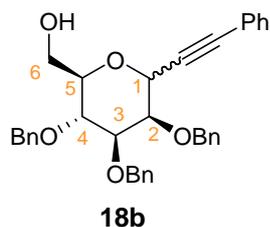
137,7,4-137,1 (2 Cq Bn)
131,9 (CH Ph)
128,8-127,9 (CH Bn)
122,3 (Cq Ph)
87,0 et 86,8 (C7 et C8)
86,5 (C2)
85,1 (C5)
83,8 (C3, C4)
72,2 (2 CH₂-Ph)
64,2 (C1)
62,7 (C6)

HRMS (m/z, ESI) :

19b C₂₈H₂₈O₅Na (*M* + Na) = 467,1834 (calculé), 467,1836 (trouvé)

20b C₂₈H₂₈O₅Na (*M* + Na) = 467,1834 (calculé), 467,1844 (trouvé)

1-(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2-phénylacétylène (18b)



Formule : C₃₅H₃₄O₅

$M = 534,641$ g/mol

Aspect : huile incolore

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-30/20)

Rendement : 16%

R_f = 0,66 (EP/AE 3/2)

RMN ¹H (CDCl₃, 250MHz, δ , ppm) : (diastéréoisomère majoritaire)

7,47-7,20 (m, 20H, 4 Ph)

4,36-4,18 (m, 1H, H5)

4,96 (d, 1H, H1, $J = 2,1$ Hz)

4,16-4,08 (dd, 1H, H3, $J = 2,8, 9$ Hz)

4,97 et 4,74 (2d, 2H, CH₂-Ph, $J = 10,1$ Hz)

4,08-3,96 (dd, 1H, H4, $J = 9, 10,6$ Hz)

4,79 et 4,55 (2d, 2H, CH₂-Ph, $J = 13,3$ Hz)

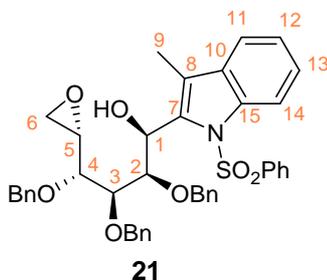
3,92-3,90 (dd, 1H, H2, $J = 2,1, 2,8$ Hz)

4,69 et 4,54 (2d, 2H, CH₂-Ph, $J = 14,4$ Hz)

3,69-3,54 (m, 2H, H6)

HRMS (m/z, ESI) : C₃₅H₃₄O₅Na ($M + Na$) = 557,2304 (calculé), 557,2304 (trouvé)

1-(5,6-anhydro-2,3,4-tri-*O*-benzyl)-C-(3-méthyl-1-(phénylsulfonyl)-1*H*-indol-2-yl)-L-gulo-hexose (21)



Formule : C₄₂H₄₁NO₇S

$M = 703,26$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre épaisse

Mode opératoire :

L'époxyaldéhyde **16** et le bromure de lithium sont avant toute utilisation co-évaporés plusieurs fois au toluène puis séchés sous vide. L'indole est placé sous vide avant la réaction.

L'indole lithié est préparé par addition de *n*-butyllithium (0,9 éq., 104 μ L, 0,23 mmol) à -78°C sur une solution d'indole (1 éq., 66,5 mg, 0,25 mmol) dans le THF (4,9 mL, C=0,05 mol/L). Le mélange est agité pendant 1h30, toujours à -78°C. Puis une solution d'aldéhyde (0,66 éq., 70,6 mg, 0,16 mmol) dans le THF (2 mL, C=0,08 mol/L) est additionnée lentement. Le mélange est agité pendant 3h à -78°C. La solution est stoppée par ajout de quelques gouttes de triéthylamine. Puis le milieu est placé à température ambiante pour poursuivre le traitement. La solution est diluée dans de l'eau et du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée par une solution saturée de NaCl puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 92,5/7,5-89/11)

Rendement : 55 % (indole récupéré) et 48 % (intermédiaire *anti* **20**)

R_f = 0,23 (EP/AE 4/1) (intermédiaire), 0,52 (EP/AE 4/1) (indole)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

8,01 (d, 1H, H11, <i>J</i> =7,4 Hz)	4,39-4,36 (m, 1H, H3)
7,67 (2 d, 2H, H12, H13, <i>J</i> =7,4 Hz)	4,30 et 4,10 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C4, <i>J</i> =11,4 Hz)
7,34-7,10 (m, 16H, 3 Ph, H14)	4,05-4,01 (m, 2H, H2, H4)
7,04-6,64 (4 d et 1 t, 5H, SO ₂ Ph, <i>J</i> =7,0, 7,3 Hz)	3,40-3,36 (m, 2H, H1, H5)
5,70 (s large, 1H, OH)	2,61-2,52 (m, 2H, H6)
4,84 et 4,61 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C2, <i>J</i> =11,4 Hz)	2,06 (s, 3H, CH ₃ indole)
4,75 et 4,67 (2 d, 2H, CH ₂ -Ph sur la position C3, <i>J</i> =11,6 Hz)	

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ, ppm) :

138,3-115,5 (CH Bn, SO ₂ Ph, tryptophane, 7 Cq Bn)	73,0 (CH ₂ -Ph (C2))
81,8 (C3)	66,7 (C1)
81,3 (C2)	53,2 (C5)
81,2 (C4)	44,0 (C6)
73,8 (CH ₂ -Ph (C4))	9,9 (CH ₃ indole)
73,5 (CH ₂ -Ph (C3))	

[α]^{20,5}_D = - 7,1 (C = 0,00674 g/mL, CHCl₃)

IR (film, ν, cm⁻¹) : 3506, 3064, 3030, 2929, 2869, 1601, 1580, 1491, 1454, 1367, 1217, 1171, 1153, 1090, 1027, 752, 698

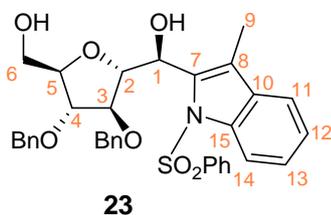
UV (ε en Lmol⁻¹cm⁻¹): ε = 1717 (CHCl₃, C = 0,002 mol/L, λ = 261 nm, Abs = 3,435)

LRMS (m/z, ESI) : C₄₂H₄₁NO₇SNa (*M* + Na) = 726,259 (calculé), 726,2 (trouvé)

Analyse Élémentaire :

Calculés :	C = 71,67 %, H = 5,87 %	Trouvés :	C = 71,96 %, H = 6,29 %
	N = 1,99 %, S = 4,56 %		N = 1,90 %, S = 4,17 %

(S)-1-(3,4-di-*O*-benzyl-*C*-α-*D*-arabinofuranose)-2-(3-méthyl-1-(phénylesulfonyl)-*1H*-indol-2-yl) méthanol (23**)**



Formule : C₃₅H₃₅NO₇S

M = 613,213 g/mol

Aspect : huile jaune

Mode opératoire :

26,2 mg d'alcool intermédiaire **21** (1 éq., 37 μmol) sont dissous dans 0,5 mL de CH₂Cl₂ anhydre. 9,2 mg de CSA (1,07 éq., 39 μmol) sont ajoutés progressivement à température ambiante. Après 40 min, la solution est diluée dans de l'eau et du CH₂Cl₂. La phase organique extraite est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10-76/14)

Rendement : 50-66 %

$R_f = 0,11$ (EP/AE 72/28)

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

7,99 (d, 1H, H11, $J=7,3$ Hz) je penche pour H11	4,63 et 4,53 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C4, $J=11,6$ Hz)
7,76 (2d, 2H, H12, H13, $J=7,3$ Hz)	4,50-4,47 (m, 1H, H3)
7,53-7,18 (m, 16H, 2 Ph, SO_2Ph , H14)	4,21-4,19 (m, 1H, OH)
5,39 (d large, 1H, H1, $J=8,6$ Hz)	4,18-4,09 (m, 1H, H5)
4,93 (d, 1H, H2, $J=8,6$ Hz)	4,08-4,05 (m, 1H, H4)
4,64 et 4,50 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$ sur la position C3, $J=11,8$ Hz)	3,65-3,60 (m, 2H, H6)
	2,24 (s, 3H, CH_3 indole)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

137,9-115,01 (CH Bn, SO_2Ph , tryptophane, 6Cq)	71,9 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C4))
85,4 (C2)	71,4 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (C3))
85,0 (C5)	67,4 (C1)
84,5 (C4)	62,9 (C6)
84,0 (C3)	9,8 (CH_3 indole)

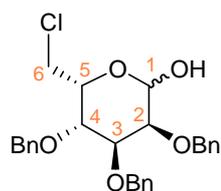
HRMS (m/z, ESI) : $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{NO}_7\text{SNa}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 636,2032 (calculé), 636,2044 (trouvé)

6-chloro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-L-gulose (A1)

1-triméthylsilylacétylène-6-chloro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-L-gulo-hexose (A2)

1-phénylacétylène-6-chloro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-L-gulo-hexose (A3)

1,6-bis-phénylacétylène-2,3,4-tri-*O*-benzyl-L-gulo-hexose (A4)

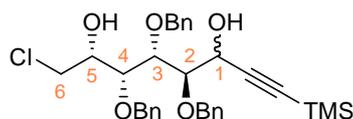


A1

Formule A1: $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClO}_5$

\mathcal{M} A1 = 468,170 g/mol

Aspect : huile jaunâtre épaisse

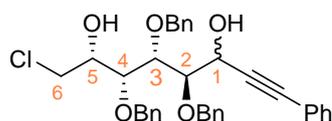


A2

Formule A2: $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{ClO}_5\text{Si}$

\mathcal{M} A2 = 566,226 g/mol

Aspect : huile jaunâtre épaisse

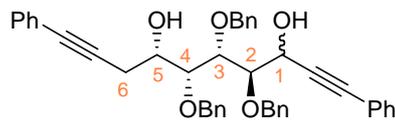


A3

Formule A3: $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{ClO}_5$

\mathcal{M} A3 = 570,217 g/mol

Aspect : huile jaunâtre épaisse



A4

Formule A4: $\text{C}_{43}\text{H}_{40}\text{O}_5$

\mathcal{M} A4 = 636,288 g/mol

Aspect : huile jaunâtre épaisse

Rendement : 15 % (A1) ; 12 % (A2) ; 23 % (A3); 28 % (A4)

$R_f = 0,47$ (EP/AE 3/2) (**A1**)
 $R_f = 0,63$ (EP/AE 3/2) (**A2**)
 $R_f = 0,70$ (EP/AE 3/2) (**A3**)
 $R_f = 0,28$ (EP/AE 80/20) (**A4**)

LRMS (m/z, ESI) :

A1 $C_{32}H_{39}ClO_5SiNa$ ($\mathcal{M} + Na$) = 589,225 (calculé), 589,0 (trouvé)

A2 $C_{27}H_{29}ClO_5SiNa$ ($\mathcal{M} + Na$) = 491,169 (calculé), 491,0 (trouvé)

A3 $C_{35}H_{35}ClO_5Na$ ($\mathcal{M} + Na$) = 593,207 (calculé), 593,2 (trouvé)

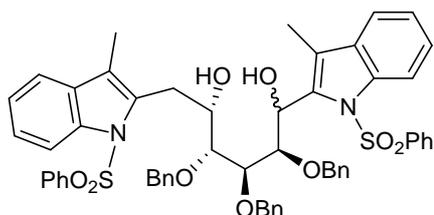
A4 $C_{43}H_{40}O_5Na$ ($\mathcal{M} + Na$) = 659,287 (calculé), 659,251 (trouvé)

1,6-bis-(3-méthyl-1-(phénylesulfonyl)-1H-indol-2-yl)-2,3,4-tri-O-benzyl-L-gulo-hexose (B1)

6-(3-méthyl-1-(phénylesulfonyl)-indol)-2,3,4-tri-O-benzyl-L-gulose (B2)

1-(5,6-anhydro-2,3,4-tri-O-benzyl)-C-(éthyl-1-(phénylesulfonyl)-1H-indol-2-yl)-L-gulo-hexose (B3)

3-butyl-3-hydroxy-2-(2-(1-(phénylesulfonyl)-1H-indol-3-yl)éthyl)isoindolin-1-one (B4)

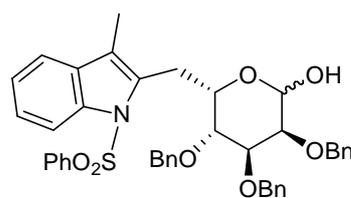


B1

Formule B1: $C_{57}H_{54}N_2O_9S_2$

$\mathcal{M} B1 = 974,327$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

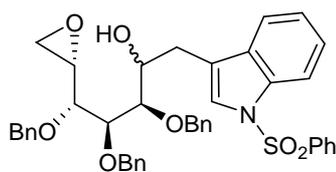


B2

Formule B2: $C_{42}H_{41}NO_7S$

$\mathcal{M} B2 = 703,260$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

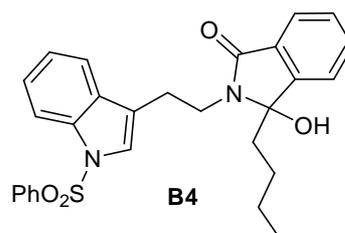


B3

Formule B3: $C_{42}H_{41}NO_7S$

$\mathcal{M} B3 = 703,260$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre



B4

Formule B4: $C_{28}H_{28}N_2O_4S$

$\mathcal{M} B2 = 488,177$ g/mol

Aspect : solide blanc

Rendement : 11 % (**B1**); 13 % (**B2**); 4% (**B3**); 38% (**B4**)

$R_f = 0,32$ (EP/AE 72/28) (**B1**)

$R_f = 0,17$ (EP/AE 72/28) (**B2**)

$R_f = 0,44$ (EP/AE 72/28) (**B3**)

$R_f = 0,33$ (EP/AE 60/40) (**B4**)

PF = 181-183°C (**B4**)

Eléments de RMN affirmant la structure des produits:

B1 : absence du CH₂ de l'époxyde, intégration des protons aromatiques doublée

B2 : absence du CH₂ de l'époxyde

B3 : absence du méthyl de l'indole, présence d'un CH₂ alkyl, protons de l'époxyde toujours présents

B4 : absence de protons relatifs au sucre, présence groupe alkyle

LRMS (m/z, ESI):

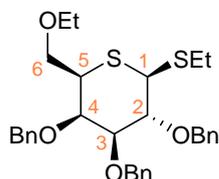
B1 C₅₇H₅₄N₂O₉S₂Na ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 997,326 (calculé), 997,2 (trouvé)

B2 C₄₂H₄₁NO₇SNa ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 726,259 (calculé), 726,2 (trouvé)

B3 C₄₂H₄₁NO₇SNa ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 726,259 (calculé), 726,2 (trouvé)

B4 C₂₈H₂₈N₂O₄SNa ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 511,176 (calculé), 511,1 (trouvé)

Partie Expérimentale du Chapitre D

1-éthylthioacétal-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-éthyl-5-thio- β -D-galactopyranose (24)

24

Formule : $C_{31}H_{38}O_4S_2$ $M = 538,221$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

Le dérivé pivaloylé-mésylé **9** (1 éq., 780 mg, 1,1 mmol) est traité à 0°C par de la potasse (2,2 éq., 123 mg, 2,2 mmol) dans du méthanol de qualité CLHP (11 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 12h. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par de l'eau et de l'éther diéthylique. La phase étherée est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 90/10)

Rendement : 85 %

$R_f = 0,42$ (EP/AE 90/10)

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz, δ , ppm) :

