



HAL
open science

Synthèse et évaluation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues du salacinol

Estelle Gallienne

► **To cite this version:**

Estelle Gallienne. Synthèse et évaluation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues du salacinol. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2005. Français. NNT : 2005CLF21560 . tel-00664887

HAL Id: tel-00664887

<https://theses.hal.science/tel-00664887>

Submitted on 31 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Numéro d'ordre : D.U. 1560

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

(U.F.R. de Recherche Scientifique et Technique)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° : 443

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(*Spécialité* : CHIMIE ORGANIQUE BIOLOGIQUE)

PAR

Estelle GALLIENNE

Diplômée d'Etudes Approfondies de Chimie

Ingénieur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand

**SYNTHESE ET EVALUATION
D'INHIBITEURS POTENTIELS DE GLYCOSIDASES,
ANALOGUES DU SALACINOL**

Soutenue publiquement le 31 janvier 2005 devant la commission d'examen :

Président : D. AITKEN, Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II

Rapporteurs : G. DEMAILLY, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne
Y. LE MERRER, Professeur à l'Université René Descartes, Paris 5

Examineurs : J. BOLTE, Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II
B. FIGADERE, Directeur de Recherche CNRS à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud
M. LEMAIRE, Maître de conférences à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes d'Intérêt Biologique, UMR 6504 du CNRS, dirigé par le Professeur Jean Bolte, que je remercie de m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant dans son laboratoire.

Je tiens également à remercier chaleureusement Marielle Lemaire, Maître de conférences, pour m'avoir accompagnée durant ces trois années sur la route des inhibiteurs de glycosidases. Merci pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, merci pour tout en somme...

Je tiens à témoigner ma gratitude à Monsieur Gilles Demailly, Professeur à l'Université de Picardie et à Monsieur Yves Le Merrer, Professeur à l'Université Paris 5, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Bruno Figadère, Directeur de Recherche et à Monsieur David Aitken, Professeur à l'Université Blaise Pascal, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Un grand merci à Thierry Gefflaut pour ses nombreux conseils, les discussions fructueuses, sa disponibilité et sa grande patience.

Un merci tout particulier à mes collègues de paillasse : Henri, Lahssen, Sébastien, pour leur aide, leur soutien et leur patience à mon égard. Un remerciement collégial à l'ensemble des membres de l'équipe Bioconversions pour leurs encouragements, et en particulier à Aurélie et Agnès.

Merci beaucoup à Nicolas, Sandrine, Sébastien, Marjorie, Stéphanie et Karen, pour leur participation à ce travail et leur aide précieuse.

Je voudrais également remercier l'ensemble du Laboratoire SEESIB et surtout mes collègues étudiants et mes collègues de RU, sans oublier les indispensables Stéphanie, Béatrice et Anne-Sophie.

Merci à Anne-Sophie, Régis et Bruno pour la RMN et à Bertrand et Franck pour la masse.

Un grand merci à tous mes amis pour leur soutien, et particulièrement à mon collègue moniteur Jérémy. Heureusement que tu étais là !!!

Une pensée toute particulière pour ma famille, pour Céline et Vincent, mais surtout pour mes parents. C'est grâce à eux, si je suis arrivée jusque là. Merci encore pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci Michaël pour ta compréhension, ton soutien et ta grande patience. Que c'est loin la Pologne !

Merci au CNRS et à la superbe région Auvergne d'avoir financé ces recherches.



ABREVIATIONS

α -gal : α -galactosidases
 α -glu : α -glucosidases
 α -man : α -mannosidases
AMY1 : isoenzyme 1 recombinante de l' α -amylase d'orge
anh. : anhydre
aq. : aqueux
arom : aromatique
 β -gal : β -galactosidases
 β -glu : β -glucosidases
 β -man : β -mannosidases
CCM : chromatographie sur couches minces
CYB-3 : 3-hydroxy-2-hydroxyméthylpyrrolidine
cyclohex. : cyclohexane
D-AB1 : 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol
DDMJ : 1,4-didésoxymannojirimycine
dist. : distillé(e)
DMDP : 2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrrolidine
DMF : diméthylformamide
DMJ : 1-désoxymannojirimycine
DNJ : 1-désoxynojirimycine
éq : équivalent
ESI : électrospray
Glc : glucose
GlcNAc : *N*-acétylglucosamine
HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IC : ionisation chimique
IE : impact électronique
IR : infrarouge
IUBMB : International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
L-DNJ : L-1-désoxynojirimycine
LSIMS : Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry
Man : mannose
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
N-butyl-DNJ : *N*-butyl-1-désoxynojirimycine
nd : non déterminé
NI : non inhibiteur
N-méthyl-DNJ : *N*-méthyl-1-désoxynojirimycine
NOE : Nuclear Overhauser Effect
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
%AR : pourcentage d'activité restante
PPA : α -amylase de pancréas de porc
ppm : partie par million
quant. : quantitatif

RE : réticulum endoplasmique
rév. : révélateur
RMN : résonance magnétique nucléaire
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
TA : température ambiante
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
tris : 2-amino-2-hydroxyméthylpropan-1,3-diol
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

NB : la nomenclature et la numérotation des molécules dans ce document sont le plus souvent celles employées en chimie des glucides.

SOMMAIRE



INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
CHAPITRE I : LES GLYCOSIDASES ET LEURS INHIBITEURS	7
I. LES GLYCOSIDASES	9
<i>I.1. Généralités.....</i>	9
<i>I.2. Rôles des glycosidases</i>	10
I.2.1. Dégradation des polysaccharides alimentaires et de stockage	10
I.2.2. Maturation des glycoprotéines	11
<i>I.3. Mécanismes.....</i>	13
I.3.1. Mécanisme avec inversion de configuration.....	13
I.3.2. Mécanisme avec rétention de configuration	14
I.3.3. Aspects mécanistiques particuliers	14
<i>I.4. Modèle général de l'état de transition.....</i>	16
I.4.1. Distorsion de cycle du substrat	16
I.4.2. Structure "pseudo-cationique" de type oxocarbénium	18
II. L'INHIBITION ENZYMATIQUE	18
<i>II.1. Rappels de cinétique enzymatique.....</i>	18
<i>II.2. Les différents types d'inhibition.....</i>	20
II.2.1. Inhibition compétitive.....	20
II.2.2. Inhibition incompétitive.....	22
II.2.3. Inhibition non compétitive.....	23
III. LES INHIBITEURS DE GLYCOSIDASES	24
<i>III.1. Inhibiteurs mimant la charge positive sur l'oxygène exocyclique (I).....</i>	25
III.1.1. Les manostatines et analogues	25
III.1.2. L'acarbose et analogues	26
<i>III.2. Inhibiteurs mimant la charge positive sur l'oxygène endocyclique (IIa)</i>	28
III.2.1. Les aminosucres et analogues	28
III.2.2. Le salacinol et le kotalanol.....	31
<i>III.3. Inhibiteurs mimant la charge positive sur le carbone anomérique (III ou IIb)</i>	32
III.3.1. L'isofagomine et analogues	33
III.3.2. La siastatine B et analogues	34
<i>III.4. Inhibiteurs mimant la délocalisation de la charge positive</i>	35
<i>III.5. Inhibiteurs non chargés mimant uniquement la distorsion de cycle.....</i>	36
<i>III.6. Tableau récapitulatif et conclusion.....</i>	37
IV. APPLICATIONS DES INHIBITEURS DE GLYCOSIDASES	40
<i>IV.1. L'acarbose comme traitement du diabète de type II.....</i>	41
<i>IV.2. La N-butyl-DNJ comme traitement du SIDA ?.....</i>	42

CHAPITRE II : LE SALACINOL ET ANALOGUES	43
I. SYNTHÈSES DU SALACINOL ET DE SES ANALOGUES	45
<i>I.1. Synthèses du salacinol et de ses stéréoisomères.....</i>	<i>45</i>
<i>I.2. Synthèses d'analogues soufrés du salacinol</i>	<i>49</i>
<i>I.3. Synthèses d'analogues azotés du salacinol.....</i>	<i>51</i>
<i>I.4. Synthèses d'analogues séléniés du salacinol</i>	<i>55</i>
II. AUTRES INHIBITEURS COMPORTANT UN ION SULFONIUM	58
III. PROPRIÉTÉS INHIBITRICES DU SALACINOL ET DES DIFFÉRENTS ANALOGUES	60
RESULTATS ET DISCUSSION	69
I. INTRODUCTION.....	71
II. SYNTHÈSE DES IMINOSUCRES	72
<i>II.1. Stratégie de synthèse</i>	<i>72</i>
<i>II.2. Synthèse des iminosucres avec $R = CH_2OBn$.....</i>	<i>72</i>
II.2.1. Synthèse du précurseur de l'oxyde de nitrile	72
II.2.2. Synthèse en version racémique.....	73
II.2.2.a. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire	73
II.2.2.b. Synthèse des isoxazolines sulfates.....	75
II.2.2.c. Réaction d'hydrogénolyse des isoxazolines sulfates	78
II.2.2.d. Obtention des iminosucres benzylés.....	82
II.2.3. Synthèse en version énantiosélective.....	83
II.2.3.a. Synthèse de l'alcène de configuration (<i>S</i>) par voie chimique.....	84
II.2.3.b. Synthèse de l'alcène par voie chimioenzymatique.....	85
II.2.3.c. Synthèse des iminosucres benzylés optiquement actifs	86
<i>II.3. Synthèse des iminosucres avec $R = CO_2H$.....</i>	<i>90</i>
II.3.1. Synthèse du précurseur de l'oxyde de nitrile	90
II.3.2. Synthèse en version racémique.....	90
II.3.2.a. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire	90
II.3.2.b. Synthèse des isoxazolines sulfates.....	91
II.3.2.c. Réaction d'hydrogénolyse des isoxazolines sulfates	92
II.3.2.d. Obtention des iminosucres carboxyliques	94
III. SYNTHÈSE DES SULFATES CYCLIQUES	96
<i>III.1. Stratégie de synthèse</i>	<i>96</i>
<i>III.2. Synthèse de l'intermédiaire commun.....</i>	<i>97</i>
<i>III.3. Synthèse du sulfate cyclique de la série D-érythro.....</i>	<i>98</i>
<i>III.4. Synthèse du sulfate cyclique de la série L-érythro</i>	<i>99</i>
IV. SYNTHÈSE DES ZWITTERIONS.....	100
<i>IV.1. Zwitterions azotés.....</i>	<i>101</i>
IV.1.1. Avec la morpholine.....	101
IV.1.2. Avec les iminosucres synthétisés	103
IV.1.2.a. Mise au point de la réaction de couplage avec un iminosucre racémique	103
IV.1.2.b. Couplage des iminosucres optiquement actifs	105

IV.2. Zwitterions soufrés	109
IV.2.1. Thiosucres à cinq chaînons	110
IV.2.2. Thiosucres à six chaînons.....	113
IV.2.3. Thiosucres à sept chaînons.....	115
IV.3. Tableau récapitulatif.....	117
V. EVALUATION DES PROPRIETES INHIBITRICES	119
V.1. Détermination des constantes de Michaelis	120
V.2. Iminosucres et thiosucres.....	121
V.2.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur.....	121
V.2.1.a. Principe.....	121
V.2.1.b. Résultats	122
V.2.2. Détermination des constantes d'inhibition.....	123
V.2.2.a. Principe.....	123
V.2.2.b. Résultats	124
V.2.2.c. Cas particulier de la β -glucosidase d'amandes.....	127
V.3. Zwitterions	129
V.3.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur.....	129
V.3.1.a. Zwitterions azotés.....	130
V.3.1.b. Zwitterions soufrés.....	130
V.3.2. Détermination des constantes d'inhibition.....	132
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	135
PARTIE EXPERIMENTALE	141
SYNTHESE	143
I. GENERALITES	145
I.1. Nomenclature et numérotation	145
I.2. Techniques chromatographiques.....	145
I.3. Techniques spectroscopiques et d'analyse	145
II. SOMMAIRE	147
III. SYNTHESE DES IMINOSUCRES.....	151
III.1. Synthèse des précurseurs	151
III.1.1. Synthèse du nitroéthanol protégé	151
III.1.2. Synthèse de l'alcène optiquement actif.....	153
III.2. Synthèse des iminosucres avec $R = CH_2OBn$	155
III.3. Synthèse des iminosucres avec $R = CO_2H$	174
IV. SYNTHESE DES SULFATES CYCLIQUES.....	185
IV.1. Synthèse de l'intermédiaire commun	185
IV.2. Synthèse du sulfate cyclique de la série D-érythro.....	187
IV.3. Synthèse du sulfate cyclique de la série L-érythro.....	189

V. SYNTHÈSE DES ZWITTERIONS	193
<i>V.1. Zwitterions azotés</i>	<i>193</i>
<i>V.2. Zwitterions soufrés.....</i>	<i>205</i>
 EVALUATION DES PROPRIÉTÉS INHIBITRICES	225
I. GÉNÉRALITÉS	227
II. DÉTERMINATION DES CONSTANTES DE MICHAELIS	228
III. ACTIVITÉ RESTANTE DE L'ENZYME EN PRÉSENCE D'INHIBITEUR.....	229
IV. DÉTERMINATION DES CONSTANTES D'INHIBITION	229
<i>IV.1. Détermination précise</i>	<i>229</i>
<i>IV.2. Détermination rapide</i>	<i>230</i>
<i>IV.3. Détermination avec la β-glucosidase et le cellobiose</i>	<i>230</i>
IV.3.1. Préparation de la solution de dosage.....	230
IV.3.2. Droite de standardisation.....	231
IV.3.3. Détermination du K_m et du K_i	231
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	233

INTRODUCTION



Les glycosidases sont des enzymes très importantes, largement exploitées dans les domaines des biotechnologies, de l'alimentaire, de la chimie du bois ou de la recherche médicale. Elles sont notamment utilisées pour la synthèse enzymatique d'oligosaccharides complexes dans des conditions douces.

De nombreux inhibiteurs de ces enzymes existent et jouent un rôle important à la fois dans l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes d'hydrolyse enzymatique des glucides, mais aussi comme outil thérapeutique. Parmi ces inhibiteurs, les iminosucres et les carbasucres, analogues de sucres dont l'atome d'oxygène a été remplacé respectivement par un atome d'azote et un atome de carbone, sont des composés particulièrement actifs. Certains sont même actuellement commercialisés en tant qu'antidiabétiques.

Récemment, deux nouveaux inhibiteurs de glycosidases : le salacinol **1** et le kotalanol **2**, dont la structure zwitterionique est unique (**Figure 1**), ont été isolés d'une plante *Salacia reticulata*, que l'on trouve au sud de l'Inde et au Sri Lanka^{1,2}. Les racines et les tiges de cette plante sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner le diabète.

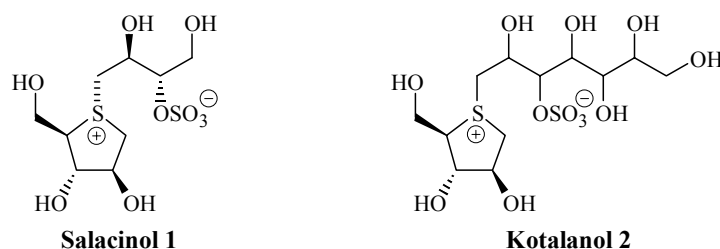


Figure 1

Ces composés sont de puissants inhibiteurs d' α -glucosidases, ce qui est probablement à l'origine des vertus de la plante dont ils sont extraits.

L'objectif de ce travail était de synthétiser de nouveaux analogues du salacinol et d'évaluer leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de différentes glycosidases. La synthèse de composés de ce type est effectuée selon une méthodologie commune aux différentes équipes travaillant actuellement sur ce thème. Celle-ci consiste en l'attaque nucléophile d'un hétéroatome inclus dans un cycle sur le carbone le moins encombré d'un sulfate cyclique (**Schéma 1**).

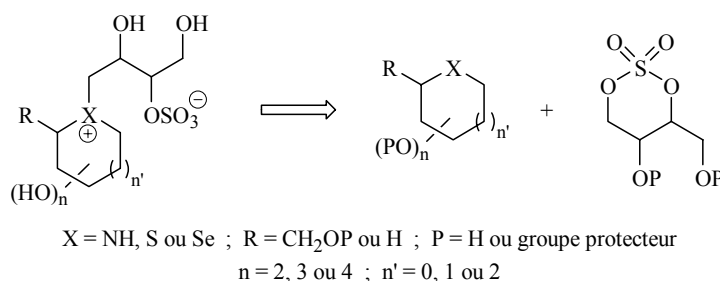


Schéma 1

¹ Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Shimada, H. ; Matsuda, H. ; Yamahara, J. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8367-8370.

² Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Yashiro, K. ; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 1339-1340.

Cette voie de synthèse implique donc de disposer de différents hétérocycles et sulfates cycliques. Or nous avons préparé plusieurs iminosucres au moyen d'une méthodologie basée sur l'utilisation d'isoxazolines, ainsi que deux sulfates cycliques, nous permettant d'obtenir plusieurs zwitterions azotés, analogues du salacinol. De plus, nous disposons de six thiosucres, synthétisés dans le Laboratoire des Glucides de l'Université de Picardie à Amiens, qui ont donné après couplage sur les sulfates cycliques différents analogues soufrés du salacinol.

Dans le premier chapitre de notre étude bibliographique, nous présenterons les glycosidases et leurs inhibiteurs les plus actifs. Puis un second chapitre sera consacré aux travaux déjà publiés concernant la synthèse et l'évaluation du salacinol et de ses analogues.

Les résultats que nous avons obtenus seront ensuite exposés et discutés. Ils concerneront, dans un premier temps, la synthèse en versions racémique et énantiosélective de plusieurs iminosucres, puis la synthèse de deux sulfates cycliques à partir du D-glucose. Dans un deuxième temps, les réactions de couplage entre les différents hétérocycles et les sulfates cycliques obtenus, menant aux zwitterions azotés et soufrés analogues du salacinol, seront décrites. Enfin, les résultats de l'évaluation des propriétés inhibitrices de ces composés sur plusieurs glycosidases seront présentés et commentés.

Une conclusion dressant le bilan des résultats obtenus, ainsi que les perspectives à apporter termineront ce travail.

Une partie expérimentale en fin de document détaillera l'ensemble des protocoles mis en œuvre, ainsi que les analyses effectuées.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I :
LES GLYCOSIDASES ET LEURS INHIBITEURS

I. Les glycosidases

I.1. Généralités

Les glycosidases ou glycoside-hydrolases sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse sélective des liaisons glycosidiques dans les polysaccharides et les glycoconjugués. Elles permettent la libération de molécules non saccharidiques, de monosaccharides ou d'oligosaccharides de plus faible poids moléculaire. Par exemple, la maltase catalyse l'hydrolyse de la liaison entre les deux unités du maltose pour donner deux molécules de glucose (**Schéma 2**).

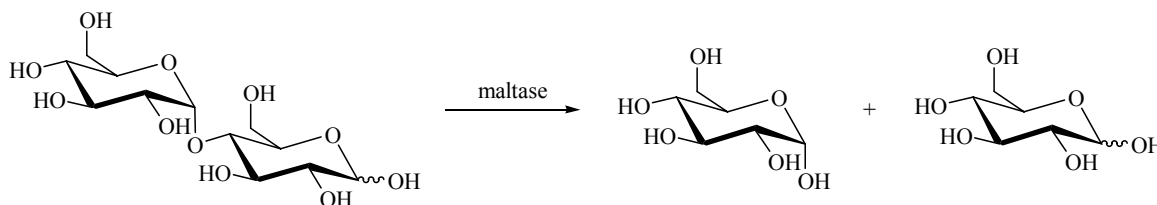


Schéma 2

Les glycosidases sont spécifiques de l'unité glucidique hydrolysée, de sa série D ou L, de sa forme furanique ou pyranique et de la configuration de la liaison glycosidique α ou β . Ainsi les α -D-glucosidases hydrolysent les α -D-glucosides, les β -D-galactosidases les β -D-galactosides etc. De plus, au sein de chaque famille, il existe de petites variations selon l'origine de l'enzyme³.

On distingue également les exoglycosidases des endoglycosidases. Les premières hydrolysent la liaison glycosidique terminale, les secondes des liaisons internes des chaînes polysaccharidiques. Les exoglycosidases sont relativement indifférentes vis-à-vis de la nature du groupement lié au carbone anomérique, tandis que les endoglycosidases sont spécifiques de la nature et de la configuration des deux sucres qu'elles séparent.

Selon la nomenclature établie par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) et basée sur la spécificité de substrat, les glycosidases font partie de la famille EC 3.2.1., dans laquelle le chiffre 3 correspond aux hydrolases, le chiffre 2 aux glycosylases et le chiffre 1 aux O- et S-glycosidases.

En 1991, Henrissat a proposé une autre classification de ces enzymes basée sur les séquences d'acides aminés et permettant de mieux rendre compte des similitudes en terme de mécanisme et de structure tridimensionnelle⁴. Actuellement cette classification contient près de 100 familles. Elle est régulièrement mise à jour et consultable sur Internet⁵.

³ David, S. *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres* 1995, InterEditions / CNRS Editions, 58-61.

⁴ Henrissat, B. *Biochem. J.* 1991, 280, 309-316.

⁵ Coutinho, P. M. ; Henrissat, B. *Carbohydrate-Active Enzymes Server* 1999, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>

I.2. Rôles des glycosidases

Les glycosidases sont des enzymes très répandues et elles sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. Ce paragraphe n'a pas pour vocation de détailler l'ensemble des fonctions assurées par les glycosidases, qui sont d'ailleurs pour certaines encore mal connues, mais d'en donner quelques exemples chez l'homme⁶.

I.2.1. Dégradation des polysaccharides alimentaires et de stockage

Les glycosidases sont responsables de la digestion des polysaccharides de l'alimentation dans la bouche et l'intestin grêle, en permettant la dégradation de ceux-ci en monosaccharides, qui peuvent ensuite passer la barrière intestinale pour être véhiculés par le sang vers les organes. Par exemple, l' α -amylase sécrétée par les glandes salivaires et le pancréas transforme l'amidon en maltose, maltotriose et dextrines. Les deux premiers composés sont hydrolysés par la maltase et le dernier par l' α -dextrinase pour donner du glucose. De même, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose par la saccharase et le lactose en glucose et galactose par la lactase. Ces enzymes sont localisées à la surface des cellules épithéliales qui tapissent l'intestin grêle.

Certaines de ces enzymes jouent également un rôle important dans la dégradation du glycogène, polysaccharide formé d'unités glucose reliées entre elles par des liaisons α -1,4 et possédant des ramifications créées par des liaisons α -1,6, sur environ un résidu sur dix (Figure 2).

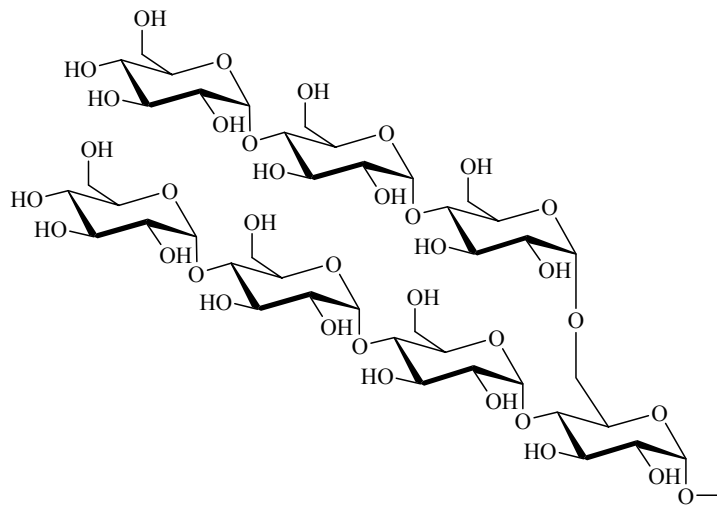


Figure 2

Le glycogène est stocké dans le foie et les muscles. Sa concentration est plus élevée dans le foie, mais les muscles en contiennent plus en raison de leur plus grande masse. Son hydrolyse par différentes enzymes, dont une α -1,6-glycosidase, permet d'apporter rapidement de l'énergie sous forme de glucose aux différents organes.

⁶ Stryer, L. *La biochimie de Lubert Stryer* 1992, Médecine-Sciences Flammarion.

I.2.2. Maturation des glycoprotéines

Les glycosidases sont également impliquées dans le processus de maturation des glycoprotéines et des glycolipides. Ces composés sont très répandus dans l'organisme et leurs fonctions sont très variées. Les glycoprotéines sont notamment présentes dans les membranes cellulaires et interviennent dans de nombreux processus, comme le transport membranaire, la reconnaissance cellulaire, la réplication des virus, la réponse immunitaire etc.

Chez les eucaryotes, de nombreuses protéines sont modifiées dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) et sont notamment glycosylées⁷.

Les unités oligosaccharidiques des glycoprotéines sont liées à des résidus asparagine par des liaisons *N*-glycosidiques ou à des résidus sérine et thréonine par des liaisons *O*-glycosidiques. Dans le cas des oligosaccharides *N*-liés, quatorze résidus osidiques sont transférés en bloc d'un transporteur lipidique à la protéine⁸. Il s'agit d'un enchaînement de deux *N*-acétylglucosamines (GlcNAc), suivies de neuf mannoses (Man) et de trois glucoses (Glc) (**Figure 3**).

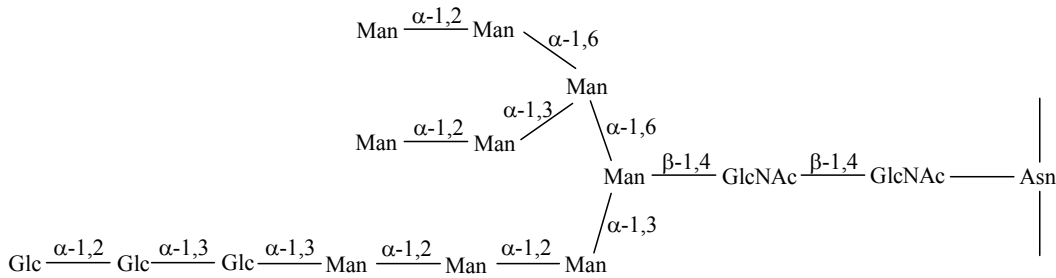


Figure 3

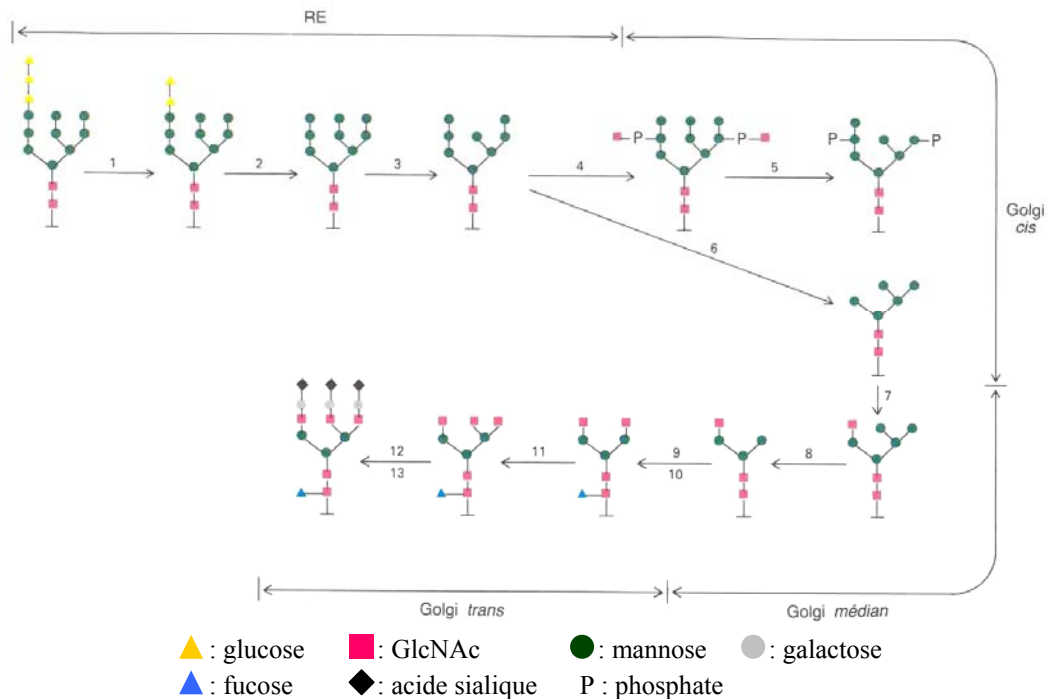
Dans le réticulum endoplasmique, les trois unités glucose ainsi qu'un des résidus mannose sont hydrolysés par action de différentes glycosidases (étapes 1 à 3, **Figure 4**).

Les glycoprotéines sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi, qui est un amoncellement de sacs membranaires aplatis. Cet organe a pour but de poursuivre la modification des protéines *N*-glycosylées et d'entamer la maturation des protéines *O*-glycosylées. Il joue également le rôle très important de trier les glycoprotéines pour les envoyer vers leurs sites d'activité.

Dans le compartiment *cis* de l'appareil de Golgi, il existe plusieurs voies de maturation. L'une d'entre elles consiste en la phosphorylation d'unités mannose, ce qui entraîne la création d'un résidu mannose 6-phosphate (étapes 4 et 5, **Figure 4**). Ce résidu agit comme un marqueur, qui permet l'adressage de la glycoprotéine vers le lysosome.

⁷ Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.

⁸ Lennarz, W. J. *Biochemistry* **1987**, 26, 7205-7210.



- (1) : glucosidase I ; (2) : glucosidase II ; (3) : α -1,2-mannosidase du réticulum endoplasmique ;
 (4) : *N*-acétylglucosaminyl-phosphotransférase ; (5) : phosphodiester glycosidase ; (6) : mannosidase I de l'appareil de Golgi ; (7) : GlcNAc transférase I ; (8) : mannosidase II ; (9) : GlcNAc transférase II ;
 (10) : fucosyl transférase ; (11) : GlcNAc transférase IV ; (12) : galactosyl transférase ; (13) : sialyl transférase.

Figure 4

Dans les autres compartiments de l'appareil de Golgi, des sucres sont ajoutés par l'intermédiaire de glycosyl transférases ou retirés par des glycosidases, pour former des structures saccharidiques plus ou moins complexes (étapes 6 à 13, **Figure 4**). Les glycoprotéines devenues matures sont ensuite envoyées vers leurs sites d'activité : le lysosome, la membrane ou les vésicules de sécrétion (**Figure 5**).

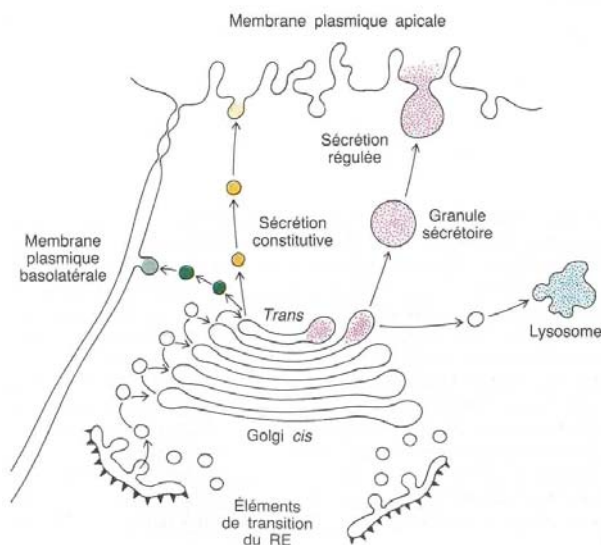


Figure 5

I.3. Mécanismes

Les glycosidases agissent dans l'organisme selon deux mécanismes principaux décrits pour la première fois par Koshland en 1953⁹. En effet, l'hydrolyse enzymatique de la liaison glycosidique peut entraîner la formation :

- soit d'un glucide dont la configuration anomérique est l'inverse de celle du substrat, on parle alors d'un mécanisme avec inversion de configuration ;
- soit d'un glucide dont la configuration anomérique est identique à celle du substrat, on parle alors d'un mécanisme avec rétention de configuration.

Ces mécanismes mettent principalement en jeu deux groupements carboxyliques provenant de résidus glutamate ou aspartate du site actif de l'enzyme. Ils sont donnés ci-dessous pour des β -glycosidases¹⁰. Dans le cas d' α -glycosidases, il est nécessaire d'invertir sur les schémas les deux résidus carboxyliques.

I.3.1. Mécanisme avec inversion de configuration

C'est le mécanisme le moins répandu. Il correspond à une substitution nucléophile s'effectuant selon un mécanisme concerté. L'un des groupements carboxyliques permet le départ de l'aglycone par son rôle de catalyseur acide, tandis que l'autre sous forme de carboxylate déprotonne l'eau pour favoriser son attaque sur le carbone anomérique, selon un processus de catalyse acide-base générale. Cette réaction s'effectue en passant par un état de transition dont la structure est proche de celle d'un cation oxocarbenium (**Schéma 3**).

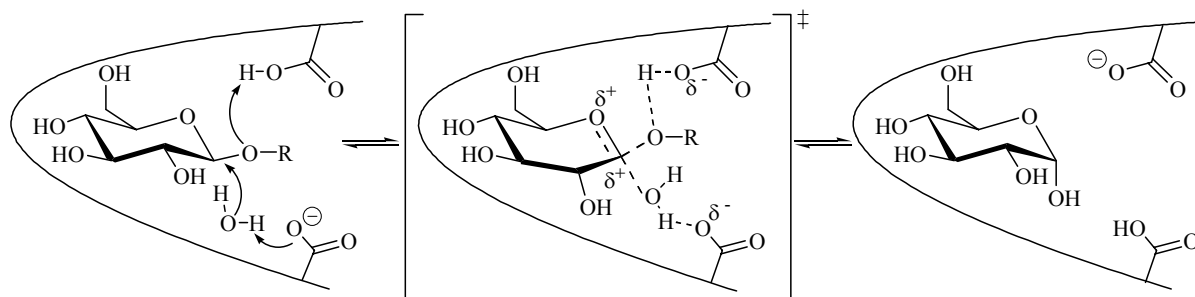


Schéma 3

Dans ce cas, les deux groupements carboxyliques doivent être suffisamment éloignés pour permettre l'insertion du substrat et de la molécule d'eau. En effet, pour ce type de glycosidases, une distance moyenne de 10,5 Å entre les deux acides aminés a été mise en évidence^{11,12}.

⁹ Koshland, D. E. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416-436.

¹⁰ Zechel, D. L. ; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11-18.

¹¹ McCarter, J. D. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885-892.

¹² Wang, Q. ; Graham, R. W. ; Trimbur, D. ; Warren, R. A. J. ; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11594-11595.

I.3.2. Mécanisme avec rétention de configuration

La rétention de configuration est la conséquence de deux inversions de configuration successives. Ce mécanisme implique la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent. Comme précédemment, l'un des groupements carboxyliques joue le rôle de catalyseur acide en protonant le groupe partant. L'autre groupement sous forme de carboxylate nucléophile attaque le carbone anomérique pour former l'intermédiaire covalent lié à l'enzyme par une liaison α (**Schéma 4**). Dans le cas d' α -glycosidases, cet intermédiaire est lié au site actif par une liaison β .

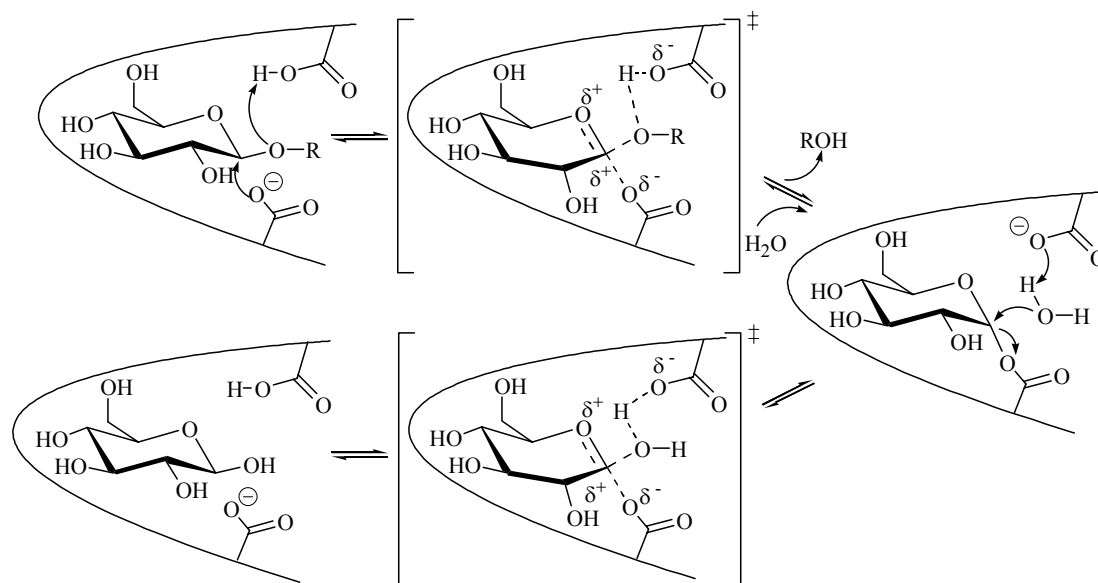


Schéma 4

Lors de la seconde étape, une molécule d'eau est alors déprotonée par le résidu carboxylique devenu basique. Elle peut ainsi attaquer le carbone anomérique. Le deuxième groupement carboxylique joue alors le rôle de groupe partant pour libérer le sucre. Ces deux étapes s'effectuent en passant par des états de transition également proches de cations oxocarbénium.

Pour ce mécanisme, les deux groupements carboxyliques doivent être plus rapprochés afin de permettre une attaque directe sur le sucre. En effet, ils sont distants de 5,5 Å en moyenne^{11,12}.

I.3.3. Aspects mécanistiques particuliers

Les séquences d'acides aminés, ainsi que les structures en trois dimensions d'un grand nombre de glycosidases sont désormais connues, ce qui permet d'affiner encore les connaissances relatives aux mécanismes de ces enzymes^{13,14}.

¹¹ McCarter, J. D. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 885-892.

¹² Wang, Q. ; Graham, R. W. ; Trimbur, D. ; Warren, R. A. J. ; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11594-11595.

¹³ Sinnott, M. L. *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1171-1202.

¹⁴ Vasella, A. ; Davies, G. J. ; Böhm, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 619-629.

Des différences peuvent apparaître selon les glycosidases considérées. Par exemple, pour certaines *N*-acétyl- β -hexosaminidases fonctionnant selon un mécanisme avec rétention de configuration, la réaction d'hydrolyse enzymatique passe par un intermédiaire oxazolinium^{15,16}. En effet, c'est le groupement *N*-acétyl du substrat qui joue ici le rôle du nucléophile (**Schéma 5**).

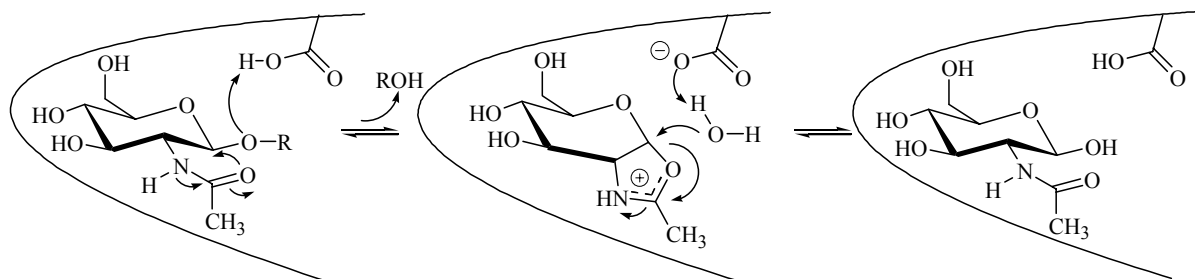


Schéma 5

En 1999, Vasella et coll. ont publié une étude concernant le cas général des β -glycosidases fonctionnant selon un mécanisme avec rétention de configuration. Ce sont les enzymes les plus courantes et les plus étudiées. Ils ont montré que ces enzymes ne protonent pas leur substrat depuis le dessus, mais plutôt par le côté. Ainsi la protonation par le résidu carboxylique peut se faire en *anti* (**Figure 6a** en bleu) ou en *syn* (**Figure 6b** en rouge) par rapport à la liaison entre l'oxygène endocyclique et le carbone anomérique¹⁷.

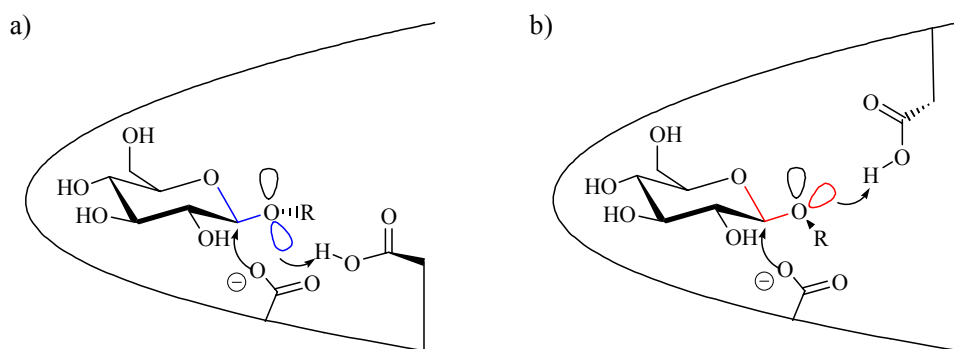


Figure 6

Cependant la position du résidu acide/base semble moins fondamentale que celle du résidu nucléophile. En effet, il a été montré sur une β -xylanase que l'allongement ou le raccourcissement, obtenu par mutagenèse, de la chaîne portant le catalyseur acide/base entraîne une diminution de la vitesse de la réaction nettement moins importante que lorsque ces manipulations sont faites sur la chaîne portant le résidu nucléophile^{18,19}. Le raccourcissement de la chaîne est obtenu par remplacement de l'acide glutamique, impliqué

¹⁵ Terwisscha van Scheltinga, A. C. ; Armand, S. ; Kalk, K. H. ; Isogai, A. ; Henrissat, B. ; Dijkstra, B. W. *Biochemistry* **1995**, *34*, 15619-15623.

¹⁶ Mark, B. L. ; Vocadlo, D. J. ; Knapp, S. ; Triggs-Raine, B. L. ; Withers S. G. ; James, M. N. G. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10330-10337.

¹⁷ Heightman, T. D. ; Vasella, A. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750-770.

¹⁸ Lawson, S. L. ; Wakarchuk, W. W. ; Withers S. G. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10110-10118.

¹⁹ Lawson, S. L. ; Wakarchuk, W. W. ; Withers S. G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2257-2265.

dans la catalyse, par un acide aspartique, tandis que l'allongement provient du remplacement de l'acide glutamique par une cystéine, qui subit ensuite une carboxyméthylation sélective.

I.4. Modèle général de l'état de transition

La connaissance des mécanismes et donc des états de transition impliqués dans les réactions catalysées par des enzymes est fondamentale. En effet, de nombreuses stratégies de synthèse d'inhibiteurs sont orientées vers la création de molécules mimant les états de transition, ceux-ci étant considérés comme les structures les plus fortement liées par l'enzyme au cours du chemin réactionnel.

Dans le cas des glycosidases, l'état de transition est similaire quel que soit le mécanisme mis en jeu et il est généralement représenté de la manière suivante :

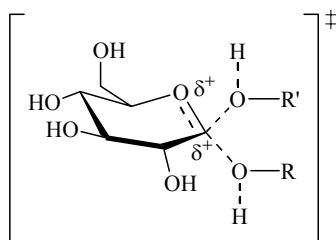


Figure 7

D'après cette représentation, deux caractéristiques de l'état de transition semblent essentielles : une distorsion de cycle du substrat et une structure "pseudo-cationique" de type oxocarbenium.

I.4.1. Distorsion de cycle du substrat

La distorsion de cycle du substrat se traduit par une structure dont la conformation est demi-chaise, bateau ou twist selon les glycosidases considérées (**Schéma 6**)²⁰. Elle permet de se rapprocher de la conformation de l'ion oxocarbenium.

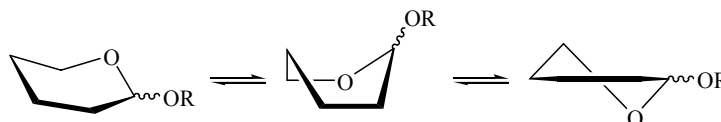


Schéma 6

Dans le cas des β -glycosidases, cette distorsion facilite l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique en diminuant les interactions stériques défavorables et en rapprochant l'oxygène exocyclique du catalyseur acide. De plus, il a été montré qu'elle permettait l'orientation pseudoaxiale de la liaison glycosidique (**Figure 8**). Cette orientation entraîne le recouvrement de l'orbitale occupée par une des paires libres d'électrons de l'oxygène

²⁰ Davies, G. J. ; Ducros, V. M.-A. ; Varrot, A. ; Zechel, D. L. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 523-527.

endocyclique avec l'orbitale antiliante de la liaison glycosidique, ce qui constitue un facteur favorable à l'hydrolyse de la liaison^{21,22}.

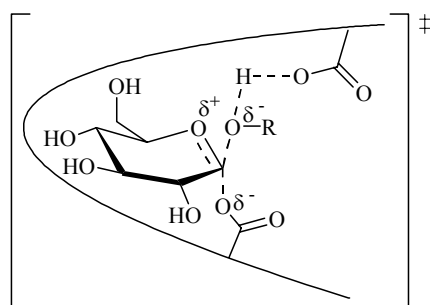


Figure 8

En ce qui concerne les α -glycosidases, les données sur leurs mécanismes et donc leurs états de transition sont beaucoup moins abondantes dans la littérature. Cependant la plupart des mécanismes publiés supposent une distorsion du cycle du substrat²³.

En 2000, Howell et coll. ont proposé un mécanisme pour l' α -1,2-mannosidase du réticulum endoplasmique²⁴, enzyme impliquée dans la maturation des glycoprotéines (**Figure 4**). Cette glycosidase n'est active qu'en présence de calcium et la réaction d'hydrolyse s'effectue avec inversion de configuration. Ils ont montré, grâce à un spectre de diffraction de rayons X de l'enzyme cristallisée en présence d'un inhibiteur, que le sucre se présentait dans la conformation 1C_4 , qui n'est pas privilégiée en solution en raison du positionnement axial des trois substituants (**Schéma 7**). Mais dans le site actif, les nombreuses interactions entre les acides aminés, le calcium et les groupements hydroxyles du sucre permettent la stabilisation de cette conformation.

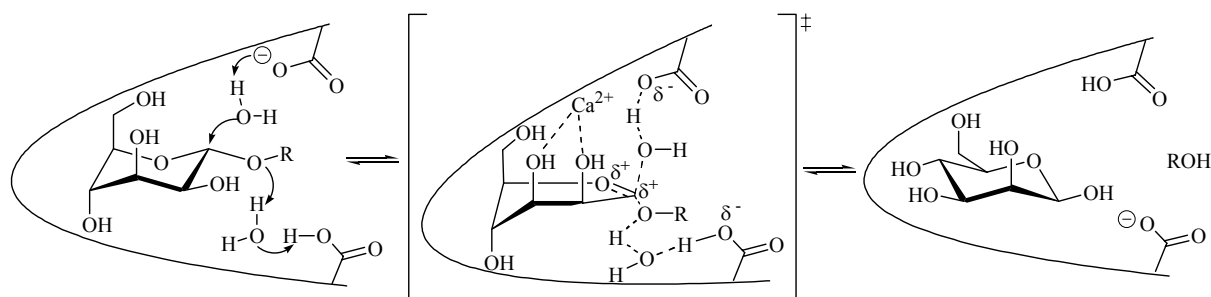


Schéma 7

Le schéma réactionnel proposé présente la particularité de faire intervenir deux molécules d'eau, contrairement au mécanisme général conduisant à une inversion de configuration. Comme observé précédemment, la distorsion de cycle du substrat à l'état de transition permet l'orientation pseudoaxiale de la liaison glycosidique, ce qui facilite la réaction d'hydrolyse.

²¹ Sulzenbacher, G. ; Driguez, H. ; Henrissat, B. ; Schülein, M. ; Davies, G. J. *Biochemistry* **1996**, 35, 15280-15287.

²² Davies, G. J. ; Mackenzie, L. ; Varot, A. ; Dauter, M. ; Brzozowski, A. M. ; Schülein, M. ; Withers, S. G. *Biochemistry* **1998**, 37, 11707-11713.

²³ Numao, S. ; Kuntz, D. A. ; Withers, S. G. ; Rose, D. R. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 48074-48083.

²⁴ Vallée, F. ; Karaveg, K. ; Herscovics, A. ; Moremen, K. W. ; Howell, P. L. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 41287-41298.

I.4.2. Structure "pseudo-cationique" de type oxocarbénium

Une structure "pseudo-cationique" de type oxocarbénium implique le développement d'une charge positive partielle sur l'oxygène endocyclique ou le carbone anomérique (**Schéma 8**). Dans le cas de plusieurs β -glycosidases fonctionnant selon un mécanisme avec rétention de configuration, des mesures d'effets isotopiques secondaires ont mis en évidence le caractère cationique plus ou moins important du carbone anomérique dans l'état de transition²⁵.

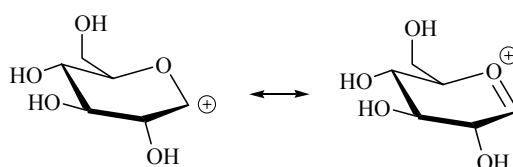


Schéma 8

La stabilisation de cet intermédiaire chargé est renforcée par des interactions entre les résidus carboxyliques du site actif de l'enzyme et différents groupements ou atomes du substrat. Par exemple, pour les β -glycosidases fonctionnant selon un mécanisme avec rétention de configuration, la position du résidu nucléophile, qui est en interaction avec le groupement hydroxyle en position 2, permet de stabiliser la charge positive développée sur le carbone anomérique (**Figure 9a**). Par contre dans le cas des α -glycosidases fonctionnant selon le même mécanisme, la proximité du résidu nucléophile et de l'oxygène endocyclique engendre la stabilisation de la charge positive développée sur cet atome (**Figure 9b**)¹⁰.

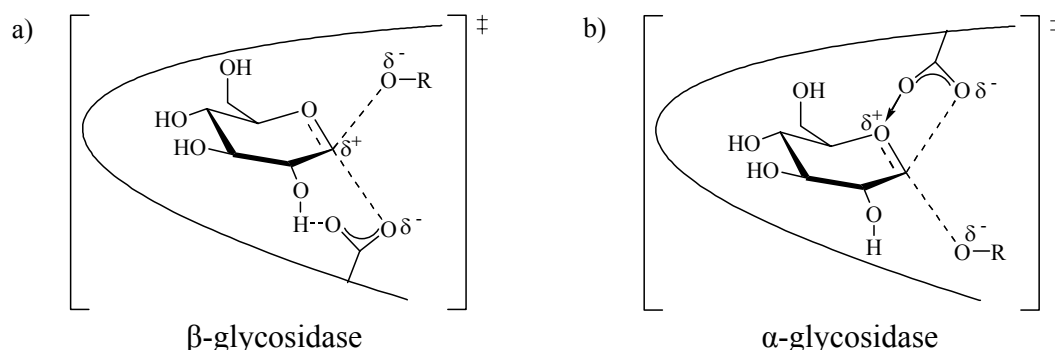


Figure 9

II. L'inhibition enzymatique

II.1. Rappels de cinétique enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs de réactions biochimiques. L'étude cinétique de ces réactions permet de mieux comprendre les mécanismes de la catalyse et de déterminer l'activité des enzymes.

²⁵ Kempton, J. B. ; Withers, S. G. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9961-9969.

¹⁰ Zechel, D. L. ; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11-18.

Une réaction enzymatique peut être décrite par différents modèles. En 1913, Leonor Michaelis et Maud Menten ont proposé un modèle simple, dans lequel l'enzyme (E) en présence du substrat (S) forme un complexe dissociable (ES), qui libère le produit de la réaction (P) (**Schéma 9**).

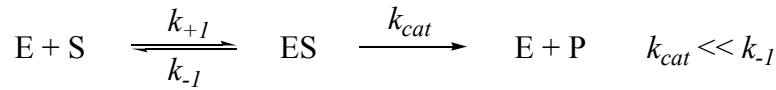


Schéma 9

L'enzyme en tant que catalyseur est en concentration plus faible que le substrat, ce qui conduit à un état stationnaire où la concentration en complexe (ES) est constante. Ainsi la vitesse d'apparition du produit v est également constante :

$$v = k_{cat} \times [ES]$$

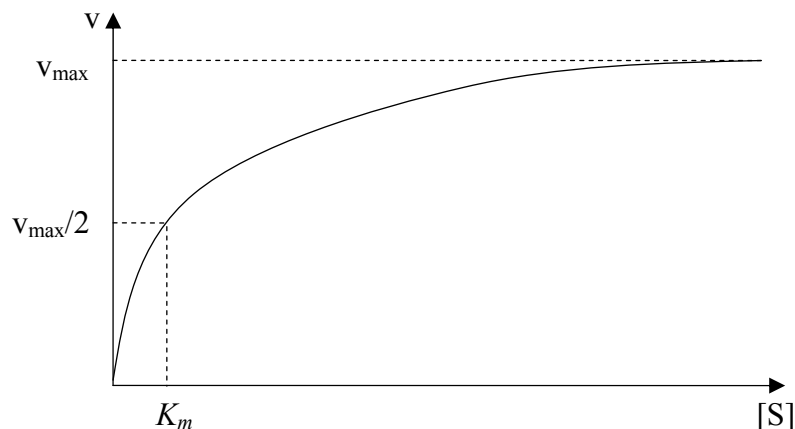
En posant $K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}} = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$, avec K_m appelée constante de Michaelis, et $[E]_t = [E] + [ES]$, avec $[E]_t$ la concentration totale en enzyme, on obtient l'équation de Michaelis-Menten (**Equation 1**).

$$v = k_{cat} \times [E]_t \frac{[S]}{[S] + K_m} = v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Equation 1

En traçant la vitesse v en fonction de la concentration en substrat $[S]$, on obtient une courbe montrant que la vitesse croît avec la concentration jusqu'à une valeur limite (v_{max}) (**Graphique 1**). En effet, quand $[S]$ est très grande devant K_m , on a $v = v_{max}$.

Lorsque la concentration en substrat est faible par rapport au K_m , la vitesse est proportionnelle à cette concentration et $v = v_{max} \frac{[S]}{K_m}$.



Graphique 1

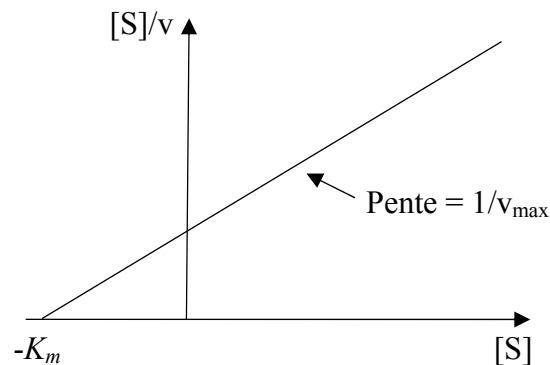
Les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique v_{\max} et K_m sont définis de la façon suivante :

- v_{\max} représente la vitesse maximale de la réaction. Elle est atteinte pour une concentration élevée en substrat et traduit la saturation de l'enzyme par le substrat, c'est-à-dire lorsque l'enzyme est entièrement sous forme de complexe (ES).
- K_m représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de v_{\max} ou pour laquelle la moitié des sites actifs de l'enzyme est occupée. Ainsi plus le K_m est faible et plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est importante.

Ces paramètres cinétiques peuvent facilement être déterminés en portant sur un graphique les valeurs de $[S]/v$ obtenues pour différentes concentrations en substrat $[S]$. En effet, on peut transformer l'équation de Michaelis-Menten (**Equation 1**) en l'équation suivante :

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}}$$

Le tracé de $[S]/v$ en fonction de $[S]$, appelé représentation de Hanes-Woolf, donne une droite, qui coupe l'axe des abscisses en $-K_m$ et dont la pente est $1/v_{\max}$ (**Graphique 2**).



Graphique 2

II.2. Les différents types d'inhibition

Il existe trois principaux types d'inhibition : l'inhibition compétitive, l'inhibition incompétitive et l'inhibition non compétitive.

II.2.1. Inhibition compétitive

Dans le cas d'une inhibition compétitive, l'inhibiteur est le plus souvent un analogue structural du substrat. Ainsi, il apparaît une compétition entre le substrat (S) et l'inhibiteur (I) pour l'occupation du site actif de l'enzyme (E) et il y a formation de complexes dissociables (ES) et (EI). L'existence du complexe (EI) diminue la quantité d'enzyme libre et ralentit fortement la réaction de formation du produit (P) (**Schéma 10**).

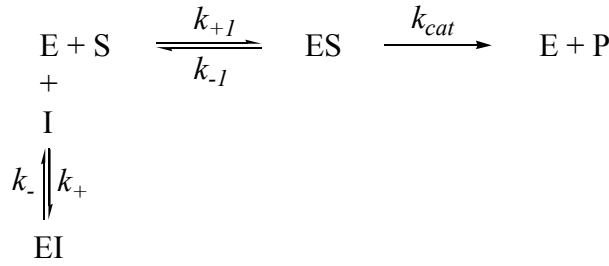


Schéma 10

Avec $K_m = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$, $K_i = \frac{k_-}{k_+} = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$ et $[E]_t = [E] + [ES] + [EI]$, on peut alors définir la vitesse de la réaction en présence d'inhibiteur (**Equation 2**).

$$v_i = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K'_m}$$

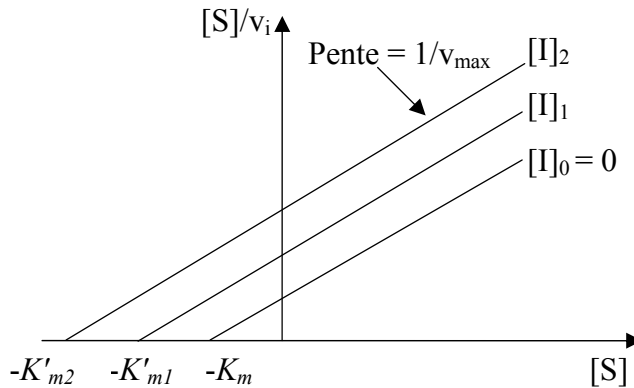
Equation 2

K'_m est la constante de Michaelis apparente. Elle augmente avec la concentration en inhibiteur. Par contre, la vitesse maximale v_{\max} est inchangée en présence d'un inhibiteur compétitif. K_i est la constante d'inhibition, qui définit l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur. Plus la valeur de cette constante est faible et plus l'inhibiteur est efficace.

Pour déterminer ces paramètres cinétiques, on peut transformer, de la même façon que précédemment, l'équation donnant la vitesse de la réaction (**Equation 2**) en :

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S]}{v_{\max}} + \frac{K'_m}{v_{\max}}$$

La représentation de Hanes-Woolf pour différentes concentrations en inhibiteur donne plusieurs droites parallèles, qui permettent d'obtenir les différents K'_m (**Graphique 3**). L'obtention de droites parallèles permet d'affirmer que l'inhibition observée est compétitive.

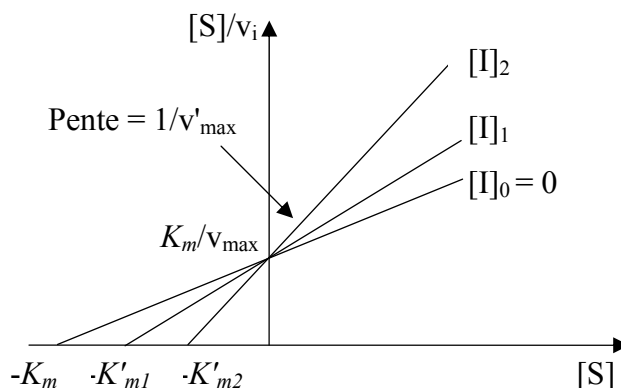


Graphique 3

Pour utiliser la représentation de Hanes-Woolf, on transforme cette équation en :

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S]}{v'_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}}$$

Et on obtient le graphique suivant :



Le tracé des K'_m ou des v'_{\max} en fonction de la concentration en inhibiteur permet de déterminer la constante d'inhibition K_i .

II.2.3. Inhibition non compétitive

Dans le cas d'une inhibition non compétitive, l'inhibiteur se fixe de façon réversible à la fois sur l'enzyme (E) et sur le complexe (ES) (Schéma 12).

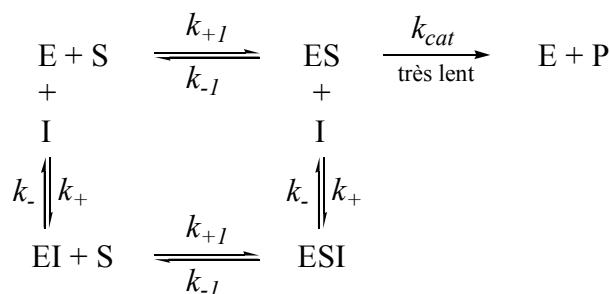


Schéma 12

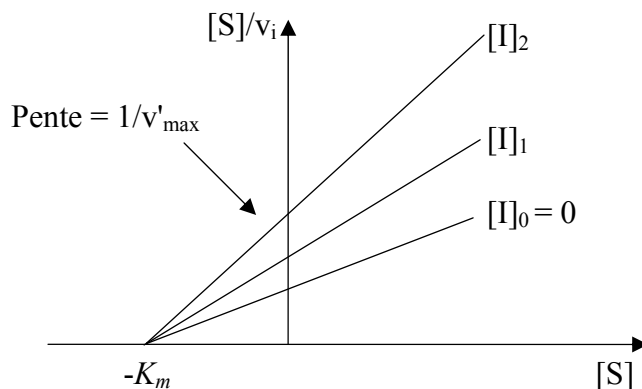
En considérant le cas particulier pour lequel : $K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{[EI] \times [S]}{[ESI]}$ et $K_i = \frac{k_-}{k_+} = \frac{[E] \times [I]}{[EI]} = \frac{[ES] \times [I]}{[ESI]}$, avec $[E]_t = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$, on peut alors écrire :

$$v_i = v_{\max} \frac{[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)([S] + K_s)} = v'_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_s} \text{ avec } v'_{\max} = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \text{ et } K_s = K_m$$

Pour utiliser la représentation de Hanes-Woolf, on transforme cette équation en :

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S]}{v'_{\max}} + \frac{K_m}{v'_{\max}}$$

Et on obtient le graphique suivant :



Le tracé des v'_{\max} en fonction de la concentration en inhibiteur permet de déterminer la constante d'inhibition K_i .

Le tracé des droites selon la représentation de Hanes-Woolf nous permet donc de définir le type d'inhibition. Ainsi, l'obtention de droites parallèles, de droites se coupant sur l'axe des ordonnées ou de droites se coupant sur l'axe des abscisses implique respectivement que l'inhibiteur est compétitif, incompétitif ou non compétitif. Pour quantifier l'inhibition plus rapidement, on peut également déterminer l' IC_{50} , la concentration en inhibiteur nécessaire pour avoir 50 % d'inhibition, c'est-à-dire la quantité d'inhibiteur permettant d'obtenir une vitesse deux fois plus faible que la vitesse mesurée en l'absence d'inhibiteur.

III. Les inhibiteurs de glycosidases

Les stratégies de synthèse d'inhibiteurs de glycosidases se sont souvent orientées vers la construction de molécules mimant l'état de transition, grâce à une distorsion de cycle, une charge positive ou en combinant les deux. Parmi les inhibiteurs possédant une charge positive, Bols et coll. distinguent trois grandes catégories (**Figure 10**)²⁶.

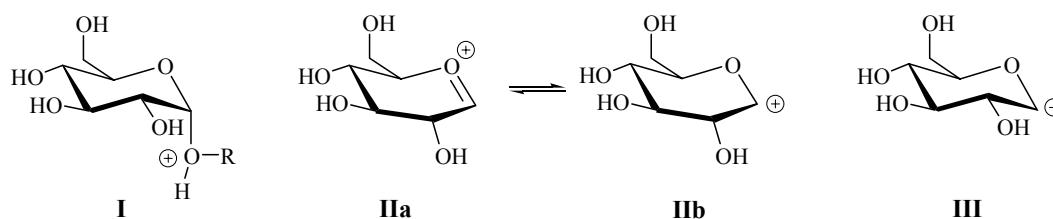


Figure 10

²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

La première catégorie correspond au cation localisé sur l'oxygène exocyclique (**I**). La deuxième catégorie correspond au cation localisé sur l'oxygène endocyclique (**IIa**) et la dernière catégorie au cation localisé sur le carbone anomérique (**III**). Certains inhibiteurs peuvent appartenir à plusieurs de ces catégories en même temps.

Nous avons choisi d'utiliser cette classification pour présenter quelques exemples significatifs d'inhibiteurs de glycosidases. Cependant, l'appartenance à ces catégories n'est pas toujours clairement établie. Il existe, de plus, une controverse concernant les critères précis permettant d'affirmer qu'un inhibiteur mime effectivement l'état de transition. En effet, l'activité de certains composés est parfois attribuée à de fortes interactions avec le site actif sans pour autant correspondre à un mimétisme de l'état de transition²⁷.

III.1. Inhibiteurs mimant la charge positive sur l'oxygène exocyclique (I)

Les composés qui contiennent un atome d'azote exocyclique protoné à pH physiologique sont les inhibiteurs les plus fréquents de cette catégorie.

III.1.1. Les mannostatines et analogues

Les mannostatines A **3** et B **4** (**Figure 11**) ont été isolées en 1989 d'un microorganisme de sol : *Streptoverticillium verticillus*, et nommées ainsi en raison de leur forte activité inhibitrice vis-à-vis d' α -mannosidases ($IC_{50} = 0,07 \mu M$ et $0,17 \mu M$ respectivement vis-à-vis de l' α -mannosidase de pois sabre (*Canavalia ensiformis* ou jack beans))²⁸. Cette inhibition est sélective des mannosidases, réversible et compétitive.

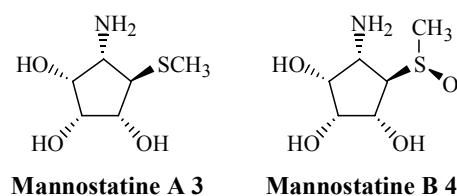


Figure 11

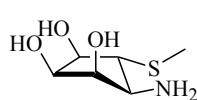
Ces composés à cinq chaînons ont une conformation enveloppe, qui permet de mimer la distorsion de cycle du substrat. Dans la littérature, un doute subsiste sur leur appartenance à la catégorie des inhibiteurs mimant la charge positive sur l'oxygène exocyclique²⁹. Cependant la forte ressemblance entre la mannostatine A **3** et la D-mannopyranosylamine **5**, un inhibiteur compétitif de mannosidases, est en faveur de cette classification (**Figure 12**)³⁰.

²⁷ Withers, S. G. ; Namchuk, M. ; Mosi, R. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 188-206.

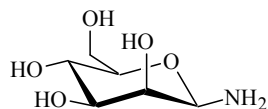
²⁸ Berecibar, A. ; Grandjean, C. ; Siriwardena, A. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 779-844.

²⁹ Li, B. ; Kawatkar, S. P. ; George, S. ; Strachan, H. ; Woods, R. J. ; Siriwardena, A. ; Moremen, K. W. ; Boons, G.-J. *Chembiochem* **2004**, *5*, 1220-1227.

³⁰ King, S. B. ; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 562-570.



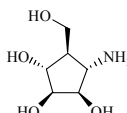
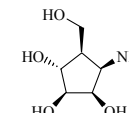
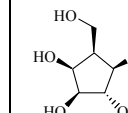
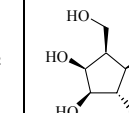
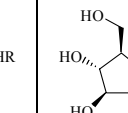
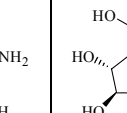
Mannostatine A 3



D-mannopyranosylamine 5

Figure 12

Après la découverte des mannostatines, de nombreux aminocyclopentitols ont été synthétisés dans le but de trouver de nouveaux inhibiteurs de glycosidases. On peut citer par exemple les composés de type "manno" **6** et **7**, les composés de type "galacto" **8** et **9** et les composés de type "gluco" **10** et **11**. Dans ce cas également, le mode d'inhibition n'est pas bien défini. En effet, on remarque que le composé **6** de configuration α est un moins bon inhibiteur d' α -mannosidases, que le composé **7** de configuration β . Il est donc difficile d'affirmer définitivement que l'azote protoné de ces dérivés mime l'oxygène exocyclique chargé positivement. Car dans ce cas, ils devraient être sélectifs vis-à-vis de la configuration anomérique. Par contre, la présence d'un groupement hydrophobe sur l'atome d'azote, mimant la partie aglycone, semble être un facteur positif à l'inhibition. En effet, les composés *N*-substitués **9** et **11** sont de meilleurs inhibiteurs que les composés non substitués **8** et **10**, excepté pour **11** vis-à-vis de la maltase de levure (**Tableau 1**)²⁶.

Enzymes	K_i en μM					
						
α -mannosidase*	0,41	0,074	/	/	180	/
β -galactosidase [#]	/	/	4,5	0,02	NI	NI
α -glucosidase ^s	/	/	/	/	6,2	67
β -glucosidase [£]	/	/	2,2	0,104	6,6	0,024

* : pois sabre

[#] : *Escherichia coli*

^s : maltase de levure

[£] : amandes

NI = moins de 50 % d'inhibition à 1 mM

/ = non donné

R = CH₂C₆H₁₁

Tableau 1

III.1.2. L'acarbose et analogues

Isolé dans les années 70 d'une souche d'*Actinoplanes*, l'acarbose **12** est un pseudotétrascarhide composé d'une unité aminocyclitol insaturée liée à un aminodésoxyglucose, lui-même lié à un résidu maltose (**Figure 13**). C'est un puissant inhibiteur d' α -glucosidases intestinales ($K_i = 0,26 \mu\text{M}$; saccharase de porc)³¹. A ce titre, il est commercialisé sous le nom Glucor® ou Glucobay® par la société Bayer pour le traitement du diabète de type II.

²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

³¹ Truscheit, E. ; Frommer, W. ; Junge, B. ; Müller, L. ; Schmidt, D. D. ; Wingender, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 744-761.

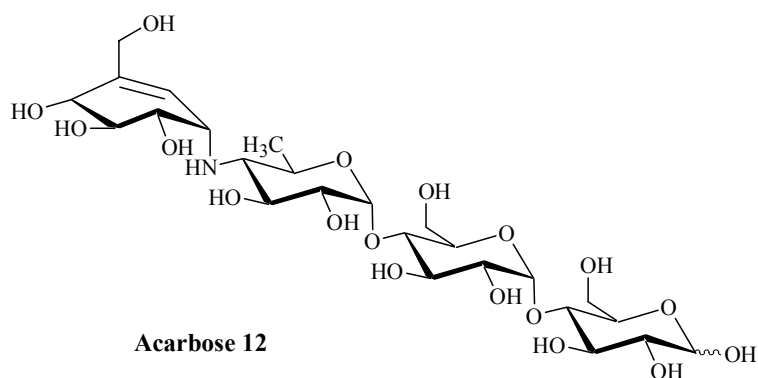


Figure 13

L'activité importante de ce composé est probablement liée au fait qu'il présente plusieurs caractéristiques en commun avec l'état de transition : l'oxygène exocyclique chargé positivement grâce à l'atome d'azote et la distorsion de cycle grâce à la double liaison, même si celle-ci ne se situe pas entre le carbone pseudo-anomérique et le carbone remplaçant l'oxygène endocyclique.

Différentes unités de l'acarbose se sont révélées être actives. Ainsi le cycle insaturé, nommé valiénamine **13**, est également un bon inhibiteur d' α -glucosidases intestinales ($K_i = 50 \mu\text{M}$; saccharase de porc) (**Figure 14**)³². D'autres aminocyclitols isolés en même temps que la valiénamine d'une fermentation de microorganismes, ont une bonne activité inhibitrice. Par exemple, la valiolamine **14** est plus puissante ($K_i = 0,03 \mu\text{M}$; saccharase de porc)³³ que la valiénamine **13**, ce qui peut sembler surprenant, car sans double liaison, elle ne mime plus la distorsion de cycle du substrat.