7,40-7,20 (m, 15H, 3 Ph)	3,58 (t, 3H, H2, $J=1,2, 3,2$ Hz)
4,98 (d, 1H, H1, $J=1,2$ Hz)	2,85 (dd, 1H, H6b, $J=2,1, 14,0$ Hz)
4,64-4,26 (6 d, 6H, 3 CH_2 -Ph, $J=11,8, 12,1, 12,3$ Hz)	2,73 (q, 2H, OCH_2-CH_3 , $J=7,5$ Hz)
4,00-3,94 (ddd, 1H, H5, $J=2,1, 9,0, 9,7$ Hz)	2,67-2,60 (m, 3H, H6a, SCH_2-CH_3)
3,67 (dd, 1H, H3, $J=2,9, 3,2$ Hz)	1,32 (t, 3H, OCH_2-CH_3 , $J=7,5$ Hz)
3,62 (dd, 1H, H4, $J=2,9, 9,7$ Hz)	1,23 (t, 3H, SCH_2-CH_3 , $J=7,5$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 500 MHz, δ , ppm) :

138,1-137,7 (Cq Bn)	72,3 (C3)
128,4-127,8 (CH Bn)	71,5 (CH_2 -Ph (C4))
82,0 (C1)	33,6 (C6)
78,2 (C2)	27,2 (CH_2 Et)
76,9 (C5)	25,7 (CH_2 Et)
75,7 (C4)	15,3 (CH_3 Et)
73,6 (CH_2 -Ph (C2))	15,0 (CH_3 Et)
72,8 (CH_2 -Ph (C3))	

IR (film, v, cm^{-1}) : 3087, 3063, 3029, 2963, 2923, 2869, 1953, 1605, 1586, 1496, 1454, 1398, 1373, 1312, 1264, 1207, 1072, 1028, 913, 818, 735, 698

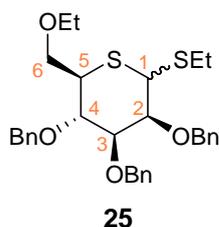
HRMS (m/z , ESI) : $C_{31}H_{38}O_4S_2Na$ ($M + Na$) = 561,2109 (calculé), 561,2103 (trouvé)

Analyse Élémentaire :

Calculés : C = 69,11 %, H = 7,11 %

Trouvés : C = 69,23 %, H = 7,42 %

1-éthylthioacétal-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-éthyl-5-thio- α,β -D-mannopyranose (25)



Formule : $C_{31}H_{38}O_4S_2$

$M = 538,221$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

100 mg de composé pivaloylé-mésylé **14** (1 éq., 0,14 mmol) est dissous dans 1,5 ml de méthanol de qualité CLHP. De la potasse (1,5 éq., 11,8 mg, 0,21 mmol) en plaque est ajoutée au mélange. La solution est chauffée à 40°C pendant 4h. Après évaporation à sec, le résidu est repris avec 5 ml d'eau et 15 ml d'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 95/5)

Rendement : 90% (2 diastéréoisomères A et B évalués en proportion 5/1)

$R_f = 0,44$ (EP/AE 90/10)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

7,43-7,17 (m, 30H, Bn)	3,86-3,83 (m, 1H, H3B)
5,31 (d, 1H, H1A, $J = 5,6$ Hz)	3,77-3,75 (m, 2H, H3A)
5,01-4,96 (m, 1H, H1B)	3,67-3,64 (m, 2H, H4B)
4,88-4,28 (6 d + 6 d, 12H, 3 CH_2 -Ph A, $J = 11,4, 11,7,$ 12,3 Hz et 3 CH_2 -Ph B)	3,57-3,55 (m, 2H, H4A)
4,53-4,46 (m, 2H, H5A et H5B)	2,95 (2 dd, 2H, H6bA et B, $J = 2,0, 13,9$ Hz)
4,16-4,10 (m, 1H, H2B)	2,89-2,44 (m, 10H, H6aA et B, 2 CH_2 - CH_3)
4,08-4,05 (m, 1H, H2A)	1,31 (t, 6H, 2 CH_2 - CH_3 A et B, $J = 7,3$ Hz)
	1,23 (t, 6H, 2 CH_2 - CH_3 A et B, $J = 7,3$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

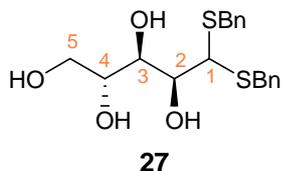
138,6-137,7 (Cq Bn)	72,8 (CH_2 -Ph en position 3)
130,4-127,4 (CH Ph)	71,3 (CH_2 -Ph en position 4)
84,2 (C1A)	70,6 (CH_2 -Ph B)
82,3 (C1B)	66,7 (C5A et B)
75,9 (C4A)	31,5 (C6A et B)
75,1-75,0 (C3B et C4B)	26,5 (CH_2 - CH_3 A et B)
79,9-74,5 (2 CH_2 -Ph B)	26,4 (CH_2 - CH_3 A et B)
73,7 (C3A, C2A)	15,2 (CH_2 - CH_3 A et B)
73,3 (CH_2 -Ph en position 2)	14,7 (CH_2 - CH_3 A et B)
72,9 (C2B)	

$[\alpha]_D^{19} = -57,5^\circ$ (C = 0,011 g/mL, $CHCl_3$)

UV (ϵ en $Lmol^{-1}cm^{-1}$): $\epsilon = 1137$ ($CHCl_3$, C = 0,002 mol/L, $\lambda = 247$ nm, Abs = 2,275)

HRMS (m/z, ESI) : $C_{31}H_{38}O_4S_2Na$ ($M + Na$) = 561,2200 (calculé), 561,2135 (trouvé)

1-(dibenzyl)dithioacétal-D-arabino-pentose (27)



Formule : $C_{19}H_{24}O_4S_2$

$M = 380,112$ g/mol

Aspect : solide blanc

Mode opératoire :

50 g de D-Arabinose sont dissous à froid par une solution concentrée d'acide chlorhydrique (20 mL). Le benzyl mercaptan est ajouté et le mélange est vigoureusement agité à la main. Après une heure, la solution crème est devenu un solide blanc que l'on casse pour le laver sur fritté, successivement par 1L d'eau, 140 mL d'une solution d'hydroxyde d'ammonium 1M et 500 mL d'eau.

Purification : recristallisation dans 300 mL de méthanol de qualité CLHP (dissolution à reflux puis recristallisation pendant une nuit à température ambiante)

Rendement : 80 %

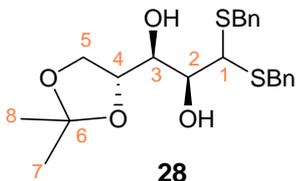
PF = 153°C (Littérature 148-149°C)

LRMS (m/z, ESI) : $C_{19}H_{24}O_4S_2Na$ ($M + Na$) = 403,111 (calculé), 403,1 (trouvé)

Analyse Élémentaire :

Calculés : C = 62,83 %, H = 6,71 %, S = 15,25 % Trouvés : C = 63,04 %, H = 6,76 %, S = 15,21 %

4,5-O-isopropylidène-1-(dibenzyl)dithioacétal-D-arabino-pentose (28)



Formule : $C_{22}H_{28}O_4S_2$

$M = 420,143$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

11,7 g de tétrol **27** (30,8 mmol) sont dissous dans 122 mL d'acétone fraîchement distillée sur K_2CO_3 , 7,8 mL de 2,2-diméthoxypropane sont ajoutés au milieu à température ambiante et 730 mg de PPTS sont incorporés. Après 15 min d'agitation, on stoppe la réaction avec 50 mL d'une solution saturée de $NaHCO_3$. Après évaporation, le résidu est repris par 200 mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée trois fois avec 10 mL d'une solution saturée de $NaHCO_3$ puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée. Le brut est co-évaporé trois avec du toluène et engagé directement dans la réaction suivante.

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

7,37-7,02 (m, 10H, 2 Ph)

4,02-3,82 (m, 3H, H1, H2, H3)

3,81-3,60 (m, 7H, H4, H5, 2 CH_2 -Ph)

3,03 (s large, 1H, OH)

2,32 (d, 1H, OH, $J=8$ Hz)

1,31 (s, 3H, CH_3 acétonide)

1,24 (s, 3H, CH_3 acétonide)

Parties expérimentales

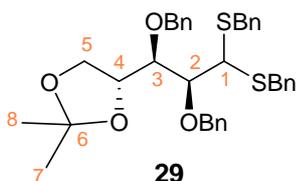
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 250 MHz, δ , ppm) :

137,9 (Cq Bn)	55,0 (C1)
129,7-127,8 (CH Bn)	36,3 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (SBn))
109,7 (Cq acétonide)	35,1 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (SBn))
76,5 (C2, C3, C4)	27,4 (CH_3 acétonide)
71,7 et 71,3 (2 $\text{CH}_2\text{-Ph}$)	25,8 (CH_3 acétonide)
67,3 (C5)	

Analyse Élémentaire :

Calculés : C = 62,83 %, H = 6,71 %, S = 15,25 % Trouvés : C = 63,04 %, H = 6,76 %, S = 15,21 %

4,5-*O*-isopropylidène-2,3-di-*O*-benzyl-1-(dibenzyl)dithioacétal-D-arabino-pentose (29)



Formule : $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{S}_2$

$\mathcal{M} = 600,237$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

Le brut de la réaction précédente est repris dans 76 mL de DMF anhydre. On ajoute, à 0°C, 3,7 g de NaH 60% non déshuilé, une pointe de spatule d'imidazole et de TBAI puis 12,2 ml de bromure de benzyle. Après 16h d'agitation, la réaction est stoppée par ajout de méthanol à 0°C. Après évaporation à sec, le résidu est directement purifié par chromatographie.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 30/1- 25/1 - 20/1 - 15/1 - 10/1 - 5/1)

Rendement : 94 % (2 étapes)

$R_f = 0,35$ (EP/AE 10/1)

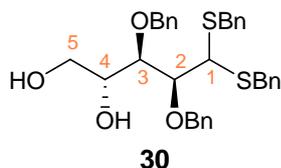
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

7,37-7,04 (m, 20H, 4 Ph)	3,93-3,65 (m, 8H, H1, H2, H5, 2 $\text{CH}_2\text{-Ph}$)
4,83 et 4,57 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $J=12,3$ Hz)	1,33 (s, 3H, CH_3 acétonide)
4,48 et 4,42 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $J=11,4$ Hz)	1,27 (s, 3H, CH_3 acétonide)
4,05-3,87 (m, 2H, H3, H4)	

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

138,6-138,2 (Cq Bn)	66,5 (C5)
129,4-127,1 (CH Bn)	51,2 (C1)
108,7 (Cq acétonide)	36,6 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (SBn))
82,8 (C2)	35,5 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (SBn))
79,8 (C3)	26,7 (CH_3 acétonide)
76,4 (C4)	25,4 (CH_3 acétonide)
74,8 et 74,7 (2 $\text{CH}_2\text{-Ph}$)	

LRMS (m/z, ESI) : $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{S}_2\text{Na}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 623,236 (calculé), 623,2 (trouvé)

2,3-di-*O*-benzyl-1-(dibenzyl)dithioacétal-D-*arabino*-pentose (**30**)Formule : C₃₃H₃₆O₄S₂ $\mathcal{M} = 560,206$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

17,31g de l'acétonide **29** (1 éq., 29,2 mmol) sont dissous dans 200 mL d'un mélange acide acétique glacial / 70 mL d'eau. Après 3h à reflux, le milieu encore trouble est évaporé à sec. Le résidu est directement purifié par chromatographie.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 10/1 - 8/1 - 6/1 - 4/1 - 2/1 - 1/1)

Rendement : 90 %

$R_f = 0,53$ (EP/AE 1/1)

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz, δ , ppm) :

7,31-7,08 (m, 20H, 4 Ph)

3,90-3,62 (m, 7H, H1, H2, H3, 2CH₂-Ph)4,80 et 4,59 (2 d, 2H, CH₂-Ph, $J=12,1$ Hz)

3,55-3,45 (m, 3H, H4, H5)

4,44 (2 d, 2H, CH₂-Ph, $J=11,5$ Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz, δ , ppm) :

138,1-137,7 (Cq Bn)

70,9 (C4)

129,2-126,9 (CH Bn)

63,2 (C5)

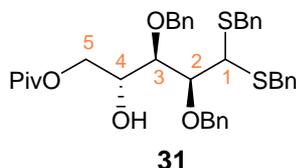
81,8 (C2)

50,6 (C1)

78,5 (C3)

35,9(CH₂-Ph (SBn))74,2 et 73,9 (2CH₂-Ph)35,7 (CH₂-Ph (SBn))

LRMS (m/z, ESI) : C₃₃H₃₆O₄S₂Na ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 583,205 (calculé), 583,2 (trouvé)

5-*O*-pivaloyl-2,3-di-*O*-benzyl-1-(dibenzyl)dithioacétal-D-*arabino*-pentose (**31**)Formule : C₃₈H₄₄O₅S₂ $\mathcal{M} = 644,263$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

1g de diol **30** (1,79 mmol) dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂ puis 6 mL de pyridine anhydre et le chlorure de pivaloyl (2,2 éq., 480 μ L, 3,94 mmol) sont ajoutés, à 0°C. La réaction étant propre et lente, nous avons ajouté une pointe de spatule de DMAP. Après 2h supplémentaires à température ambiante, la réaction est finie et est diluée par 50 mL de CH₂Cl₂ et neutralisée par de l'acide chlorhydrique 1M. La phase organique est lavée par 10 mL d'eau et 10 mL de saumure. Après séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation, le résidu huileux est déposé sur la colonne.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 30/1 - 25/1 - 20/1 - 15/1)

Rendement : 80 %

Parties expérimentales

$R_f = 0,47$ (EP/AE 10/1)

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

7,39-7,04 (m, 20H, 4 Ph)

4,820 et 4,62 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $J=11,3$ Hz)

4,38 (2 d, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $J=11,2$ Hz)

4,22-3,99 (m, 2H, H5)

3,95-3,64 (m, 8H, H1, H2, H3, H4, 2 $\text{CH}_2\text{-Ph}$)

1,21 (s large, 9H, 3 CH_3 ^tBu Piv)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz, δ , ppm) :

178,8 (Cq Piv)

138,1-137,8 (Cq Bn)

129,2-126,9 (CH Bn)

81,5 (C2)

78,5 (C3)

74,4 et 73,9 (2 $\text{CH}_2\text{-Ph}$)

69,9 (C4)

65,6 (C5)

50,9 (C1)

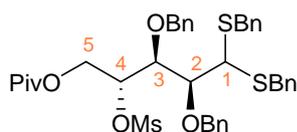
36,2 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (SBn))

35,4 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$ (SBn))

27,2 (3 CH_3 ^tBu Piv)

LRMS (m/z, ESI) : $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{S}_2\text{Na}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 667,262 (calculé), 667,2 (trouvé)

5-O-(tert-butyl ester)-4-O-méthylsulfonyl-2,3-di-O-benzyl-1-(dibenzyl)dithioacétal-D-arabino-pentose (32)



Formule : $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{O}_7\text{S}_3$

$\mathcal{M} = 722,241$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

32

Mode opératoire :

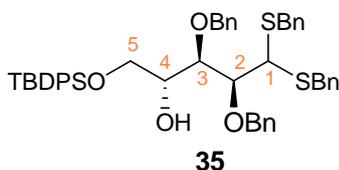
630 mg de l'alcool **31** (0,98 mmol) sont dissous dans 8,2 mL de CH_2Cl_2 , 410 μL de triéthylamine anhydre et le chlorure de mésyle (2 éq., 100 μL , 1,96 mmol) sont ajoutés, à 0°C sous atmosphère inerte. Après plusieurs heures, le contrôle par CCM bidimensionnelle (Toluène/AE 9/1) nous révèle la présence d'un produit à très bas R_f , indicateur d'une décomposition sur silice. La phase organique est extraite par de l'éther puis lavée par 10 mL de saumure et enfin séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée.

Purification : non (l'essai sur gel de silice fait chuter le rendement à 50 %)

Rendement : -

$R_f = 0,70$ (Toluène/AE 9/1)

5-O-(tert-butyl-diphénylsilyl)-2,3-di-O-benzyl-1-(dibenzyl)dithioacétal-D-arabino-pentose (35)



Formule : C₄₉H₅₄O₄S₂Si

$\mathcal{M} = 798,323$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

1 g de diol **30** (1,78 mmol) est dissous dans 2,4 mL de DMF, 300 mg d'imidazole, 700 μ L de TBDPSCl (1,5 eq. , 2,67 mmol) ($M = 274,86$, $d = 1,057$) sont ajoutés à température ambiante sous atmosphère inerte. Après 1h d'agitation, on dilue avec 50 mL de dichlorométhane. Après ajout de 10 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 30/1 – 25/1 – 20/1 – 15/1 – 10/1 – 5/1)

Rendement : quantitatif

$R_f = 0,7$ (EP/AE 6/1)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

7,94-6,96 (m, 30H, 5 Ph)

4,92 et 4,70 (2 d, 2H, CH₂-Ph, $J=11,1$ Hz)

4,44 et 4,37 (2 d, 2H, CH₂-Ph, $J=11,3$ Hz)

4,13-3,98 (m, 3H, H1, H2, H3)

3,96-3,74 (m, 7H, H4, H5, 2 CH₂-Ph)

1,17 (s, 9H, 3 CH₃ TBDPS)

RMN ¹³C (CDCl₃, 250 MHz, δ , ppm) :

138,8 et 133,5 (Cq Bn)

136,0-135,3 et 130,3-127,4 (CH Bn)

82,4 (C2)

78,9 (C3)

75,1 et 74,4 (2 CH₂-Ph)

71,9 (C4)

65,3 (C5)

51,9 (C1)

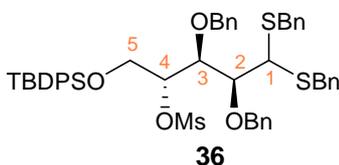
37,0 (CH₂-Ph (SBn))

35,8 (CH₂-Ph (SBn))

27,5 et 27,0 (3 CH₃ 'Bu TBDPS)

19,8 (Cq 'Bu TBDPS)

5-O-(tert-butyl-diphénylsilyl)-4-O-méthylsulfonyl-2,3-di-O-benzyl-1-(dibenzyl)dithioacétal-D-arabino-pentose (36)



Formule : C₅₀H₅₆O₆S₃Si

$\mathcal{M} = 876,301$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

Tests sur 110 mg d'alcool **35** (0,138 mmol) dissous dans 4 mL de dichlorométhane

1) Ajout à température ambiante de 6 eq. de chlorure de mésyle (50 μ L). La réaction est immédiate.

2) Ajout à -20°C de 2 eq. de chlorure de mésyle (17 μ L) et une pointe de spatule de DMAP. De la dégradation est observée avec le temps. Rien n'a été récupéré.

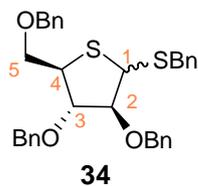
Parties expérimentales

Traitement : on dilue avec 50 mL d'éther. Après lavage avec 5 mL d'une solution saturée de NH_4Cl et 5 mL de saumure, la phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée.

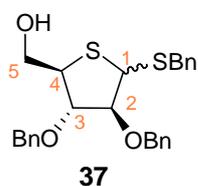
$R_f = 0,4$ (EP/AE 6/1) (test 1)

2,3,5-tri-*O*-benzyl-1-benzylthioacétal-4-thio- α,β -D-arabino-furanose (34)

2,3-di-*O*-benzyl-1-benzylthioacétal-4-thio- α,β -D-arabino-furanose (37)



Formule : $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{S}_2$
 $\mathcal{M} = 542,195$ g/mol
Aspect : huile jaunâtre



Formule : $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{S}_2$
 $\mathcal{M} = 452,148$ g/mol
Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

Le brut métylé **37** (125 μmol) est dissous dans 5 mL de THF à température ambiante. A cette solution, on ajoute 250 μL de TBAF 1M dans le THF (2 éq., 250 μmol). Après contrôle par CCM 4/1, on constate un produit à très bas $R_f = 0,1$. On concentre à moitié la solution puis on ajoute alors 50 mg de méthanolate de sodium (10 éq., 1,31 mmol). Après une nuit, la réaction est évaporée à sec et le résidu est déposé sur la colonne.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 30/1 – 25/1 – 20/1 – 15/1)

Rendement : 20-30% (à optimiser)

$R_f = 0,47$ (EP/AE 10/1)

Eléments de RMN affirmant la structure des produits:

Absence de groupement méthylénique propre à l'époxyde.

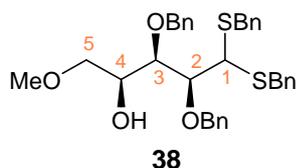
Absence des protons définissant le groupe TBDPS

LRMS (m/z, ESI) :

34 $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{S}_2\text{Na}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 565,185 (calculé), 565,2 (trouvé)

37 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{S}_2\text{Na}$ ($\mathcal{M} + \text{Na}$) = 475,138 (calculé), 475,1 (trouvé)

5-methoxy-2,3-di-O-benzyl-1-(dibenzyl)dithioacétal-L-xylo-pentose (38)



Formule : $C_{33}H_{35}O_3S_2$

$\mathcal{M} = 543,203$ g/mol

Aspect : huile jaunâtre

Mode opératoire :

Le brut mésylé **36** (125 μ mol) est dissous dans 2 mL de méthanol CLHP à T.A. A cette solution, on ajoute 140 mg de fluorure d'ammonium (3 éq., 378 μ mol). Après chauffage à 50°C pendant 1 nuit, la réaction est évaporée à sec et le résidu est déposé sur la colonne.

Purification : chromatographie flash (EP/AE 30/1 – 25/1 – 20/1 – 15/1)

Rendement : n.d.

$R_f = 0,45$ (EP/AE 10/1)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

7,94-6,96 (m, 20H, Bn)	4,16-4,12 (m, 1H)
4,98 et 4,84 (2 d, 2H, CH_2 -Ph, $J=11,4$ Hz)	4,10-4,02 (m, 1H)
4,89 et 4,67 (2 d, 2H, CH_2 -Ph, $J=11,1$ Hz)	3,87-3,78 (m, 1H)
4,69 et 4,57 (2 d, 2H, CH_2 -Ph, $J=11,5$ Hz)	3,72-3,64 (m, 3H)
4,61 et 4,44 (2 d, 2H, CH_2 -Ph, $J=11,9$ Hz)	3,25 (s, 3H, OCH_3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 250 MHz, δ , ppm) :

138,5 et 132,5 (Cq Bn)	63,5 (C5)
129,6-127,5 (CH Bn)	56,3 (OMe)
88,7 (CH)	49,1 (CH)
82,4 (CH)	36,3 (CH_2 -Ph (SBn))
79,6 (CH)	34,8 (CH_2 -Ph (SBn))
72,9 et 71,4 (2 CH_2 -Ph)	

LRMS (m/z, ESI) : $C_{33}H_{35}O_3S_2Na$ ($\mathcal{M} + Na$) = 597,211 (calculé), 597,1 (trouvé)

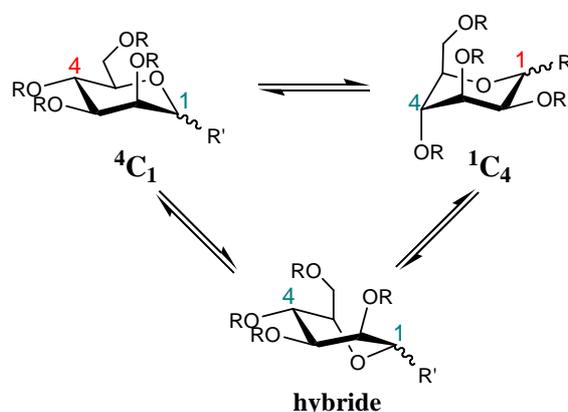
ANNEXES

Annexe A

Etude des conformations du D-Mannose et de ses dérivés

Comme tous les pyranoses, le D-Mannose et ses dérivés peuvent se présenter sous deux conformations chaise, l'une dite 4C_1 et l'autre dite 1C_4 . Ces deux conformères sont en équilibre entre eux. Généralement la conformation 4C_1 est la plus fréquente car pour des raisons énergétiques la majorité des groupements sont en position équatoriale. Toutefois, dans le cas du D-Mannose et de ses dérivés, il est possible d'observer un conformère hybride apparenté à un modèle croisé¹⁸⁶ (Schéma 127).

Schéma 127 : Conformations du D-Mannose et de ses dérivés



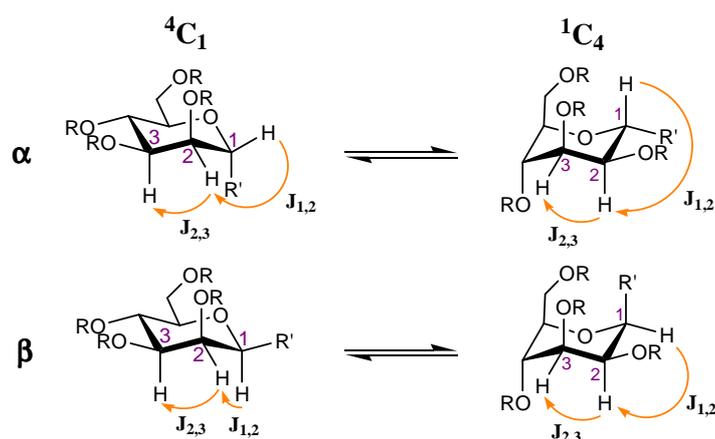
R = groupe protecteur

R' = *O*-mannoside, *C*-mannoside

Pour ces deux (« trois ») types de conformations, il faut prendre en compte les deux autres configurations possibles pour la position anomérique : α et β (Schéma 128). A première vue, un des moyens pour savoir quel anomère nous avons formé au cours de nos réactions est d'utiliser les constantes de couplage entre les protons H1 et H2 ($J_{1,2}$), essentiellement, et les protons H2 et H3 ($J_{2,3}$), voire entre H3 et H4 ($J_{3,4}$). Certes, la constante de couplage $J_{1,2}$ dépend fortement du groupement R' (*O*-mannoside ou *C*-mannoside), mais diffère également selon la conformation 4C_1 et 1C_4 ce qui rend la tâche plus difficile.

¹⁸⁶ George T.G., Szolcsányi P., Koenig S.G., Paterson D.E., Isshiki Y., Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 5, 1287

Schéma 128 : Quatre conformères à envisager dans le cas du D-Mannose



- Pour les *O*-mannosides, la constante de couplage $J_{1,2}$ reste faible voir inexistante, que l'anomère soit α ou β (Tableau 19).

Tableau 19 : Quelques constantes de couplage $J_{1,2}$ typiques dans le cas du D-Mannose, du D-Glucose et du D-Galactose

<i>D-Mannose</i>		<i>D-Glucose</i>		<i>D-Galactose</i>		<i>Réf.</i>
$J_{1,2} (\alpha)$	$J_{1,2} (\beta)$	$J_{1,2} (\alpha)$	$J_{1,2} (\beta)$	$J_{1,2} (\alpha)$	$J_{1,2} (\beta)$	
< 0,5 Hz	-	3,4 à 3,8 Hz	-	-	-	187
2 Hz	1 Hz	3,8 Hz	8,3	3,6 Hz	-	188
-	0 Hz	-	-	-	-	189

Ces petites constantes de couplages (α ou β) sont souvent associées à la conformation 4C_1 car elles correspondent aux constantes attendues pour des protons en position axiale-équatoriale et en position équatoriale-équatoriale. Par conséquent l'équilibre conformationnel est déplacé en faveur de cette conformation.

Toutefois, Yamada¹⁹⁰ a démontré qu'il était possible de forcer le *O*-Mannoside à se placer dans la conformation 1C_4 . L'introduction de groupements silylés encombrants en position 3 (TBS) et 4 (TBDPS) du D-Mannose augmente la répulsion stérique entre ceux-ci, ce qui a pour conséquence de retourner la conformation du D-Mannose pour placer ces deux groupements en positions 1,2-diaxiales. On parle alors d'enrichissement axial. La constante de couplage entre les protons H1 et H2 pour l'anomère α est alors de 7,1 Hz.

¹⁸⁷ Ohtake H., Ichiba N., Ikegami S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 24, 8171

¹⁸⁸ D'Accorso N.B., Thiel I.M.E. *Carbohydr. Res.* **1983**, 124, 177

¹⁸⁹ Nitz M., Purse B.W., Bundle D.R. *Org.Lett.* **2000**, 2, 19, 2939

¹⁹⁰ Yamada H., Nakatani M., Ikeda T., Marumoto Y. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5573

Les observations faites sur la valeur des constantes de couplages $J_{1,2}$ ne suffisent pas à déterminer si le produit synthétisé est, d'une part, de configuration α ou β car les constantes sont souvent du même ordre, et d'autre part on ignore quelle est la conformation chaise préférée par le sucre. Il est nécessaire d'étudier les effets nOe de ces molécules pour confirmer les résultats obtenus.

▪ A première vue, les mêmes observations peuvent être étendues aux *C*-mannosides. Dans un premier temps, axons notre intérêt sur les études effectuées sur les alcynyl-*C*-mannosides^{191, 192} possédant des groupements protecteurs benzyles ou acétyles (influençant peu un basculement de la conformation chaise contrairement aux groupements silylés). Les alcynes n'induisent pas d'encombrement stérique particulier sur la position anomérique. Par conséquent, les constantes de couplages obtenues devraient bien corrélérer avec celles observées pour les *O*-mannosides (Tableau 20).

Tableau 20 : Constantes de couplage des alcynyl-*C*-mannosides

<i>R</i>	<i>R'</i>	$J_{1,2} (\alpha)$	$J_{1,2} (\beta)$	Réf.
Bn	\equiv -H	2,23 Hz	1,05 Hz	191
Ac	\equiv -H	2,15 Hz	1,36 Hz	191
Bn	\equiv -H	2,5 Hz	1 Hz	192
Bn	\equiv -aniline	2,5 Hz	1 Hz	192

Le tableau 24 confirme nos attentes. Les constantes de couplages sont d'environ 1 à 2 Hz. La conformation 4C_1 est alors préférée pour les α,β -alcynyl-*C*-mannosides (confirmation par effets nOe).