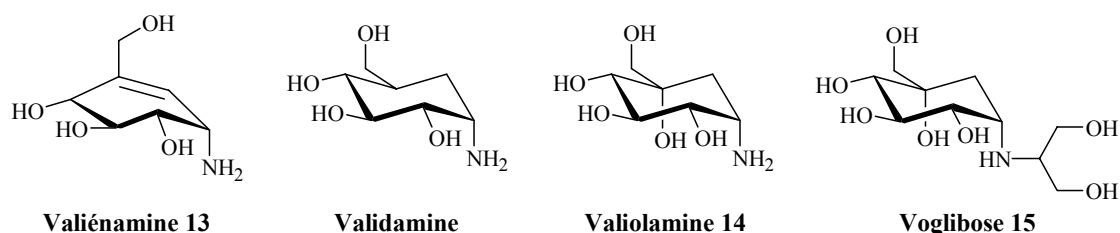


Figure 14

En 1986, Horii *et al.* ont synthétisé un grand nombre de dérivés *N*-substitués de la valiolamine **14**³⁴. Parmi ces composés, le voglibose **15** est un des plus puissants inhibiteurs d' α -glucosidases ($K_i = 3,8 \text{ nM}$; maltase de porc et $K_i = 2,0 \text{ nM}$; saccharase de porc) (**Figure 14**). Il est actuellement commercialisé en Asie sous le nom Basen® par la société Takeda pour le traitement du diabète de type II.

De même, le premier pseudodisaccharide de l'acarbose **12** est très actif. En effet, une forme méthylée de celui-ci, l' α -méthylacarviosine **16**, est un excellent inhibiteur d' α -glucosidases intestinales ($\text{IC}_{50} = 0,16 \mu\text{M}$; saccharase de porc)³⁴. De la même façon, la

³² Chen, X. ; Fan, Y. ; Zheng, Y. ; Shen, Y. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1955-1977.

³³ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Yoshikawa, M. ; Takeuchi, M. ; Yamaguchi, T. ; Matsui, K. ; Horii, S. ; Fukase, H. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1301-1307.

³⁴ Horii, S. ; Fukase, H. ; Matsuo, T. ; Kameda, Y. ; Asano, N. ; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1038-1046.

validoxyamine A **17**, un puissant inhibiteur de tréhalases ($IC_{50} = 0,43 \text{ nM}$; insecte), semble être à l'origine de l'activité de la validamycine A **18** ($IC_{50} = 47 \text{ nM}$; insecte), un insecticide utilisé en agriculture (**Figure 15**)³⁵.

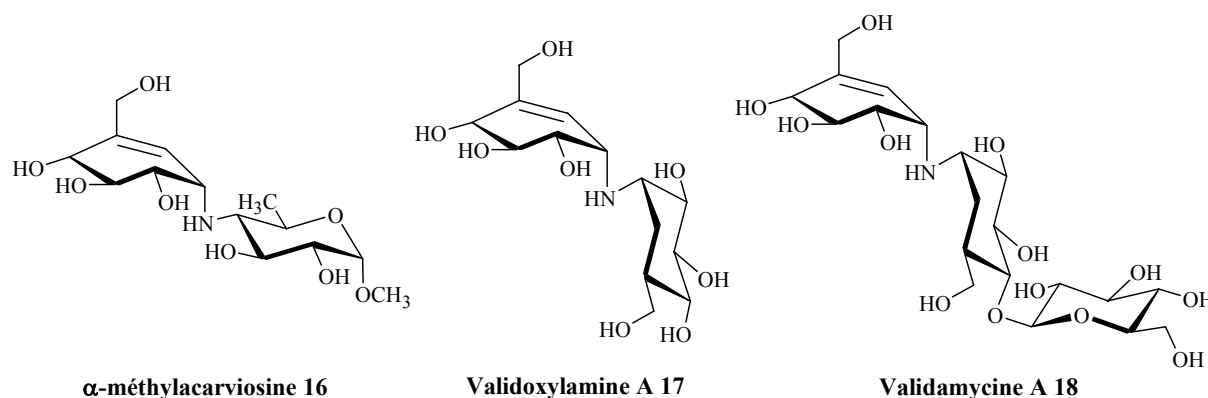


Figure 15

III.2. Inhibiteurs mimant la charge positive sur l'oxygène endocyclique (IIa)

Les analogues de sucres dont l'oxygène endocyclique a été remplacé par un atome d'azote sont les représentants les plus importants de cette catégorie^{36,37}. Comme précédemment, cet atome est protoné à pH physiologique et mime ainsi la charge positive. Les composés possédant un ion sulfonium endocyclique comme le salacinol peuvent également être considérés comme mimant l'oxygène endocyclique chargé positivement.

III.2.1. Les aminosucres et analogues

Le premier aminosucre naturel découvert a été la nojirimycine **19**, analogue azoté du D-glucose, isolée en 1967 de *Streptomyces nojiriensis*. Ce composé est un puissant inhibiteur d' α - et de β -glucosidases ($K_i = 0,13 \text{ }\mu\text{M}$; saccharase d'intestin de lapin et $K_i = 0,07 \text{ }\mu\text{M}$; β -glucosidase d'*Aspergillus wentii*)³⁸. La nojirimycine B ou mannojirimycine **20** et la galactostatine **21** ont également été isolées de cultures de *Streptomyces*. La mannojirimycine est un très bon inhibiteur d' α - et de β -mannosidases ($K_i = 1,2 \text{ }\mu\text{M}$; α -mannosidase de pois sabre et $K_i = 7,7 \text{ }\mu\text{M}$; β -mannosidase d'*Aspergillus wentii*)³⁸, la galactostatine un puissant inhibiteur d' α - et de β -galactosidases ($K_i = 0,7 \text{ nM}$; α -galactosidase de grains de café vert³⁹ et $IC_{50} = 30,5 \text{ nM}$; β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae*⁴⁰) (**Figure 16**).

³⁵ Asano, N. ; Takeuchi, M. ; Kameda, Y. ; Matsui, K. ; Kono, Y. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 722-726.

³⁶ Simmonds, M. S. J. ; Kite, G. C. ; Porter, E. A. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 8-30.

³⁷ Watson, A. A. ; Fleet, G. W. J. ; Asano, N. ; Molyneux, R. J. ; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265-295.

³⁸ Legler, G. ; Jülich, E. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 61-72.

³⁹ Ekhardt, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Taus, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.

⁴⁰ Miyake, Y. ; Ebata, M. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 153-158.

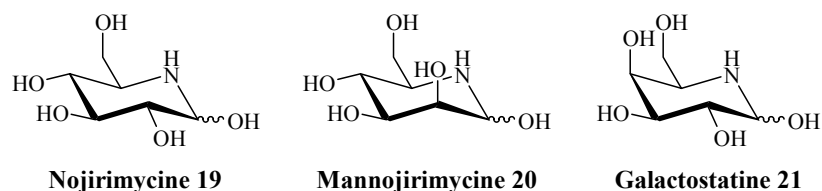


Figure 16

Si ces composés miment effectivement l'oxygène endocyclique chargé positivement, leur conformation chaise ne traduit pas la distorsion de cycle du substrat. C'est pour cette raison qu'ils ne sont pas forcément considérés comme des analogues de l'état de transition²⁷.

Après la découverte de ces aminosucres, de nombreux "désoxyanalogues", comme la 1,2-didésoxynojirimicine ou fagomine **22**, la 1-désoxynojirimicine (DNJ) **23** et la 1-désoxymannojirimicine (DMJ) **24**, ont à leur tour été isolés (**Figure 17**).

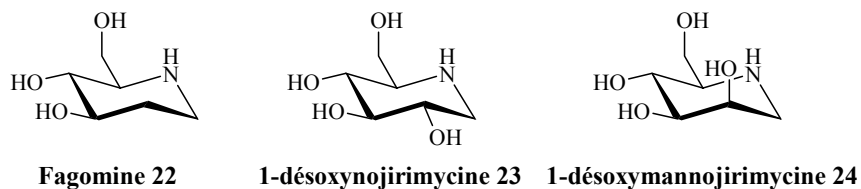


Figure 17

La perte du groupement hydroxyle en position anomérique augmente la stabilité de ces composés, sans perturber l'activité inhibitrice. Ainsi, la DNJ **23** est un puissant inhibiteur d' α et de β -glucosidases ($K_i = 32$ nM ; saccharase d'intestin de lapin³⁸ et $K_i = 60$ nM ; β -glucosidase d'*Aspergillus wentii*³⁹). La DMJ **24** est quant à elle un bon inhibiteur des α -mannosidases impliquées dans le processus de maturation des glycoprotéines ($IC_{50} = 25$ μ M ; Golgi I de foie de rat), mais aussi un bon inhibiteur d' α -fucosidases ($IC_{50} = 26$ μ M ; épiphyse de bœuf)⁴¹. Par contre, la fagomine **22** inhibe faiblement les α -glucosidases ($IC_{50} = 460$ μ M ; isomaltase d'intestin de rat)⁴¹, ce qui montre l'importance du groupement hydroxyle en position 2.

Certains analogues substitués sur l'atome d'azote sont également de bons inhibiteurs de glycosidases. Par exemple, la *N*-méthyl-1-désoxynojirimicine **25** est un meilleur inhibiteur d' α -glucosidases que la DNJ **23** ($IC_{50} = 0,04$ μ M ; saccharase d'intestin de rat), tandis que l'activité de la *N*-butyl-1-désoxynojirimicine **26** est légèrement moins importante ($IC_{50} = 0,58$ μ M ; saccharase d'intestin de rat)⁴². La *N*-hydroxyéthyl-1-désoxynojirimicine ou miglitol **27** est également un puissant inhibiteur d' α -glucosidases intestinales ($IC_{50} = 0,19$ μ M ;

²⁷ Withers, S. G. ; Namchuk, M. ; Mosi, R. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 188-206.

³⁸ Legler, G. ; Jülich, E. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 61-72.

³⁹ Ekhardt, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Tauss, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.

⁴¹ Asano, N. ; Oseki, K. ; Kizu, H. ; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3701-3706.

⁴² Asano, N. ; Kizu, H. ; Oseki, K. ; Tomioka, E. ; Matsui, K. ; Okamoto, M. ; Baba, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2349-2356.

saccharase d'intestin de rat)⁴³. Ce composé est d'ailleurs commercialisé en Europe sous le nom Diastabol® par la société Sanofi-Aventis pour le traitement du diabète de type II (**Figure 18**).

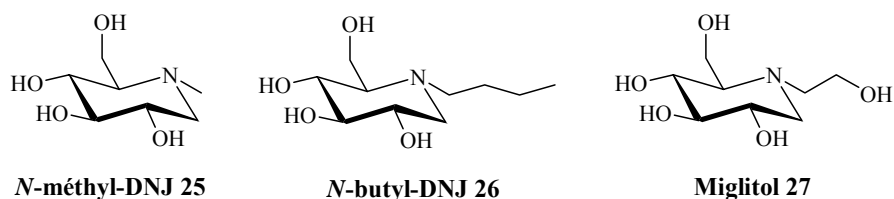


Figure 18

Parmi les analogues de sucres sous forme furanique, on peut citer différentes pyrrolidines polyhydroxylées comme la 2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrrolidine (DMDP) **28**, le 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-AB1) **29** ou la 3-hydroxy-2-hydroxyméthylpyrrolidine (CYB-3) **30** (**Figure 19**).

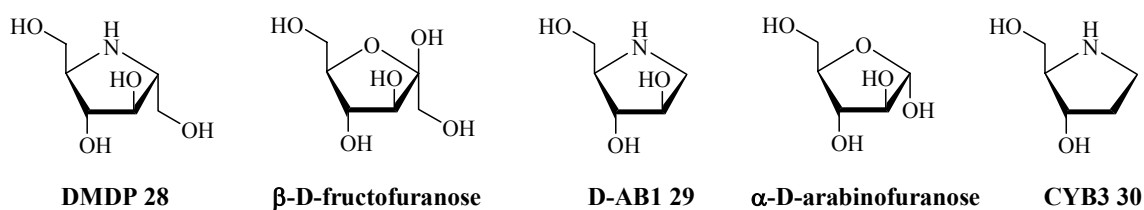


Figure 19

La DMDP **28** a été isolée en 1976 des feuilles de *Derris elliptica* et est considérée comme un analogue du β-D-fructofuranose. Or il s'agit d'un bon inhibiteur de fructofuranosidases ($IC_{50} = 44 \mu M$; intestin de rat)³⁹, mais elle est aussi un très bon inhibiteur d'α-glucosidases ($IC_{50} = 2 \mu M$; isomaltase de levure) et de β-galactosidases ($IC_{50} = 3,3 \mu M$; foie de bœuf)⁴³. Elle est très peu sélective. Le D-AB1 **29**, isolé en 1985, est un analogue de D-arabinofuranose. C'est un meilleur inhibiteur d'α-glucosidases que la DMDP **28** ($IC_{50} = 0,84 \mu M$; isomaltase de levure)⁴³. Enfin le CYB3 **30** n'est qu'un faible inhibiteur d'isomaltase, ce qui montre encore une fois l'importance du groupement hydroxyle en position 2. Comme nous l'avons vu avec les manostatines, le cycle à cinq chaînons permet de mimer la distorsion du substrat. C'est probablement pour cette raison que ces composés furaniques sont de bons inhibiteurs des glycosidases spécifiques de sucres sous forme pyranique.

Il existe également de nombreux inhibiteurs de glycosidases sous forme bicyclique. Par exemple, on peut citer l'alexine **31**, l'australine **32**, la swainsonine **33** et la castanospermine **34** (**Figure 20**).

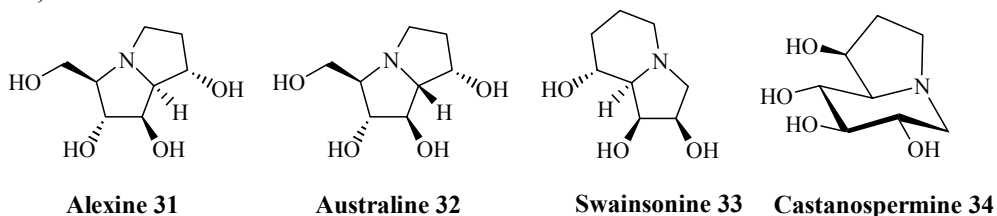


Figure 20

⁴³ Yasuda, K. ; Kizu, H. ; Yamashita, T. ; Kameda, Y. ; Kato, A. ; Nash, R. J. ; Fleet, G. W. J. ; Molyneux, R. J. ; Asano, N. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 198-202.

³⁹ Ekhart, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Tauss, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.

L'alexine **31** et l'australine **32** inhibent principalement les α -glucosidases disaccharidiques ($IC_{50} = 540$ et $24 \mu M$ respectivement ; maltase d'intestin de rat)⁴⁴. La castanospermine **34** ressemble à la DNJ **23** et c'est également un très bon inhibiteur d' α -glucosidases ($IC_{50} = 2,8 \mu M$; intestin de souris)⁴⁵. La swainsonine **33** quant à elle est un puissant inhibiteur de l' α -mannosidase II de l'appareil de Golgi, impliquée dans la maturation des glycoprotéines ($IC_{50} = 0,2 \mu M$; foie de rat)⁴⁶. Elle est très sélective, car elle n'est pas active vis-à-vis des autres α -mannosidases impliquées dans ce processus.

III.2.2. Le salacinol et le kotalanol



Récemment, de nouveaux inhibiteurs de glycosidases ont été isolés d'une plante : *Salacia reticulata*, ou "Kotala himbutu" en cingalais. C'est une plante grimpante ligneuse de la famille des Hippocrateaceae, que l'on trouve principalement dans les forêts du Sri Lanka et du sud de l'Inde. Les racines et les tiges de cette plante sont très souvent utilisées en médecine ayurvédique. L'ayurvéda est un système de santé traditionnel créé il y a plus de 5000 ans en Inde, et toujours largement pratiqué de nos jours. En sanskrit, "Ayus" signifie vie et "Vid" connaissance.

Les infusions faites à partir des racines et des tiges de *Salacia reticulata* sont ainsi utilisées depuis très longtemps comme traitement contre les rhumatismes, les maladies de peau et surtout contre le diabète. Dans les années 90, de nombreuses études sur cette plante ont montré la présence de composés tels que des stérols, des triterpènes et des composés phénoliques, sans toutefois identifier les principes actifs et leurs propriétés pharmacologiques.



Racines de *Salacia reticulata*

Ce n'est qu'en 1997 que Yoshikawa *et al.* ont montré que la fraction extraite au méthanol des racines et des tiges de cette plante inhibait chez des rats l'augmentation du taux de glucose dans le sang après leur avoir administré du saccharose ou du maltose^{1,47}. De plus, cette fraction inhibait *in vitro* la saccharase ($IC_{50} = 26 \mu g/mL$) et la maltase ($IC_{50} = 35 \mu g/mL$) intestinales de rat. Cela a permis de montrer que les propriétés traditionnelles antidiabétiques de cette plante étaient vraisemblablement dues à une activité inhibitrice vis-à-vis d' α -glucosidases intestinales. Ainsi les auteurs ont entrepris d'isoler les composés actifs par chromatographies sur gel de silice et HPLC répétées.

Ces différentes séparations leur ont permis d'isoler le salacinol **1** (0,025 %)⁴⁷ et le kotalanol **2** (0,0002 %)², deux nouveaux inhibiteurs d' α -glucosidases ($K_i = 0,93$ et $0,54 \mu M$; maltase d'intestin grêle de rat)², possédant une structure zwitterionique inédite contenant un

⁴⁴ Kato, A. ; Kano, E. ; Adachi, I. ; Molyneux, R. J. ; Watson, A. A. ; Nash, R. J. ; Fleet, G. W. J. ; Wormald, M. R. ; Kizu, H. ; Ikeda, K. ; Asano, N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 325-331.

⁴⁵ Nash, R. J. ; Fellows, L. E. ; Dring, J. V. ; Fleet, G. W. J. ; Girdhar, A. ; Ramsden, N. G. ; Peach, J. M. ; Hegarty, M. P. ; Scofield, A. M. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 111-114.

⁴⁶ Tulsiani, D. R. P. ; Harris, T. M. ; Touster, O. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7936-7939.

¹ Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Shimada, H. ; Matsuda, H. ; Yamahara, J. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8367-8370.

⁴⁷ Yoshikawa, M. ; Morikawa, T. ; Matsuda, H. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1547-1554.

² Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Yashiro, K. ; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1339-1340.

cation sulfonium stabilisé par un anion sulfate (**Figure 21**). Ces deux composés ont également été isolés chez d'autres variétés de *Salacia* : *Salacia oblonga* en Inde⁴⁸ et *Salacia chinensis* en Thaïlande.

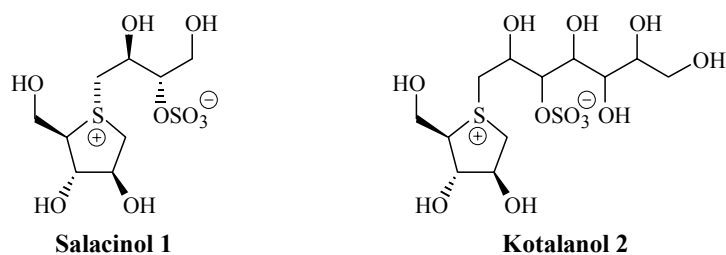


Figure 21

Ils ont été complètement caractérisés en spectrométrie de masse et en RMN. Pour le salacinol, la stéréochimie a été démontrée grâce à un spectre de diffraction de rayons X et par un traitement basique, qui a donné un composé, identifié comme étant le 1,4-anhydro-1-thio-D-arabinitol par synthèse à partir du D-xylose. Cette structure cristalline a également permis de mettre en évidence la conformation de type "spiro" adoptée par le salacinol (**Figure 22**).

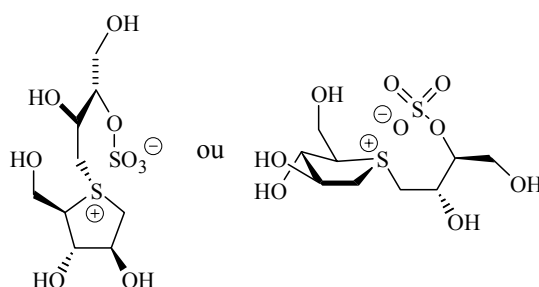


Figure 22

Quant au kotalanol, la stéréochimie des carbones asymétriques de la chaîne polyhydroxylée n'a pas encore été décrite. Celle du cycle par contre est acquise, puisque le traitement basique du zwitterion a fourni comme pour le salacinol le 1,4-anhydro-1-thio-D-arabinitol.

Plusieurs équipes ont entrepris ces dernières années de synthétiser le salacinol et différents analogues. Ces synthèses, ainsi que les propriétés inhibitrices de ces composés seront détaillées par la suite.

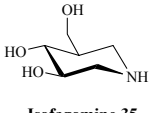
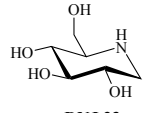
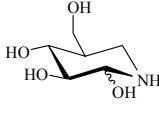
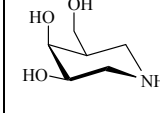
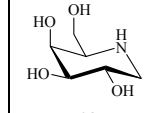
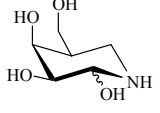
III.3. Inhibiteurs mimant la charge positive sur le carbone anomérique (III ou IIb)

Là encore, ce sont principalement les composés possédant un atome d'azote à la place du carbone anomérique, capable de se protoner à pH physiologique, qui sont les principaux représentants de cette catégorie.

⁴⁸ Matsuda, H. ; Murakami, T. ; Yashiro, K. ; Yamahara, J. ; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1725-1729.

III.3.1. L'isofagomine et analogues

L'isofagomine **35** est un composé synthétisé en 1994, dérivé de la fagomine mais dont l'atome d'azote se trouve en position pseudo-anomérique. C'est un puissant inhibiteur de β -glucosidases et un inhibiteur plus modéré d' α -glucosidases²⁶. D'autres isofagomines dérivées de différents sucres se sont révélées être de bons inhibiteurs de leurs β -glycosidases correspondantes, alors que leur inhibition vis-à-vis des α -glycosidases est moins bonne. Par exemple, l'isofagomine dérivée du galactose **37** est un meilleur inhibiteur de β -galactosidases que d' α -galactosidases. C'est également un puissant inhibiteur de la β -glucosidase d'amandes. A l'inverse, la DNJ **23** et la 1-désoxygalactostatine **38** ont une plus grande activité vis-à-vis des α -glycosidases que vis-à-vis des β -glycosidases. Enfin, la forme hémiaminal présente dans les composés **36** et **39** donne de bien meilleurs inhibiteurs de leurs α - et β -glycosidases correspondantes, avec cependant une perte de sélectivité (**Tableau 2**).

Enzymes	K_i en μM					
	 Isofagomine 35	 DNJ 23	 36	 37	 38	 39
β -glucosidase*	0,11	47	0,069	0,097	540	/
α -glucosidase [#]	86	25	0,022	/	/	/
β -galactosidase ^S	/	/	/	0,33	81	0,091
α -galactosidase [£]	/	/	/	50	0,0016	0,74

* : amandes ; [#] : levure ; ^S : *Saccharomyces fragilis* ; [£] : grains de café vert ; / = non donné

Tableau 2

Là encore, les raisons pour lesquelles ces différences d'activité entre isofagomines et désoxynojirimycines sont observées ne sont pas clairement définies. On peut cependant proposer l'explication suivante. Comme nous l'avons vu lors de la description de l'état de transition, le résidu carboxylate du site actif des β -glycosidases est proche du carbone anomérique, ce qui lui permet d'interagir plus fortement avec l'azote protoné des isofagomines. Par contre dans le cas des α -glycosidases, ce résidu se situe au dessus du sucre et interagit donc préférentiellement avec l'oxygène endocyclique, et donc avec l'azote protoné des désoxynojirimycines (**Figure 9**).

Cela n'explique cependant pas les bons résultats observés vis-à-vis des α - et β -glycosidases avec les formes hémiaminals **36** et **39**. On peut donc penser que c'est plutôt l'absence de groupement hydroxyle en α de l'azote qui nuit à l'inhibition des α -glycosidases par les isofagomines. Une autre explication consiste à considérer les isofagomines comme des mimes de l'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. En effet, tout comme pour les désoxynojirimycines, la conformation chaise de ces composés ne permet pas de mimer la distorsion de cycle du substrat à l'état de transition.

²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

III.3.2. La siastatine B et analogues

La siastatine B **40**, isolée en 1974 de *Streptomyces verticillus*, est un inhibiteur de β -glucuronidases ($IC_{50} = 39 \mu M$; foie de bœuf) et de *N*-acétyl- β -D-glucosaminidases. Trois diastéréoisomères de ce composé **41**, **42** et **43**, plus ou moins inhibiteurs de β -glucuronidases ($IC_{50} = 50 ; > 350 ; 1,6 \mu M$; foie de bœuf), ont été isolés plus récemment (**Figure 23**)²⁶.

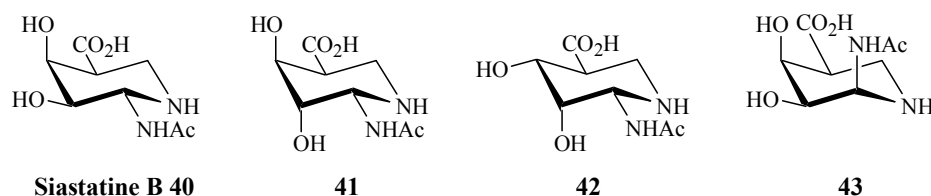


Figure 23

De nombreux analogues de la siastatine B **40** ont été synthétisés et testés vis-à-vis de la β -glucuronidase de foie de bœuf. Le remplacement du groupement acétamide par un groupement trifluoroacétamide augmente nettement l'inhibition ($IC_{50} = 0,065 \mu M$; composé **44**). L'analogue de type "gluco" **45** a la même activité que le composé **44** ($IC_{50} = 0,065 \mu M$) et le composé 4-désoxy **46** a une activité voisine de celle de la siastatine B **40** ($IC_{50} = 60 \mu M$). Cela montre la faible influence du groupement hydroxyle en position 4 sur l'inhibition des glucuronidases. De même, l'ajout d'un groupement hydroxyle en position 5 ne modifie pas l'activité ($IC_{50} = 0,062 \mu M$; composé **47**) (**Figure 24**).

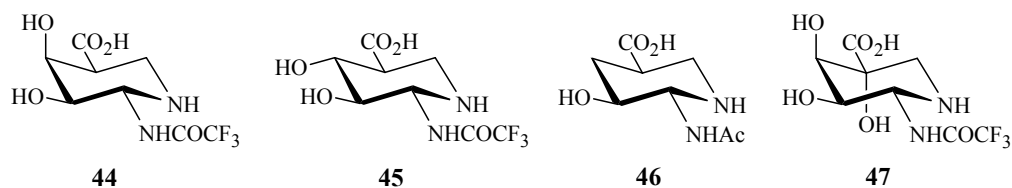


Figure 24

Cependant, la présence du groupement acide en position 5 est fondamentale pour l'inhibition de la β -glucuronidase de foie de bœuf. Si ce groupement est remplacé par un groupement hydroxyméthyle, cette enzyme n'est plus inhibée. Cependant, les composés **48** et **50** deviennent alors de puissants inhibiteurs respectivement de galactosidases ($IC_{50} = 0,17 \mu M$ et $0,34 \mu M$; β -galactosidase et α -galactosidase d'*Aspergillus niger*) et de glucosidases ($IC_{50} = 0,19 \mu M$; α -glucosidase de levure de boulanger et $IC_{50} = 0,42 \mu M$; β -glucosidase d'amandes). On observe de la même façon que précédemment qu'ils sont de meilleurs inhibiteurs que leurs analogues **49** et **51** comportant un groupement acétamide ($IC_{50} = 17 ; 25 ; 2,9$ et $5,4 \mu M$ vis-à-vis des mêmes enzymes) (**Figure 25**).

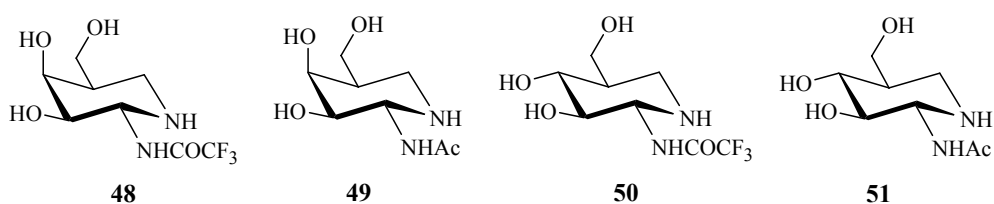


Figure 25

²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

III.4. Inhibiteurs mimant la délocalisation de la charge positive

Les composés de cette catégorie possèdent en général deux atomes d'azote, qui peuvent être chargés positivement à pH physiologique et mimer ainsi la délocalisation de la charge positive sur différentes positions²⁶.

En 1992, la nagstatine **52** a été isolée d'une fermentation de *Streptomyces*. Il s'agit d'un puissant inhibiteur sélectif de *N*-acétyl- β -D-glucosaminidases ($IC_{50} = 13$ nM ; rein de bœuf). Ses deux atomes d'azote lui permettent de mimer la délocalisation de la charge positive sur l'oxygène endocyclique et sur l'oxygène exocyclique. Les propriétés inhibitrices de l'analogue **53** montre que le substituant sur l'imidazole a peu d'influence sur l'inhibition de ces enzymes ($IC_{50} = 6$ nM ; rein de bœuf). De même, la configuration du groupement hydroxyle en position 4 semble peu influente, si l'on considère le composé **54** ($IC_{50} = 7$ nM ; rein de bœuf). Par contre, le groupement acétamide est primordial, puisque l'activité du composé hydroxylé **55** est alors nettement diminuée ($IC_{50} = 60$ μ M ; rein de bœuf). Le substituant sur l'imidazole prend de l'importance, si l'on considère l'inhibition vis-à-vis de β -glucosidases. En effet, le composé "D-gluco" substitué **56** est un bien meilleur inhibiteur de ces enzymes, que le composé non substitué **54** ($K_i = 0,11$ et 20 nM respectivement; *Caldocellum saccharolyticum*) (**Figure 26**).

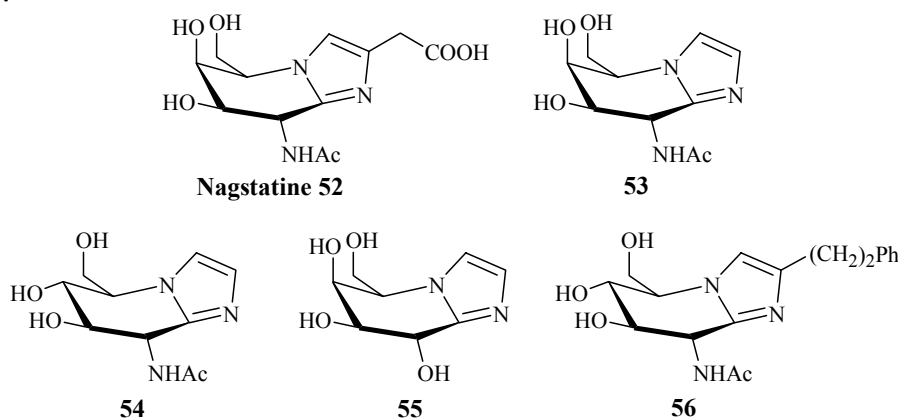


Figure 26

Pour mimer à la fois la charge positive sur l'oxygène endocyclique et sur le carbone anomérique, un hybride de la fagomine et de l'isofagomine, nommé 1-azafagomine **57**, a été synthétisé et testé. C'est un puissant inhibiteur d' α - et de β -glucosidases ($K_i = 0,27$ μ M ; isomaltase de levure et $K_i = 0,32$ μ M ; β -glucosidase d'amandes). De même, la 1-azagalactofagomine **58** est un bon inhibiteur de galactosidases. Elle est même meilleure que la déoxygalactostatine **38** vis-à-vis de certaines β -galactosidases ($K_i = 0,30$ et $12,5$ μ M respectivement; *Escherichia coli*), et meilleure que l'isogalactofagomine **37** vis-à-vis de certaines α -galactosidases ($K_i = 0,28$ et 50 μ M respectivement ; grains de café vert) (**Figure 27**).

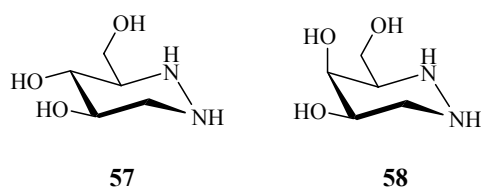


Figure 27

²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

III.5. Inhibiteurs non chargés mimant uniquement la distorsion de cycle

Les glyconolactones sont connues depuis longtemps pour être de bons inhibiteurs de glycosidases. En effet, bien que ces composés soient globalement neutres, leur conformation est proche de celle de l'état de transition et le carbone pseudo-anomérique a une hybridation sp^2 . De plus, la forme mésomère permet de mimer partiellement le cation oxocarbénium (**Figure 28**).

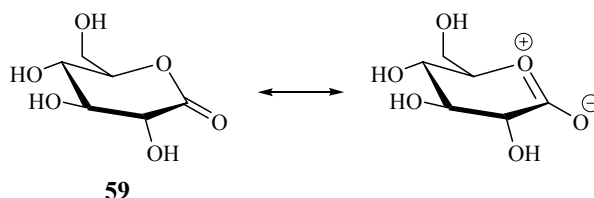


Figure 28

La D-glucono-1,5-lactone **59** est un inhibiteur de glycosidases. Mais son activité est plus importante vis-à-vis de β -glucosidases ($IC_{50} = 28 \mu M$; *Aspergillus niger*) que vis-à-vis d' α -glucosidases ($IC_{50} = 1,7 \text{ mM}$; *Aspergillus niger*). Elle est cependant moins active que la 1-désoxynojirimycine **23** ($IC_{50} = 0,6$ et $5 \mu M$ respectivement)⁴⁹, qui ne présente pourtant pas de distorsion de cycle.

Les glyconolactones étant peu stables, différents glyconolactames ont également été synthétisés²⁶. Le gluconolactame **60** est un bon inhibiteur de β -glucosidases ($K_i = 51 \mu M$; amandes), tandis que le mannonolactame **61** inhibe plus fortement les β -mannosidases ($K_i = 9 \mu M$; escargot), mais aussi la β -glucosidase d'amandes ($K_i = 0,51 \mu M$). Le galactonolactame **62** a une très bonne activité inhibitrice sur les β -galactosidases ($K_i = 4,5 \mu M$; *Aspergillus niger*). Enfin, le D-glucosaminolactame **63** est également un très bon inhibiteur de la β -glucosidase d'amandes ($K_i = 6,6 \mu M$) (**Figure 29**).

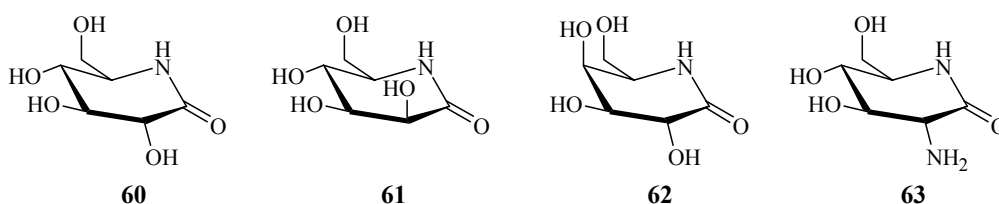


Figure 29

Les glycotétrazoles sont aussi considérés comme des composés globalement neutres mimant uniquement la distorsion de cycle du substrat, car ils ne sont pas protonés à pH physiologique. Le composé de configuration D-gluco **64** est un très bon inhibiteur de β -glucosidases ($K_i = 1,4 \mu M$; *Agrobacter*) et de β -galactosidases ($K_i = 1,5 \mu M$; foie de bœuf), tout comme le composé "D-galacto" **66** ($K_i = 0,8 \mu M$; β -galactosidase de foie de bœuf). Par contre, le composé "D-manno" **65** est plus faiblement inhibiteur de mannosidases ($K_i = 160 \mu M$; β -mannosidase d'escargot et $K_i = 180 \mu M$; α -mannosidase de pois sabre). Enfin, le

⁴⁹ Reese, E. T. ; Parrish, F. W. ; Ettlinger, M. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 381-388.

²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

composé *N*-acétylé **67** est un puissant inhibiteur de la β -glucoaminidase de rein de bœuf ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$) (**Figure 30**)²⁶.

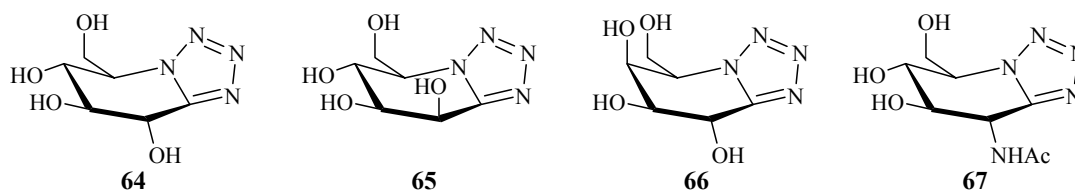


Figure 30

Enfin, parmi les composés neutres, on trouve également les anhydroalditols comme le composé **68** et les thioalditols comme le composé **69** (**Figure 31**). Cependant, ces composés ne sont que de faibles inhibiteurs de glycosidases²⁶.

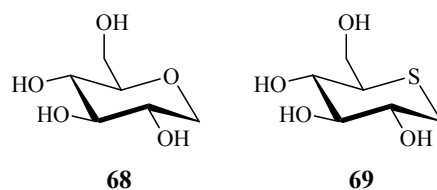
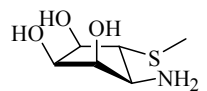
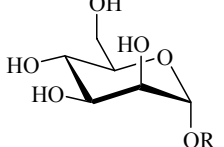
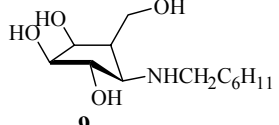
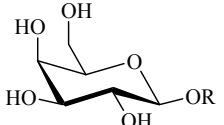
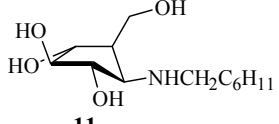
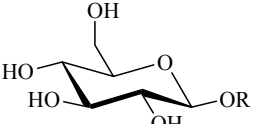


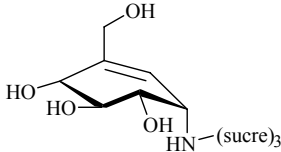
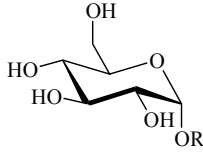
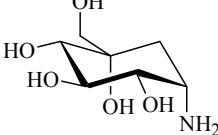
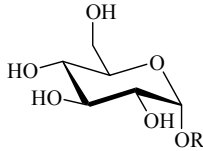
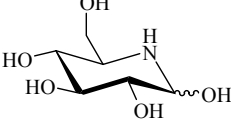
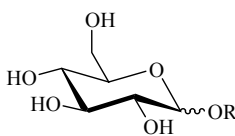
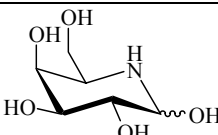
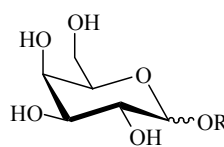
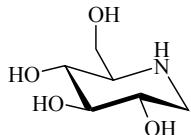
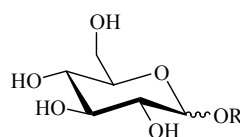
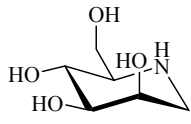
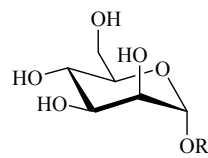
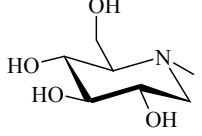
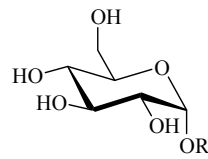
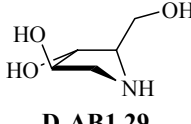
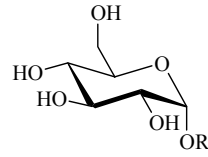
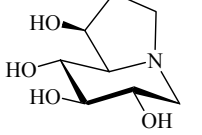
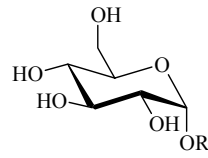
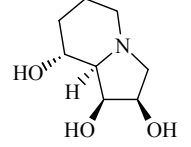
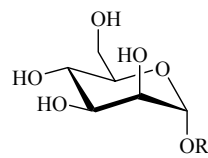
Figure 31

III.6. Tableau récapitulatif et conclusion

Afin de clarifier les résultats exposés précédemment, nous avons récapitulé dans le tableau suivant les principaux inhibiteurs et leur action vis-à-vis de différentes glycosidases : α -glucosidases (α -glu), β -glucosidases (β -glu), α -galactosidases (α -gal), β -galactosidases (β -gal), α -mannosidases (α -man) et β -mannosidases (β -man). La structure du substrat correspondant à l'enzyme principalement inhibée est également donnée et peut ainsi être comparée à celle de l'inhibiteur (**Tableau 3**).

Inhibiteurs	Substrats	α -glu	β -glu	α -gal	β -gal	α -man	β -man
 Mannostatine A 3						+++	
 9			+++		+++		
 11		+	+++				

²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.

Inhibiteurs	Substrats	α -glu	β -glu	α -gal	β -gal	α -man	β -man
 <p>Acarbose 12</p>		+++					
 <p>Valiolamine 14</p>		+++					
 <p>Nojirimycine 19</p>		+++	+++				
 <p>Galactostatine 21</p>				+++	+++		
 <p>DNJ 23</p>		+++	+++				
 <p>DMJ 24</p>						+	
 <p>N-méthyl-DNJ 25</p>		+++					
 <p>D-AB1 29</p>		++					
 <p>Castanospermine 34</p>		++					
 <p>Swainsonine 33</p>						+++	

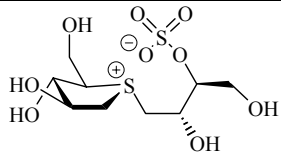
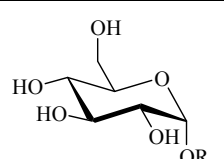
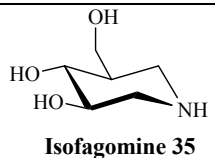
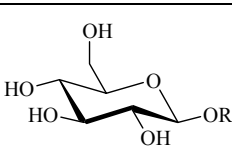
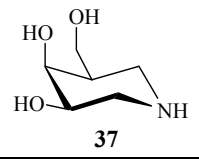
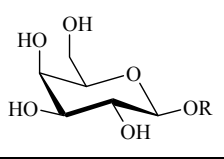
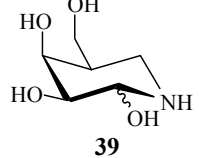
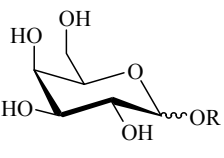
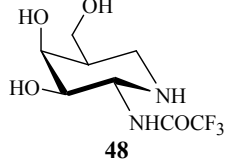
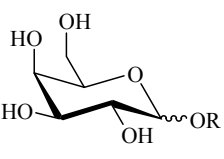
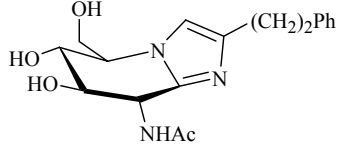
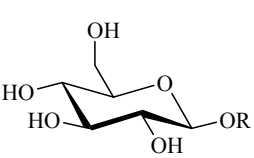
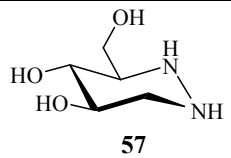
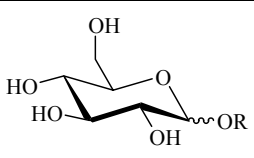
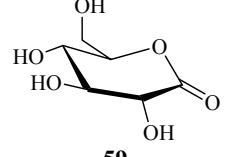
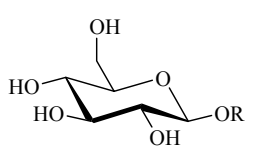
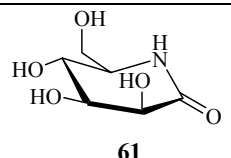
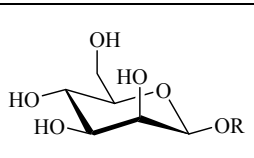
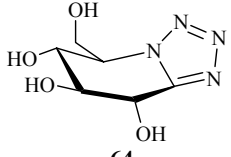
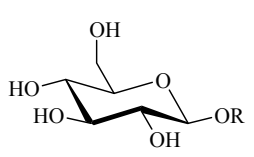
Inhibiteurs	Substrats	α -glu	β -glu	α -gal	β -gal	α -man	β -man
 <p>Salacinol 1</p>		++					
 <p>Isofagomine 35</p>		+	+++				
 <p>37</p>			+++	+	+++		
 <p>39</p>				++	+++		
 <p>48</p>				+++	+++		
 <p>56</p>			+++				
 <p>57</p>		+++	+++				
 <p>59</p>			+				
 <p>61</p>							++
 <p>64</p>			++		++		

Tableau 3

L'ensemble de ces résultats montre qu'il y a en général une analogie de structure entre les inhibiteurs et les substrats correspondants aux enzymes inhibées. Cependant, pour certains d'entre eux, cette analogie est plus difficile à visualiser, comme dans le cas par exemple des manostatines.

En fait, de nombreux facteurs influencent l'activité de ces inhibiteurs : la position et la basicité du ou des hétéroatomes, la conformation privilégiée du composé, les interactions entre le site actif et la partie aglycone et la position des différents groupements hydroxyles⁵⁰.

Si l'on prend l'exemple des glycotétrazoles, il apparaît qu'un composé ne doit pas nécessairement être chargé positivement pour être un bon inhibiteur de glycosidases, mais que la présence des atomes d'azote associée à la distorsion de cycle permet d'obtenir de très bonnes activités inhibitrices. Inversement il ne semble pas non plus nécessaire de mimer la distorsion de cycle du substrat pour inhiber fortement ces enzymes, comme le montrent les dérivés de la nojirimycine ou de l'isofagomine. La différence d'activité de ces deux groupes d'inhibiteurs semble être liée au positionnement de l'atome d'azote. En effet, nous avons vu que les dérivés de la nojirimycine sont plutôt actifs vis-à-vis d' α -glycosidases, tandis que les dérivés de l'isofagomine agissent plus spécifiquement sur les β -glycosidases. Cependant, les analogues de l'isofagomine sous forme hémiaminal sont efficaces sur les deux types d'enzymes, ce qui montre que le positionnement des groupements hydroxyles est lui aussi fondamental. Ainsi nous avons vu dans plusieurs cas leur importance, notamment en position 2. Par contre, le groupement hydroxyle en position 4 semble moins primordial pour certaines enzymes. En effet, les inhibiteurs de configuration *galacto* inhibent parfois, en plus des galactosidases, des glucosidases, et inversement. La présence d'un groupement hydrophobe mimant l'aglycone semble également être un facteur positif à l'inhibition. Enfin, les composés qui réunissent plusieurs de ces facteurs, comme l'acarbose ou la nagstatine semblent particulièrement efficaces.

La difficulté d'élaborer de nouveaux inhibiteurs de glycosidases se situe surtout dans le fait qu'il semble difficile de trouver une stratégie générale. Ainsi la connaissance plus précise du site actif de l'enzyme ciblée est primordiale pour la construction d'inhibiteurs sélectifs.

IV. Applications des inhibiteurs de glycosidases

Nous avons vu que les glycosidases sont des enzymes très courantes dans l'organisme et que leurs fonctions sont très variées. Ainsi les inhibiteurs de ces enzymes peuvent avoir de nombreuses applications.

Le premier intérêt de ces composés est purement fondamental, puisqu'ils sont un outil important dans l'étude de ces enzymes, de leurs mécanismes et de leurs sites actifs. En effet, de nombreuses glycosidases sont cristallisées en présence d'inhibiteurs, afin de mettre en évidence les acides aminés impliqués dans la catalyse et les interactions spécifiques à l'intérieur de leur site actif. Ils peuvent également être utilisés pour faire de la chromatographie d'affinité pour la purification des glycosidases⁵¹.

⁵⁰ Legler, G. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 31-67.

⁵¹ Winchester, B. ; Fleet, G. W. J. *Glycobiology*, **1992**, 2, 199-210.

Le second intérêt de ces molécules réside dans leur potentiel thérapeutique important. Ainsi, les inhibiteurs de glycosidases peuvent être utilisés pour combattre le diabète, le cancer, le SIDA, la grippe et certaines maladies, dans lesquelles des glycosidases sont directement impliquées⁵². Nous allons présenter ici deux exemples d'applications thérapeutiques d'inhibiteurs de glycosidases.

IV.1. L'acarbose comme traitement du diabète de type II

Le diabète de type I ou diabète insulino-dépendant résulte de l'absence de production d'insuline, une hormone sécrétée par le pancréas. Celle-ci permet aux cellules d'absorber le glucose, provenant de la dégradation des polysaccharides de l'alimentation. Elle intervient également dans la formation de réserves de sucre, sous forme de glycogène, dans le foie et les muscles. L'unique traitement de cette maladie consiste à injecter de l'insuline au patient.

Le diabète de type II, également appelé diabète non insulino-dépendant, est la forme la plus répandue de diabète : 85 à 90 % des diabétiques en sont atteints. Il touche principalement l'adulte. Cette maladie résulte d'une mauvaise réponse des cellules à l'insuline. Ainsi le glucose reste dans le sang en quantité élevée, ce qui entraîne une altération des artères. De plus, les cellules ne reçoivent plus suffisamment d'énergie pour fonctionner normalement. Cette maladie entraîne alors fatigue et nausées, mais surtout de nombreuses complications à long terme comme des problèmes cardiaques et des maladies des yeux, des reins, des jambes et des nerfs résultant de l'altération des petites artères.

Les α -glucosidases sont des enzymes localisées à la surface externe des cellules épithéliales tapissant l'intestin grêle. A cet endroit, de nombreux replis membranaires, appelées microvillosités, permettent d'augmenter la surface de contact entre ces cellules et les nutriments, améliorant ainsi leur absorption. Les inhibiteurs de ces enzymes constituent un des traitements contre le diabète de type II. En effet, leur action entraîne une augmentation réduite et étalée dans le temps du taux de glucose dans le sang.

Le principal représentant de cette classe de médicaments est l'acarbose (**Figure 13**), commercialisé pour la première fois en Allemagne en 1990. Des études ont montré l'efficacité de cet inhibiteur qui n'induit ni prise de poids supplémentaire, ni problème d'hypoglycémie. N'étant pas métabolisé par l'organisme, il n'a pas directement d'effets secondaires sévères. Cependant, une intolérance gastro-intestinale apparaît fréquemment en raison de la présence de polysaccharides non dégradés dans l'intestin, mais celle-ci s'atténue avec une modification du dosage du principe actif au bout de quelques semaines.

Pour les personnes atteintes de diabète de type II, les traitements médicamenteux oraux sont prescrits en priorité. Des études à court terme ont montré que l'acarbose est un bon traitement chez les personnes présentant une hyperglycémie faible, mais une forte augmentation du taux de glucose après les repas. De plus, étant donné qu'il n'induit pas d'hypoglycémie, il est particulièrement recommandé chez les personnes âgées⁵³.

⁵² Asano, N. ; Nash, R. J. ; Molyneux, R. J. ; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645-1680.

⁵³ Scheen, A. J. ; Lefebvre, P. J. *Drugs* **1998**, *55*, 225-236.

IV.2. La *N*-butyl-DNJ comme traitement du SIDA ?

Le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH, qui se transmet par voies sexuelle, sanguine ou transplacentaire, détruit certaines cellules du système immunitaire : les lymphocytes T4. Lorsque ceux-ci sont en nombre insuffisant, des maladies graves, appelées maladies opportunistes, peuvent alors se développer. Une personne qui a l'une de ces maladies est alors atteinte du syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA, dont l'issue est inévitablement mortelle. En effet, il n'existe pas de vaccin contre le VIH et les traitements actuels, comme la trithérapie, permettent seulement de retarder l'apparition de la maladie.

Le VIH pour se développer a besoin de pénétrer à l'intérieur de cellules hôtes, les lymphocytes T4. En effet, avant d'être détruits, ceux-ci vont lui permettre de répliquer son matériel génétique et ainsi de se multiplier. Le VIH est enveloppé d'une membrane dans laquelle sont enchâssées deux glycoprotéines : la gp41 transmembranaire et la gp120 localisée sur la face externe. Il entre dans les lymphocytes T4 grâce à l'interaction de la gp120 avec un récepteur membranaire appelé CD4. Les deux membranes fusionnent alors et le matériel génétique du virus est libéré dans la cellule hôte.

Les inhibiteurs des glycosidases intervenant dans la maturation des glycoprotéines ont donc été envisagés comme possible traitement contre le SIDA. Or il a effectivement été montré que la 1-désoxynojirimycine **23** (**Figure 17**), la *N*-butyl-1-désoxynojirimycine **26** (**Figure 18**) et la castanospermine **34** (**Figure 20**) sont de bons inhibiteurs de la réplication du VIH *in vitro*. Cette activité semble induite par une modification de la glycosylation de gp120, altérant la structure tridimensionnelle de celle-ci et entraînant ainsi une pénétration plus délicate du virus dans la cellule hôte.

La *N*-butyl-DNJ **26** est le produit qui s'est révélé le plus efficace *in vivo*. Cependant, la nécessité d'une forte concentration en produit et l'apparition de nombreux effets secondaires semblent compromettre son développement. Ainsi les propriétés anti-VIH d'autres analogues substitués de la DNJ ou de la castanospermine sont en cours d'évaluation³⁷.

Cette démarche d'inhiber les glycosidases impliquées dans le processus de maturation des glycoprotéines peut également être utilisée dans la lutte contre d'autres agents pathogènes, comme le virus de la grippe ou de l'hépatite B.

³⁷ Watson, A. A. ; Fleet, G. W. J. ; Asano, N. ; Molyneux, R. J. ; Nash, R. J. *Phytochemistry*, **2001**, 56, 265-295.

CHAPITRE II :
LE SALACINOL ET ANALOGUES

I. Synthèses du salacinol et de ses analogues

Les synthèses du salacinol ou de ses analogues parues dans la littérature sont toutes basées sur la même stratégie. En effet, dans tous les articles qui seront présentés par la suite, l'étape clé consiste en l'attaque nucléophile d'un hétéroatome inclus dans un cycle sur le carbone le moins encombré d'un sulfate 1,3-cyclique (**Schéma 13**).

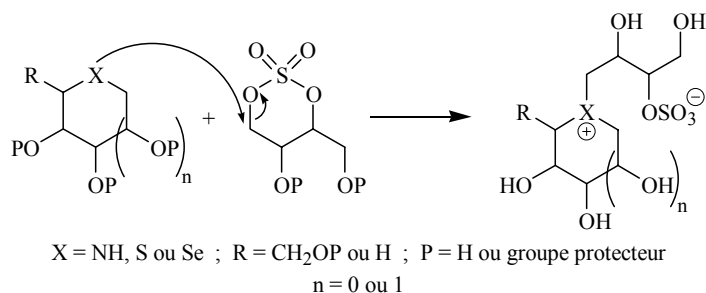


Schéma 13

I.1. Synthèses du salacinol et de ses stéréoisomères

En 2000, Yuasa *et al.* ont été les premiers à travailler sur la synthèse du salacinol⁵⁴. Lors d'une étude préliminaire avec le tétrahydrothiophène comme modèle, les auteurs ont montré que la réaction de couplage était plus favorable, lorsque les hydroxyles du sulfate cyclique étaient protégés par un groupement acétone. S'appuyant sur ces résultats, ils ont pu décrire la première synthèse du salacinol.

L'étape clé a consisté en l'ouverture du sulfate cyclique du 1,3-*O*-isopropylidène-D-érythritol **71**, issu du 4,6-*O*-isopropylidène-L-glucose, par le 1,4-anhydro-1-thio-D-arabinitol **70**. Cette étape s'effectue avec un rendement de 61 %. La déprotection des groupements hydroxyles en milieu acide a ensuite permis d'accéder au salacinol (**Schéma 14**).

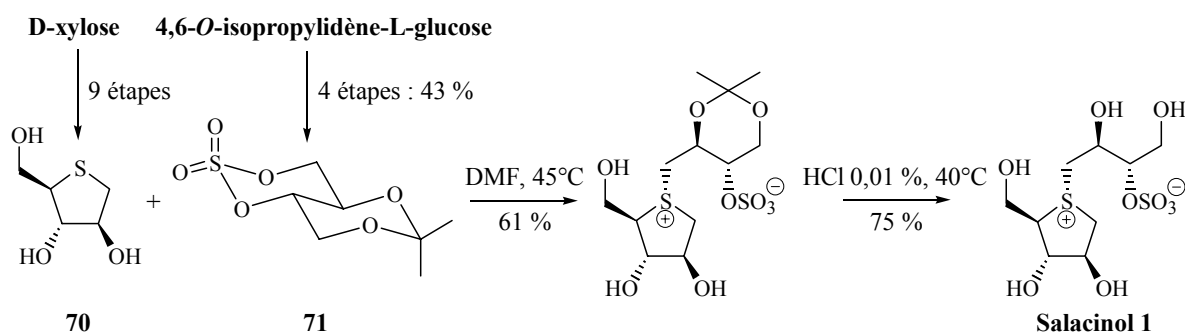


Schéma 14

⁵⁴ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6615-6618.

L'attaque nucléophile de ce même thiosucre **70** sur le sulfate cyclique du 2,4-*O*-isopropylidène-D-érythritol **72**, issu du 4,6-*O*-isopropylidène-D-glucose, suivie d'une étape de déprotection, a permis l'obtention de **73**, un diastéréoisomère du salacinol (**Schéma 15**).

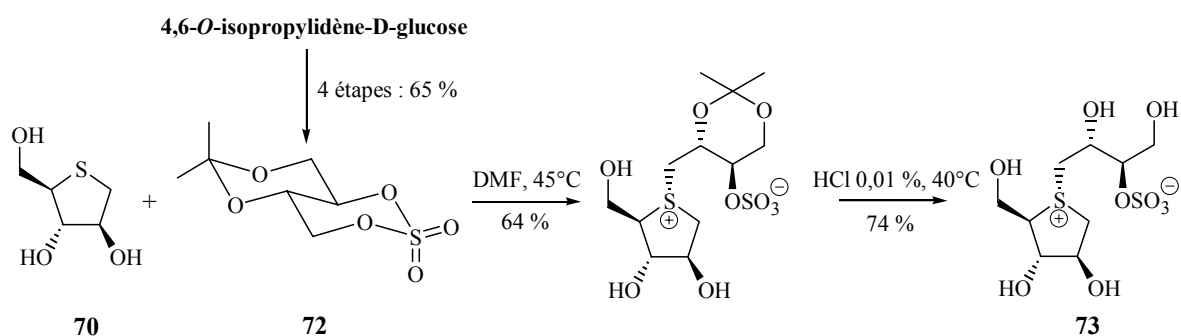


Schéma 15

En 2001, Pinto et coll. ont également publié la synthèse de ces deux composés, ainsi que celle de l'énantiomère du salacinol, avec de légères différences⁵⁵. D'une part les hétérocycles utilisés étaient entièrement protégés par des groupements benzyles, ce qui leur a permis de réaliser la réaction de couplage dans l'acétone à 75°C. D'autre part, ils ont travaillé avec des sulfates cycliques protégés par un groupement benzylidène. Ils ont aussi montré que l'emploi de K₂CO₃ lors de la réaction de couplage était important, pour limiter la dégradation des sulfates cycliques. Après déprotection, ils ont obtenu le salacinol (**Schéma 16**) sans optimiser les rendements.

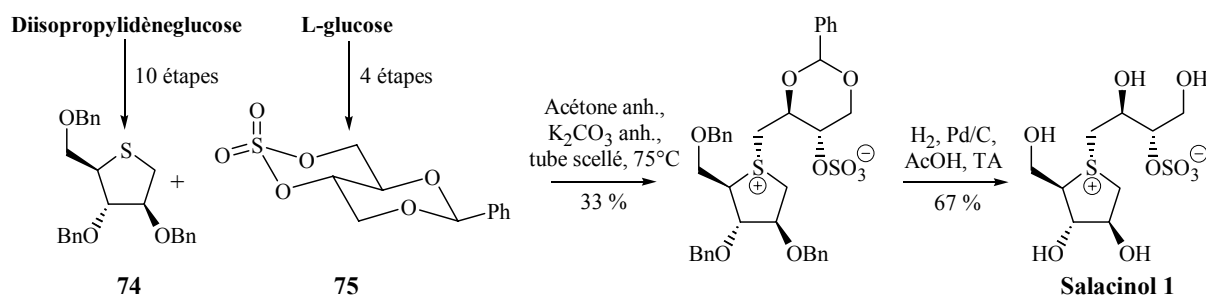


Schéma 16

Dans les mêmes conditions opératoires, ils ont synthétisé l'énantiomère du salacinol **78** avec des rendements voisins (**Schéma 17**).

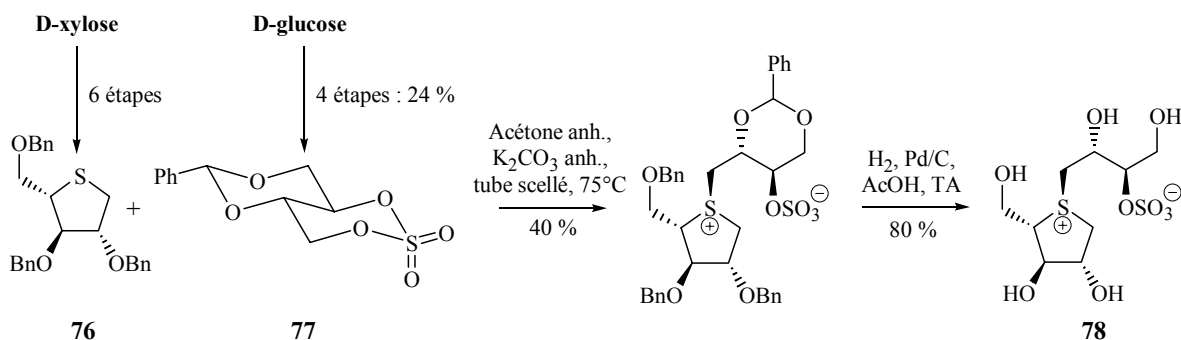


Schéma 17

⁵⁵ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2312-2317.

Ils ont également préparé **73**, le même stéréoisomère que l'équipe de Yuasa (**Schéma 18**) avec un rendement nettement amélioré pour la réaction de couplage.

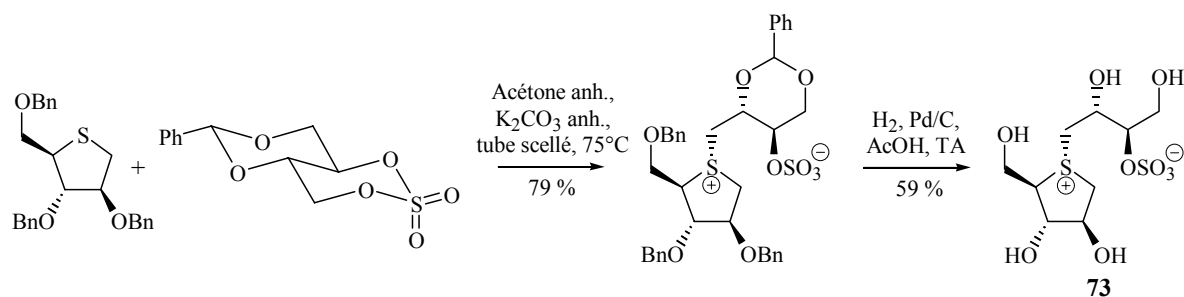


Schéma 18

Enfin, dans cet article, ils ont également rapporté les résultats concernant le couplage entre un thiosucre partiellement protégé **79** et le sulfate cyclique **75** provenant du L-glucose (**Schéma 19**). Paradoxalement, alors qu'il y a moins d'hydroxyles protégés, la réaction de déprotection a été plus difficile. L'emploi d'acétone dans la réaction de couplage n'a pas permis de travailler avec des thiosucres entièrement déprotégés.

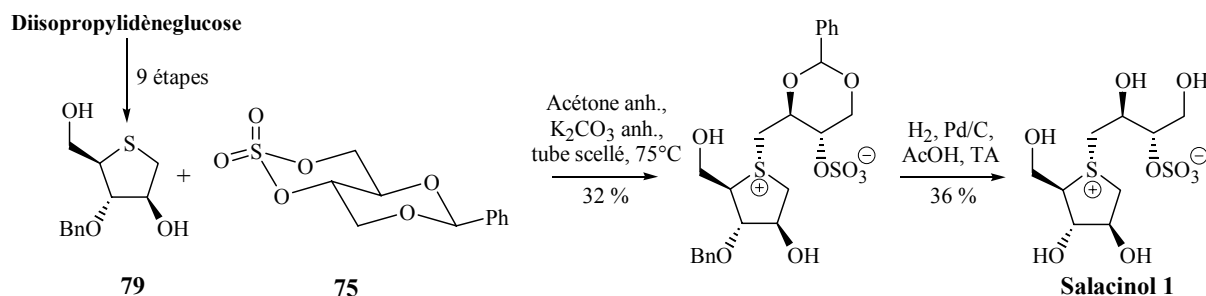


Schéma 19

En 2002, cette même équipe a publié la synthèse d'un autre diastéréoisomère du salacinol⁵⁶. L'attaque nucléophile du 1,4-anhydro-2,3,5-tri-*O*-benzyl-1-thio-D-xylitol **80**, obtenu à partir du L-arabinose, sur le sulfate cyclique **75** provenant du L-glucose a donné après déprotection le zwitterion **81** (**Schéma 20**) avec un bon rendement. De même que précédemment, les résultats pour l'étape de déprotection utilisant de l'hydroxyde de palladium ont été moins bons. Les auteurs supposent que cela est dû à l'empoisonnement du catalyseur par des résidus soufrés, provenant de la dégradation des zwitterions.

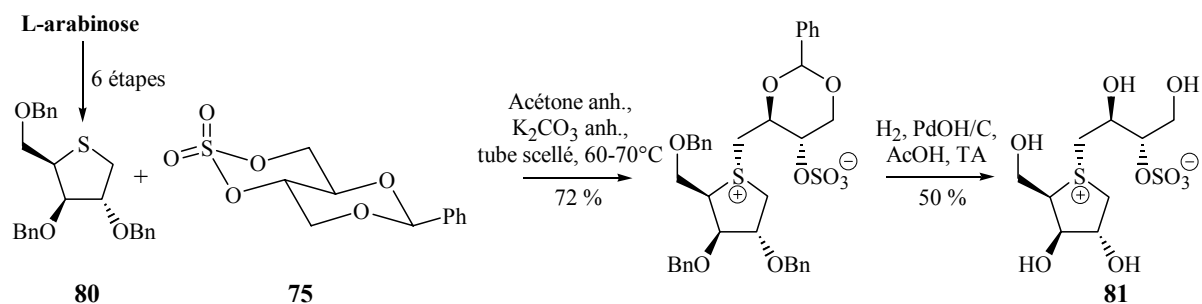


Schéma 20

⁵⁶ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Maddess, M. D. ; Chinapoo, S. M. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 937-942.

En 2003, l'équipe de Pinto a publié une amélioration de sa synthèse du salacino⁵⁷. Pensant qu'un solvant plus polaire permettrait d'augmenter le rendement de l'étape de couplage, ils ont effectué cette réaction en parallèle dans l'acétone et dans le 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP) dans les mêmes conditions de température, de concentration et sur la même durée (**Schéma 21**). Les résultats obtenus montrent le gain important apporté par le HFIP. Les auteurs ont expliqué cela par une meilleure solvation des états de transition et des produits de la réaction. Dans cet article, ils ont également mentionné l'échec du couplage dans ces conditions entre le thiosucre non protégé et le sulfate cyclique **75**.

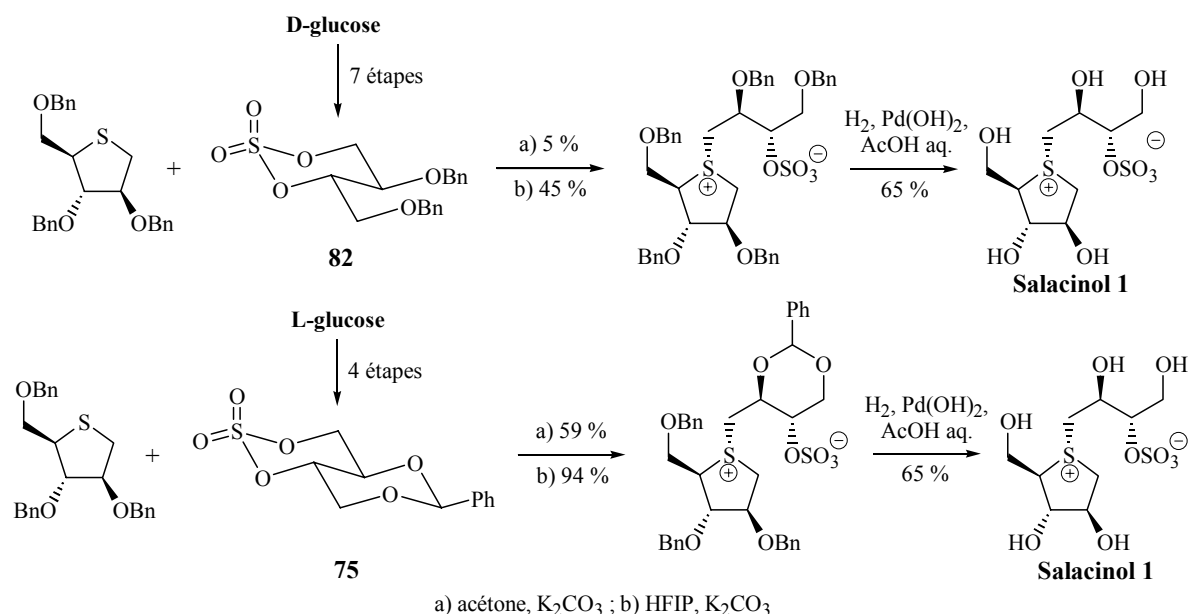


Schéma 21

Cette équipe a aussi cherché à améliorer le rendement de l'étape de déprotection en protégeant les hydroxyles du thiosucre par des groupements *para*-méthoxybenzyles, dont la déprotection en milieu acide est plus facile. En effet, celle-ci est réalisée avec un rendement de 86 % (**Schéma 22**).

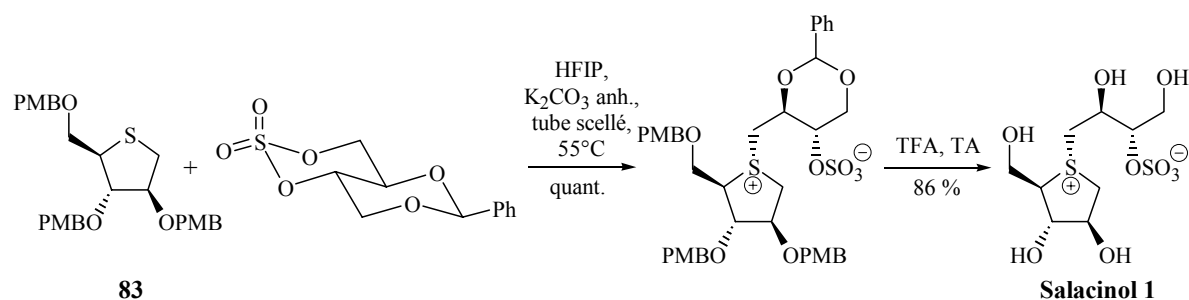


Schéma 22

Cette dernière synthèse est la plus efficace pour obtenir le salacino. En effet, elle s'effectue avec un rendement de 86 % pour les deux étapes. Pour chaque composé synthétisé,

⁵⁷ Ghavami, A. ; Sadalpure, K. S. ; Johnston, B. D. ; Lobera, M. ; Snider, B. B. ; Pinto, B. M. *Synlett* **2003**, 1259-1262.

la stéréochimie des ions sulfoniums a été vérifiée par des expériences de NOESY : la chaîne qui porte le groupement sulfate se greffe toujours du côté opposé au groupement hydroxyméthyle. En modifiant l'hétérocycle et le sulfate cyclique, il semble possible avec cette méthodologie d'accéder efficacement à un grand nombre d'analogues du salacinol.