L'insertion d'un groupement phényle en position anomérique n'induit aucune modification conformationnelle. La constante de couplage est toutefois sensiblement plus élevée ($J_{1,2}\beta = 2,6$ Hz).¹⁹³

Les premiers écarts à cette logique sont rencontrés pour le groupement allyle.¹⁸⁶ Souhaitant synthétiser des analogues de la guanofosfocine (inhibiteurs de la chitine synthase), l'équipe de Vasella a observé un changement de conformation du D-Mannose lors de l'échange d'un groupement méthoxy ou acétyle en position anomérique avec un groupement allyle. La constante de couplage $J_{1,2}\alpha$ d'environ 2 Hz, typique d'un arrangement vicinal équatorial/axial, atteint 4,2 Hz dans le composé allylique. De plus, la constante de couplage entre les protons 3 et 4 passe de 9 à 7,6 Hz. Une conformation hybride reflétant l'équilibre conformationnel peut être envisagée. La poursuite de la synthèse conduit à un acide carboxylique souhaité possédant une constante de couplage $J_{1,2}\alpha$

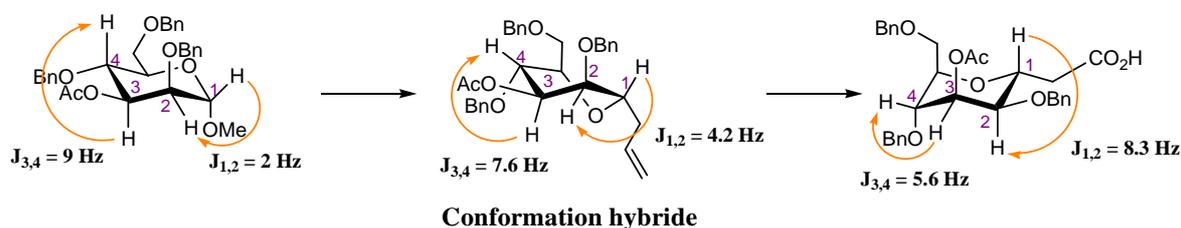
¹⁹¹ Lowary T., Meldal M., Helmboldt A., Vasella A., Bock K. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9657

¹⁹² (a) Nishikawa T., Koide Y., Wada K., Ishikawa M., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4, 687; (b) Nishikawa T., Koide Y., Kanakubo A., Yoshimura H., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 7, 1268

¹⁹³ Terauchi M., Abe H., Matsuda A., Shuto S. *Org. Lett.* **2004**, 6, 21, 3751

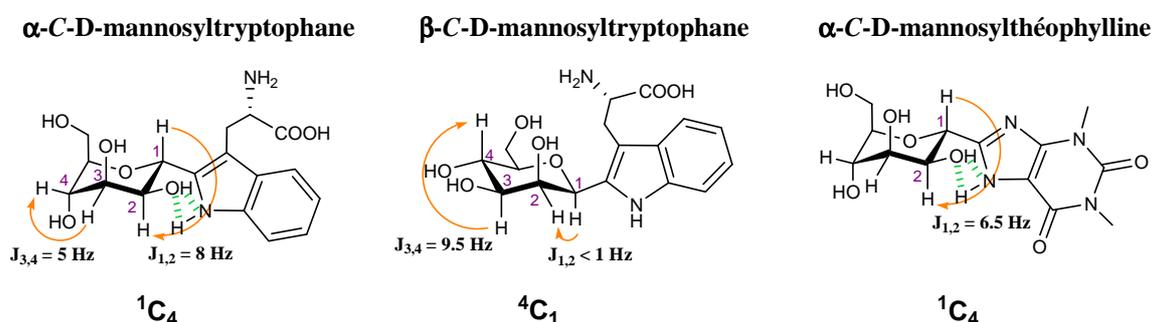
atteignant alors 8,3 Hz. L'encombrement stérique de l'acide déplace l'équilibre (amorcé par le groupe allyle) en faveur de la conformation 1C_4 (Schéma 129).

Schéma 129 : Influence des groupements allyle et acide sur la conformation du D-Mannose



Ce déplacement d'équilibre conformationnel est encore plus significatif avec des groupements très volumineux tels que le tryptophane^{192(a)} ou l' α -théophylline¹⁹⁴ (Schéma 130). L'accès à ces α -C-mannosides implique une inversion de conformation, car il n'existe pas d'effet anomère qui avantagerait la position axiale dans le cas du tryptophane et de l' α -théophylline. Seul leur encombrement stérique implique ce basculement vers la conformation chaise 1C_4 . La possibilité d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle en position 2 du D-mannose et les atomes d'azote favorise également cette conformation. Leurs analogues β étant déjà idéalement orientés en position équatoriale ne subissent pas d'inversion conformationnelle.

Schéma 130 : Influence des groupements L-tryptophane et α -théophylline

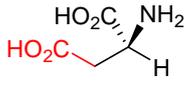
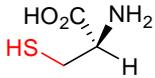
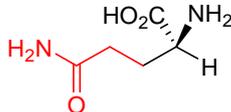
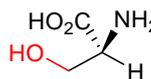
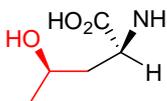
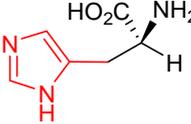
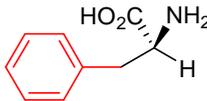
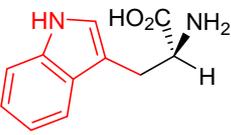
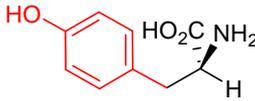


Les constantes de couplages nous apportent certaines informations sur l'orientation des divers groupements présents sur une molécule. Mais elles ne sont pas toujours suffisantes ou très concluantes. C'est pourquoi il est nécessaire d'effectuer des NOESY pour conclure assurément sur les conformations des C-mannosides.

¹⁹⁴ Onodera K., Hirano S., Masuda F., Kashimura N. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 7, 2403

Annexe B

Liste des acides aminés impliqués dans les interactions KRN7000/CD1d

<i>Nature</i>	<i>Acides Aminés intéressants</i>	<i>Structures (Zone active en rouge)</i>
Non aromatique	Acide Aspartique : Asp80, Asp151	
	Cystéine: Cys12	
	Glutamine : Gln127	
	Sérine : Ser76	
	Thréonine : Thr154	
Aromatique	Histidine : His38	
	Phénylalanine: Phe70, Phe58, Phe114, Phe169, Phe77, Phe18, Phe118, Phe84	
	Tryptophane : Trp40, Trp140, Trp63, Trp131	
	Tyrosine : Tyr73	

Annexe C

Description du logiciel QUIRAL et mode d'emploi

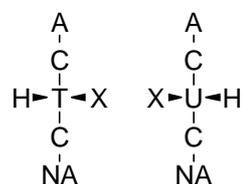
Dans le chapitre B-III-2, le logiciel QUIRAL est présenté succinctement. A titre d'informations, cette annexe reprend le descriptif et le mode d'emploi du logiciel décrits dans les deux publications qui lui sont consacrées.^{40, 41}

Software description

In order to be as accurate as possible, a list of definitions is necessary. A C[#] atom is a carbon bound to two carbon atoms, an hydrogen atom, and an X atom, X being oxygen, nitrogen, sulfur, or any halogen. A Q-sugar is an aldose molecule that contain from p = 3 to 6 carbon atoms and therefore n = p-2 adjacent C[#] atoms. The aldehyde carbon of a Q-sugar is its A-end (anomeric end) and the primary alcohol is the NA-end (non anomeric end). In order to avoid confusion with conventional R and S labelling, T and U have been introduced to qualify the configuration of the C[#] atoms (Figure 1). In Q-sugars, R chiral centers are of the T type and S chiral centers are of the U type. The configuration of the chiral atoms in a Q-sugar is simply summarized by a list of its "T or U's", arbitrarily starting from the C[#] that is bonded to the A-end. With this convention, the reference of D-glucose is "TUTT".

A target molecule contains one or more clusters of adjacent C[#] atoms. By definition, a cluster is either linear or monocyclic. A linear cluster has two ends, one qualified as the A-end and the other one as NA-end, without any consideration of oxidation state. In a cyclic cluster, two adjacent C[#] atoms are arbitrarily transformed into an A-end and a NA-end. When an X atom that is bonded to a C[#] is not an oxygen, its configuration is automatically inverted because the introduction of the X atom is assumed to require a substitution reaction that inverts configuration. A Q-target of a target molecule is a Q-sugar whose reference exactly matches the one of a cluster of C[#] atoms within this target.

Figure 1 : *Definition of the T and U configuration of C[#] atoms, as used by the Quiral program. In aldoses, T and U configurations are like R and S, respectively (a Fischer-type representation was chosen).*



A Q-reaction transforms a Q-sugar into another Q-sugar. In a general reaction scheme (Scheme 1), a Q-reactant is transformed into a Q-target, possibly with a Q-subtarget(s) as intermediate(s), to obtain the desired asymmetric configurations in the target. Q-reactants and Q-subtargets are also Q-sugars. A particular Q-target may be very expensive or, more generally, not suitable to start with in a practical synthesis. A Q-scheme is succession of one or more Q-reactions that transforms a Q-reactant in a

Q-target. Q-schemes that contain up to three Q-reactions are proposed by Quiral to solve this type of synthetic problem. The list of Q-reactions includes: the inversion of a single C[#] (Mitsunobu reaction, for example), the inversion of two adjacent C[#]s (epoxide formation and opening), the exchange of the A-end and NA-end, the cleavage of one of the ends, and the addition of a carbon atom to one of the ends. For the latter reaction, the possible generation of a new C[#] with either a T or a U configuration is considered.

Scheme 1 : *General scheme for the creation of adjacent asymmetric centers in a given target molecule*



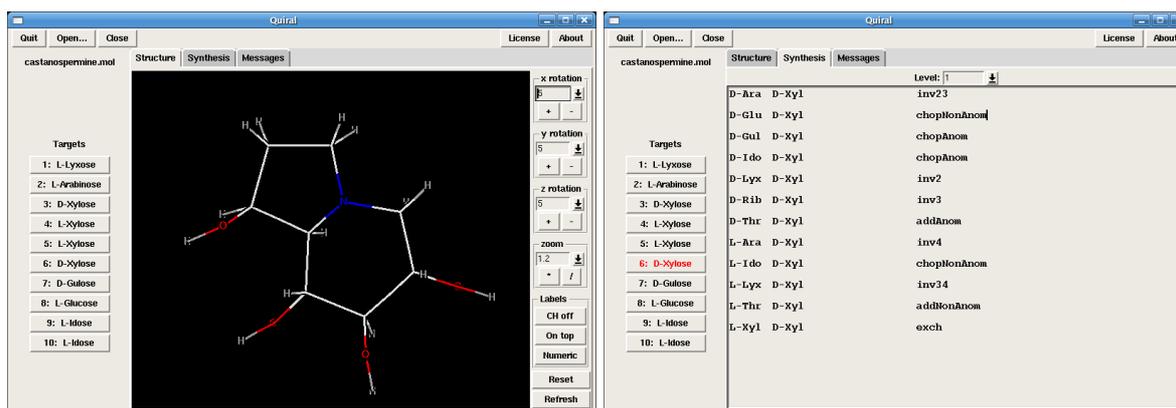
The Quiral program reads a 3D MDL (<http://www.mdli.com>, accessed June 6, 2007) MOL file of the target molecule, that is conveniently created by ChemDraw 3D (<http://www.cambridgesoft.com>, accessed June 6, 2007). Quiral is written in the Perl script language (<http://www.perl.com>, accessed June 6, 2007), taking advantage of its availability for a wide range of computer operating systems, of its object-oriented programming features and of the existence of a wide library of software modules (a description that is admittedly also valid for nearly all modern script languages).

The first time Quiral is run on a computer it creates a file named “schemes” that contains all the Q-schemes made of one to three Q-reactions. This file is generated by the “schemes.pl” Perl script only if it does not yet exist. The names and structure of the available sugars is taken from “sugars.txt”, while the Q-reactions are coded within the perl module “sugars.pm”. A Q-sugar is internally represented either by its “T or U” character string or by its abbreviated chemical name, such as L-Ara for L-Arabinose. The latter form is used to represent a Q-reaction in the “reactions.pm” module as a [initial Q-sugar, reaction name, final Q-sugars] triplet. Reaction names are character strings: “inv2”, “inv3”, “inv4”, “inv5” for the inversion of a single C[#], “inv23”, “inv34”, “inv45” for the inversion of two adjacent C[#]s, “exch” for the exchange of the A-end and of the NA-end, “chopAnom”, “chopNonAnom” for the elimination of a chain extremity, and finally “addAnom”, “addNonAnom” for chain elongation reactions. A “Reactions” object contains the list of all possible Q-reaction triplets. Such an object is build by the “schemes.pm” module to create a “Schemes” objet that allows the connection of any Q-sugar with any other Q-sugar through all Q-schemes made of up to three Q-reactions. A “Schemes” object is created by the “schemes.pl” script and then serialized by the “Storable” standard Perl module as the “schemes” binary file. This file is the only link between the strictly chemical part of the Quiral software and the graphical user interface.

Directions for use

When “quiral.pl” is launched, the interface window appears, composed of three tabbed pages. Each page is dedicated to a particular task: molecular structure drawing, Q-scheme display and message posting. The latter page shows up first, posts the “About..” message and invites the user to read the licence file. The 3D .mol file of the target molecule for which a retrosynthetic analysis is desired is accessed by the “Open...” button. The selected molecule shows up, as visible in Figure 2a. A .mol file contains atom and bond descriptions that are needed by “molecule.pm” to build a “Molecule” object. The C[#] atoms are then identified and grouped into clusters. In each cluster, either linear or cyclic, a A-end and a NA-end are defined; the other atoms then receive their “T” or “U” label according to the rule that is illustrated in Figure 1. Definition of the “T or U” value of a C[#] within a cluster boils down to the calculation of the determinant of a three vector set, to know if it forms a right-handed or a left-handed coordinate system.

Figure 2 : The user interface of the Quiral program: (a) the “Structure” page, once a molecular structure file has been read ; (b) the “Synthesi” page, once a Q-target has been selected



The clusters that contain three or more C[#] atoms are the only ones retained for further analysis. All pentose and hexose Q-sugars, whose structures and names are imported from the “schemes” file, are then searched for within all clusters to define the Q-target set of the molecule. For example, a four-membered linear cluster (C₁ to C₄) matches with 2 pentoses (C₁ to C₃ and C₂ to C₄) and 1 hexose (C₁ to C₄), each being placed in two directions along the cluster (C₃ to C₁, C₄ to C₂, and C₄ to C₁), thus providing a 6 Q-target set. Of course, identical Q-targets may exist, depending on the repartition of the “T or U” within the cluster. Atoms, bonds, clusters are implemented in Quiral as objects. The sets of such objects are also objects, whose addresses are members of the current “Molecule” object.

The “moldro.pm” package contains all that is needed to draw a molecule on screen, seen from various view angles, at different scales and with options that will be detailed hereafter. Coordinate transformation mathematics is delegated to the “mat.pm” module. The “Moldro” class is a subclass of “Molecule”, considering that a “Moldro” is a “Molecule” that is able to draw the information it contains. The whole user interface is laid out by “Molshow.pm” when a “Molshow” object is created

by the execution of the top level “quiral.pl” script. All drawing operations are performed by the standard Tk module and its astonishingly powerful Canvas widget class.

Molecular rotations are controlled by three widgets, one per rotation axis, and view scaling by a fourth one. Three toggle buttons change the way a molecule is displayed. The “CH on” / “CH off” button hides or shows the H atoms that are bonded to carbon atoms. This can be useful to improve the drawing readability. The “on top” / “in place” button controls the z-ordering of the graphical objects. In the “in place” mode all objects are drawn from the most distant ones to the closest ones, atom labels included. This gives the feeling of depth dimension on screen but may obscure label reading. In the “on top” mode, the labels are drawn after all bonds have been displayed. This sometimes results in drawings that look like the famous Escher “Waterfall” painting but may also ease information readability. The “Normal” / “Numeric” button switches between the display of atom labels and atom numbers, as defined in the molecule .mol file. The “Reset button” redraws the molecule in the position it first appeared on screen and that is optimized to occupy a maximum area for a given scaling factor. This effect is obtained by computing the eigenvalues and eigenvectors of the molecule inertia tensor. If I_x , I_y and I_z are the three inertia moments ($I_x \leq I_y \leq I_z$), associated to the X, Y and Z directions, the molecule is rotated so that the X axis is superimposed with the horizontal screen axis, and the Y axis with the vertical screen axis. The “Refresh” button redraws the molecule in its current state and is only useful when the size of the drawing area has been modified by the user.

The list of the molecule Q-targets is placed on the leftmost panel of the interface window. Each Q-target is associated to a button that, when pressed, modifies the way the molecule is drawn and writes information about the molecular synthesis on the “Synthesis” page of the graphical interface, as shown in Figure 2b. A selected Q-target appears in the molecule drawing area as if its atoms were highlighted (the other parts of the molecule are shaded). The A-end and the NA-end labels are made visible and arrows indicate the way from the former to the latter through chemical bonds. The “T or U’s” of each $C^\#$ within the selected Q-target are also made visible. The “Synthesis” page provides all Q-schemes that lead to the Q-target. The maximum number of involved Q-reactions (between 1 and 3) is the level parameter that can be adjusted by the user by means of a list widget. The reaction display area is divided in four columns. Each line corresponds to a Q-scheme. It successively indicates the name of the Q-reactant, the name of the Q-target, the Q-subtarget list (empty if the level is 1, a single Q-sugar if the level is 2, a Q-sugar pair if the level is 3), and the list of Q-reactions that constitute the current Q-scheme.

Annexe D

1) Glossaire d'immunologie¹⁹⁵

Agoniste : molécule interagissant avec un récepteur membranaire et activant celui-ci. L'agoniste mime en général le message se liant habituellement avec le récepteur en question. Il peut être plus ou moins sélectif pour un type de récepteur.

Apoptose : mort cellulaire programmée, ou suicide cellulaire. C'est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire.

Antigène : macromolécule naturelle ou synthétique, étrangère à l'organisme considéré, mais reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immunitaire.

Cascades protéolytiques : coupure des liaisons peptidiques des protéines par des enzymes (protéases). On parle alors de coupure protéolytique ou de protéolyse. Ce processus implique l'utilisation d'une molécule d'eau ce qui les classe parmi les hydrolases. Les fonctions biologiques des protéases sont variées : elles interviennent dans la maturation des protéines, dans la digestion des aliments, dans la coagulation sanguine, dans le remodelage des tissus au cours du développement de l'organisme et dans la cicatrisation. Certaines protéases sont des toxines, comme la toxine botulique.

Choc septique : défaillance circulatoire aiguë, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques et viscéraux, déclenché par un agent infectieux. C'est une cause de collapsus cardiovasculaire.

Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) : système de reconnaissance du soi présent chez la plupart des vertébrés. Le CMH I permet aux cellules présentatrices d'antigène d'être identifiées comme faisant partie du corps et le CMH II permet à certains globules blancs de présenter des parties de corps intrus pour déclencher une réponse immunitaire. Dans de rares cas, les peptides du CMH peuvent devenir à leurs tours responsables de maladies auto-immunes indépendamment de l'immunité cellulaire.

¹⁹⁵ L'essentielle de ces définitions ont été trouvées sur le site <http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>

Endogène : désigne ce qui se produit dans un organisme ou qui émane de celui-ci.¹⁹⁶

Endosomes : sous compartiments de la cellule, qui permettent le tri des molécules internalisées. Celles-ci pourront avoir plusieurs devenir : soit repartir à la membrane plasmique (recyclage), être dégradées (détruites) par des systèmes de dégradation intracellulaire, ou être redirigées vers d'autres compartiments intracellulaires (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, etc.), pour agir ailleurs dans la cellule.

Ex vivo : cellules primaires fraîches sorties de l'animal (dans notre cas, il s'agit de cellules de la rate)

Hématopoïèse : formation de cellules sanguines.

Leucocytes : globules blancs produits dans la moelle osseuse et présents dans le sang, tels que les lymphocytes T ou B.

Lysosomes : organites cellulaires contenant des enzymes digestives (hydrolases acides) pour digérer les macromolécules. Pour fonctionner correctement, les enzymes digestives requièrent l'environnement acide du lysosome (pH voisin de 4,8).

Maladie de Crohn : affection inflammatoire chronique pouvant toucher tout le tube digestif avec une prédilection pour l'iléon, le côlon et la région anale.

Mutagenèse : induction de mutations dans le génome de la descendance d'un organisme unicellulaire ou multicellulaire, par exposition à un agent chimique (par exemple un agent alkylant), à un agent physique (par exemple des rayons X), à un virus intégratif ou à un élément transposable, ou par utilisation d'une technique de biologie moléculaire (mutagenèse dirigée).

Phagocytose : procédé par lequel les microbes sont détruits par des cellules macrophages : leucocytes et phagocytes. Elle consiste en la capture et l'ingestion des particules solides inertes ou vivantes du milieu ambiant. La phagocytose est caractérisée par l'adhésion, l'ingestion et éventuellement la digestion de particules de diamètre microscopique, puis par le rejet des déchets. Cette activité constitue un élément essentiel de l'immunité naturelle.

Pathogène : (du grec « naissance de la douleur ») signifie : qui entraîne une maladie. La capacité d'une bactérie à provoquer des troubles chez un hôte dépend de son pouvoir invasif (capacité à se répandre dans les tissus et à y établir un/des foyers infectieux), et de son pouvoir toxigène (capacité à produire des toxines). Il existe aussi de nombreux virus pathogènes.

On distingue deux catégories de bactéries pathogènes :

¹⁹⁶ <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/endogene-1693.html>

Annexe D

- **Strictes ou spécifiques :** Ces bactéries provoquent des troubles quel que soit le patient, sauf dans le cas des *porteurs sains*. Par exemple : *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae*.
- **Opportunistes :** Ces bactéries provoquent des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (on parle aussi de sujets *immunodéprimés*). Par exemple : *Pseudomonas aeruginosa*.

Plasmocytes : globules blancs du sang. Ces cellules sont productrices d'anticorps, et elles sont le stade final de différenciation des lymphocytes B. A la différence d'autres Lymphocytes B, qui présentent leurs anticorps au niveau de leur surface membranaire, les plasmocytes sont capables de produire des anticorps solubles. De plus, ces cellules se caractérisent par une incapacité de prolifération (contrairement aux autres stades d'activation des lymphocytes). Ces plasmocytes sont produits dans la rate des mammifères et migrent dans la moelle osseuse ou ils peuvent survivre plusieurs mois, permettant ainsi une défense à long terme de l'organisme.

Pouvoir chimiotactique : capacité d'une cellule à réagir à un gradient d'une substance chimique.

Propriétés anti-protéasiques : capacité à ralentir ou à stopper les enzymes clivant les liaisons peptidiques des protéines.

Résonance plasmonique de surface : méthode de mesure de la liaison d'un ligand sur un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique. Le système de détection est basé sur une variation de l'indice de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs.¹⁹⁷

Splénocyte : terme utilisé pour désigner les cellules issues de la rate.

Transfection : processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes, non-médié par un virus, par opposition à la transduction.

¹⁹⁷ http://www.biochimie.univ-montp2.fr/licence/liaison/surf_plas.htm

2) Activités des α -GalCer

Résumé des tests effectués, jusqu'à présent, sur le KRN 7000 (K), l'OCH (O) et l' α -C-GalCer (C).

Remarque : Pour une question de clarté, une annotation distincte de celle du manuscrit a été attribuée aux références citées dans les tableaux. Certaines ont déjà été citées au cours des chapitres précédents.

Maladie/Système modèle	Effet de l' α -GalCer sur la maladie			Références
	Mauvais	Aucun	Bon	
Maladie Autoimmune				
Diabète Type 1				
Souris NOD			K, O	D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8
Encéphalomyélites (EAE)				
Souris SJL (Protéine myelinique)	K			D9
Souris PL (Protéine myelinique)			K	D9
Souris B6 (peptide MOG35–55)		K	K, O	D9, D10, D11
Rhumatismes et Inflammations				
Souris B6 (Arthrite induite par le collagène)			K	^p D12
Souris SJL (Arthrite induite par le collagène)		K	O	D12
Model K/BxN (Injection d'anticorps)	K			D13
Souris F1 (NZB×NZW) (Lupus nephritis)	K			D14, D15, D16, D17
Souris BALB/c (Lupus nephritis)			K	D18, D19
Souris SJL (Lupus nephritis)			K	D19
Souris MRL- <i>lpr/lpr</i> (Dermatite)		K	K	D20, D21
Souris B6 ou B6×129 (Colitis)			K, O	D22, D23
Allergie/asthme/sensibilité au contact				
Souris BALB/c (immunisation contre l'ovalbumine et mesure de l'éosinophilie)			K	D24, D25
Souris BALB/c (immunisation contre l'ovalbumine et mesure de la fonction pulmonaire avec obstruction par de la méthacholine)	K			D26, D27, D28
Athéroscléroses				
Souris déficiente en Apolipoprotéine E	K, O			D29, D30, D31

Maladie/Système modèle	Effet de l'α-GalCer sur la maladie			Références
	Mauvais	Aucun	Bon	
Infectious disease				
<i>Mycobacterium tuberculosis (M. tb.)</i>				
Souris B6 ou BALB/c infectées par <i>M. tb</i> Erdman par intraveineuse			K	D32, D33
Lyses des cellules NKT humaines <i>in vitro</i> infectées par <i>M. tb</i> H37			K	D34
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
Souris B6 (infection intra trachéale)			K	D35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Souris BALB/c ou B6 (pneumonie)			K	D36
Souris B6 (infection urinaire)			K	D37
<i>Plasmodium</i> spp. (malaria)				
Souris BALB/c ou B6 infectées par les sporozoaires <i>P. yoelii</i> ou <i>P. bergi</i>			K, C	D38, D39
Souris BALB/c ou B6 infectées par <i>P. yoelii</i> or <i>P. bergi</i> (stade érythrocytaire)		K		D39
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Maladie de Chagas)				
Souris B6 ou BALB/c infectées par injection péritonéale			K	D40, D41
Souris B6 ou BALB/c infectées par intramusculaire ou par intraveineuse		K		D41
<i>Cryptococcus neoformans</i>				
Souris B6 (infection par intraveineuse par sérotype A)			K	D42
Virus Hépatite B				
Souris transgéniques infectées par le VHB			K	D43, D44
Virus encéphalomyocardie diabétogénique				
Souris BALB/c			K	D45
Virus syncytium respiratoire				
Destruction du virus	K			D46
Perte de poids			K	D46
Immunologie tumorale				
Initiation de la tumeur sur souris modèles				
Tumeurs mammaires sur souris transgénique Her-2/neu			K	D47
Souris B6 (élimination de p53)			K	D47
Souris B6 (infection par sarcome)			K	D47, D48, D49
Grossissement de la tumeur et métastases sur souris modèles				
Inoculation par intraveineuse du mélanome B16			K, C	D38, D50
Inoculation par intra péritonéale du lymphome EL-4			K	D50

Annexe D

- ^{D1} Gombert J. M., Herbelin A., Tancrede-Bohin E., Dy M., Carnaud C., Bach J. F. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 2989-2998
- ^{D2} Wang B., Geng Y. B., Wang C. R. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 313-320
- ^{D3} Hong S., Wilson M. T., Serizawa I., Wu L., Singh N., Naidenko O. V., Miura T., Haba T., Scherer D. C., Wei J., Kronenberg M., Koezuka Y., Van Kaer L. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1052-1056
- ^{D4} Sharif S., Arreaza G. A., Zucker P., Mi Q. S., Sondhi J., Naidenko O. V., Kronenberg M., Koezuka Y., Delovitch T. L., Gombert J. M., Leite-De-Moraes M., Gouarin C., Zhu R., Hameg A., Nakayama T., Taniguchi M., Lepault F., Lehuen A., Bach J. F., Herbelin A. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1057-1062
- ^{D5} Godfrey D. I., Kinder S. J., Silvera P., Baxter A. G. *J. Autoimmun.* **1997**, *10*, 279-285
- ^{D6} Hammond K. J., Poulton L. D., Palmisano L. J., Silveira P. A., Godfrey D. I., Baxter A. G. *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 1047-1056
- ^{D7} Mizuno M., Masumura M., Tomi C., Chiba A., Oki S., Yamamura T., Miyake S. *J. Autoimmun.* **2004**, *23*, 293-300
- ^{D8} Berzins S. P., Kyparissoudis K., Pellicci D. G., Hammond K. J., Sidobre S., Baxter A., Smyth M. J., Kronenberg M., Godfrey D. I. *Immunol. Cell. Biol.* **2004**, *82*, 247-252
- ^{D9} Singh A. K., Wilson M. T., Hong S., Olivares-Villagomez D., Du C., Stanic A. K., Joyce S., Sriram S., Koezuka Y., Van Kaer L. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 1801-1811
- ^{D10} Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T. *Nature* **2001**, *413*, 531-534
- ^{D11} Pal E., Tabira T., Kawano T., Taniguchi M., Miyake S., Yamamura T. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 662-668
- ^{D12} Chiba A., Oki S., Miyamoto K., Hashimoto H., Yamamura T., Miyake S. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 305-313
- ^{D13} Kim H. Y., Kim H. J., Min H. S., Kim S., Park W. S., Park S. H., Chung D. H. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 41-47
- ^{D14} Zeng D., Liu Y., Sidobre S., Kronenberg M., Strober S. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1211-1222
- ^{D15} Morshed S. R., Mannoor K., Halder R. C., Kawamura H., Bannai M., Sekikawa H., Watanabe H., Abo T. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 2551-2561
- ^{D16} Zeng D., Lee M. K., Tung J., Brendolan A., Strober S. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 5000-5004
- ^{D17} Forestier C., Molano A., Im J. S., Dutronc Y., Illarionov P. A., Diamond B., Davidson A., Besra G. S., Porcelli S. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 763-770
- ^{D18} Yang J. Q., Singh A. K., Wilson M. T., Satoh M., Stanic A. K., Park J. J., Hong S., Gadola S. D., Mizutani A., Kakumanu S. R., Reeves W. H. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 2142-2153
- ^{D19} Singh A. K., Yang J. Q., Parekh V. V., Wei J., Wang C. R., Joyce S., Singh R. R., Van Kaer L. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 1143-1154
- ^{D20} Yang J. Q., Saxena V., Xu H., Van Kaer L., Wang C. R., Singh R. R. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 4439-4446
- ^{D21} Chan O. T., Paliwal V., McNiff J. M., Park S. H., Bendelac A., Shlomchik M. J. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 2985-2990
- ^{D22} Ueno Y., Tanaka S., Sumii M., Miyake S., Tazuma S., Taniguchi M., Yamamura T., Chayama K. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2005**, *11*, 35-41
- ^{D23} Saubermann L. J., Beck P., De Jong Y. P., Pitman R. S., Ryan M. S., Kim H. S., Exley M., Snapper S., Balk S. P., Hagen S. J., Kanauchi O., Motoki K., Sakai T., Terhorst C., Koezuka Y., Podolsky D. K., Blumberg R. S. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 119-128
- ^{D24} Korsgren M., Persson C. G., Sundler F., Bjerke T., Hansson T., Chambers B. J., Hong S., Van Kaer L., Ljunggren H. G., Korsgren O. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 553-562
- ^{D25} Matsuda H., Suda T., Sato J., Nagata T., Koide Y., Chida K., Nakamura H. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2005**, *33*, 22-31
- ^{D26} Akbari O., Stock P., Meyer E., Kronenberg M., Sidobre S., Nakayama T., Taniguchi M., Grusby M. J., DeKruyff R. H., Umetsu D. T. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 582-588
- ^{D27} Lisbonne M., Diem S., de Castro K. A., Lefort J., Araujo L. M., Hachem P., Fourneau J. M., Sidobre S., Kronenberg M., Taniguchi M., Van Endert P., Dy M., Askenase P., Russo M., Vargaftig B. B., Herbelin A., Leite-de-Moraes M. C. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 1637-1641
- ^{D28} Kim J. O., Kim D. H., Chang W. S., Hong C., Park S. H., Kim S., Kang C. Y. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *114*, 1332-1338
- ^{D29} Tupin E., Nicoletti A., Elhage R., Rudling M., Ljunggren H. G., Hansson G. K., Berne G.P. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 417-422
- ^{D30} Nakai Y., Iwabuchi K., Fujii S., Ishimori N., Dashtsoodol N., Watano K., Mishima T., Iwabuchi C., Tanaka S., Bezbradica J. S., Nakayama T., Taniguchi M., Miyake S., Yamamura T., Kitabatake A., Joyce S., Van Kaer L., Onoe K. *Blood* **2004**, *104*, 2051-2059
- ^{D31} Major A. S., Wilson M. T., McCaleb J. L., Ru S. Y., Stanic A. K., Joyce S., Van Kaer L., Fazio S., Linton M. F. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 2351-2357
- ^{D32} Chackerian A., Alt J., Perera V., Behar S. M. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 6302-6309
- ^{D33} Behar S. M., Dascher C. C., Grusby M. J., Wang C. R., Brenner M. B. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1973-1980