I.2. Synthèses d'analogues soufrés du salacinol

Très récemment, Pinto et coll. ont publié la synthèse de nouveaux analogues du salacinol comportant des hétérocycles soufrés à six chaînons⁵⁸. Le 1,5-anhydro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thioxylitol **84** a été couplé avec le sulfate cyclique **77** provenant du D-glucose dans le HFIP avec un très bon rendement (**Schéma 23**).

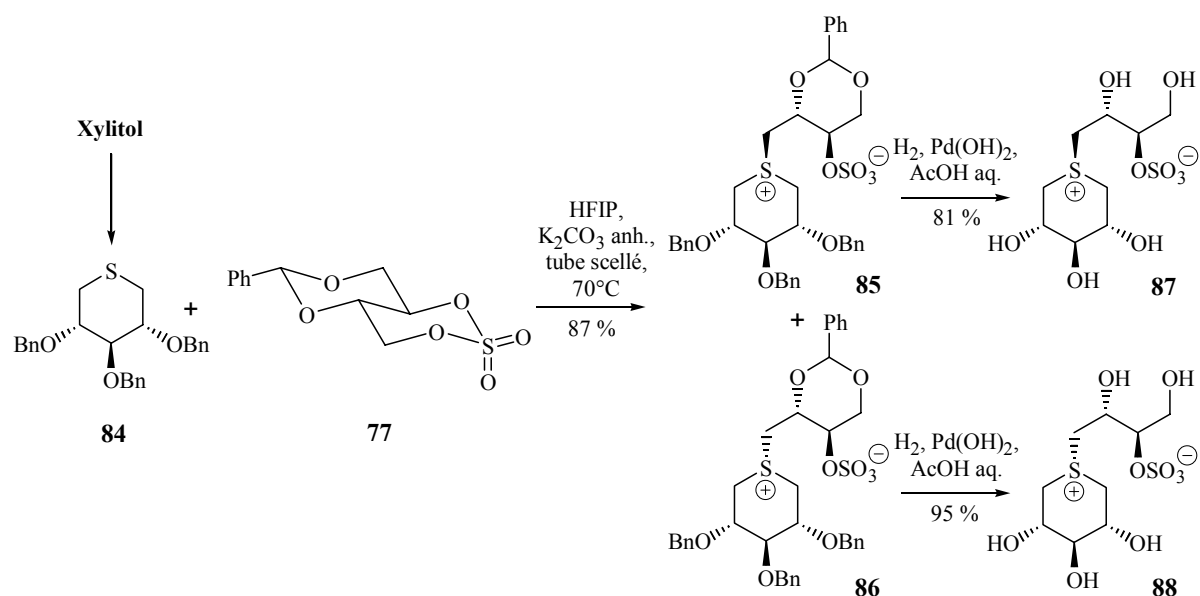


Schéma 23

Le zwitterion est isolé sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères séparables par chromatographie. Les produits **85** et **86** ont été obtenus dans des proportions respectives de 2:1. Chaque diastéréoisomère a ensuite été déprotégé pour donner les deux analogues **87** et **88** avec de très bons rendements. Une étude par RMN a permis de déterminer la stéréochimie des ions sulfoniums, ainsi que les conformations adoptées par les deux zwitterions (**Figure 32**).

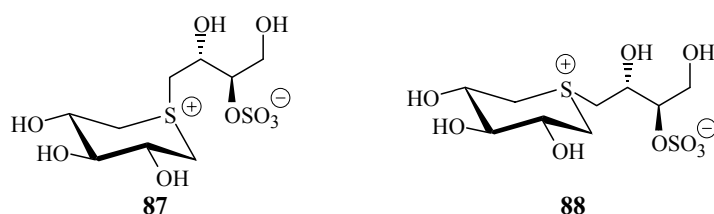


Figure 32

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

Le thiosucre **84** a aussi été couplé avec le sulfate cyclique **75** provenant du L-glucose. La réaction de couplage s'est effectuée dans les mêmes conditions opératoires que précédemment avec un très bon rendement, et elle a également donné deux diastéréoisomères séparables par chromatographie (**Schéma 24**).

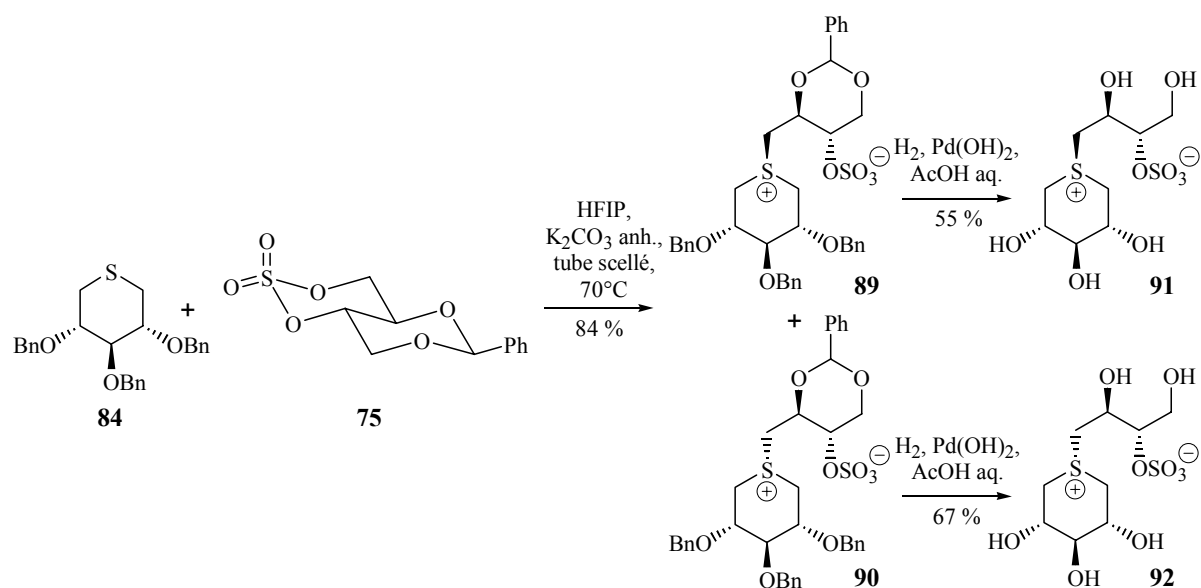


Schéma 24

Les composés **89** et **90** ont été obtenus dans des proportions respectives de 5:2. Chacun des deux zwitterions obtenus a été déprotégé avec de bons rendements pour donner les deux analogues **91** et **92**.

Dans cet article, les auteurs ont également publié les résultats du couplage entre le 1,5-anhydro-2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-1-thio-D-glucitol **93** et les sulfates cycliques **77** (**Schéma 25**) et **75** (**Schéma 26**).

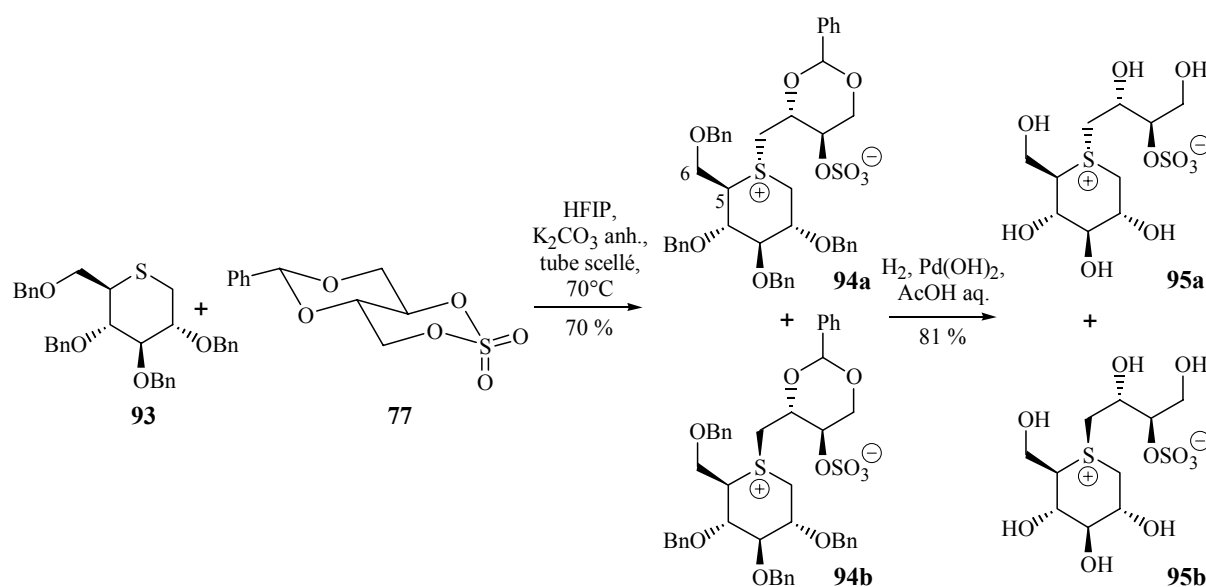


Schéma 25

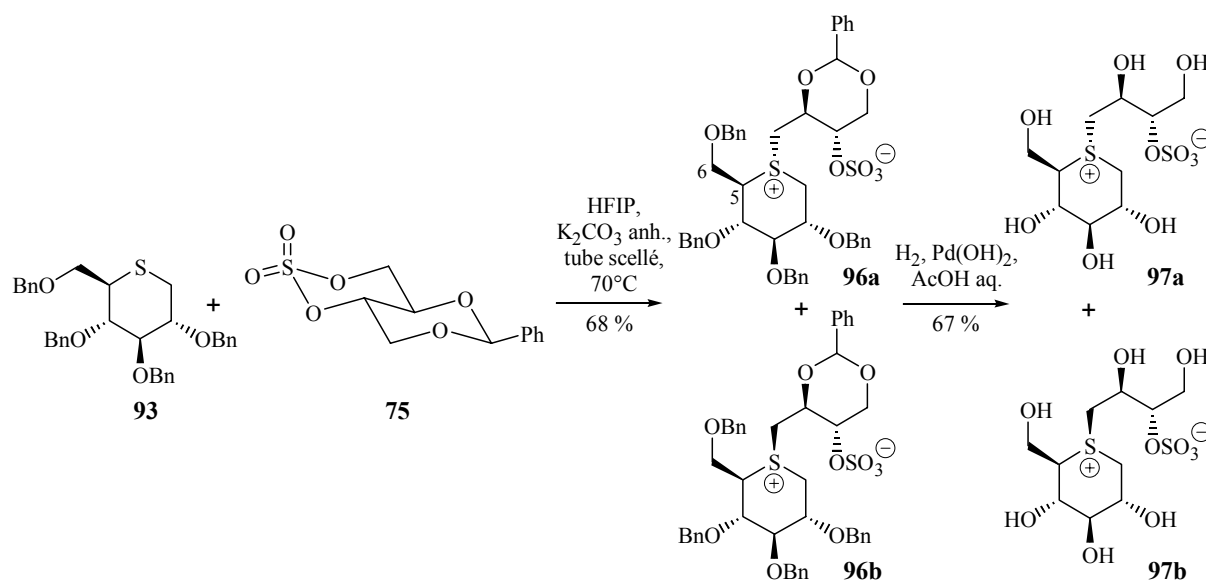


Schéma 26

Ces réactions, dont les rendements sont un peu moins bons qu'avec le thiosucre précédent moins encombré, ont dans les deux cas conduit à un mélange de diastéréoisomères non séparables, en proportions 2:1 et 3:1 respectivement. Ce sont les composés **94a** et **96a** dont la liaison C-S est en *trans* par rapport à la liaison C₅-C₆ qui sont majoritaires. L'hydrogénolyse de ces mélanges a conduit à l'obtention, dans chaque cas, de deux diastéréoisomères, les composés *trans* **95a** et **97a** étant majoritaires.

La réaction de couplage avec des hétérocycles soufrés à six chaînons s'effectue avec de bons rendements, mais conduit plus facilement à l'obtention de mélanges de diastéréoisomères.

I.3. Synthèses d'analogues azotés du salacinol

En 2001, peu après la publication de leurs résultats sur la synthèse du salacinol et de ses stéréoisomères, l'équipe de B. M. Pinto a décrit les premières synthèses d'analogues azotés du salacinol⁵⁹.

Les iminoarabinitols **98** et **100** ont été synthétisés à partir du D-glucose et du D-xylose. Par couplage avec les sulfates cycliques **75** et **77**, suivi d'une réaction de déprotection, l'analogue azoté du salacinol **99** et son énantiomère **101** ont été obtenus (**Schéma 27**).

⁵⁹ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6268-6271.

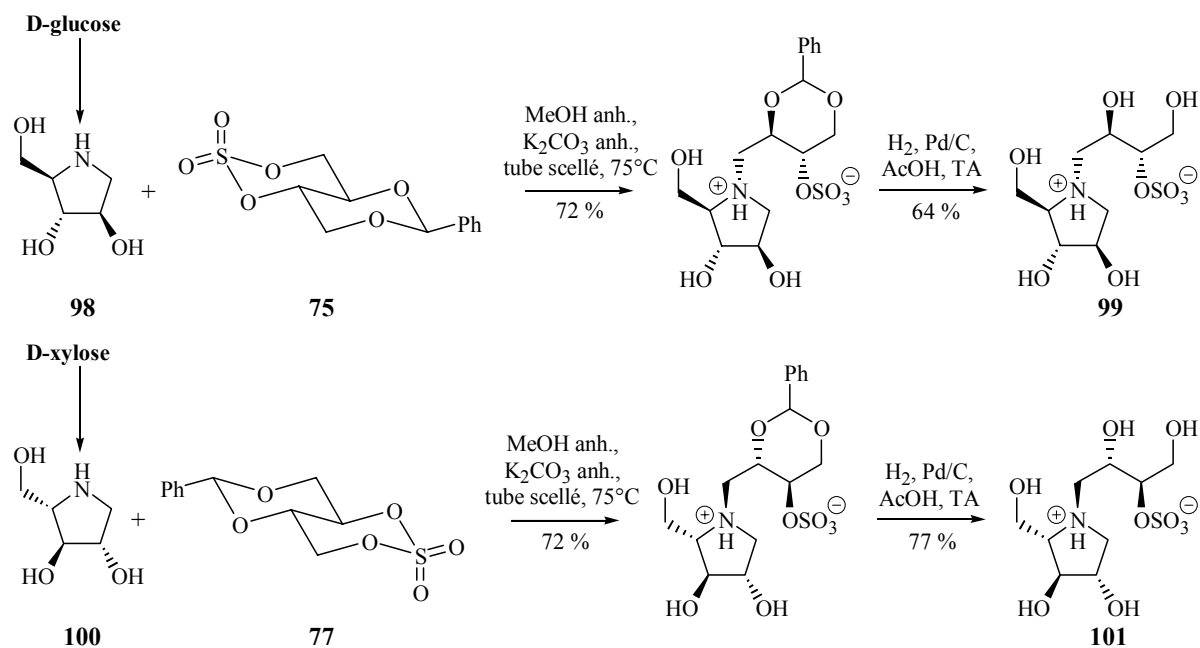


Schéma 27

Dans ce cas, les pyrrolidines ne sont pas protégées et le couplage a été réalisé dans le méthanol anhydre en présence de K_2CO_3 avec de bons rendements. Cependant l'utilisation de ce solvant nucléophile a entraîné la formation du produit de méthanolyse du sulfate cyclique. La stéréochimie de l'atome d'azote a été démontrée par des expériences de NOESY. De même que pour les analogues soufrés du salacinol, on constate que la chaîne sulfatée se greffe du côté opposé au groupement hydroxyméthyle.

En 2002, cette équipe a également publié la synthèse d'un autre analogue azoté du salacinol en utilisant la même stratégie⁵⁶. La pyrrolidine **102** a été obtenue à partir du L-arabinose, puis couplée avec le sulfate cyclique **75** avec un bon rendement (**Schéma 28**). La déprotection du zwitterion ainsi obtenu s'est effectuée sans problème et a conduit à l'analogue azoté **103**.

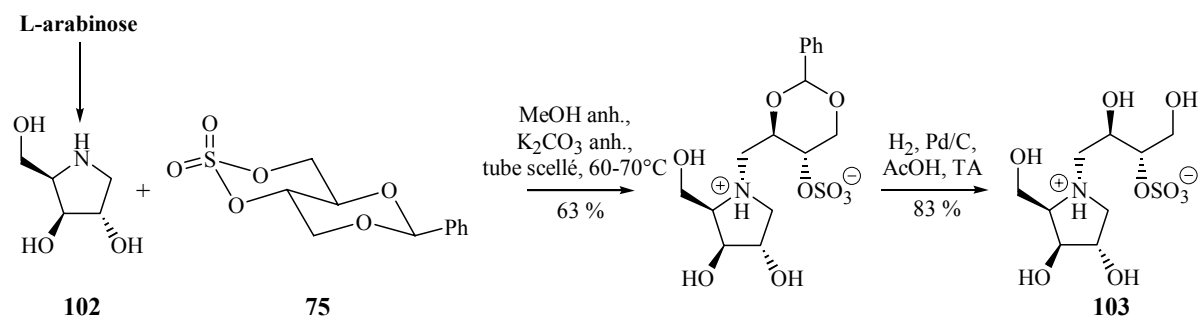


Schéma 28

⁵⁶ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Maddess, M. D. ; Chinapoo, S. M. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 937-942.

Muraoka *et al.* ont également publié la synthèse de l'analogue azoté du salacinol **99**⁶⁰. Ils ont réalisé la réaction de couplage dans le DMF à température ambiante avec un rendement légèrement moins bon, alors que toutes les synthèses précédentes ont eu lieu à une température supérieure à 45°C (**Schéma 29**).

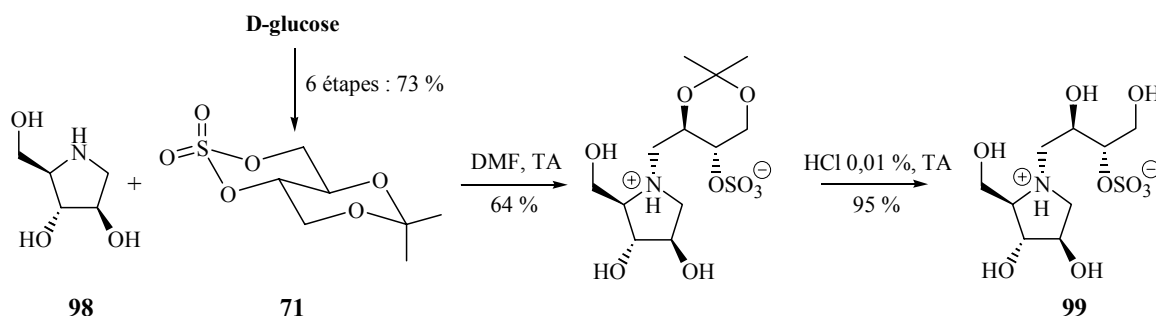


Schéma 29

L'intérêt majeur de cet article réside surtout dans la préparation du sulfate cyclique **71** dérivant du L-érythritol, à partir du D-glucose. En effet, en six étapes, les auteurs ont proposé une méthode efficace permettant d'obtenir ce sulfate sans partir du L-glucose nettement plus onéreux (**Schéma 30**). De plus, après couplage, l'hydrolyse de l'acétonide s'effectue en milieu acide avec un très bon rendement.

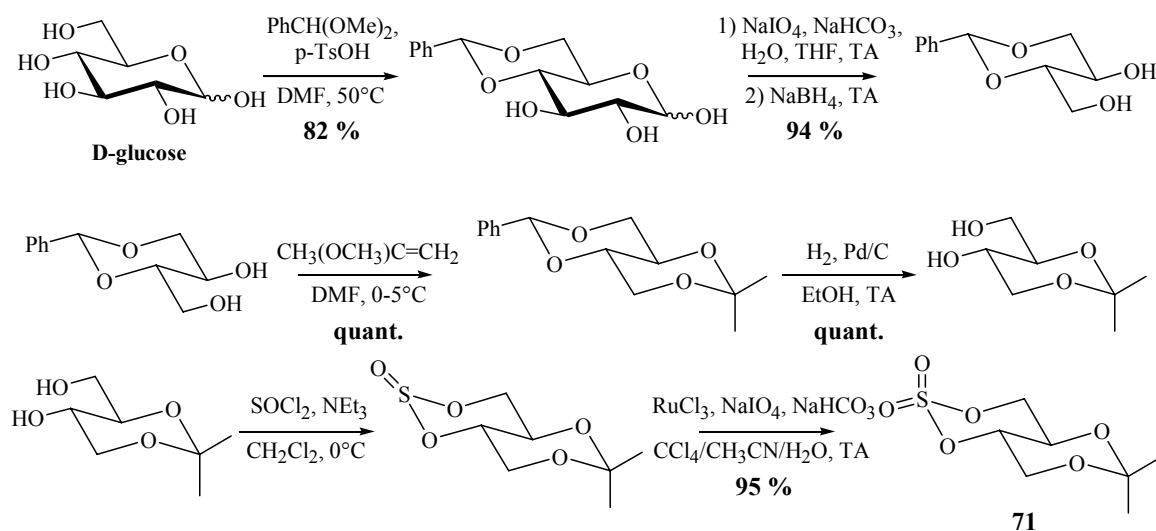


Schéma 30

Très récemment, Pinto et coll. ont publié la synthèse d'analogues du salacinol comportant des pipéridines polyhydroxylées⁵⁸.

L'attaque nucléophile du 1-amino-1,5-anhydro-1-désoxy-xylitol **104** sur les sulfates cycliques **75** et **77** dans le méthanol a conduit aux zwitterions protégés avec des rendements

⁶⁰ Muraoka, O. ; Ying, S. ; Yoshikai, K. ; Matsuura, Y. ; Yamada, E. ; Minematsu, T. ; Tanabe, G. ; Matsuda, H. ; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1503-1505.

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

moyens. D'après les auteurs, cela s'expliquerait par la formation en quantité importante du produit d'ouverture du sulfate par le méthanol. La déprotection en milieu acide a permis l'obtention des deux nouveaux analogues azotés du salacinol **105** et **106** (Schéma 31).

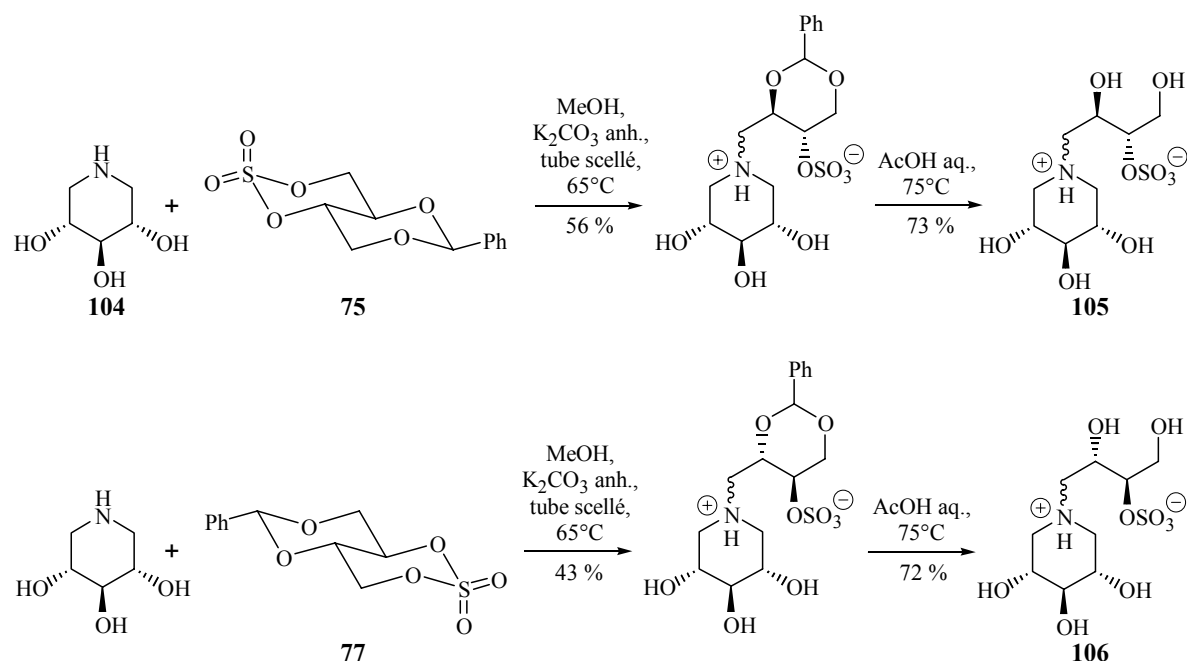


Schéma 31

Deux autres composés **108** et **109** ont également été décrits. Ils proviennent du couplage entre la désoxynojirimycine protégée **107** et les deux sulfates cycliques **75** et **77** (Schéma 32). Cette réaction a été réalisée dans l'acétone avec de bons rendements et la déprotection par hydrogénélyse s'est effectuée sans difficulté.

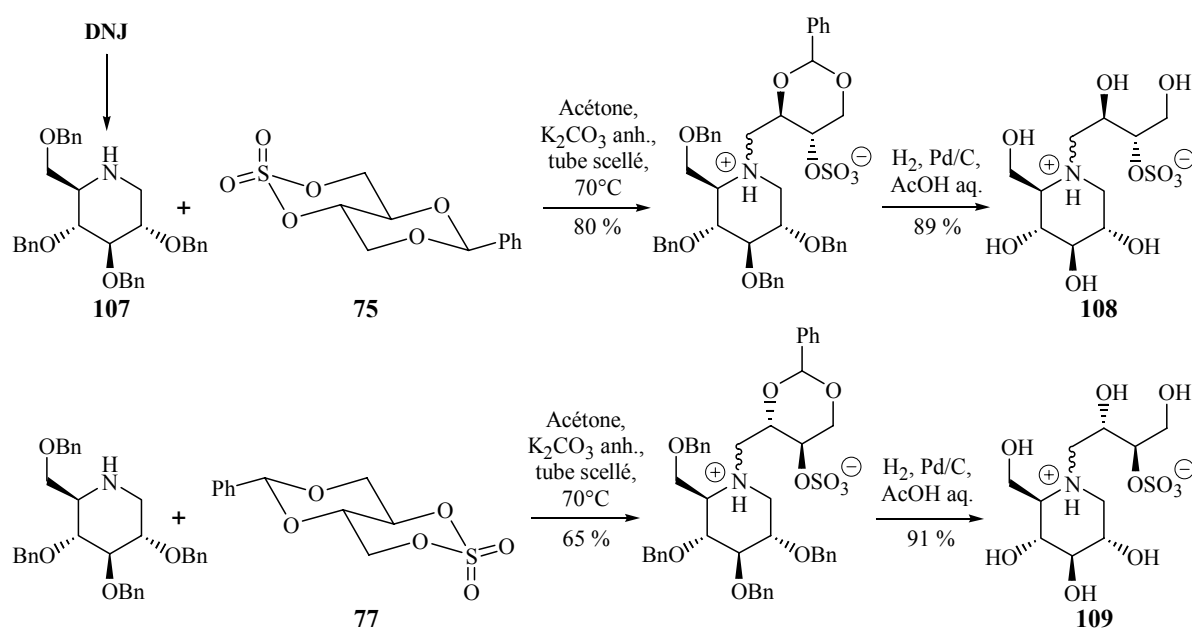


Schéma 32

Les auteurs n'ont, dans ce cas, pas pu définir la stéréochimie de l'atome d'azote des composés zwitterioniques obtenus, en raison d'un équilibre acido-basique permettant l'inversion de configuration de l'atome d'azote et donc l'existence simultanée des deux diastéréoisomères. Nous avons également observé ce phénomène avec nos produits. Il sera présenté plus en détails dans la partie "Résultats et discussion" (**Schéma 95**).

Le couplage d'hétérocycles azotés à cinq ou six chaînons sur différents sulfates cycliques s'effectue avec de bons rendements. Il peut en général être réalisé sans protection préalable des groupements hydroxyles avec de meilleurs rendements que pour les thiosucres, l'azote étant plus nucléophile que le soufre vis-à-vis des sulfates cycliques. Cependant, la réaction de couplage semble plus délicate avec les hétérocycles non protégés, en raison probablement de l'utilisation de méthanol comme solvant.

I.4. Synthèses d'analogues séléniés du salacinol

En 2002, Pinto et coll. ont publié la synthèse d'analogues séléniés du salacinol⁶¹.

En utilisant la même stratégie de couplage entre le 1,4-anhydro-2,3,5-tri-*O*-benzyl-1-séno-D-arabinitol **110** provenant du L-xylose et le sulfate cyclique **75**, ils ont obtenu le zwitterion **111** avec un très bon rendement (**Schéma 33**), mais sous la forme de deux diastéréoisomères séparables par HPLC. Le composé dont la liaison C-Se est en *trans* par rapport à la liaison C₄-C₅ est majoritaire. Le mélange obtenu n'a pas été déprotégé.

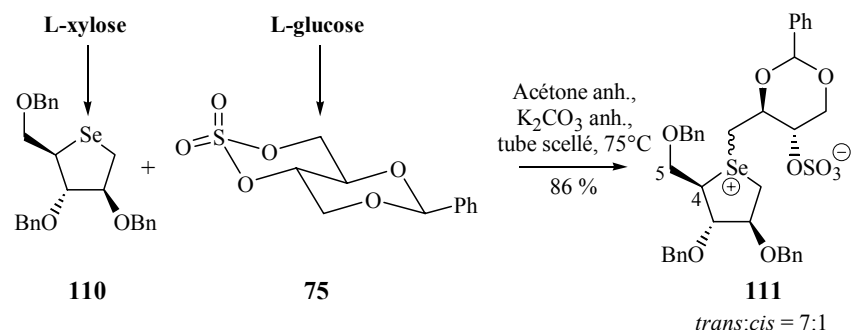


Schéma 33

Pour éviter l'utilisation de L-glucose très onéreux, ils ont entrepris de travailler avec le sulfate cyclique **82**, obtenu à partir du D-glucose. Son couplage avec l'hétérocycle sélénié **110**, dans les mêmes conditions que précédemment, a fourni uniquement le zwitterion *trans*-**112** avec un rendement médiocre de 20 %, confirmant les conclusions de Yuasa et al.⁵⁴ sur la moins bonne réactivité de ce sulfate (**Schéma 34**).

⁶¹ Johnston, B. D. ; Ghavami, A. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8245-8250.

⁵⁴ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6615-6618.

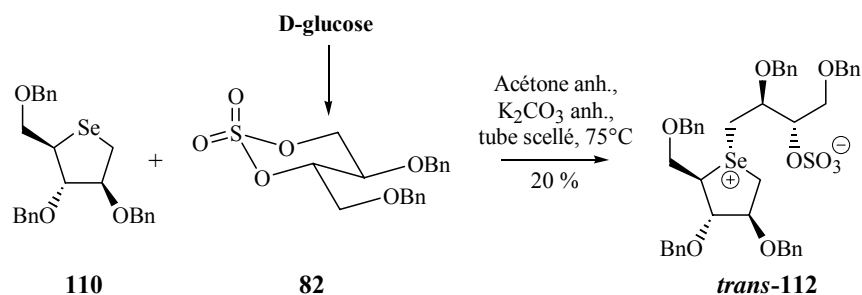


Schéma 34

Cependant, en réalisant la réaction précédente dans un solvant plus polaire comme le HFIP, ils ont constaté que celle-ci s'effectuait plus rapidement et avec un bien meilleur rendement que dans l'acétone (**Schéma 35**). Le zwitterion **112** a été obtenu sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, en faveur de la configuration *trans*. L'hydrogénolyse de ce mélange a conduit au zwitterion déprotégé **113**, qui par recristallisation a majoritairement donné le composé *trans*.

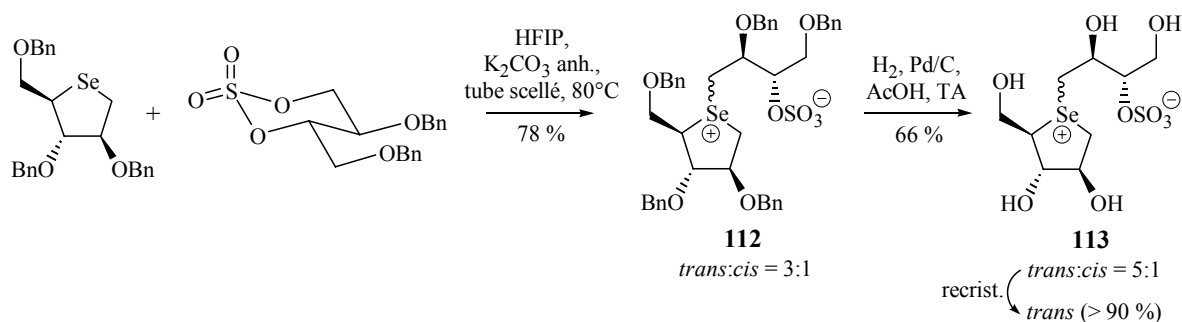


Schéma 35

Enfin, ils ont réalisé la synthèse du zwitterion **114**, en couplant le même hétérocycle sélénié sur le sulfate cyclique **77** (**Schéma 36**). Deux diastéréoisomères sont obtenus avec un bon rendement, le composé *trans* étant toujours majoritaire. La déprotection de ce mélange par contre a été très difficile, en raison d'une mauvaise purification du zwitterion de départ, qui a entraîné l'empoisonnement du catalyseur. Une recristallisation du mélange a permis d'obtenir uniquement le composé *trans*.

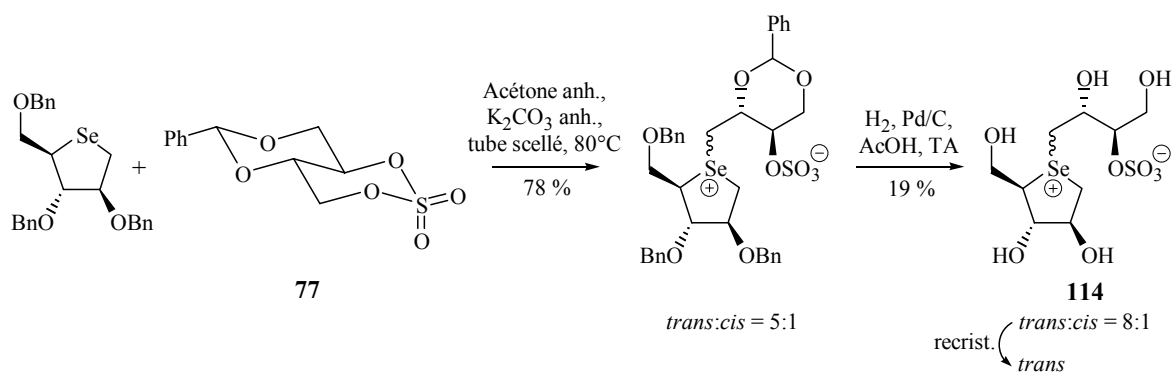


Schéma 36

En 2004, cette équipe a synthétisé d'autres analogues sélénisés du salacinol avec des hétérocycles à six chaînons⁵⁸.

Le 1,5-anhydro-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-selenoxylitol **115** a été couplé avec le sulfate cyclique **77** dans le HFIP avec un bon rendement (**Schéma 37**). Mais ce couplage a là aussi conduit à un mélange de deux diastéréoisomères non séparables. Les composés **116a** et **116b** ont été obtenus dans des proportions respectives de 4:1. L'hydrogénation de ce mélange a donné majoritairement le zwitterion **117a** avec un rendement médiocre, probablement dû à l'empoisonnement du catalyseur par des impuretés ou des produits de dégradation.