Annexe D

- ^{D34} Gansert J. L., Kiessler V., Engele M., Wittke F., Rollinghoff M., Krensky A. M., Porcelli S. A., Modlin R. L., Stenger S. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3154-3161
- ^{D35} Kawakami K., Yamamoto N., Kinjo Y., Miyagi K., Nakasone C., Uezu K., Kinjo T., Nakayama T., Taniguchi M., Saito A. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 3322-3330
- ^{D36} Nieuwenhuis E. E., Matsumoto T., Exley M., Schleipman R. A., Glickman J., Bailey D. T., Corazza N., Colgan S. P., Onderdonk A. B., Blumberg R. S. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 588-593
- ^{D37} Minagawa S., Ohyama C., Hatakeyama S., Tsuchiya N., Kato T., Habuchi T. *J. Urol.* **2005**, *173*, 2171-2174
- ^{D38} Schmiege J., Yang G., Franck R. W., Tsuji M. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1631-1641
- ^{D39} Gonzalez-Aseguinolaza G., de Oliveira C., Tomaska M., Hong S., Bruna-Romero O., Nakayama T., Taniguchi M., Bendelac A., Van Kaer L., Koezuka Y., Tsuji M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8461-8466
- ^{D40} Duthie M. S., Wleklinski-Lee M., Smith S., Nakayama T., Taniguchi M., Kahn S. *J. Infect. Immun.* **2002**, *70*, 36-48
- ^{D41} Miyahira Y., Katae M., Takeda K., Yagita H., Okumura K., Kobayashi S., Takeuchi T., Kamiyama T., Fukuchi Y., Aoki T. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 1234-1241
- ^{D42} Kawakami K., Kinjo Y., Yara S., Koguchi Y., Uezu K., Nakayama T., Taniguchi M., Saito A. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 213-220
- ^{D43} Kakimi K., Guidotti L. G., Koezuka Y., Chisari F. V. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 921-930
- ^{D44} Kakimi K., Lane T. E., Chisari F. V., Guidotti L. G. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 6701-6705
- ^{D45} Exley M. A., Bigley N. J., Cheng O., Tahir S. M., Smiley S. T., Carter Q. L., Stills H. F., Grusby M. J., Koezuka Y., Taniguchi M., Balk S. P. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 713-718
- ^{D46} Johnson T. R., Hong S., Van Kaer L., Koezuka Y., Graham B. S. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4294-4303
- ^{D47} Hayakawa Y., Rovero S., Forni G., Smyth M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9464-9469
- ^{D48} Crowe N. Y., Smyth M. J., Godfrey D. I. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 119-127
- ^{D49} Smyth M. J., Thia K. Y., Street S. E., Cretney E., Trapani J. A., Taniguchi M., Kawano T., Pelikan S. B., Crowe N. Y., Godfrey D. I. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 661-668
- ^{D50} Kobayashi E., Motoki K., Uchida T., Fukushima H., Koezuka Y. *Oncol. Res.* **1995**, *7*, 529-534

Références Bibliographiques

- ¹ (a) Levy D. E., Tang C. *The chemistry of C-Glycosides* **1995**, vol. 13, Pergamon Press, Oxford; (b) Postema M. H. D. *C-Glycoside Synthesis* **1995**, CRC Press, Inc; (c) Du Y., Linhardt R. J. *Tetrahedron* **1998**, 54, 34, 9913; (d) Beau J. M., Gallagher T. *Top. Curr. Chem.* **1997**, 187, 1; (e) Nicotra F. *Top. Curr. Chem.* **1997**, 187, 55; (f) Sinaÿ P. *Pure & Appl. Chem.* **1997**, 69, 3, 459 et références citées
- ² (a) Ringel S. M., Greenough R. C., Roemer S., Connor D., Gutt A. L., Blair B., Kanter G., Von Strandtmann M. J. *Antibiot.* **1977**, 30, 371; (b) Kende A. S., Fujii Y., Mendoza J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 26, 9645; (c) Kende A. S., Mendoza J. S., Fujii Y. *Tetrahedron* **1993**, 49, 36, 8015
- ³ Pettit G. R., Cichacz Z. A., Gao F., Herald C. L., Boyg M. R., Schmidt J. M., Hooper J. N. A. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6, 1302
- ⁴ Hanessian S. *Total Synthesis of Natural Products. The Chiron Approach* **1983**, Pergamon Press, Oxford
- ⁵ Cai S. Q., Wang R., Yang W., Shang M., Ma C., Shoyama Y. *Chemistry & Biodiversity* **2006**, 3, 3, 343
- ⁶ Dinda B., Bhattacharya A., De Chandra U., Arima S., Takayanagi H., Harigaya Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54, 5, 679
- ⁷ (a) Sanhueza C. A., Mayato C., Garcia-Chicano M., Diaz-Penate R., Dorta R. L., Vazquez J. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 16, 4223; (b) Chaulagain M. R., Postema M. H. D., Valeriote F., Pietraszkewicz H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 41, 7791
- ⁸ (a) Zou W. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2005**, 5, 14, 1363; (b) Stolz F., Blume A., Hinderlich S., Reutter W., Schmidt R. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 15, 3304
- ⁹ (a) Robson R. J., Dennis E.A. *Acc. Chem. Res.* **1983**, 16, 7, 251; (b) Förster T., Claas M., Seipel W. Brevet DE4417476A1 **1995**
- ¹⁰ (a) Effet anomère : Tendance d'un groupement alkoxy sur le carbone anomérique C₁, à s'orienter en position axiale plutôt qu'en position équatoriale, malgré les interactions stériques défavorables. (Terme introduit par Lemieux R. U. *Abstracts of papers, Am. Chem. Soc.* **1958**, 133, 31N). En terme orbitaire, il existe un recouvrement entre un des doublets non liants de l'oxygène endo-cyclique et l'orbitale anti-liante σ^* de la liaison C₁-OR.
- (b) Effet exo-anomère : orientation privilégiée de la liaison O-R du groupe alkoxy sur le centre anomérique. (Terme également introduit par Lemieux R. U. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 4427)
- ¹¹ Wu T. C., Goekjian P. G., Kishi Y. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4819
- ¹² Lemieux R. U., Koto S. *Tetrahedron* **1974**, 30, 13, 1933
- ¹³ (a) Brown D. S., Bruno M., Davenport R. J., Ley S. V. *Tetrahedron* **1989**, 45, 13, 4293; (b) Kozikowski A. P., Konoike T., Ritter A. *Carbohydr. Res.* **1987**, 171, 1, 109
- ¹⁴ (a) Rainier J. D., Cox J. M. *Org. Lett.* **2000**, 2, 17, 2707; (b) Leeuwenburgh M. A., Timmers C. M., Van der Marel G. A., Van Boom J. H., Mallet J. M., Sinaÿ P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 35, 6251; (c) Leeuwenburgh M. A., Litjens R. E. J. N., Codée J. D. C., Overkleeft H. S., Van der Marel G. A., Van Boom J. H. *Org. Lett.* **2000**, 2, 9, 1275; (d) Bellosta V., Czernecki S. *Carbohydr. Res.* **1993**, 244, 2, 275
- ¹⁵ Streicher H., Reiner M., Schmidt R. R. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, 16, 3, 277
- ¹⁶ Toshima K., Miyamoto N., Matsuo G., Nakata M., Matsumura S. *Chem. Commun.* **1996**, 11, 1379
- ¹⁷ (a) Cohen T., Matz J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 22, 6900; (b) Cohen T., Lin M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4, 1130; (c) Beau J. M., Sinaÿ P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 50, 6185
- ¹⁸ (a) Beau J. M., Sinaÿ P. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 50, 6193; (b) Aebischer B., Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 789; (c) Baumberger F., Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2210
- ¹⁹ Hanessian S., Martin M., Desai R. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 926
- ²⁰ Burkhart F., Hoffmann M., Kessler H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1191
- ²¹ (a) Hanessian S. *Preparative Carbohydrate Chemistry* **1997**, Marcel Dekker Inc., New York, 507; (b) Keck G. E., Enholm E. J., Kochensky D. F. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1867; (c) Dupuis J., Giese B., Hartwig J., Leising M., Korth H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4332
- ²² (a) Mazeas D., Skrydstrup T., Doumeix O., Beau J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 13, 1383; (b) Skrydstrup T., Mazeas D., Elmouchir M., Doisneau G., Riche C., Chiaroni A., Beau J. M. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1342
- ²³ Vyplel H., Scholz D., Macher I., Schindlmaier K., Schütze E. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2759
- ²⁴ Armstrong R. W., Teegarden B. R. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 915
- ²⁵ Nicotra F., Panza L., Ronchetti F., Russo G., Toma L. *Carbohydr. Res.* **1987**, 171, 49
- ²⁶ (a) Liu P. S. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4717; (b) Qjao L., Vedras J. C. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3480
- ²⁷ Lancelin J. M., Pougny J. R., Sinaÿ P. *Carbohydr. Res.* **1985**, 136, 369
- ²⁸ Boschetti A., Nicotra F., Panza L., Russo G. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 18, 4181

- ²⁹ Schmid W., Whitesides G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9670
- ³⁰ Wang Y., Babirad S. A., Kishi Y. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 468
- ³¹ Burke S. D., Armistead D. M., Schoenen F. J., Fevig J. M. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2787
- ³² Guillaume S., Plé K., Banchet A., Liard A., Haudrechy A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2355
- ³³ (a) Cram D. J., Abd Elhafez F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 23, 5828-5835; (b) Chérest M., Felkin H., Prudent N. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *18*, 2199; (c) Anh N. T. *Top. Curr. Chem.* **1980**, *88*, 145
- ³⁴ (a) Reetz M. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 8, 556; (b) Mengel A., Reiser O. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1191-1224; (c) Smith R. J., Trzoss M., Bühl M., Bienz S. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *16*, 2770
- ³⁵ (a) Fürstner A., Wuchrer M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 76; (b) Hanessian S., Sahoo S. P., Botta M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, *11*, 1143; (c) Lopez R., Poupon J.-C., Prunet J., Férézou J.-P., Ricard L. *Synthesis* **2005**, *4*, 644; (d) Lam H. W., Pattenden G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3, 508
- ³⁶ Alami M., Crousse B., Linstrumelle G., Mambu L., Larchevêque M. *Tetrahedron: Asymm.* **1997**, *8*, 2949
- ³⁷ Pilli R. A., Victor M. M., de Meijere A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5910
- ³⁸ Young R. N., Champion E., Gauthier J. Y., Jones T. R., Leger S., Zamboni R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 539
- ³⁹ Evans J. C., Goralski C. T., Hasha D. L. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2941
- ⁴⁰ Clive D. L. J., Tao, Y., Bo Y., Hu Y.-Z., Selvakumar N., Sun S., Daigneault S., Wu Y.-J. *Chem. Commun.* **2000**, 1341
- ⁴¹ Mead K. T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, *10*, 1019
- ⁴² (a) Maezaki N., Hirose, Y., Tanaka T. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2177; (b) Trost B. M., Ball Z. T., Jöge T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3415
- ⁴³ Ishiyama H., Takemura T., Tsuda M., Kobayashi J. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4583
- ⁴⁴ Dolence E. K., Adamczyk M., Watt D. S., Russell G. B., Horn D. H. S. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1189
- ⁴⁵ Abel S., Faber D., Hüter O., Giese B. *Synthesis* **1999**, *1*, 188
- ⁴⁶ Krause N., Seebach D. *Chem. Ber.* **1987**, *120*, 1845
- ⁴⁷ (a) Takatori K., Tanaka N., Tanaka K., Kajiwara M. *Heterocycles* **1993**, *36*, 1489; (b) Miyata O., Nakajima E., Naito T. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 213; (c) Marshall J. A., Johns B. A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1501; (d) Toshima K., Arita T., Kato K., Tanaka D., Matsumura S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8873
- ⁴⁸ (a) Haustedt L. O., Panicker S. B., Kleinert M., Hartung I. V., Eggert U., Niess B., Hoffmann H. M. R. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6967; (b) Ball M., Gaunt M. J., Hook D. F., Jessiman A. S., Kawahara S., Orsini P., Scolaro A., Talbot A. C., Tanner H. R., Yamanoi S., Ley S. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5433
- ⁴⁹ (a) Evans D. A., Halstead D. P., Allison B. D. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4461; (b) Evans D. A., Allison B. D., Yang M. G. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4457
- ⁵⁰ (a) Bukownik R. R., Wilcox C. S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 463; (b) Gaudino J. J., Wilcox C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4374; (c) Williams D. R., Jass A. P., Tse H.-L. A., Gaston R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4552; (d) Sharma G. V. M., Punna S., Hymavathi L., Reddy N. Y., Krishna P. R., Chorghade M. S., Ley S. V. *Tetrahedron: Asymm.* **2005**, *16*, 1135; (e) Su Y.-L., Yang C.-S., Teng S.-J., Zhao G., Ding, Y. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2147
- ⁵¹ (a) Smith A. B., Friestad G. K., Barbosa J., Bertounesque E., Hull K. G., Iwashima M., Qui Y., Salvatore B. A., Spoor P. G., Duan J. J.-W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10468; (b) Czernecki S., Horns S., Valery J.-M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 650; (c) Michelet V., Adiey K., Tanier S., Dujardin G., Genêt J.-P. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2947
- ⁵² (a) Marco-Contelles J., de Opazo E., Arroyo N. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4729; (b) Marco-Contelles J., de Opazo E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3705; (c) Ley S. V., Michel P. *Synthesis* **2004**, 147; (d) Michel P., Ley S. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3898; (e) Dixon D. J., Krause L., Ley S. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2516
- ⁵³ (a) Buchanan J. G., Dunn A. D., Edgar A. R. *Carbohydrate. Res.* **1974**, *36*, *1*, C5; (b) Buchanan J. G., Dunn A. D., Edgar A. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 1191; (c) Pearson W. H., Hembre E. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8273
- ⁵⁴ Trost B. M., Harrington P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5028
- ⁵⁵ Kasatkin A. N., Podlipchuk R. P., Biktimirov R. K., Tolstikov G. A. *Russ. Chem. Bull.* **1993**, *42*, 1078
- ⁵⁶ Lu X., Byun H.-S., Bittman R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5433
- ⁵⁷ Tezuka K., Compain P., Martin O. R. *Synlett* **2000**, 1837
- ⁵⁸ (a) Leteux C., Veyrières A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2647; (b) Désiré J., Veyrières A. *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 177; (c) Dondoni A., Mariotti G., Marra A. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4475; (d) Chen G., Schmieg J., Tsuji M., Franck R. W. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4077; (e) Toba T., Murata K., Yamamura T., Miyake S., Annoura H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5043
- ⁵⁹ (a) Guillaume S., Haudrechy A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3175; (b) Guillaume S., Plé K., Haudrechy A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1015
- ⁶⁰ Frankowski A., Deredas D., Streith J., Tschamber T. *Tetrahedron* **1998**, *54*, *31*, 9033

- ⁶¹ (a) Herrmann J. L., Berger M. H., Schlessinger R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6, 1544; (b) Midland, M. M., Tramontano A., Cable J. R. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1, 28
- ⁶² (a) Demin P. M., Vasil'eva L. L., Lapitskaya M. A., Belosludtev Y. Y., Myagkova G. I., Pivnitskii K. K. *Bioorg. Khim.* **1990**, 16, 1125; (b) Tichkowsky I., Lett R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4003; (c) Shahi S. P., Koike K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 2525
- ⁶³ (a) Kakinuma K. *Tetrahedron* **1984**, 40, 2089; (b) Rouzaud D., Sinaÿ P. G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 1353; (c) Reginato G., Mordini A., Degl'Innocenti A., Caracciolo M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8275
- ⁶⁴ Kaila N., Chen L., Thomas IV B. E., Tsao D., Tam S., Bedard P. W., Camphausen R. T., Alvarez J. C., Ullas G. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 8, 1563
- ⁶⁵ Ce composé existe dans la littérature mais en série D-Glucose : (a) Larabi M.-L., Frechou C., Demailly G. *Carbohydrate Lett.* **1996**, 2, 1, 61; (b) Motawia M. S., Marcussen J., Moeller B. L. *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, 14, 9, 1279
- ⁶⁶ (a) Lecourt T., Herault A., Pearce A.J., Sollogoub M., Sinaÿ P. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 12, 2960; (b) Jia C., Pearce A.J., Blériot Y., Zhang Y., Zhang L.-H., Sollogoub M., Sinaÿ P. *Tetrahedron: Asymm.* **2004**, 15, 4, 699
- ⁶⁷ (a) Takahashi S., Nakata T. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 16, 5739; (b) Gesson J.-P., Renoux B., Tranoy I. *Tetrahedron* **1998**, 54, 6739
- ⁶⁸ Augé C. *Synthèses en série tryptophane : Dipeptides à visée anti-angiogénique et dérivés C-2-mannosylés* **2006**, Thèse de doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, mention Pharmacie
- ⁶⁹ Doucey M.-A., Hess D., Bloomers M. J. J., Hofsteenge J. *Glycobiology* **1999**, 9, 435
- ⁷⁰ Perez-Vilar J., Randell S. H., Boucher R. C. *Glycobiology* **2004**, 14, 325
- ⁷¹ Hartmann S., Hofsteenge J. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 28569
- ⁷² (a) Manabe S., Ito Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9754; (b) Manabe S., Marui Y., Ito Y. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 6, 1435
- ⁷³ (a) Nishikawa T., Ishikawa M., Wada K., Isobe M. *Synlett* **2001**, 945; (b) Nishikawa T., Koide Y., Kajii S., Wada K., Ishikawa M., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 687
- ⁷⁴ Nishikawa T., Koide Y., Kankubo A., Yoshimura H., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1268
- ⁷⁵ (a) Buttery C. D., Jones R. G., Knight D. W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1993**, 13, 1425; (b) Sundberg R. J., Broome R., Walters C. P., Schnur D. *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, 807; (c) Shen K., Fu Y., Li J.-N., Liu L., Guo Q.-X. *Tetrahedron* **2007**, 63, 7, 1568
- ⁷⁶ Saulnier M. G., Gribble G. W. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 5, 757
- ⁷⁷ Sundberg R. J., Parton R. L. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 163
- ⁷⁸ Kondo Y., Yoshida A., Sakamoto T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 2331
- ⁷⁹ Danieli B., Lesma G., Martinelli M., Passarella D., Peretto I., Silvani A. *Tetrahedron* **1998**, 54, 14081
- ⁸⁰ (a) Higa T., Tanaka J., Ohtani I. I., Musman M., Roy M. C., Kuroda I. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 3, 589; (b) Simmons T. L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P., Gerwick W. H. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, 4, 2, 333; (c) Sipkema D. *Cultivation of Marine Sponges: From Sea to Cell* **2003**, thèse (Hollande); (d) Hirsch S., Kashman Y. *Tetrahedron* **1989**, 45, 12, 3897
- ⁸¹ (a) Editorial *Pathologie Biologie* **2004**, 52, 1; (b) Kornprobst J.-M. *Les médicaments de la mer* <http://www.bioaqua.net/mnp/Documents/informacion-cientifica/Les%20medicaments%20de%20la%20mer.pdf>
- ⁸² Tan R. X., Chen J. H. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 509
- ⁸³ Howell A. R., So R. C., Richardson S. K. *Tetrahedron* **2004**, 60, 11327
- ⁸⁴ Morita M., Motoki K., Akimoto K., Natori T., Sakai T., Sawa E., Yamaji K., Koezuka Y., Kobayashi E., Fukushima H. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2176
- ⁸⁵ Natori T., Koezuka Y., Higa T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 35, 5591
- ⁸⁶ Akimoto K., Natori T., Morita M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 35, 5593
- ⁸⁷ Natori T., Morita M., Akimoto K., Koezuka Y. *Tetrahedron* **1994**, 50, 2771
- ⁸⁸ Kobayashi E., Motoki K., Yamagushi Y., Uchida T., Fukushima H., Koezuka Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 4, 615
- ⁸⁹ (a) Nakagawa R., Motoki K., Ueno H., Iijima R., Nakamura H., Kobayashi E., Shimosaka A., Koezuka Y. *Cancer Res.* **1998**, 58, 1202; (b) Nakagawa R., Serizawa I., Motoki K., Sato M., Ueno H., Iijima R., Nakamura H., Shimosaka A., Koezuka Y. *Oncol. Res.* **2000**, 12, 51; (c) Fuji N., Ueda Y., Fujiwara H., Toh T., Yoshimura T., Yamagishi H. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 3380; (d) Kobayashi E., Motoki K., Uchida T., Fukushima H., Koezuka Y. *Oncol. Res.* **1995**, 7, 529; (e) Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Sato H., Kondo E., Harada M., Koseki H., Nakayama T., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 5690; (f) Cretney E., Takeda K., Yagita H., Glaccum M., Peschon J. J., Smyth M. J. *J. Immunol.* **2002**, 168, 1356; (g) Hayakawa Y., Rovero S., Forni G., Smyth M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 16, 9464
- ⁹⁰ (a) Hansen D. S., Siomos M.-A., de Koning-Ward T., Buckingham L., Crabb B. S., Schofield L. *Eur. J. Immunol.* **2003**, 33, 2588; (b) Gonzalez-Aseguinolaza G., Van Kaer L., Bergmann C. C., Wilson J. M., Schmeig J., Kronenberg M., Nakayama T., Taniguchi M., Koezuka Y., Tsuji M. *J. Exp. Med.* **2002**, 195, 617; (c) Chackerian A., Alt J., Perera V., Behar S. M. *Inf. Immunol.* **2002**, 70, 6302

- ⁹¹ (a) Singh A. K., Yang J.-Q., Parekh V. V., Weil J., Wang C.-R., Joyce S., Singh R. R., Van Kaer L. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 1143; (b) Duarte N., Stenstrom M., Sampino S., Bergman M.-L., Lundholm M., Holmberg D., Cardell S. L. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 3112; (c) Hong S., Wilson M. T., Serizawa I., Wu I., Singh N., Naidenko O. V., Miura T., Haba T., Scherer D. C., Wei J., Kronenberg M., Koezuka, Y., Van Kaer L. *Nature Med. (N.Y., NY, U.S.A.)* **2001**, *7*, 1052; (d) Falcon M., Facciotti F., Ghidoli N., Monti P., Olivieri S., Zaccagnino L., Bonifacio E., Casorati G., Sanvito F., Sarvetnick N. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 5908
- ⁹² Yu K. O. A., Porcelli S. A. *Immunol. Lett.* **2005**, *100*, 42
- ⁹³ (a) Giaccone G., Punt C. J. A., Ando Y., Ruijter R., Nishi N., Peters M., von Blomberg B. M. E., Scheper R. J., van der Vliet H. J. J., van den Eertwegh A. J. M., Roelvink M., Beijnen J., Zwierzina H., Pinedo H. M. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3702; (b) Nieda M., Okai M., Tazbirkova A., Lin H., Yamaura A., Ide K., Abraham R., Uji T., Macfarlane D. J., Nicol A. J. *Blood* **2004**, *103*, 383
- ⁹⁴ Moody B. B. *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5*, 387
- ⁹⁵ (a) Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T. *Nature* **2001**, *413*, 531-534; (b) Berkers C., Ovaa H. *Trends in Pharmacological Sciences* **2005**, *26*, 5, 252
- ⁹⁶ (a) Mizuno M., Masumura M., Tomi C., Chiba A., Oki S., Yamamura T., Miyake S. *J. Autoimmun.* **2004**, *23*, 293; (b) Chiba A., Oki S., Miyamoto K., Hashimoto H., Yamamura T., Miyake S. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 305
- ⁹⁷ Oki S., Chiba A., Yamamura T., Miyake S. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 11, 1631
- ⁹⁸ Goff R. D., Gao Y., Mattner J., Zhou D., Yin N., Cantu (III) C., Teyton L., Bendelac A., Savage P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13602
- ⁹⁹ (a) Ndonge R. M., Izmirian D. P., Dunn M. F., Yu K. O. A., Porcelli S. A., Khurana A., Kronenberg M., Richardson S. K., Howell A. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10260; (b) Sidobre S., Hammond K. J. L., Bénazet-Sidobre L., Maltsev S. D., Richardson S. K., Ndonge R. M., Howell A. R., Sakai T., Besra G. S., Porcelli S. A., Kronenberg M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12254
- ¹⁰⁰ Yu K. O. A., Im J. S., Molano A., Dutronc Y., Illarionov P. A., Forestier C., Fujiwara N., Arias I., Miyake S., Yamamura T., Chang Y.-T., Besra G. S., Porcelli S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9, 3383
- ¹⁰¹ Fujio M., Wu D., Garcia-Navarro R., Ho D. D., Tsuji M., Wong C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9022
- ¹⁰² (a) Barbieri L., Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Basilico N., Mondani M., Taramelli D. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3279; (b) Barbieri L., Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Aru E., Parapini S., Taramelli D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 468
- ¹⁰³ Xing G.-W., Wu D., Poles M. A., Horowitz A., Tsuji M., Ho D. D., Wong C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2907
- ¹⁰⁴ (a) Xia C., Yao O., Schumann J., Rossy E., Chen X., Zhu L., Zhang W., De Liberoc G., Wang P. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2195; (b) Savage P. B., Teyton L., Bendelac A. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 771
- ¹⁰⁵ (a) Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H., Taniguchi M. *Science* **1997**, *278*, 1626; (b) Prigozy T. I., Naidenko O., Qazba P., Elewaut D., Brossay L., Khurana A., Natori T., Koezuka Y., Kulkarni A., Kronenberg M. *Science* **2001**, *291*, 664; (c) Zhou D., Mattner J., Cantu (III) C., Schrantz N., Yin N., Gao Y., Sagiv Y., Hudspeth K., Wu Y.-P., Yamashita T., Tenenber S., Wang D., Proia R. L., Lavery S. B., Savage P. B., Teyton L., Bendelac A. *Science* **2004**, *306*, 1786
- ¹⁰⁶ (a) Zhou X. T., Forestier C., Goff R. D., Li C., Teyton L., Bendelac A., Savage P. B. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1267; (b) Vo-Hoang Y., Micouin L., Ronet C., Gachelin G., Bonin M. *Chem. Bio. Chem.* **2003**, *4*, 27
- ¹⁰⁷ Tomiyama H., Yanagisawa T., Nimura M., Noda A., Tomiyama T. JP 2001/354666, 2002; Chem. Abst. 2002, 136, 37901x; US Patent Appl. 2002/0032158 A1, 14 Mars, **2002**
- ¹⁰⁸ Note 7 dans la référence 58e (*Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5043)
- ¹⁰⁹ Tsuji M., Franck R. W., Yang G., Chen G., Synthetic C-glycolipid and its use for treating cancer infectious diseases and autoimmune disease, *US Patent WO 03/105769 A2*, **2003**
- ¹¹⁰ Yang G., Schmiege J., Tsuji M., Franck R. W. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2004**, *43*, 3818
- ¹¹¹ Tsuji M., Franck R. W., Chen G., Novel synthetic C-glycolipids, their synthesis and use to treat infections, cancer and autoimmune disease, *US Patent WO 2005/102049 A1*, **2005**
- ¹¹² Wipf P., Pierce J. G. *Org.Lett.* **2006**, *8*, 15, 3375
- ¹¹³ Gonzalez-Aseguinolaza G., de Oliveira C., Tomaska M., Hong S., Bruan-Romero O., Nakayama T., Taniguchi M., Bendela A., Van Kaer L., Koezuka Y., Tsuji M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8461
- ¹¹⁴ Schmiege J., Yang G., Franck R. W., Tsuji M. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1631
- ¹¹⁵ Chaulagain M. R., Postema M. H. D., Valeriote F., Pietraszkewicz H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7791
- ¹¹⁶ Lu X., Song L., Metelitsa L. S., Bittman R. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 1750
- ¹¹⁷ Yu S.-H., Park J.-J., Chung S.-K. *Tetrahedron: Asymm.* **2006**, *17*, 3030
- ¹¹⁸ (a) Koch M., Stronge V. S., Shepherd D., Gadola S.D., Mathew B., Ritter G., Fersht A. R., Besra G. S., Schmidt R. R., Jones E. Y., Cerundolo V. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 8, 819; (b) Zazonc D. M., Cantu (III) C., Mattner J., Zhou D., Savage P. B., Bendelac A., Wilson I. A., Teyton L. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 8, 810

- ¹¹⁹ Case D. A., Darden T. A., Cheatham (III) T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Merz K. M., Pearlman D. A., Crowley M., Walker R. C., Zhang W., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Wong K. F., Paesani F., Wu X., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Mathews D. H., Schafmeister C., Ross W. S., Kollman P. A.
- ¹²⁰ <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- ¹²¹ Gaussian 03, Revision C.02, Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery (Jr.) J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A. *Gaussian, Inc.*, Wallingford CT, **2004**
- ¹²² G.Schaftenaar and J.H. Noordik, "Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures", *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **14** (2000) 123
- ¹²³ <http://openbabel.sourceforge.net/wiki/>
- ¹²⁴ <http://www.romeo2.fr>
- ¹²⁵ (a) Al-Dulayymi J. R., Baird M. S., Mohammed H., Roberts E., Clegg W. *Tetrahedron* **2006**, 62, 20, 4851; (b) Al-Dulayymi J. R., Baird M. S., Roberts E., Deyselb M., Verschoor J. *Tetrahedron* **2007**, 63, 12, 2571; (c) Al-Dulayymi J. R., Baird M. S., Roberts E. *Chem. Commun.* **2003**, 228
- ¹²⁶ Delano Scientific LLC 2006
- ¹²⁷ Furneaux R. H., Landersjö C. L., McCullough J. L., Severn W. B. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1618
- ¹²⁸ Nuzillard J.-M., Haudrechy A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2311; Quiral est téléchargeable sur <http://www.univ-reims.fr/LSD/JmnSoft/Quiral>
- ¹²⁹ Nuzillard J.-M., Banchet A., Haudrechy A. *J. Chem. Inf. and Mod.* **2007**, 47, 5, 1979-1985
- ¹³⁰ (a) Foucault P. A. dans *Centrifugal Partition Chromatography*, Chromatographic Science Series 68, New York: Marcel Dekker, Inc., **1994**; (b) Marchal L., Intes O., Foucault A., Legrand J., Nuzillard J.-M., Renault J.-H. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1005, 51
- ¹³¹ La CPC se trouve au Laboratoire Extraction, Isolement et Structures de Produits Naturels, FRE CNRS 2715 à l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de Reims.
- ¹³² Toribio A. *Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt* **2007**, Thèse de doctorat, mention Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne
- NDL : Grand merci à Alix Toribio et à Jean-Hugues Renault pour leur aide dans ce projet.
- ¹³³ Murayama W., Tobayashi Y., Kosuge Y., Yano H., Nunogaki Y., Nunogaki K. *J. Chromatogr.* **1982**, 239, 643
- ¹³⁴ Maciuk A., Renault J.-H., Margraff R., Trébuchet P., Zèches-Hanrot M., Nuzillard J.-M. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 21, 6179
- ¹³⁵ Renault J.-H., Nuzillard J.-M., Le Crouérou G., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Le Men-Olivier L. *J. Chromatogr. A.* **1999**, 849, 421 et références citées
- ¹³⁶ Delannay E., Toribio A., Boudesocque L., Nuzillard J.-M., Zèches-Hanrot M., Dardennes E., Le Dour G., Sapi J., Renault J.-H. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1127, 45
- ¹³⁷ Margraff R., Intes O., Renault J.-H., Garret P. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2005**, 28, 1893
- ¹³⁸ La perte de charge ΔP prend en compte la différence de pression à l'entrée et à la sortie de la colonne. Van Buel M. J., Van der Wielen L. A. M., Luyben K. C. A. M. *Pressure drop in Centrifugal Partition Chromatography* dans *Centrifugal Partition Chromatography*, Ed. Foucault A. P., New York : Marcel Dekker Inc., **1995**, 51
- ¹³⁹ Kromaton Technologies *Caractéristiques des FCPC* <http://www.kromaton.com/page1.htm> [consulté le 03/11/2006]
- ¹⁴⁰ Marchal L., Foucault A., Patisier G., Rosant J. M., Legrand J. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 869, 339
- ¹⁴¹ (a) Chovin P. *Théories et techniques de la chromatographie d'absorption* dans *Chromatographie en chimie organique et biologique*, Ed. Lederer E., **1959**, 1; (b) Couillard F., Foucault A., Durand D. Patent FR2856933
- ¹⁴² (a) Marston A., Hostettmann K. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1112, 181; (b) Foucault A. P., Chevolut L. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 808, 3; (c) Renault J.-H., Nuzillard J.-M., Intes O., Maciuk A. *Solvents systems* Chap.3 dans *Countercurrent Chromatography-The Support-Free Liquid Stationary Phase*, Amsterdam: Elsevier Science B. V., Ed. Berthod A., **2002**, 49; (d) Foucault A. P. *Solvent systems in Centrifugal Partition Chromatography* dans *Centrifugal Partition Chromatography*, New York: Marcel Dekker, Inc., Ed. Foucault A. P., **1995**, 71; (e)