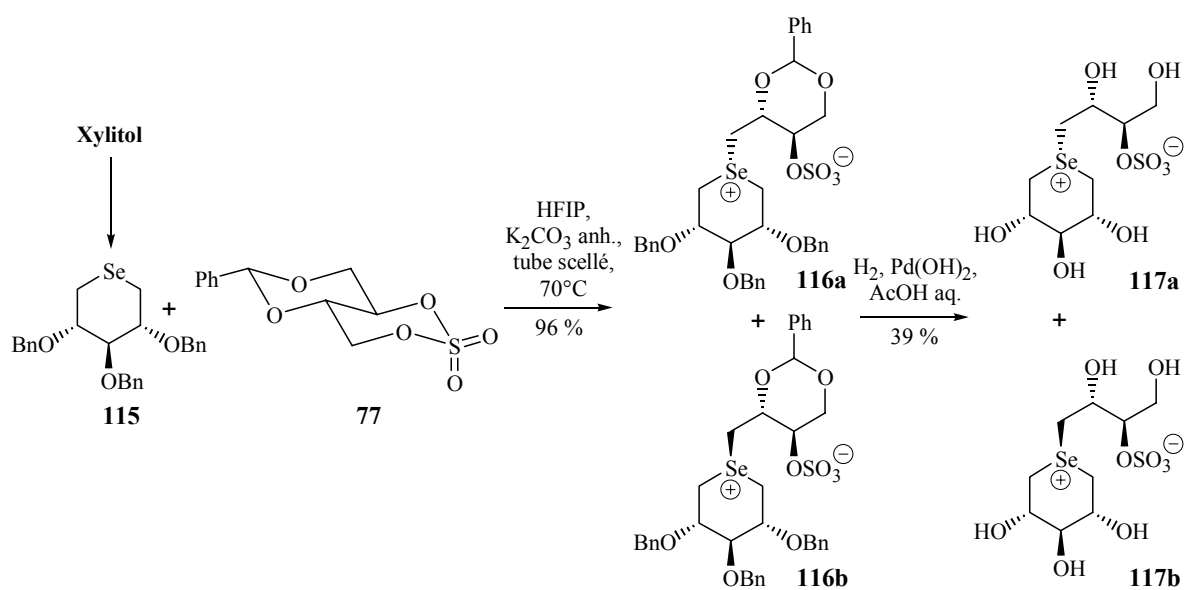


Schéma 37

Le couplage de cet hétérocycle sélénisé avec le sulfate cyclique **75** a également conduit à un mélange de deux diastéréoisomères non séparables avec un très bon rendement (**Schéma 38**). Les composés **118a** et **118b** ont été obtenus dans des proportions respectives de 3:1. L'hydrogénolyse du mélange a majoritairement donné le zwitterion **119a** avec là aussi un rendement médiocre.

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

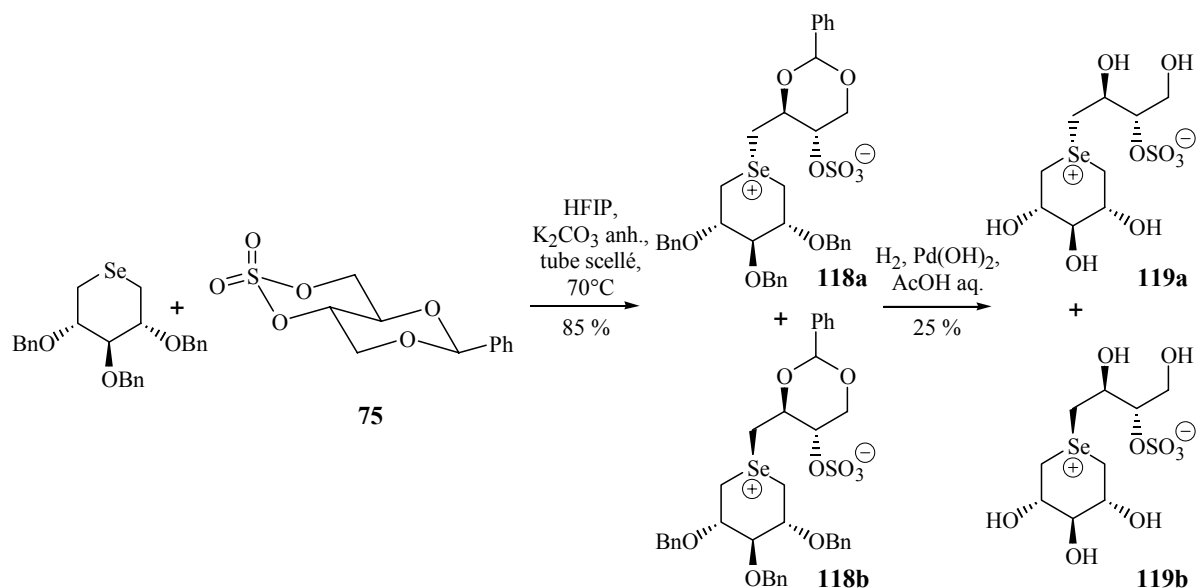


Schéma 38

Les hétérocycles sélénés à cinq ou six chaînons montrent une bonne réactivité lors de la réaction de couplage, mais conduisent à un mélange de diastéréoisomères en général non séparables. Pour les cycles à cinq chaînons, il est cependant possible d'obtenir majoritairement le composé *trans* par recristallisation.

Enfin, il est important de noter que l'ensemble des composés soufrés, azotés ou sélénés synthétisés par l'équipe de Pinto, ainsi que les méthodes employées ont été brevetés⁶².

II. Autres inhibiteurs comportant un ion sulfonium

Même si ce ne sont pas forcément des analogues du salacinol, d'autres inhibiteurs potentiels de glycosidases comportant un ion sulfonium ont été synthétisés ces dernières années.

En 1994, Wong et coll. ont publié la synthèse du composé zwitterionique **120**, proche du salacinol (**Figure 33**)⁶³. En dix étapes à partir du D-xylose, ils ont obtenu un mélange de deux diastéréoisomères séparables par chromatographie.

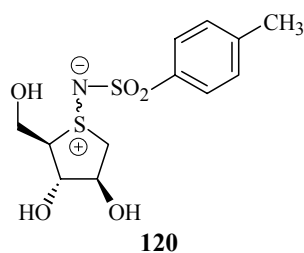


Figure 33

⁶² Pinto, B. M. ; Johnston, B. D. ; Ghavami, A. *WO Patent 01/49674*, **2001**.

⁶³ Yuasa, H. ; Kajimoto, T. ; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8243-8246.

L'équipe de Pinto a publié en 2000 la synthèse d'un analogue soufré de la castanospermine **121** (Figure 34), dont les propriétés inhibitrices pourront être comparées à celles du salacinol⁶⁴. Ce composé a été obtenu en onze étapes à partir du tétraacétate du 1,5-anhydro-5-thio-D-glucitol.

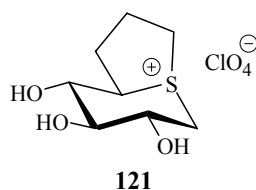


Figure 34

En 2001, Yuasa *et al.* ont proposé la synthèse du composé **122**, afin de comparer ses propriétés inhibitrices à celles du salacinol⁶⁵. Ce produit a été obtenu par traitement du 1,4-anhydro-1-thio-D-arabinitol par de l'iodure de méthyle en présence de NaHCO₃ sous la forme de deux diastéréoisomères **122(R)** et **122(S)** dans des proportions respectives de 7:1 (Figure 35). Après chromatographie, ils ont pu obtenir un mélange contenant majoritairement le composé **122(R)** (proportions de 10:1) et un mélange en faveur du composé **122(S)** (proportions de 4:6).

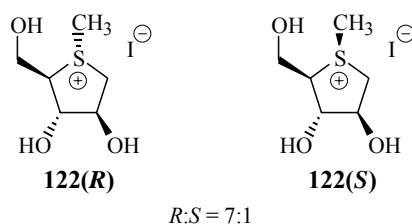


Figure 35

Bols et coll. ont quant à eux décrit la synthèse d'analogues soufrés de l'isofucofagomine⁶⁶. Ainsi par alkylation du thiosucre correspondant, ils ont obtenu les composés **123** et **124**, et par oxydation du même thiosucre protégé, le sulfoxyde **125** (Figure 36).

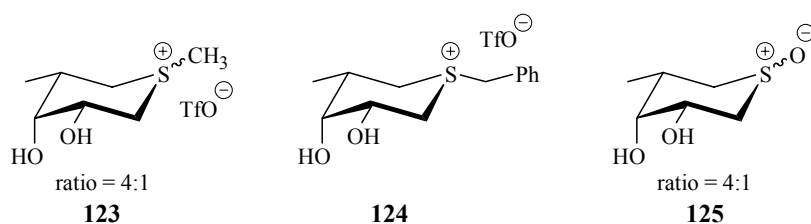


Figure 36

⁶⁴ Svansson, L. ; Johnston, B. D. ; Gu, J.-H. ; Patrick, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10769-10775.

⁶⁵ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1137-1139.

⁶⁶ Ulgar, V. ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Bols, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2002**, 1242-1246.

En 2003, Fernández-Bolaños et coll. ont synthétisé des analogues soufrés de C-nucléosides⁶⁷. Par oxydation du thiosucre correspondant, ils ont obtenu le composé **126** et le mélange **127** et par alkylation les mélanges **128** et **129** (Figure 37).

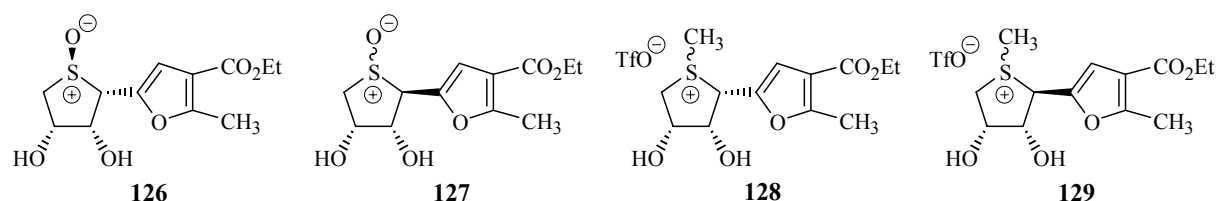


Figure 37

Ces composés ont été synthétisés, afin de disposer de nouveaux inhibiteurs de glycosidases. Ils ont donc également été testés sur plusieurs de ces enzymes.

III. Propriétés inhibitrices du salacinol et des différents analogues

Les propriétés inhibitrices du salacinol, du kotalanol et d'une grande majorité des analogues mentionnés dans les deux chapitres précédents ont été évaluées vis-à-vis de diverses glycosidases.

Yoshikawa *et al.* ont testé *in vitro* le salacinol **1**, le kotalanol **2**, ainsi que le 1,4-anhydro-1-thio-D-arabinitol **70** sur des α -glucosidases d'intestin grêle de rat et sur la β -glucosidase d'amandes. Ils ont comparé leurs résultats avec ceux obtenus pour l'acarbose **12** et le voglibose **15** (Tableau 4)^{2,47}.

Enzymes (concentration en substrat)	IC ₅₀ en µg/mL (en µM)				
	Salacinol 1	Kotalanol 2	70	Acarbose 12	Voglibose 15
Maltase ^a (37 mM)	3,2 (9,6)	2,8 (6,6)	> 400 (> 2600)	1,3 (2,0)	0,32 (1,2)
Saccharase ^a (37 mM)	0,84 (2,5)	0,58 (1,4)	> 400 (> 2600)	1,1 (1,7)	0,059 (0,22)
Isomaltase ^a (3,7 mM)	0,59 (1,8)	1,9 (4,5)	/	100 (155)	0,56 (2,1)
Tréhalase ^a (3,7 mM)	> 400 (> 1000)	/	/	> 400 (> 600)	190 (711)
β -glucosidase ^b (2,5 mM)	> 400 (> 1000)	/	/	> 400 (> 600)	> 400 (>1500)

Substrat = ^a : disaccharide correspondant, ^b : para-nitrophényl- β -D-glucopyranoside

Tableau 4

⁶⁷ Ulgar, V. ; López, Ó. ; Maya, I. ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Bols, M. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2801-2809.

² Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Yashiro, K. ; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1339-1340.

⁴⁷ Yoshikawa, M. ; Morikawa, T. ; Matsuda, H. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1547-1554.

Le salacinol, l'acarbose et le voglibose se sont révélés très peu inhibiteurs de la tréhalase et de la β -glucosidase. Et le 1,4-anhydro-1-thio-D-arabinitol **70** inhibe très faiblement la maltase et la saccharase, ce qui montre l'importance de l'ion sulfonium et de la chaîne portant le groupement sulfate.

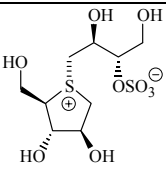
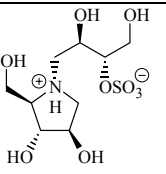
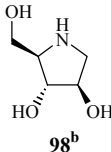
Pour compléter ces résultats et connaître le type d'inhibition du salacinol et du kotalanol vis-à-vis des enzymes testées, les auteurs ont déterminé les constantes d'inhibition K_i (**Tableau 5**). Ces deux zwitterions se sont révélés être de bons inhibiteurs compétitifs de ces trois enzymes.

Enzymes	K_m (M)	K_i en $\mu\text{g/mL}$ (en μM)			
		Salacinol 1	Kotalanol 2	Acarbose 12	Voglibose 15
Maltase	$2,7 \cdot 10^{-3}$	0,31 (0,93)	0,23 (0,54)	0,12 (0,19)	0,032 (0,12)
Saccharase	$2,0 \cdot 10^{-2}$	0,32 (0,96)	0,18 (0,42)	0,37 (0,57)	0,018 (0,067)
Isomaltase	$4,5 \cdot 10^{-3}$	0,47 (1,4)	1,80 (4,2)	75 (116)	0,41 (1,5)

Tableau 5

Le salacinol et le kotalanol sont de plus puissants inhibiteurs de l'isomaltase que l'acarbose. Par contre le salacinol est moins actif vis-à-vis de la maltase et de la saccharase et le kotalanol inhibe moins bien la maltase. Ce dernier est cependant d'activité comparable à l'acarbose sur la saccharase. Il est également meilleur sur les deux premières enzymes que le salacinol, mais il inhibe moins bien l'isomaltase. Enfin le voglibose est le meilleur inhibiteur parmi ces composés de la maltase et de la saccharase. Son activité est comparable à celle du salacinol sur l'isomaltase.

En 2001, Muraoka *et al.* ont testé leur analogue azoté **99** et la pyrrolidine **98** sur ces mêmes enzymes (**Tableau 6**)⁶⁰.

Enzymes	IC ₅₀ en μM		
	 Salacinol 1^a	 99^a	 98^b
Maltase	9,6	306	35
Saccharase	2,5	44	23
Isomaltase	1,8	136	4
Trehalase	> 1000	> 315	22

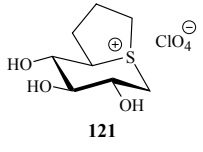
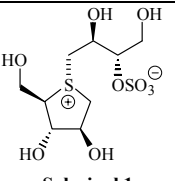
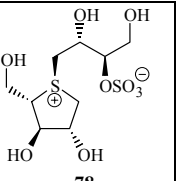
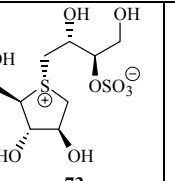
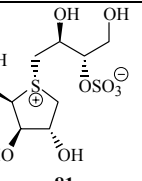
^a : enzymes provenant de l'intestin grêle de rat ; ^b : enzymes provenant de l'intestin grêle de souris

Tableau 6

⁶⁰ Muraoka, O. ; Ying, S. ; Yoshikai, K. ; Matsuura, Y. ; Yamada, E. ; Minematsu, T. ; Tanabe, G. ; Matsuda, H. ; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1503-1505.

Le remplacement de l'atome de soufre par un atome d'azote diminue considérablement l'activité inhibitrice. Cependant, cette diminution est moins importante dans le cas de la saccharase que pour les autres enzymes. L'activité inhibitrice de la pyrrolidine **98** sur les deux premières glucosidases est moins importante que celle du salacinol. Mais elle est très proche dans le cas de la saccharase et bien meilleure dans le cas de la tréhalase. Excepté pour la saccharase où les résultats sont voisins, la pyrrolidine **98** est un meilleur inhibiteur que le zwitterion azoté. Les auteurs mentionnent également qu'aucune inhibition vis-à-vis de la β -glucosidase d'amandes n'a été observée.

L'équipe de B. M. Pinto a testé ses produits sur des amylases. Ainsi ils ont montré que le salacinol était un faible inhibiteur de la forme G2 de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*, mais un bon inhibiteur de l'isoenzyme 1 recombinante de l' α -amylase d'orge (AMY1) et de l' α -amylase de pancréas de porc (PPA) (**Tableau 7**)^{64,56}.

Enzymes	K_i en Mm				
	 121	 Salacinol 1	 78	 73	 81
AMY1 ^a	> 5	0,015	> 5	> 5	0,109
PPA ^a	> 5	0,010	> 5	> 5	0,052
Glucoamylase ^b	1,32	1,71	2,17	1,06	> 5

Substrat = ^a : amylose, ^b : maltose

Tableau 7

L'analogue de la castanospermine **121** n'a pas montré d'inhibition significative des deux amylases inhibées par le salacinol. Par contre, son activité est légèrement meilleure vis-à-vis de la glucoamylase, bien que toujours modeste. L'énantiomère **78** et le diastéréoisomère **73** du salacinol n'ont pas d'activité sur les deux α -amylases, ce qui semble indiquer que la stéréochimie de la chaîne portant le groupement sulfate est importante pour ces enzymes. Par contre, le composé **73** a la meilleure activité vis-à-vis de la glucoamylase, même si celle-ci reste modeste. Enfin, le dernier diastéréoisomère **81** a un comportement similaire au salacinol. En effet, c'est un bon inhibiteur des α -amylases, mais moins bon que le salacinol, et un mauvais inhibiteur de la glucoamylase. On peut en conclure que les groupements hydroxyles en positions 2 et 3 du sucre ont assez peu d'influence sur ces enzymes.

Cette équipe a également évalué l'inhibition de ces mêmes enzymes par ses analogues azotés (**Tableau 8**)^{59,56}.

⁶⁴ Svansson, L. ; Johnston, B. D. ; Gu, J.-H. ; Patrick, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10769-10775.

⁵⁶ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Maddess, M. D. ; Chinapoo, S. M. ; Jensen, M. T. ; Svansson, B. ; Pinto, B. M. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 937-942.

⁵⁹ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Jensen, M. T. ; Svansson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6268-6271.

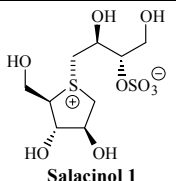
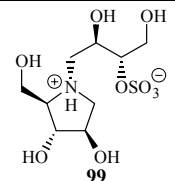
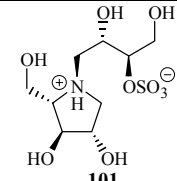
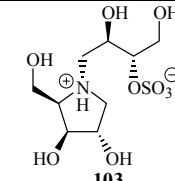
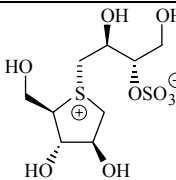
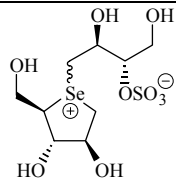
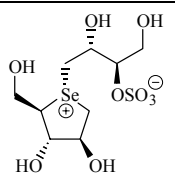
Enzymes	K_i en mM			
	 Salacinol 1	 99	 101	 103
AMY1	0,015	> 5	> 5	> 5
PPA	0,010	> 5	> 5	> 5
Glucoamylase	1,71	> 2,5	> 8	> 30

Tableau 8

Comme observé auparavant par Muraoka *et al.* (Tableau 6), le remplacement de l'atome de soufre par un atome d'azote entraîne une perte de l'inhibition.

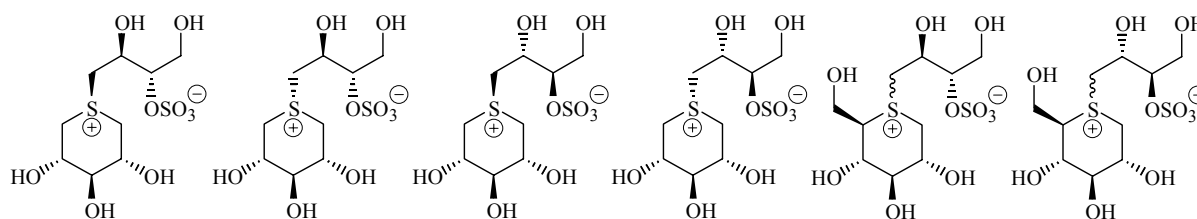
Les mêmes auteurs ont également publié les résultats concernant l'activité inhibitrice de leurs analogues sélénés (Tableau 9)⁶¹. Excepté le composé 113, qui est un meilleur inhibiteur de la glucoamylase que le salacinol, les autres tests n'ont pas montré d'inhibition significative.

Enzymes	K_i en mM		
	 Salacinol 1	 113	 trans-114
AMY1	0,015	NI	NI
PPA	0,010	NI	NI
Glucoamylase	1,71	0,72	NI

NI = non inhibiteur

Tableau 9

Enfin, ils ont aussi testé l'ensemble des analogues à six chaînons qu'ils ont synthétisés (Figure 38) sur la forme G2 de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*⁵⁸. Les composés se sont révélés soit inactifs soit très faiblement inhibiteurs ($K_i > 70$ mM).



⁶¹ Johnston, B. D. ; Ghavami, A. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8245-8250.

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

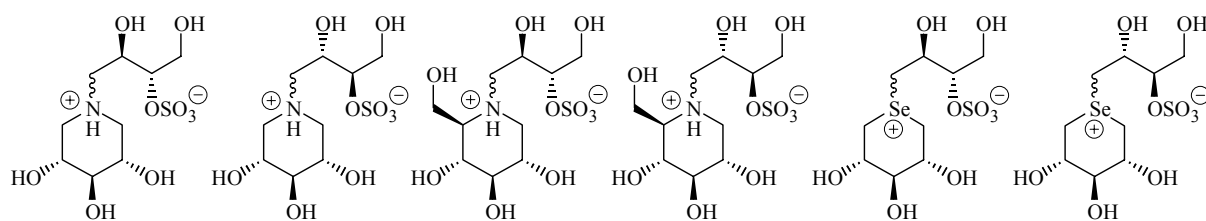


Figure 38

Wong et coll. ont évalué quant à eux l'activité inhibitrice de leurs zwitterions **120(S)** et **120(R)** sur la β -glucosidase d'amandes, la *N*-acétyl- β -glucosaminidase de rein de bœuf et l' α -glucosidase de levure de bière (**Figure 39**). Seul le composé **120(S)** inhibe très légèrement la β -glucosidase ($K_i = 1,7 \pm 0,2$ mM)⁶³.

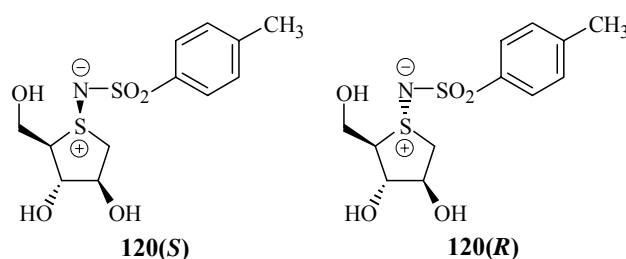
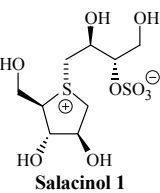
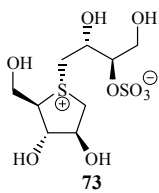
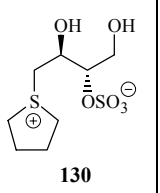
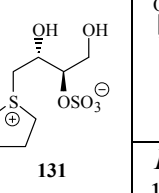
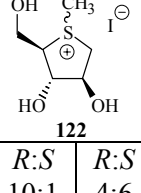


Figure 39

Yuasa *et al.* ont évalué l'inhibition de différentes glycosidases commerciales par leurs produits⁶⁵. De même, ils comparent leurs résultats avec ceux obtenus pour le salacinol (**Tableau 10**).

Enzymes		IC ₅₀ en mM					
		 Salacinol 1	 73	 130	 131	 122	
						R:S 10:1	R:S 4:6
α -glucosidase	riz	1,1.10 ⁻³	0,38	NI	1,0	0,41	2,0
	levure de boulanger	NI	NI	NI	NI	0,36	2,2
	<i>S. cerevis.</i> (recomb.)*	NI	NI	nd	nd	0,49	2,1
	<i>Bacillus stearoth.</i> #	2,5	NI	nd	nd	0,25	1,4
β -glucosidase	amandes	NI	3,4	nd	nd	NI	NI
α -mannosidase	amandes	2,1 ^{&}	3,6	nd	nd	2,1	1,2

* : *Saccharomyces cerevisiae* recombinante ; # : *Bacillus stearothermophilus*

[&] : 40 % d'inhibition ; NI = non inhibiteur = moins de 50 % d'inhibition à 5 mM ; nd = non déterminé

Substrat = para-nitrophényl- α ou β -D-gluco ou mannopyranoside

Tableau 10

⁶³ Yuasa, H. ; Kajimoto, T. ; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8243-8246.

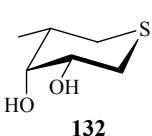
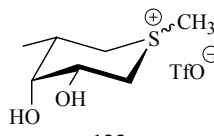
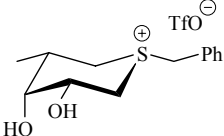
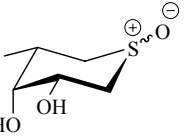
⁶⁵ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1137-1139.

Le salacinol n'a pas montré de propriétés inhibitrices vis-à-vis de deux des quatre α -glucosidases testées et de la β -glucosidase. Il est faiblement actif vis-à-vis de l' α -glucosidase de *Bacillus stearothermophilus* et de l' α -mannosidase. Par contre, le salacinol est un très bon inhibiteur de l' α -glucosidase de riz. Cela peut s'expliquer par le fait que cette enzyme a une plus grande spécificité pour le maltose, tandis que les autres enzymes sont plutôt spécifiques de substrats monosaccharidiques. De même, Yoshikawa *et al.* ont montré les bons résultats obtenus avec des disaccharidases telles que la saccharase ou l'isomaltase (**Tableau 4**).

L'inhibition de l' α -glucosidase de riz est nettement diminuée dans le cas du diastéréoisomère du salacinol **73**, indiquant une nouvelle fois l'importance de la stéréochimie de la chaîne portant le groupement sulfate. Par rapport au salacinol, ce composé n'est plus inhibiteur de l' α -glucosidase de *Bacillus stearothermophilus*, mais devient très faiblement actif vis-à-vis de la β -glucosidase. Pour ce qui est des dérivés **130** et **131**, l'absence de groupements hydroxyles sur le thiosucre entraîne encore une diminution et même une disparition, dans le cas du composé **130**, de l'inhibition de l' α -glucosidase de riz. Le mélange des deux diastéréoisomères **122(R)** et **122(S)** possède une activité inhibitrice vis-à-vis de chaque glycosidase, excepté la β -glucosidase. En comparant les résultats en fonction des proportions de chaque diastéréoisomère, on remarque que l'inhibition sur les quatre α -glucosidases est plus importante dans le cas où le composé **122(R)** est majoritaire. On observe le cas inverse pour l' α -mannosidase. Le composé **122(R)** est donc un bon inhibiteur des α -glucosidases, par contre il ne semble pas sélectif vis-à-vis de l'origine de l'enzyme.

Enfin les auteurs signalent que le 1,4-anhydro-1-thio-D-arabinitol **70** n'est pas inhibiteur de ces glycosidases, ce qui montre de nouveau l'importance de l'ion sulfonium et de la chaîne portant le groupement sulfate. De plus, aucun des produits testés n'est inhibiteur de l' α -galactosidase de grains de café vert et de la β -galactosidase d'*Escherichia coli*.

En 2002, Bols et coll. ont testé l'activité inhibitrice de leurs analogues de l'isofucofagomine sur deux fucosidases (**Tableau 11**)⁶⁶.

Enzymes	K_i en mM			
	 132	 123	 124	 125
α -L-fucosidase (rein de bœuf)	73	0,102	0,161	0,740
α -L-fucosidase (placenta humain)	> 100	0,303	0,309	> 1

Substrat = para-nitrophényl- α -L-fucopyranoside

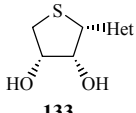
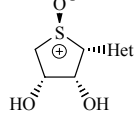
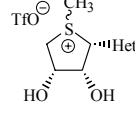
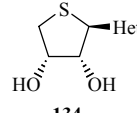
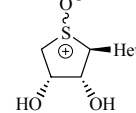
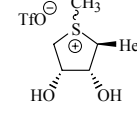
Tableau 11

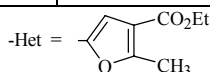
En comparant les résultats obtenus pour le composé **132** qui ne possède pas d'ion sulfonium et ceux obtenus pour les composés alkylés **123** et **124**, on peut une nouvelle fois

⁶⁶ Ulgar, V. ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Bols, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2002**, 1242-1246.

conclure que la présence de cet ion est indispensable à l'activité inhibitrice du produit. De plus, il ne semble pas que la taille du groupement alkylant influence beaucoup l'inhibition. Par contre, l'oxydation de l'atome de soufre donne de moins bons résultats. Enfin, on peut remarquer que l'activité de ces composés est plus importante sur la fucosidase de bœuf.

Enfin, Fernández-Bolaños et coll. ont aussi évalué leurs produits sur différentes glycosidases (**Tableau 12**)⁶⁷.

Enzymes	K_i en mM					
						
β -galactosidase ^a (<i>Asperg. oryzae</i>)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
α -L-fucosidase ^b (rein de bœuf)	0,452	1,22	0,500	0,853	0,348	0,663
α -glucosidase ^b (levure de boul.)	NI	NI	NI	1,35	0,496	NI
β -glucosidase ^b (amandes)	NI	5,50	0,250	0,674	0,771	1,05



NI = non inhibiteur ; Substrat = ^a : *ortho*-nitrophényl glycoside, ^b : *para*-nitrophényl glycoside

Tableau 12

Aucun des produits synthétisés n'est actif vis-à-vis de la β -galactosidase, alors que l'analogue azoté de **133** est un très bon inhibiteur de cette enzyme ($K_i = 6,6 \mu\text{M}$). Dans le cas de l' α -L-fucosidase, tous les composés sont inhibiteurs, ce qui est aussi le cas pour l'analogue azoté de **134** ($K_i = 15 \mu\text{M}$; placenta humain).

Pour les composés dont le groupement encombrant est vers l'arrière, l'hétérocycle soufré **133** a une activité légèrement supérieure vis-à-vis de l' α -L-fucosidase, à celle du composé alkylé **128**, qui est lui-même légèrement meilleur que le composé oxydé **126**. Il s'agit ici d'un des rares exemples où un hétérocycle soufré a une activité similaire à celle d'un composé possédant un ion sulfonium. Ces analogues ne sont pas inhibiteurs de l' α -glucosidase de levure de boulanger. Vis-à-vis de la β -glucosidase, l'inhibition progresse avec la substitution de l'atome de soufre. Le meilleur résultat est obtenu avec le composé alkylé **128**.

Pour les autres composés dont le groupement encombrant est vers l'avant, l'effet vis-à-vis de l' α -L-fucosidase semble inversé par rapport à l'autre série. En effet, l'analogue oxydé **127** est meilleur que le composé alkylé **129**, lui-même meilleur que l'hétérocycle soufré **134**. Cependant, les valeurs obtenues étant assez proches, il paraît difficile de conclure. Pour la β -glucosidase, l'hétérocycle est un meilleur inhibiteur que les composés avec un ion sulfonium. Vis-à-vis de l' α -glucosidase, l'inhibition est nettement améliorée par l'oxydation de l'atome de soufre, mais son alkylation entraîne la perte de l'activité.

⁶⁷ Ulgar, V. ; López, Ó. ; Maya, I. ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Bols, M. *Tetrahedron* **2003**, 59, 2801-2809.

En conclusion, les meilleures activités inhibitrices de ces composés comportant un ion sulfonium sont observées vis-à-vis de glycosidases spécifiques de substrats polysaccharidiques, comme la saccharase, les α -amylases ou l' α -glucosidase de riz. Il semble que dans la majorité des cas, la présence de cet ion soit nécessaire à l'inhibition, parce que cela permet de mimer l'état de transition de la réaction d'hydrolyse des glucides dans le site actif de l'enzyme. La présence de groupements hydroxyles sur l'hétérocycle semble également être nécessaire. Pour certaines enzymes, la configuration des centres asymétriques de la chaîne portant le groupement sulfate a aussi une grande importance.

Dans le cas des analogues du salacinol, le remplacement de l'atome de soufre par un atome d'azote ne semble pas être un facteur favorable à l'inhibition, ce qui est surprenant lorsque l'on connaît le pouvoir inhibiteur des iminosucres tels que la désoxynojirimycine, dont l'activité est probablement due à la présence d'un azote, capable de se protoner à pH physiologique. La substitution du soufre par un atome de sélénium rend l'inhibition plus sélective, mais celle-ci semble toutefois moins importante. Enfin, les analogues à six chaînons n'ont pas montré d'activité inhibitrice significative vis-à-vis des enzymes testées.

RESULTATS ET DISCUSSION



I. Introduction

La synthèse d'analogues du salacinol constitue un thème de recherche récent et qui a suscité ces dernières années de nombreuses études, notamment par l'équipe de B. M. Pinto au Canada. Nos travaux de recherche ont été développés en parallèle et présentent donc parfois des points de convergence avec les résultats publiés très récemment par cette équipe.

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, l'étape clé de ces synthèses repose sur l'attaque nucléophile d'un hétéroatome inclus dans un cycle sur le carbone le moins encombré d'un sulfate cyclique (**Schéma 39**).

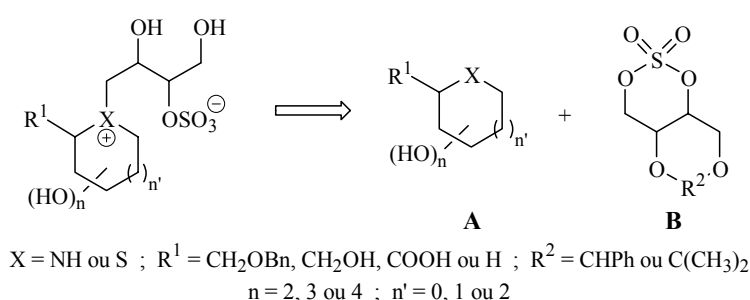


Schéma 39

Comme hétérocycles **A**, nous avons utilisé des pipéridines polyhydroxylées ou iminosucres analogues de la désoxynojirimycine ou de l'acide pipécolique. Elles ont été synthétisées grâce à une méthode originale basée sur l'utilisation d'isoxazolines et la réactivité des sulfates cycliques. Nous avons également utilisé des thiosucres à cinq, six ou sept chaînons synthétisés par le Laboratoire des Glucides (FRE 2779) de l'Université de Picardie à Amiens, avec lequel nous collaborons.

Pour évaluer dans un premier temps l'influence de la nature de l'hétérocycle sur l'inhibition, nous avons choisi d'utiliser, comme sulfate cyclique **B**, celui nous permettant d'obtenir une chaîne sulfatée identique à celle du salacinol. Afin d'évaluer l'impact de la stéréochimie de cette chaîne, nous avons également couplé le sulfate cyclique donnant la chaîne énantiomère de celle du salacinol.

Nous présenterons donc dans un premier temps les synthèses des pipéridines polyhydroxylées, puis celles des sulfates cycliques. Dans un deuxième temps, les résultats concernant la réaction de couplage entre les hétérocycles azotés et soufrés et les sulfates cycliques seront exposés. Enfin, nous présenterons et nous commenterons les propriétés inhibitrices des différentes molécules synthétisées vis-à-vis de plusieurs glycosidases commerciales.

II. Synthèse des iminosucres

II.1. Stratégie de synthèse

La méthode de synthèse originale, que nous avons développée, est basée sur l'utilisation d'isoxazolines portant un sulfate cyclique. Elle peut permettre l'obtention d'iminosucres analogues de la désoxynojirimycine ($R = \text{CH}_2\text{OBn}$) ou analogues de l'acide pipécolique ($R = \text{CO}_2\text{H}$) (Schéma 40).

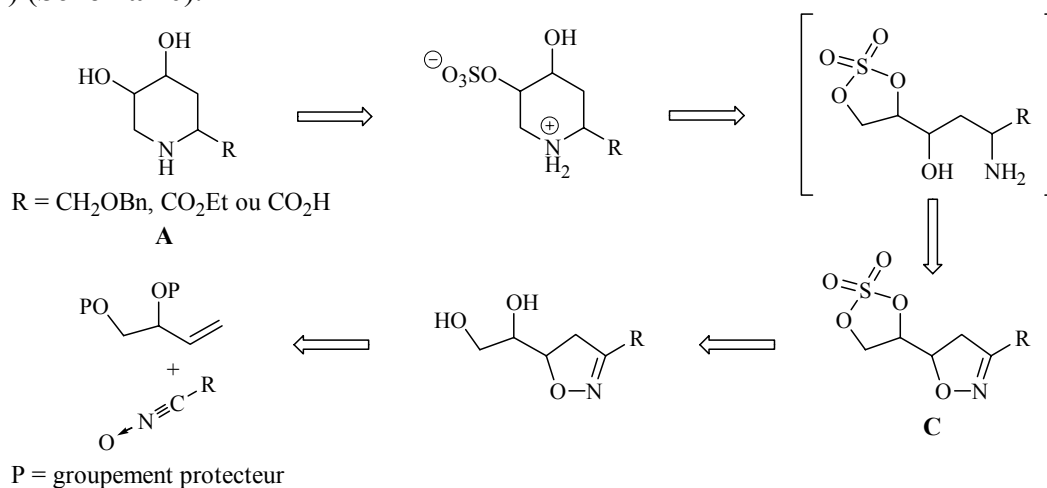


Schéma 40

La pipéridine dihydroxylée **A** est obtenue par désulfatation en milieu acide d'une pipéridine zwitterionique. Celle-ci est formée par cyclisation intramoléculaire de l'aminoalcool intermédiaire non isolé, obtenu par hydrogénolyse de l'isoxazoline **C**. Le sulfate cyclique est obtenu à partir du diol et l'isoxazoline dihydroxylée provient de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un dérivé du butènediol et un oxyde de nitrile généré *in situ*.

II.2. Synthèse des iminosucres avec $R = \text{CH}_2\text{OBn}$

II.2.1. Synthèse du précurseur de l'oxyde de nitrile

L'isoxazoline, conduisant aux pipéridines analogues de la désoxynojirimycine, provient de la cycloaddition 1,3-dipolaire entre le butènediol convenablement protégé et l'oxyde de nitrile généré *in situ* à partir du nitroéthanol benzylé **136** (Schéma 41).

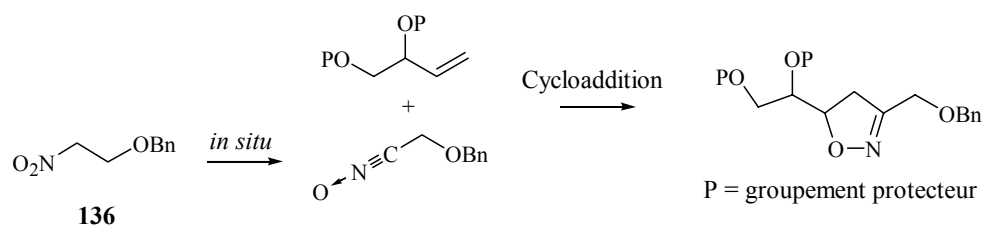


Schéma 41

Le nitroéthanol **135** a été obtenu selon le protocole décrit dans la littérature, par condensation du nitrométhane sur le paraformaldéhyde en milieu basique avec un rendement de 46 % (Schéma 42)⁶⁸.

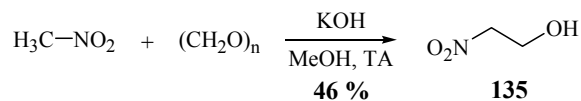


Schéma 42

Lors de la réaction de cycloaddition, l'oxyde de nitrile est généré par déshydratation. Pour éviter que cette déshydratation ait lieu au niveau de l'alcool, il est nécessaire de le protéger. Nous avons choisi d'utiliser le groupement benzyle, qui peut s'introduire en milieu acide. Le choix de ce milieu se justifie de nouveau par le fait que l'alcool subit une déshydratation dans les conditions classiques de benzylation en milieu basique. La protection a donc été réalisée en utilisant du benzyltrichloroacétimide en présence d'acide triflique avec un rendement de 94 % (Schéma 43)⁶⁹.

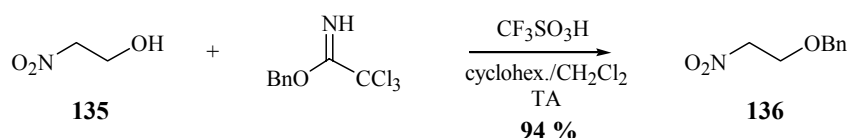


Schéma 43

La structure de ce précurseur a été confirmée par spectroscopie de RMN, conforme aux données de la littérature⁷⁰.

II.2.2. Synthèse en version racémique

Afin de valider notre méthode de synthèse, les iminosucres benzylés ont d'abord été synthétisés en version racémique. L'isoxazoline a donc été obtenue par cycloaddition 1,3-dipolaire entre le précurseur nitré précédent et le 2,2-diméthyl-4-vinyl-1,3-dioxolane racémique commercial.

II.2.2.a. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, en présence d'isocyanate de phényle et de triéthylamine, a été développée par Mukaiyama *et al.* en 1960⁷¹. En arrachant un proton en α du groupement nitro, la triéthylamine permet la formation d'un nitronate, qui attaque l'isocyanate et permet de générer l'oxyde de nitrile désiré, ainsi que le *N*-phénylcarbamate. Celui-ci subit une décarboxylation, qui entraîne la formation d'aniline, qui attaque également l'isocyanate, pour donner de la diphenylurée (Schéma 44). Mais la diphenylurée étant difficilement séparable des produits de la réaction, il est préférable d'utiliser du 1,4-phénylènediisocyanate, à la place de l'isocyanate de phényle. En effet, il se forme une polyurée plus facilement éliminée du milieu par filtration⁷².

⁶⁸ Noland, W. E. *Org. Synth.* **1961**, *41*, 67-71.

⁶⁹ Widmer, U. *Synthesis*, **1987**, 568-570.

⁷⁰ Gefflaut, T. ; Martin, C. ; Delor, S. ; Besse, P. ; Veschambre, H. ; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2296-2301.

⁷¹ Mukaiyama, T. ; Hoshino, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5339-5342.

⁷² Kantorowski, E. J. ; Brown, S. P. ; Kurth, M. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5272-5274.

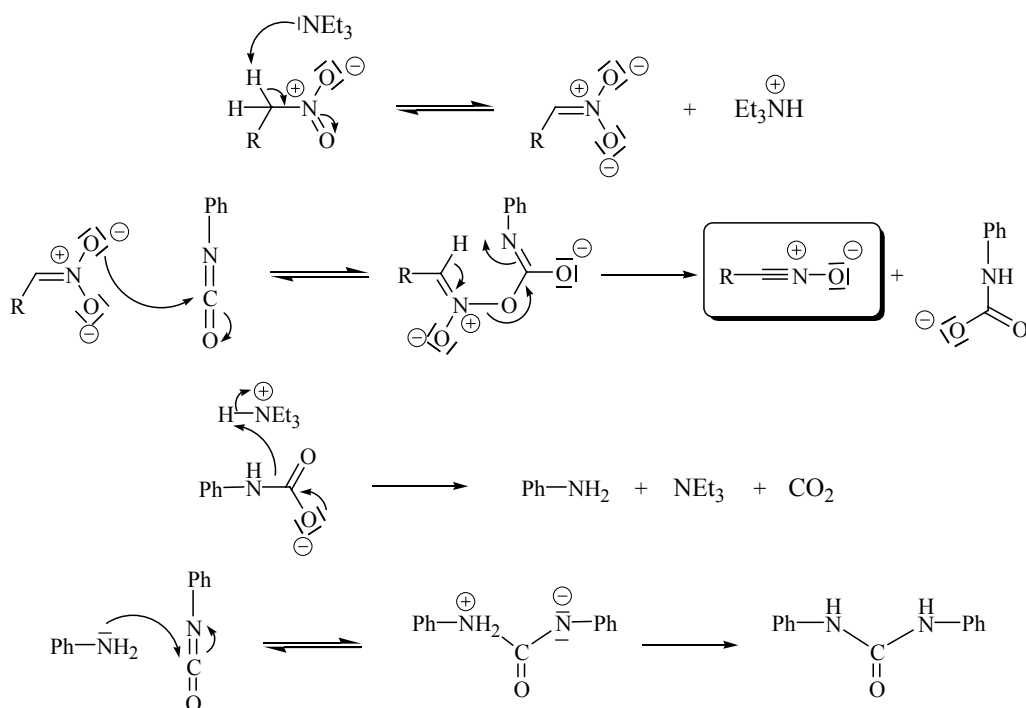


Schéma 44

L'oxyde de nitrile **137** ainsi formé peut réagir de façon concertée avec le (\pm)-2,2-diméthyl-4-vinyl-1,3-dioxolane **138** pour donner l'isoxazoline attendue (Schéma 45). Cette réaction est très régiosélective et fournit principalement l'isoxazoline disubstituée en positions 3 et 5.

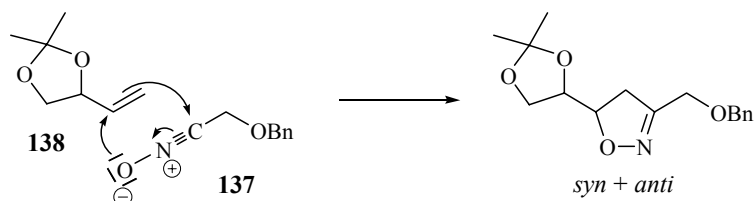


Schéma 45

De plus, l'utilisation d'un alcène chiral portant un substituant oxygéné en position allylique permet une diastéréosélectivité importante en faveur du composé *anti*. Kozikowski *et al.* ont proposé l'état de transition suivant dans lequel l'oxygène allylique serait orthogonal au plan de la double liaison carbone-carbone, minimisant ainsi les interactions stériques (Figure 40)⁷³. L'addition de l'oxyde de nitrile peut alors se faire de façon antipériplanaire, ce qui minimise également les interactions orbitales antiliantes.

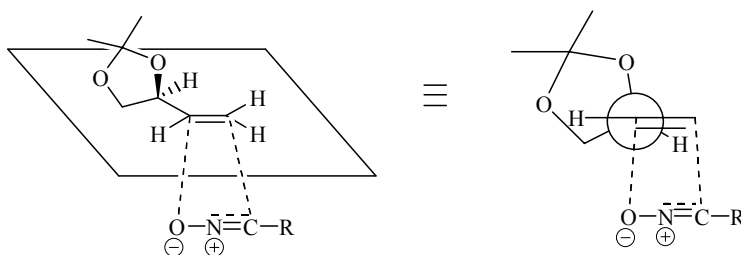


Figure 40

⁷³ Kozikowski, A. P. ; Ghosh, A. K. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2762-2772.

Ainsi la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre le (\pm)-2,2-diméthyl-4-vinyl-1,3-dioxolane **138** et le nitroéthanol benzylé **136**, en présence de 1,4-phénylènediisocyanate et de triéthylamine, a conduit à l'obtention de deux isoxazolines (\pm)-*anti* **139** et (\pm)-*syn* **140** avec des rendements respectifs de 51 % et 14 %, soit un rapport diastéréoisomérique de 78:22 (**Schéma 46**). On observe par CCM la formation de sous-produits, qui n'ont pas été isolés, ni identifiés.

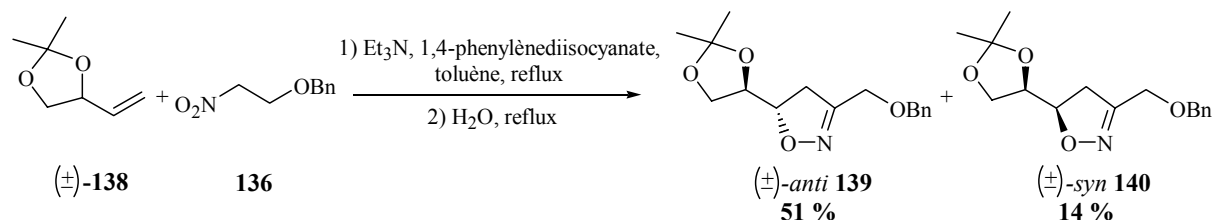


Schéma 46

Ces deux isoxazolines ont été séparées par chromatographie sur gel de silice et caractérisées par spectroscopie de RMN, en accord avec les spectres décrits dans la littérature⁷⁰.

II.2.2.b. Synthèse des isoxazolines sulfates

Pour la suite de la synthèse, chaque étape a été menée en parallèle dans les deux séries *anti* et *syn*. Pour obtenir les isoxazolines sulfates, il faut dans un premier temps déprotéger les deux groupements hydroxyles, puis synthétiser les sulfites cycliques, qui seront ensuite oxydés en sulfates cycliques.

La déprotection des groupements hydroxyles a été effectuée dans le méthanol en présence de résine acide. Elle permet l'obtention des isoxazolines diols (\pm)-*anti* **141** et (\pm)-*syn* **142** avec des rendements de 77 % et de 94 % respectivement (**Schéma 47**).

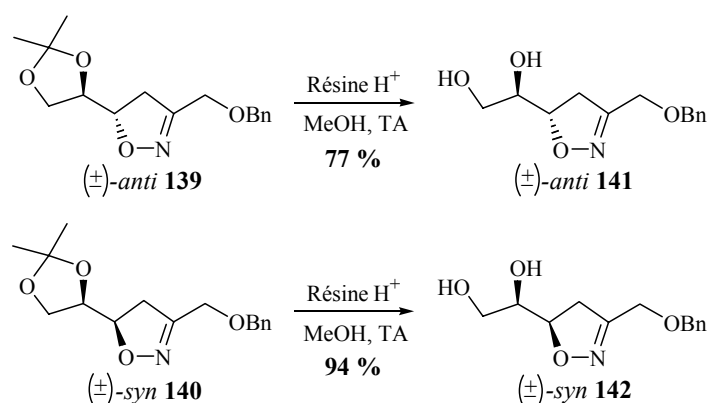


Schéma 47

Les spectres de RMN de ces deux diols sont conformes à ceux décrits dans la littérature⁷⁰.

⁷⁰ Gefflaut, T. ; Martin, C. ; Delor, S. ; Besse, P. ; Veschambre, H. ; Bolte, J. J. *Org. Chem.* **2001**, *66*, 2296-2301.

La conversion d'un diol en sulfate cyclique implique généralement la synthèse préalable de sulfites cycliques. Les isoxazolines sulfites (\pm)-*anti* **143** et (\pm)-*syn* **144** ont donc été préparées par action du chlorure de thionyle en présence de pyridine avec des rendements respectifs de 88 % et 84 % (**Schéma 48**)⁷⁴.

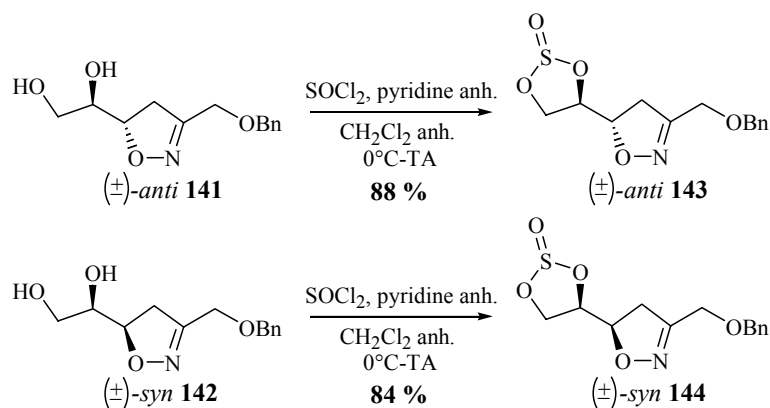


Schéma 48

Les sulfites obtenus se présentent sous la forme de mélanges de deux diastéréoisomères, en raison de la présence de l'atome de soufre asymétrique. Etant oxydés en sulfates dans l'étape suivante, ces diastéréoisomères ne sont pas séparés. Les spectres de masse réalisés sont en accord avec la structure attendue ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 298$) et la disparition des groupements hydroxyyles a été mise en évidence en infrarouge. Enfin, les expériences de RMN attestent de la présence des deux diastéréoisomères.

Une méthode classique d'oxydation de sulfites cycliques en sulfates cycliques consiste à utiliser du tétraoxyde de ruthénium en quantité stoechiométrique. Mais celui-ci étant onéreux, Sharpless et coll. ont publié une méthode générale de synthèse de sulfates cycliques⁷⁵, utilisant le système catalytique au ruthénium qu'ils ont développé en 1981⁷⁶. Celui-ci permet de générer *in situ* du tétraoxyde de ruthénium à partir d'un autre catalyseur au ruthénium (RuCl_3 ou RuO_2) apporté en quantité catalytique et associé à un cooxydant : le periodate de sodium (**Schéma 49**). Ils ont montré, par ailleurs, que la présence d'acétonitrile permet d'améliorer nettement le rendement et la vitesse de l'oxydation. En effet, le groupement nitrile peut se lier au ruthénium et faciliter ainsi sa participation au cycle catalytique⁷⁶.

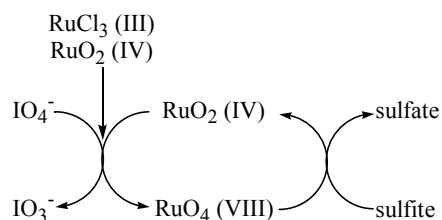


Schéma 49

⁷⁴ Kim, B. M. ; Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 655-658.

⁷⁵ Gao, Y. ; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7538-7539.

⁷⁶ Carlsen, P. H. J. ; Katsuki, T. ; Martin, V. S. ; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3936-3938.

Nous avons donc soumis les isoxazolines sulfites à une oxydation par du chlorure de ruthénium associé à du periodate de sodium dans un mélange acétonitrile/eau. Cette méthode s'est révélée efficace dans le cas du sulfite (\pm)-*syn* **144** et a permis d'isoler le sulfate (\pm)-*syn* **146** avec un rendement de 96 % (**Schéma 50**).

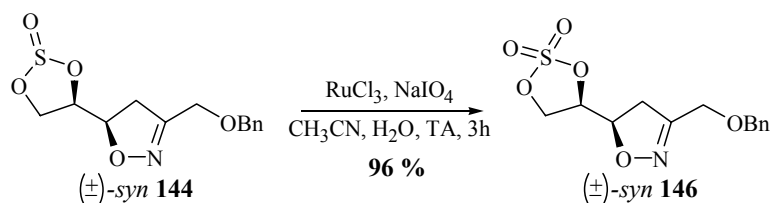


Schéma 50

Par contre, pour le sulfite (\pm)-*anti* **143**, de nombreux sous-produits ont été obtenus, notamment l'isoxazoline résultant de l'oxydation du groupement benzyle en benzoate. Or l'équation bilan de l'oxydoréduction montre qu'avec du chlorure de ruthénium comme catalyseur, il y a formation d'acide chlorhydrique, ce qui n'est pas le cas si l'on utilise par exemple de l'oxyde de ruthénium (**Schéma 51**). Il est probable que la présence de cet acide augmente le pouvoir oxydant du catalyseur et entraîne la formation de ces sous-produits.

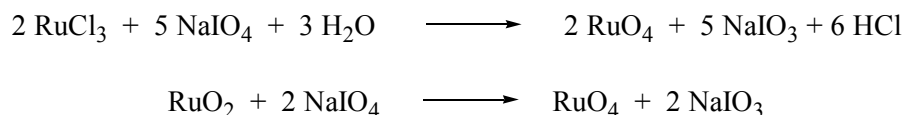


Schéma 51

Nous avons donc décidé d'utiliser de l'oxyde de ruthénium à la place du chlorure de ruthénium dans le cas de la série *anti*. Le sulfate (\pm)-*anti* **145** a ainsi été obtenu de façon plus propre avec un rendement de 84 %, même si la réaction a été plus lente (**Schéma 52**).

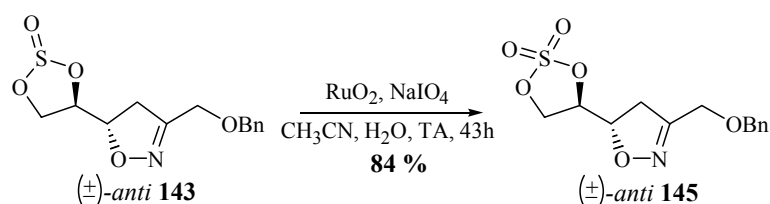


Schéma 52

Cette isoxazoline sulfate (\pm)-*anti* **145** a également été synthétisée sans purification du sulfite intermédiaire avec un très bon rendement de 78 % sur les deux étapes.

La structure de ces deux sulfates cycliques a été confirmée par RMN, spectrométrie de masse ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 314$) et analyse élémentaire.

II.2.2.c. Réaction d'hydrogénolyse des isoxazolines sulfates

Les isoxazolines constituent des intermédiaires importants dans la synthèse d'un grand nombre de molécules polyfonctionnelles⁷⁷. En effet l'ouverture du cycle dans différentes conditions donne accès à de nombreux motifs (**Schéma 53**).

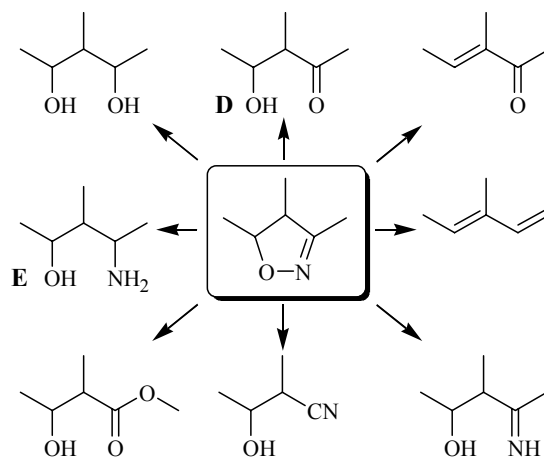


Schéma 53

Les applications les plus fréquentes de ces composés concernent la synthèse de β -hydroxycétones **D** et de γ -aminoalcools **E**. Les premières sont obtenues par hydrogénolyse en présence d'eau et d'un catalyseur acide, tandis que les seconds sont obtenus en milieu réducteur, avec en général LiAlH_4 . Cependant, l'hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon peut également permettre la synthèse de γ -aminoalcools, par rupture de la liaison O-N entraînant la formation d'une imine, qui est ensuite réduite en amine. Or Vogel et coll. ont montré que ces conditions entraînent une diastéréosélectivité différente de celle obtenue avec LiAlH_4 ⁷⁸. En effet, avec ce réactif, la réduction de la fonction imine se fait sur la face la moins encombrée, plaçant les fonctions alcool et amine en position relative *syn* (**Schéma 54**).

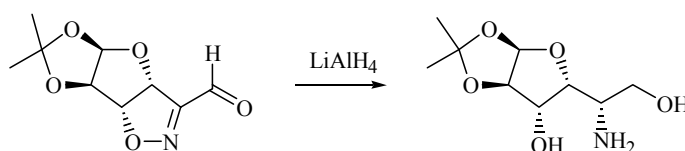


Schéma 54

Par contre, en présence de palladium, les auteurs supposent que le groupement hydroxyle, généré après rupture de la liaison O-N, interagit avec le catalyseur. La réduction se fait alors du côté de ce groupement, plaçant les fonctions alcool et amine en position relative *anti* (**Schéma 55**).

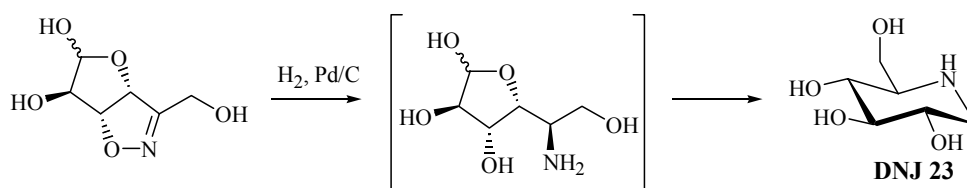


Schéma 55

⁷⁷ Kanemasa, S. ; Tsuge, O. *Heterocycles* **1990**, 30, 719-736.

⁷⁸ Schaller, C. ; Vogel, P. ; Jäger, V. *Carbohydr. Res.* **1998**, 314, 25-35.

Notre stratégie de synthèse repose aussi sur l'hydrogénolyse d'une isoxazoline, permettant l'obtention d'un γ -aminoalcool intermédiaire. La cyclisation intramoléculaire résultant de l'attaque de l'amine sur le sulfate cyclique donne une pipéridine zwitterionique (**Schéma 56**).

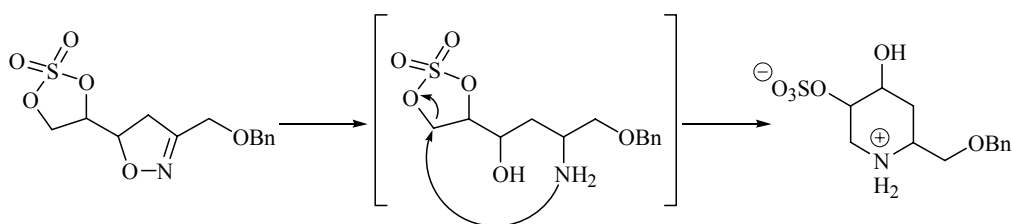


Schéma 56

Si la grande réactivité des sulfates cycliques permet d'envisager une cyclisation efficace, deux questions restent en suspens. La réduction de la fonction imine entraînant la création d'un nouveau centre asymétrique et l'attaque de l'amine pouvant se faire sur les deux positions du sulfate cyclique, peut-on espérer à la fois une stéréosélectivité et une régiosélectivité importantes pour cette réaction ?

Les premiers essais d'hydrogénolyse, en présence de palladium sur charbon dans le méthanol, réalisés sur l'isoxazoline sulfate (\pm)-*anti* **145** ont permis d'isoler principalement quatre produits : la pipéridine zwitterionique désirée (\pm)-**147**, la pipéridine zwitterionique débenzylée (\pm)-**148**, la β -hydroxycétone (\pm)-**149** et la pipéridine monohydroxylée (\pm)-**150** (**Figure 41**). Nous avons également observé une importante acidification du milieu.

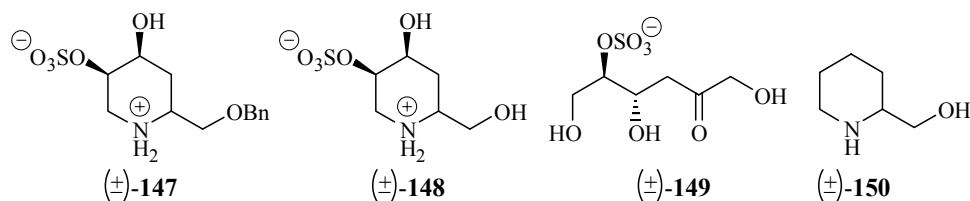


Figure 41

La solvolysse partielle du sulfate cyclique peut être à l'origine de cette acidification. Or la β -hydroxycétone (\pm)-**149** se forme à partir de l'isoxazoline sulfate (\pm)-*anti* **145** par hydrogénolyse en présence d'eau et d'un catalyseur acide. De plus, la pipéridine monohydroxylée (\pm)-**150** provient probablement d'une succession d'éliminations, favorisées par le milieu acide, et de réductions. Enfin, la pipéridine débenzylée (\pm)-**148** résulte de la déprotection de la pipéridine zwitterionique (\pm)-**147**. Pour éviter la formation de ces sous-produits, il est nécessaire de travailler en milieu rigoureusement anhydre et légèrement basique, de manière à neutraliser les traces éventuelles d'acide pouvant se former.

D'après ces premières indications, nous avons donc réalisé les réactions d'hydrogénolyse des deux isoxazolines sulfates (\pm)-*anti* **145** et (\pm)-*syn* **146** dans du méthanol anhydre en présence de carbonate de sodium anhydre. Cela nous a permis d'obtenir les pipéridines zwitterioniques (\pm)-**147** et (\pm)-**151** avec des rendements de 82 % et 40 % respectivement (**Schéma 57**). Dans ces conditions légèrement basiques, le groupement benzyle n'est pas éliminé.

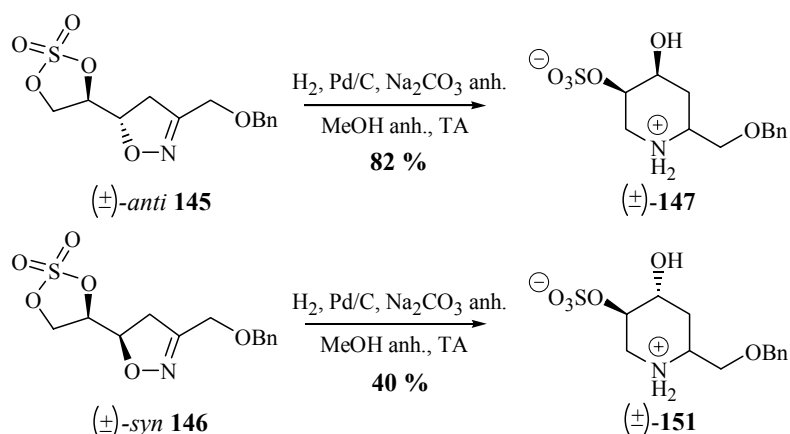


Schéma 57

L'hydrogénolyse de l'isoxazoline sulfate (\pm) -*syn* **146** s'est révélée difficile. En effet, le suivi de cette réaction par chromatographie sur couches minces a révélé la formation de plusieurs sous-produits non identifiés et ce malgré de nombreux essais de mise au point. Un séchage spécifique et intensif du palladium sur charbon et du carbonate de sodium, l'utilisation de palladium sur carbonate de calcium, des modifications de la température, de la durée de réaction, de la pression d'hydrogène ou de la quantité de carbonate de sodium n'ont pas permis d'améliorer le rendement. On peut supposer, puisque l'hydrogénolyse est efficace pour la série *anti*, que la conformation adoptée par l'isoxazoline sulfate *syn* gêne la réaction. En effet, elle pourrait entraîner une moins bonne stéréosélectivité de la réduction et l'un des deux aminoalcools obtenus a peut-être plus de difficultés à cycliser.

Les spectres de RMN de la pipéridine brute (\pm) -**147** issue de la série *anti* montrent la formation d'un seul produit. La cyclisation est donc régiosélective et la réduction de la fonction imine stéréosélective. Dans le cas de la pipéridine (\pm) -**151** issue de la série *syn*, les spectres du produit brut montrent la formation d'un mélange de produits, ce qui est en accord avec le rendement observé. On ne peut donc pas affirmer que, dans ce cas, la réduction de l'imine est stéréosélective. Néanmoins, après purification, la présence d'un seul produit est démontrée par spectroscopie de RMN.

Les spectres obtenus pour les pipéridines purifiées (\pm) -**147** et (\pm) -**151** sont en accord avec les structures attendues. Par RMN du ^{13}C , on constate la disparition de la liaison $\text{C}=\text{N}$. En RMN du ^1H , les déplacements chimiques des protons portés par les carbones 1 et 4 sont nettement plus faibles, attestant de la disparition en α de ces carbones, du groupement sulfate et de la liaison $\text{C}=\text{N}$. De plus, un signal supplémentaire correspondant au proton en position 5 apparaît. Enfin, les expériences de masse haute résolution réalisées pour ces deux pipéridines sont également en accord avec les structures proposées ($[\text{M} + \text{H}]^+ = 318,1014$ et $318,1012$).

Nous avons ensuite déterminé la configuration relative du carbone asymétrique en position 5. Dans le cas de la pipéridine (\pm) -**147** issue de la série *anti*, les déplacements chimiques des protons portés par les carbones 1, 3 et 5 sont bien différenciés. Ceci nous a permis de réaliser des mesures d'effets NOE en RMN à une dimension. Nous avons ainsi mis en évidence un effet NOE du même ordre de grandeur entre H_{1b} et H_3 d'une part et H_{1b} et H_5 d'autre part. Nous pouvons donc en déduire la position axiale de ces trois atomes d'hydrogène, ainsi que la conformation préférentielle de la pipéridine (**Figure 42**).

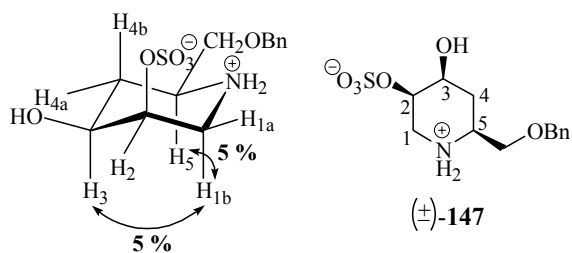


Figure 42

Les constantes de couplage mesurées sont en accord avec cette conformation. Ainsi on observe une grande constante d'environ 13 Hz entre les protons H_{4b} et H_3 et entre H_{4b} et H_5 . De plus, le signal correspondant au proton H_2 , qui ne présente que des petites constantes de couplage, apparaît comme un pseudo singulet. La réduction de l'imine semble donc s'être effectuée du même côté que le groupement hydroxyle, comme dans le cas observé par Vogel et coll.⁷⁸ (**Schéma 58**).

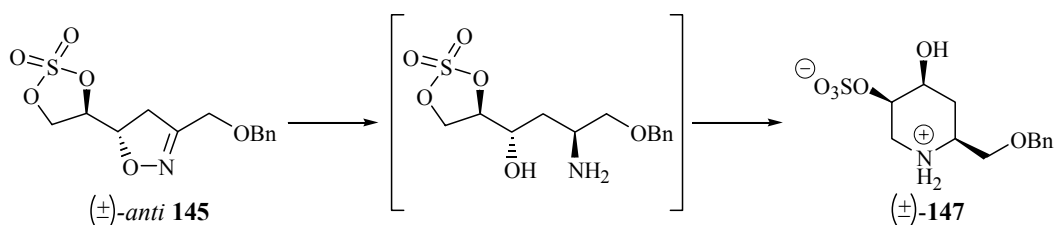


Schéma 58

Pour la pipéridine (±)-151 issue de la série *syn*, nous n'avons pas réalisé d'expériences NOE. Mais la comparaison des spectres des deux pipéridines et des constantes de couplage permet de déterminer sans ambiguïté la configuration relative du carbone en position 5 (**Figure 43**).

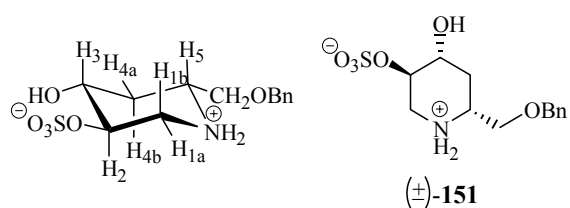


Figure 43

On observe en effet de grandes constantes de couplage entre H_{4b} et H_3 (environ 12 Hz) et entre H_{4b} et H_5 (environ 11 Hz), ainsi qu'entre H_2 et H_{1b} (environ 11 Hz) et entre H_2 et H_3 (environ 9 Hz). Pour ce composé, le signal correspondant au proton H_2 est un doublet de doublets dédoublé bien défini. Ainsi, de la même manière que précédemment, la réduction de l'imine s'est effectuée du même côté que l'hydroxyle (**Schéma 59**).

⁷⁸ Schaller, C. ; Vogel, P. ; Jäger, V. *Carbohydr. Res.* **1998**, 314, 25-35.

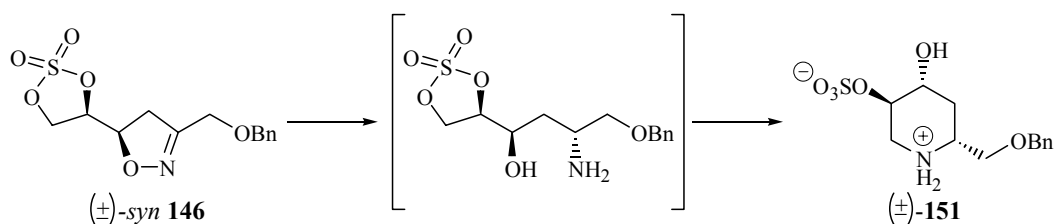


Schéma 59

II.2.2.d. Obtention des iminosucres benzylés

Pour réaliser les couplages avec les sulfates cycliques, il est nécessaire de désulfater la pipéridine. Par contre, le groupement benzyle peut être conservé, il sera supprimé lors de la déprotection finale du zwitterion obtenu. Sa présence permet d'avoir un produit moins polaire, et donc plus facile à manipuler pour les réactions de couplage.