Maciuk A. *Nouvelles methodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : application à l'isolement de substances naturelles* **2005**, Thèse de Doctorat, mention Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne

¹⁴³ Renault J.-H., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Le Men-Olivier L., Durand A., Foucault et al. *J. Chromatogr. A.* **1997**, 763, 345

¹⁴⁴ Germain J.-P. Thèse Vétérinaire : *Revue bibliographique de la molécule présentatrice d'antigènes : CD1d. Etude in vitro de la production d'interleukines par les kératinocytes de l'homme après oligomérisation de cette protéine transmembranaire* **2006**, École Nationale Vétérinaire de Lyon

NDL : Cette thèse m'a essentiellement servi de support pour rédiger ce paragraphe (explications, modèles de schémas, nombreuses références bibliographiques). Merci à Jean-Philippe Germain.

¹⁴⁵ Weinman S., Méhul P. *Toute la biochimie* **2004**, DUNOD éd.; (b) Jeannin P., Chevallier A., Renier G., McIlroy A. *Cours d'immunologie (PCEM II)* **2003-2004**, Faculté de médecine d'Angers

¹⁴⁶ www.answers.com/topic/cd3-immunology.

¹⁴⁷ (a) Gadola S. D., Zaccai N. R., Harlos K., Shepherd D., Castro-Palomino J. C., Ritter G., Schmidt R. R., Jones E. Y., Cerundolo V. *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 721; (b) Zeng Z., Castaño A. R., Segelke B. W., Stura E. A., Peterson P. A., Wilson I. A. *Science* **1997**, 277, 339

¹⁴⁸ Gadola S. D., Karadimitris A., Zaccai N. R., Salio M., Dulphy N., Sheperd D., Jones E. Y., Cerundolo V. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2003**, 358, 875 et références correspondantes

¹⁴⁹ Rhind S. M. *Vet. Pathol.* **2001**, 38, 611

¹⁵⁰ (a) Brossay L., Chioda M., Burdin N., Koezuka Y., Casorati G., Dellabona P., Kronenberg M. *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 1521; (b) Kawano T., Tanaka Y., Shimizu E., Kaneko Y., Kamata N., Sato H., Osada H., Sekiya S., Nakayama T., Taniguchi M. *Int. Immunol.* **1999**, 11, 881; (c) Spada F. M., Koezuka Y., Porcelli S. A. *J. Exp. Med.* **1998**, 188, 1529

¹⁵¹ Behar S. M., Cardell S. *Semin. Immunol.* **2000**, 12, 551

¹⁵² (a) Burdin N., Brossay L., Kronenberg M. *Eur. J. Immunol.* **1999**, 29, 2014; (b) Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S. H., Beavis A., Koezuka Y., Bendelac A. *J. Immunol.* **1999**, 163, 4647; (c) Singh N., Hong S., Scherer D. C., Serizawa I., Burdin N., Kronenberg M., Koezuka Y., Van Kaer L. *J. Immunol.* **1999**, 163, 2373

¹⁵³ (a) Maynard J., Petersson K., Wilson D. H., Adams E. J., Blondelle S. E., Boulanger M. J., Wilson D. B., Garcia I. K. C. *Immunity* **2005**, 22, 81; (b) www.bio.puc.cl/.../research/dwelltime.htm.

¹⁵⁴ (a) Gumperz J. E., Roy C., Makowska A., Lum D., Sugita M., Podrebarac T., Koezuka Y., Porcelli S. A., Cardell S., Brenner M. B., Behar S. M. *Immunity* **2000**, 12, 211; (b) Gui M., Li J., Wen L. J., Hardy R. R., Hayakawa K. *J. Immunol.* **2001**, 167, 6239

¹⁵⁵ (a) Schofield L., McConville M. J., Hansen D., Campbell A. S., Fraser-Reid B., Grusby M. J., Tachado S. D. *Science* **1999**, 283, 225; (b) Sidobre S., Hammond K. J., Benazet-Sidobre L., Maltsev S. D., Richardson S. K., Ndonge R. M., Howell A. R., Sakai T., Besra G. S., Porcelli S. A., Kronenberg M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, 101, 12254; (c) Sidobre S., Naidenko O. V., Sim B. C., Gascoigne N. R., Garcia K. C., Kronenberg M. *J. Immunol.* **2002**, 169, 1340; (d) Sim B. C., Holmberg K., Sidobre S., Naidenko O., Niederberger N., Marine S. D., Kronenberg M., Gascoigne N. R. *Immunogenetics* **2003**, 54, 874

¹⁵⁶ Cantu (III) C., Benlagha K., Savage P. B., Bendelac A., Teyton L. *J. Immunol.* **2003**, 170, 4673

¹⁵⁷ (a) <http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>; (b) <http://www.actions-traitements.org/spip.php?mot166>; (c) The cytokines web (images 3D de cytokines) http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytweb/; (d) Dictionnaire des cytokines <http://www.copewithcytokines.de/>

¹⁵⁸ Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S. H., Beavis A., Koezuka Y., Bendelac A. *J. Immunol.* **1999**, 163, 4647

¹⁵⁹ KO Y., Im J. S., Molano A., Dutronc Y., Illarionov P. A., Forestier C., Fujiwara N., Arias I., Miyake S., Yamamura T., Chang Y. T., Besra G. S., Porcelli S. A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**, 102, 3383

¹⁶⁰ (a) Oki S., Chiba A., Yamamura T., Miyake S. *J. Clin. Invest.* **2004**, 113, 1631; (b) Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T. *Nature* **2001**, 413, 531

¹⁶¹ Schmieg J., Yang G., Franck R. W., Tsuji M. *J. Exp. Med.* **2003**, 198, 1631

¹⁶² Parekh V. V., Singh A. K., Wilson M. T., Olivares-Villagomez D., Bezbradica J. S., Inazawa H., Ehara H., Sakai T., Serizawa I., Wu L., Wang C. R., Joyce S., Van Kaer L. *J. Immunol.* **2004**, 173, 3693

¹⁶³ (a) Yu K. O. A., Porcelli S. A. *Immunol. Lett.* **2005**, 100, 42; (b) van der Vliet H. J. J., Molling J. W., von Blomberg B. M. E., Nishi N., Kölgén W., van den Eertwegh A. J. M., Pinedo H. M., Giaccone G., Scheper R. J. *Clin. Immunol.* **2004**, 112, 8 (c) Sköld M., Behar S. M. *Infect. Immunol.* **2003**, 71, 10, 5447; (d) Hammond K. J. L., Godfrey D. I. *Tissue Antigens* **2002**, 59, 353

¹⁶⁴ (a) Chen G., Chien M., Tsuji M., Franck R. W. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, 7, 1017; (b) Franck R. W., Tsuji M. *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 692

¹⁶⁵ <http://www.axxora.com/>

¹⁶⁶ <http://www.avantilipids.com/>

- ¹⁶⁷ (a) Semmelhack M.F., Epa W.R., Cheung A.W.-H., Gu Y., Kim C., Zhang N., Lew W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 16, 7455; (b) Sunay U., Fraser-Reid B. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 44, 5335; (c) Meyers A.I., Babiak K.A., Campbell A.L., Comins D.L., Fleming M.P., Henning R., Heuschmann M., Hudspeth J.P., Kane J.M., Reider P.J., Roland D.M., Shimizu K., Tomioka K., Walkup R.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 15, 5015 et références citées
- ¹⁶⁸ (a) Leung L.M.H., Boydell A.J., Gibson V., Light M.E., Linclau B. *Org. Lett.* **2005**, 7, 23, 5183; (b) Smith III A.B., Pitram S.M., Boldi A.M., Gaunt M.J., Sfougataki C., Moser W.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 47, 14435; (c) Smith III A.B., Pitram S.M., Fuertes M.J. *Org. Lett.* **2003**, 5, 15, 2751; (d) Shiono H., Mochizuki Y., Tsutsui H., Mikami Y., Morohoshi T., Mitsunobu O. *Synlett* **2003**, 6, 894; (e) Terauchi T., Terauchi T., Sato I., Tsukada T., Kanoh N., Nakata M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 15, 2649; (f) Gros P., Hansen P., Caubère P. *Tetrahedron* **1996**, 52, 48, 15147; (g) Krohn K., Boerner G. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 20, 6063; (h) Khandekar G., Robinson G.C., Stacey N.A., Thomas E.J., Vather S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1993**, 1507; (i) Golinski M., Vasudevan S., Floresca R., Brock C.P., Watt D.S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1, 55; (j) Adam G., Zibuck R., Seebach D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 20, 6176; (k) Sviridov A.F., Ermolenko M.S., Yashunsky D.V., Borodkin V.S., Kochetkov N.K. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 33, 3835; (l) Culshaw D., Grice P., Ley S.V., Strange G.A. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 47, 3835; (m) Ferrier R.J., Haines S.R. *Carbohydr. Res.* **1984**, 130, 135; (n) Ferrier R.J., Prasit P., Tyler P.C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1983**, 8, 1641; (o) Mori M., Chuman T., Kato K., Mori K. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 44, 4593; (p) Hungerbühler E., Naef R., Wasmuth D., Seebach D., Lossli H.-R., Wehrli A. *Helv. Chim. Acta* **1980**, 63, 7, 1960; (q) Senring B., Seebach D. *Liebigs Ann.* **1978**, 2044; (r) Seebach D., Willert I., Beck A.K., Gröbel B.-T. *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 2510; (s) Djerassi C., Batres E., Velasco M., Rosenkranz G. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 7, 1712
- ¹⁶⁹ Banchet A., Guillarme S., Haudrechy A. *Synlett* **2007**, 9, 1467
- ¹⁷⁰ Knipe A.C. *The Chemistry of the Sulphonium Group*, Stirling, C.J.M. Ed., John Wiley and Sons, New York, **1981**, 313
- ¹⁷¹ Svansson L., Johnston B.D., Gu J.-H., Patrick B., Pinto B.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10769
- ¹⁷² Kirilyuk B.A., Mel'nitskii I.A., Golub N.M., Kiladze T.K., Kantor E.A., Rakhmankulov D.L. *Zhurnal Organicheskoi Khimii* **1987**, 23, 9, 1981
- ¹⁷³ Ikeshita K.-I., Kihara N., Sonoda M., Ogawa A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3025
- ¹⁷⁴ (a) Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G., Muraoka O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8367; (b) Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 1339; (c) Houston T.A., Blanchfield J.T. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 669; (d) Lillelund V.H., Jensen H.H., Liang X.F., Bols M. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 515
- ¹⁷⁵ Matsuda H., Morikawa T., Yoshikawa M. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 1301
- ¹⁷⁶ Kuntz D.A., Ghavami A., Johnston B.D., Pinto B.M., Rose D.R. *Tet. Asym.* **2005**, 16, 25
- ¹⁷⁷ (a) Yuasa H., Takada J., Hashimoto H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 34, 6615; (b) Ghavami A., Johnston B.D., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2312; (c) Kumar N.S., Pinto B.M. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 17, 2612; (d) Muraoka O., Yoshikai K., Takahashi H., Minematsu T., Lu G., Tanabe G., Wang T., Matsudab H., Yoshikawab M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 500–509; (e) Liu H., Sim L., Rose D.R., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 8, 3007
- ¹⁷⁸ (a) Ghavami A., Sadalapure K.S., Johnston B.D., Lobera M., Snider B.B., Pinto B.M. *Synlett* **2003**, 9, 1259; (b) Ghavami A., Johnston B.D., Maddess M.D., Chinapoo S.M., Jensen M.T., Svensson B., Pinto B.M. *Can. J. Chem.* **2002**, 80, 937; (c) Liu H., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2, 753
- ¹⁷⁹ Nasi R., Pinto B.M. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 2305
- ¹⁸⁰ Nasi R., Sim L., Rose D.R., Pinto B.M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1, 180
- ¹⁸¹ (a) Wirsching J., Voss J. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 691; (b) Jeong L.S., Moon H.R., Choi Y.J., Chun M.W., Kim H.O. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4821 et références citées
- ¹⁸² (a) Aguilard N., Moyano A., Pericas M.A., Riera A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 20, 3913; (b) Castejon P., Moyano A., Pericas M.A., Riera A. *Tetrahedron* **1996**, 52, 20, 7063; (c) Castejon P., Pasto M., Moyano A., Pericas M.A., Riera A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 17, 3919
- ¹⁸³ McNaught A. D. *Nomenclature of carbohydrates*, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919
- ¹⁸⁴ Perrin D. D., Armarego W. L. F. *Purification of laboratory chemicals*, 3^{ème} Ed. Pergamon Press, **1988**
- ¹⁸⁵ Levene P. A., Meyer G. M. *J. Biol. Chem.* **1927**, 74, 695
- ¹⁸⁶ George T.G., Szolcsányi P., Koenig S.G., Paterson D.E., Isshiki Y., Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 5, 1287
- ¹⁸⁷ Ohtake H., Ichiba N., Ikegami S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 24, 8171
- ¹⁸⁸ D'Accorso N.B., Thiel I.M.E. *Carbohydr. Res.* **1983**, 124, 177
- ¹⁸⁹ Nitz M., Purse B.W., Bundle D.R. *Org. Lett.* **2000**, 2, 19, 2939
- ¹⁹⁰ Yamada H., Nakatani M., Ikeda T., Marumoto Y. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5573
- ¹⁹¹ Lowary T., Meldal M., Helmboldt A., Vasella A., Bock K. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9657

- ¹⁹² (a) Nishikawa T., Koide Y., Wada K., Ishikawa M., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4, 687;
(b) Nishikawa T., Koide Y., Kanakubo A., Yoshimura H., Isobe M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 7, 1268
- ¹⁹³ Terauchi M., Abe H., Matsuda A., Shuto S. *Org. Lett.* **2004**, 6, 21, 3751
- ¹⁹⁴ Onodera K., Hirano S., Masuda F., Kashimura N. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 7, 2403
- ¹⁹⁵ L'essentielle de ces définitions ont été trouvées sur le site <http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>
- ¹⁹⁶ <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/endogene-1693.html>
- ¹⁹⁷ http://www.biochimie.univ-montp2.fr/licence/liaison/surf_plas.htm