Pour la désulfatation, nous avons envisagé une hydrolyse enzymatique à l'aide de la sulfatase d'*Helix pomatia* disponible commercialement. Malheureusement, le produit zwitterionique n'est pas substrat de cette enzyme. L'hydrolyse n'a donc jamais eu lieu quelles que soient les conditions testées.

Nous avons finalement opté pour une méthode chimique. La désulfatation des pipéridines zwitterioniques (±)-147 et (±)-151 s'est effectuée dans le 1,4-dioxane en milieu fortement acide⁷⁹. Elle a permis l'obtention des pipéridines polyhydroxylées (±)-152 et (±)-153 avec des rendements respectifs de 92 % et 87 % (Schéma 60).

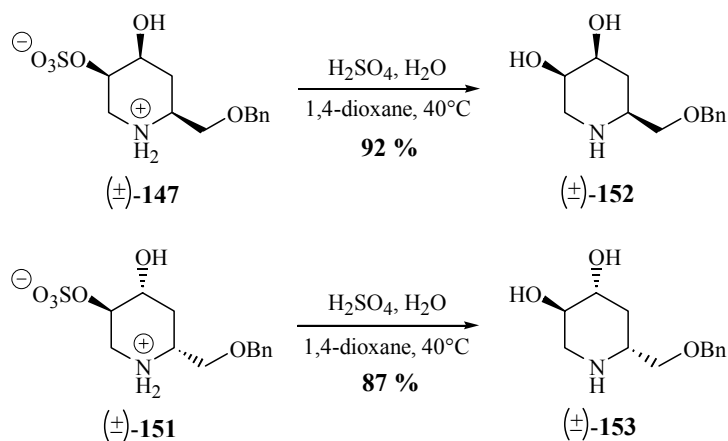


Schéma 60

La structure de ces deux pipéridines a été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution ($[M + H]^+ = 238,1442$ et $238,1441$) et par RMN. On observe un blindage important des signaux correspondants au proton H₂ et au carbone C₂. En effet, la perte du groupement sulfate fait passer le déplacement chimique pour le proton de 4,8 ppm à 3,8 ppm et pour le carbone de 73 ppm à 67 ppm. Les spectres obtenus pour (±)-152 sont en accord avec ceux décrits dans la littérature pour le produit optiquement actif trihydroxylé correspondant⁸⁰.

⁷⁹ Barco, A. ; Benetti, S. ; De Risi, C. ; Marchetti, P. ; Pollini, G. P. ; Zanirato, V. *Tetrahedron* **1999**, 55, 5923-5930.

⁸⁰ Andersen, S. M. ; Ekhart, C. ; Lundt, I. ; Stütz, A. E. *Carbohydr. Res.* **2000**, 326, 22-33.

Le mélange racémique (\pm)-**152** dérivé de la série *anti* est de configuration D,L-*manno*. Il s'agit donc d'un analogue de la désoxymannojirimycine **24** (Figure 44).

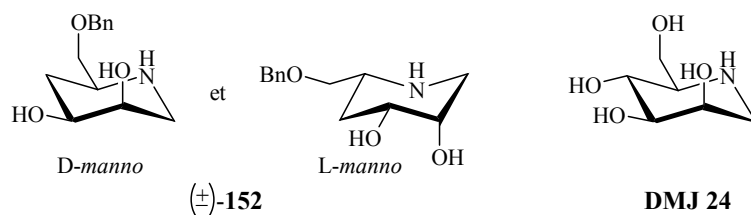


Figure 44

Le mélange racémique (\pm)-**153** dérivé de la série *syn* est de configuration D,L-*gluco*. Il s'agit d'un analogue de la désoxynojirimycine **23** (Figure 45).

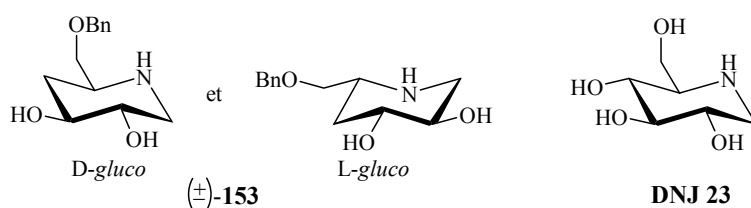


Figure 45

Les iminosucres partiellement benzylés des deux séries *anti* et *syn* ont donc été obtenus en six étapes avec de bons rendements. La synthèse en série *anti* a donné de très bons résultats, alors que celle en série *syn* a été plus délicate à mettre en œuvre, car l'isoxazoline *syn* est minoritaire lors de l'étape de cycloaddition. De plus, l'hydrogénolyse de l'isoxazoline sulfate s'est révélée plus difficile pour cette configuration. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication en 2002⁸¹.

Comme notre méthode de synthèse a été validée en version racémique, nous l'avons appliquée en série optiquement active.

II.2.3. Synthèse en version énantiosélective

Pour réaliser la synthèse décrite précédemment en version énantiosélective, il est nécessaire de disposer d'isoxazolines optiquement pures. Pour cela, il est possible de travailler dans l'étape de cycloaddition 1,3-dipolaire avec un alcène optiquement actif.

La cycloaddition avec un dérivé du butènediol de configuration (*S*) donnera accès aux iminosucres de configurations *D-manno* et *L-gluco* (Schéma 61).

⁸¹ Lemaire, M. ; Veny, N. ; Gefflaut, T. ; Gallienne, E. ; Chênevert, R. ; Bolte, J. *Synlett* **2002**, 1359-1361.

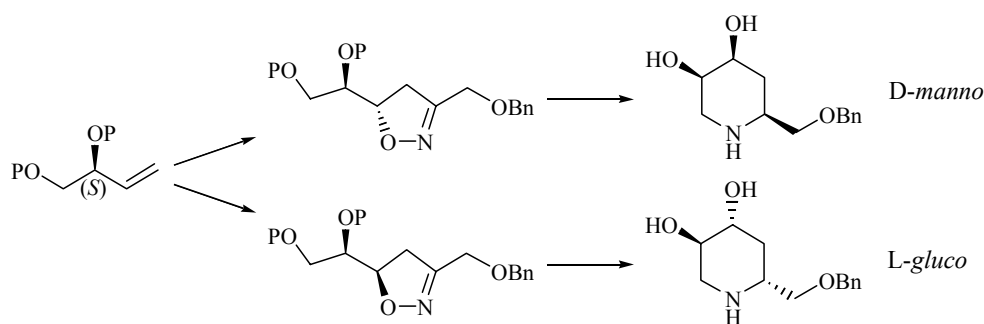


Schéma 61

La cycloaddition avec un dérivé du butènediol de configuration (*R*) permettra la synthèse des iminosucres de configurations *L-manno* et *D-gluco* (**Schéma 62**).

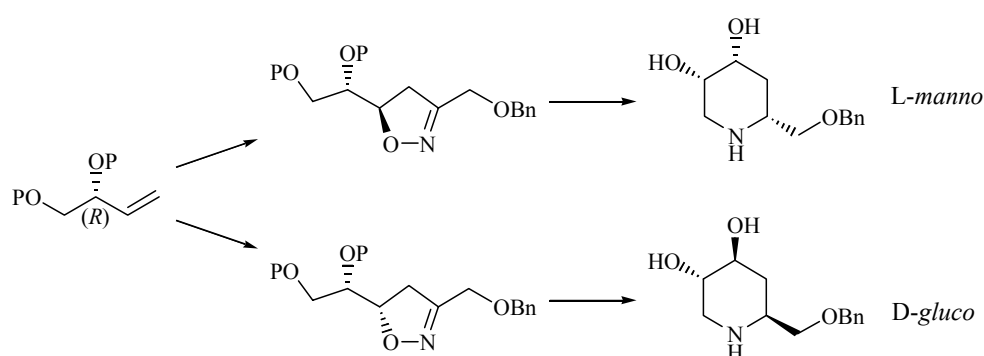


Schéma 62

II.2.3.a. Synthèse de l'alcène de configuration (*S*) par voie chimique

L'alcène de configuration (*S*) peut être obtenu très facilement à partir du D-mannitol. En effet, l'alcène protégé désiré peut être préparé à partir du D-glycéraldéhyde protégé, celui-ci étant obtenu par coupure oxydante d'un mannitol protégé en positions 1, 2, 5 et 6 (**Schéma 63**).

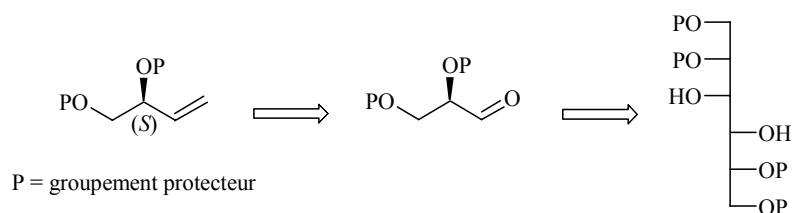


Schéma 63

Dans un premier temps, nous avons logiquement cherché à synthétiser le (4*S*)-2,2-diméthyl-4-vinyl-1,3-dioxolane optiquement actif correspondant à l'alcène utilisé dans la synthèse racémique. Cependant, nous avons rencontré de nombreux problèmes pour purifier cet alcène volatil. Nous avons donc finalement choisi de travailler avec le (2*S*)-1,2-*O*-cyclohexylidènebut-3-ène-1,2-diol **156**⁸².

⁸² Bergmeier, S. C. ; Stanchina, D. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2852-2859.

Le 1,2:5,6-di-*O*-cyclohexylidène-D-mannitol **154** commercial a subi une coupure oxydante par du periodate de sodium dans un mélange acétonitrile/eau pour donner le D-glycéraldéhyde protégé **155** avec un rendement de 67 % (**Schéma 64**).

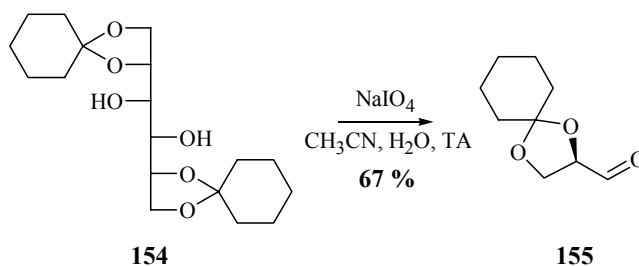


Schéma 64

Les spectres infrarouge et de RMN du ^1H sont conformes à ceux décrits dans la littérature⁸³.

L'aldéhyde **155** a ensuite été converti en alcène **156** par une réaction de Wittig avec l'ylure de méthylènetriphénylphosphorane dans le THF avec un rendement de 91 % (**Schéma 65**).

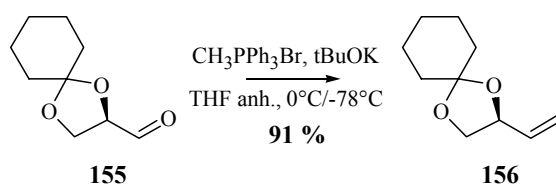


Schéma 65

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C , ainsi que le pouvoir rotatoire sont en accord avec les données de la littérature⁸².

II.2.3.b. Synthèse de l'alcène par voie chimioenzymatique

Parallèlement à cette synthèse chimique, deux stratégies principales par voie chimioenzymatique peuvent être envisagées pour obtenir cet alcène optiquement actif. La première consiste à dédoubler le butènediol racémique au moyen par exemple d'une lipase. Elle a déjà été développée plusieurs fois avec succès dans la littérature^{84,85}. La seconde stratégie, plus originale, consiste à réduire stéréosélectivement la cétone correspondante. Nous avons choisi de développer cette méthodologie, en l'appliquant à un composé α,β -éthylénique de type **F**, obtenu en deux étapes à partir du but-2-yne-1,4-diol **157**⁸⁶. La réduction stéréosélective de la fonction cétone de ce composé, accompagnée de l'hydrolyse de sa fonction ester, peuvent être envisagées au moyen de différentes enzymes isolées ou de microorganismes entiers (**Schéma 66**).

⁸³ Sugiyama, T. ; Sugawara, H. ; Watanabe, M. ; Yamashita, K. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 1841-1844.

⁸² Bergmeier, S. C. ; Stanchina, D. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2852-2859.

⁸⁴ Boaz, N. W. ; Zimmerman, R. L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 153-156.

⁸⁵ Dallanoce, C. ; De Amici, M. ; Carrea, G. ; Secundo, F. ; Castellano, S. ; De Micheli, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2741-2751.

⁸⁶ Andersen, S. H. ; Das, N. B. ; Jorgensen, R. D. ; Kjeldsen, G. ; Knudsen J. S. ; Sharma, S. C. ; Torssell, K. B. G. *Acta Chem. Scand. B* **1982**, *36*, 1-14.

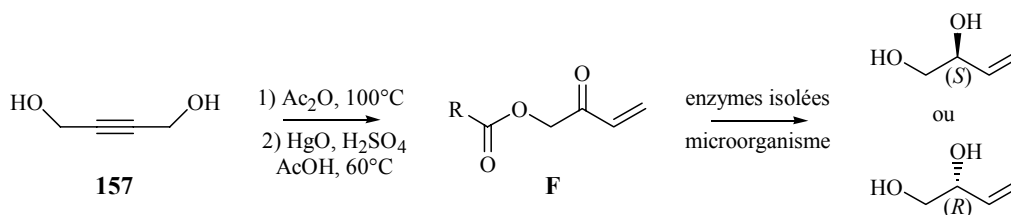


Schéma 66

Selon l'enzyme ou le microorganisme utilisé, il est possible d'obtenir le (2*S*)-but-3-ène-1,2-diol ou le (2*R*)-but-3-ène-1,2-diol, ce qui est intéressant dans l'éventualité de synthétiser les différents isomères des iminosucres désirés.

Lors d'une étude préliminaire, nous avons travaillé avec un microorganisme entier facile d'accès : la levure de boulanger. Mais il s'est avéré qu'elle réduisait également la double liaison carbone-carbone. En parallèle, nous avons également testé un système de deux enzymes isolées, une lipase et la glycérol déshydrogénase, l'enzyme qui catalyse la réduction de la dihydroxyacétone en glycérol. Dans un premier temps, la lipase de *Pseudomonas* species a permis d'hydrolyser la fonction ester des composés **158** et **159** pour donner l'hydroxycétone **160**. Le milieu a par la suite été soumis à l'action de la glycérol déshydrogénase en présence de son cofacteur le NADH. Afin de régénérer celui-ci au cours de la réaction, une autre enzyme, la formate déshydrogénase, est introduite avec son substrat, l'acide formique. Malheureusement, en comparant les vitesses de réduction de la dihydroxyacétone en présence et en absence de l'hydroxycétone **160**, on remarque que celle-ci est un inhibiteur de la glycérol déshydrogénase et il ne nous a donc pas été possible d'isoler le (2*S*)-but-3-ène-1,2-diol **161** souhaité (Schéma 67).

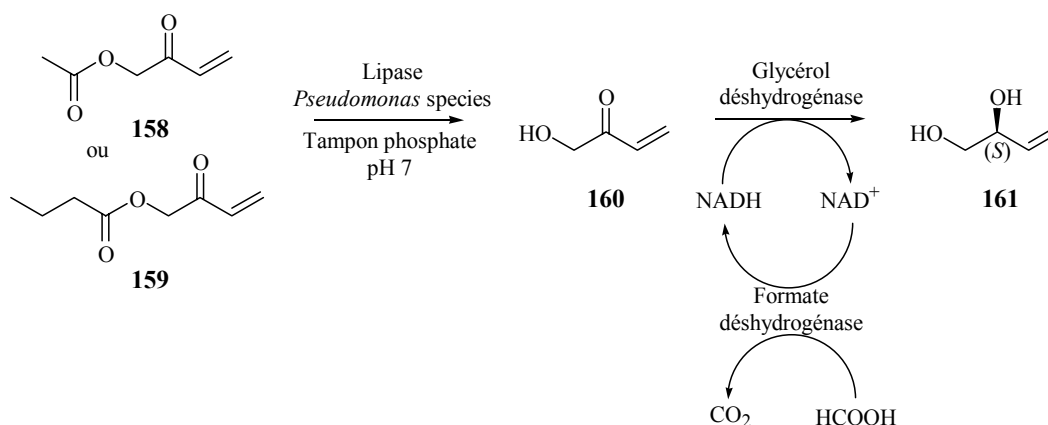


Schéma 67

Par manque de temps, nous n'avons pas pu tester d'autres microorganismes entiers ou d'autres systèmes d'enzymes isolées, pouvant nous permettre d'obtenir l'alcène (*R*) ou (*S*) optiquement actif.

II.2.3.c. Synthèse des iminosucres benzylés optiquement actifs

Disposant de l'alcène optiquement actif de configuration (*S*) grâce à la synthèse par voie chimique, nous avons pu réaliser la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire avec le nitroéthanol protégé dans les mêmes conditions que pour la synthèse en version racémique.

Ainsi la réaction de cycloaddition entre l'alcène optiquement actif **156** et l'oxyde de nitrile généré *in situ* à partir du nitroéthanol protégé **136** en présence de 1,4-phenylènediisocyanate et de triéthylamine a donné les deux isoxazoles optiquement actives *anti* **162** et *syn* **163**. Elles ont été séparées par chromatographie sur gel de silice et obtenues avec des rendements de 41 % et 14 % respectivement, soit un rapport diastéréoisomérique de 75:25 (**Schéma 68**). Comme avec le groupement protecteur acétonide, on observe la formation de sous-produits, qui n'ont pas été isolés et qui sont difficiles à séparer des produits désirés.

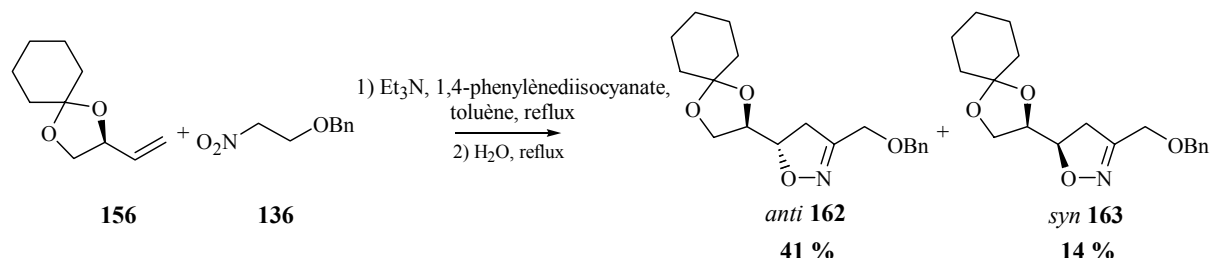


Schéma 68

Ces deux isoxazoles ont été caractérisées par spectrométrie de masse ($[M+H]^+ = 332$). La présence du cyclohexylidène, du groupement benzyle et de la fonction imine a été montrée par spectroscopie de RMN du ¹H et du ¹³C. Les déplacements chimiques observés sont voisins de ceux obtenus en série racémique avec le groupement protecteur acétonide.

Comme pour la version racémique, la suite de la synthèse a été menée en parallèle dans les deux séries *anti* et *syn*.

Les isoxazoles *anti* **162** et *syn* **163** ont été déprotégées par action d'une résine acide dans un mélange acétique/eau pour donner les isoxazoles diols *anti* **164** et *syn* **165** avec des rendements respectifs de 81 % et 89 % (**Schéma 69**).

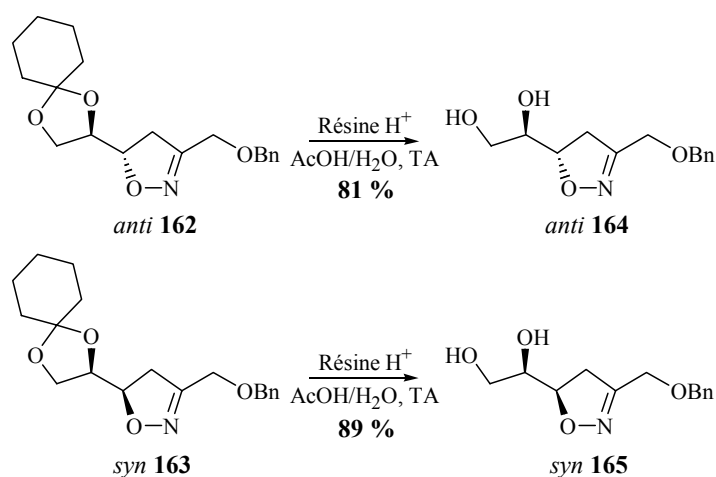


Schéma 69

Les spectres de RMN du ¹H et du ¹³C sont identiques à ceux obtenus en série racémique et les pouvoirs rotatoires sont conformes aux données de la littérature⁷⁰.

⁷⁰ Gefflaut, T. ; Martin, C. ; Delor, S. ; Besse, P. ; Veschambre, H. ; Bolte, J. J. *Org. Chem.* **2001**, *66*, 2296-2301.

La suite de la synthèse est identique à celle réalisée en version racémique. Les diols *anti* **164** et *syn* **165** ont donc été convertis en sulfites cycliques *anti* **166** et *syn* **167** par action de chlorure de thionyle en présence de pyridine avec des rendements de 81 % et 85 % respectivement (**Schéma 70**). Ces sulfites ont ensuite été oxydés en sulfates *anti* **168** et *syn* **169** par action d'un catalyseur au ruthénium et d'un cooxydant, le periodate de sodium, dans un mélange acétonitrile/eau avec des rendements respectifs de 82 % et 38 %. En raison des difficultés rencontrées en série racémique pour oxyder le sulfite *anti* avec du chlorure de ruthénium, nous avons également utilisé de l'oxyde de ruthénium dans ce cas.

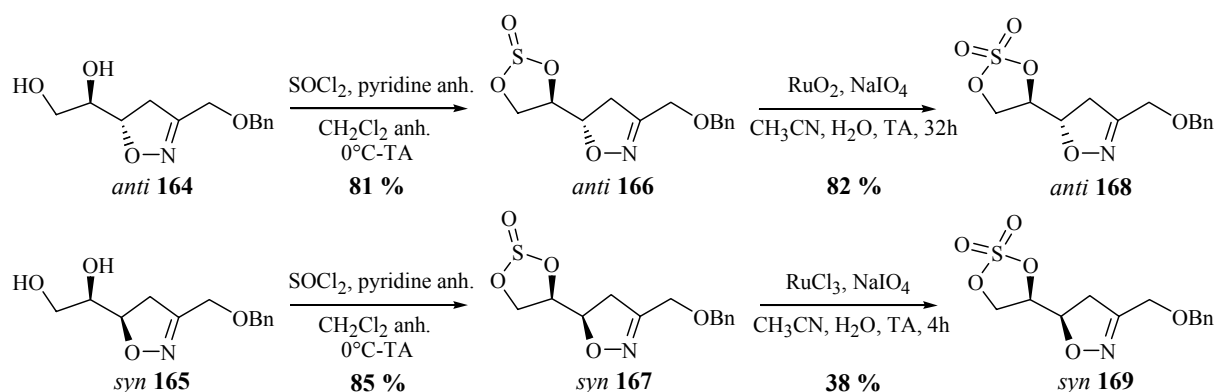


Schéma 70

Le faible rendement observé pour l'oxydation du sulfite *syn* est dû à une erreur de manipulation ponctuelle. Cette réaction n'a été effectuée qu'une seule fois.

L'étape d'hydrogénolyse des isoxazolines sulfates optiquement actives *anti* **168** et *syn* **169** a permis d'obtenir les pipéridines zwitterioniques **170** et **171** avec des rendements de 77 % et 34 % respectivement (**Schéma 71**).

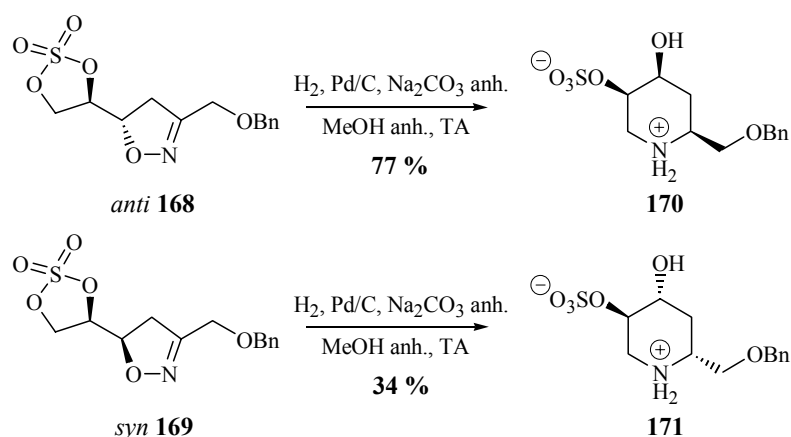


Schéma 71

Ces pipéridines zwitterioniques ont ensuite été désulfatées en milieu fortement acide pour donner les iminosucres benzylés **172** et **173** avec des rendements respectifs de 93 % et 86 % (**Schéma 72**).

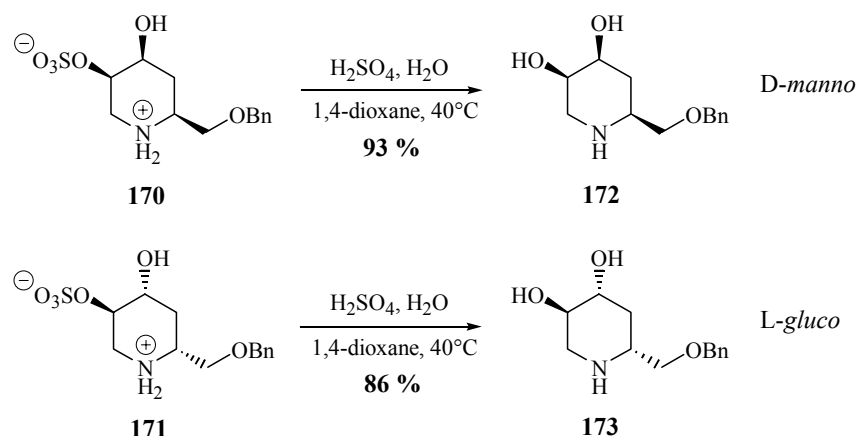


Schéma 72

Les spectres de RMN de l'ensemble des produits optiquement actifs synthétisés sont identiques à ceux obtenus pour les produits racémiques correspondants. La pipéridine **172** de configuration *D-manno* a un pouvoir rotatoire de -21,5 dans l'eau. La pipéridine **173** de configuration *L-gluco* a un pouvoir rotatoire de -28,5 dans l'eau.

Nous avons donc obtenu en six étapes la 1,4-D-didésoxymannojirimycine benzylée **172** avec de bons rendements, et la 1,4-L-didésoxynojirimycine benzylée **173**, avec des rendements plus modestes.

A notre connaissance, parmi les pipéridines trihydroxylées de configuration *manno* ou *gluco*, seule la 1,4-D-didésoxymannojirimycine optiquement active **177** a déjà été synthétisée par Lundt et coll. à partir du 3-désoxy-D-ribo-hexose protégé **174**⁸⁰. L'action de la glucose isomérase sur l'azide **175** a fourni le dérivé du D-fructofuranose **176**, qui par hydrogénation catalytique a conduit à la 1,4-didésoxymannojirimycine **177** avec de bons rendements et une grande diastéréosélectivité (**Schéma 73**).

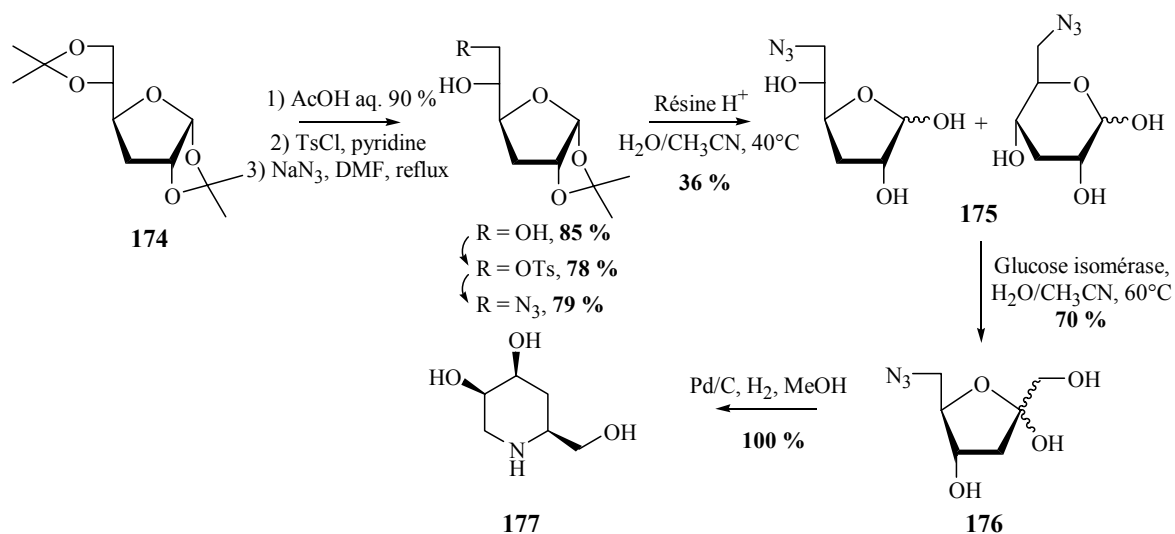


Schéma 73

⁸⁰ Andersen, S. M. ; Ekhart, C. ; Lundt, I. ; Stütz, A. E. *Carbohydr. Res.* **2000**, 326, 22-33.

II.3. Synthèse des iminosucres avec R = CO₂H

Le succès des synthèses précédentes avec R = CH₂OBn nous a encouragé à appliquer notre méthode à la synthèse d'iminosucres analogues de l'acide pipécolique.

II.3.1. Synthèse du précurseur de l'oxyde de nitrile

Pour accéder à ces pipéridines, l'isoxazoline de départ a été obtenue, selon un protocole décrit dans la littérature⁷³, par cycloaddition 1,3-dipolaire entre le butènediol protégé et l'oxyde de nitrile généré *in situ* à partir du 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle **179** (Schéma 74).

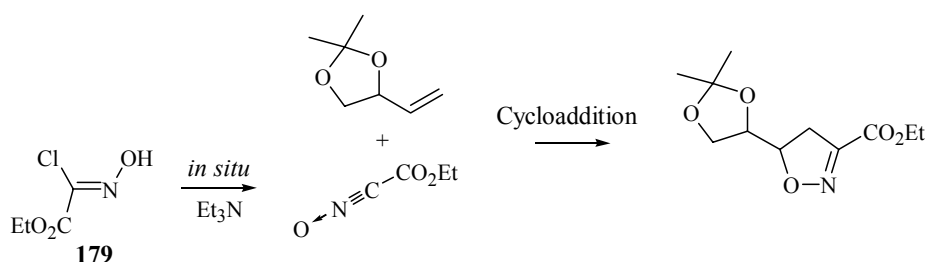


Schéma 74

Le 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle **179** est un produit commercial. Mais il peut être préparé en grande quantité à partir de l'ester éthylique de la glycine **178** (Schéma 75)⁸⁷.

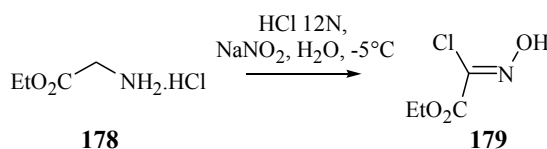


Schéma 75

II.3.2. Synthèse en version racémique

Comme pour la synthèse des analogues de la désoxynojirimycine, nous avons souhaité dans un premier temps valider notre méthode de synthèse en version racémique.

II.3.2.a. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire

Pour synthétiser les isoxazolines avec R = CO₂H, la réaction de cycloaddition n'a pas nécessité la présence d'isocyanate. En effet, le 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle **179** en présence de triéthylamine génère *in situ* l'oxyde de carbétoxyformonitrile **180** (Schéma 76)⁸⁷.

⁷³ Kozikowski, A. P. ; Ghosh, A. K. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2762-2772.

⁸⁷ Kozikowski, A. P. ; Adamczyk, M. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 366-372.

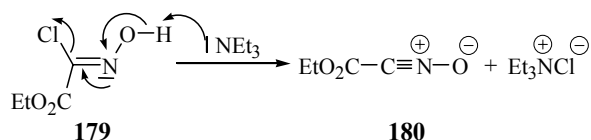


Schéma 76

Ainsi la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre le (\pm)-2,2-diméthyl-4-vinyl-1,3-dioxolane **138** et le 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle **179** en présence de triéthylamine dans l'éther a conduit à l'obtention des deux isoxazolines (\pm)-*anti* **181** et (\pm)-*syn* **182**. Elles ont été séparées par chromatographies sur gel de silice et obtenues avec des rendements respectifs de 61 % et 20 %, soit un rapport diastéréoisomérique de 75:25 (**Schéma 77**).

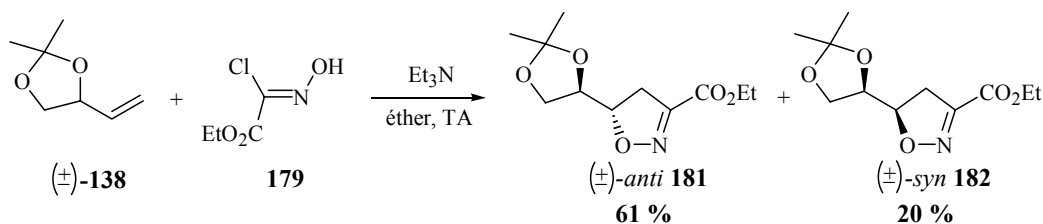


Schéma 77

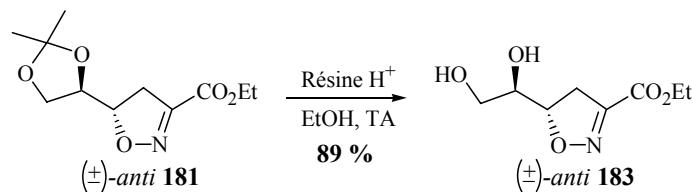
Cette réaction s'est également révélée très régiosélective, fournissant principalement l'isoxazoline disubstituée en positions 3 et 5. Comme précédemment décrit, la présence d'un centre asymétrique et d'un substituant oxygéné en position allylique a permis une diastéréosélectivité importante en faveur du composé *anti*.

Les données spectroscopiques obtenues pour ces deux isoxazolines sont conformes à celles de la littérature⁷³.

II.3.2.b. Synthèse des isoxazolines sulfates

Comme précédemment, les groupements hydroxyles des isoxazolines ont été déprotégés, convertis en sulfites cycliques, puis en sulfates cycliques.

La déprotection des isoxazolines (\pm)-*anti* **181** et (\pm)-*syn* **182** s'est effectuée dans l'éthanol en présence d'une résine acide et a conduit aux diols (\pm)-*anti* **183** et (\pm)-*syn* **184** avec des rendements de 89 % et 84 % respectivement (**Schéma 78**).



⁷³ Kozikowski, A. P. ; Ghosh, A. K. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2762-2772.

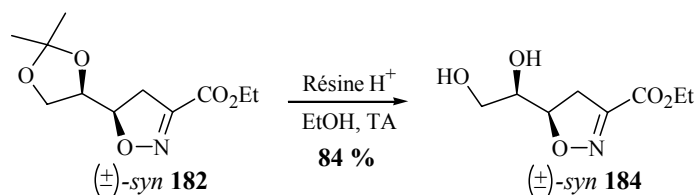


Schéma 78

Les spectres de RMN de ces composés sont identiques à ceux décrits dans la littérature pour les diols obtenus par hydrolyse d'un groupement cyclohexylidène⁸⁸.

Les diols ont ensuite été convertis en sulfites cycliques (±)-*anti* **185** et (±)-*syn* **186** par action de chlorure de thionyle en présence de pyridine avec des rendements respectifs de 83 % et 78 %. Puis ces sulfites ont été oxydés en sulfates cycliques (±)-*anti* **187** et (±)-*syn* **188** par du chlorure de ruthénium associé à du periodate de sodium avec des rendements de 80 % et 78 % respectivement (**Schéma 79**). On peut noter que dans ce cas, l'utilisation du chlorure de ruthénium dans les deux séries *anti* et *syn* n'a pas entraîné la formation de sous-produits.

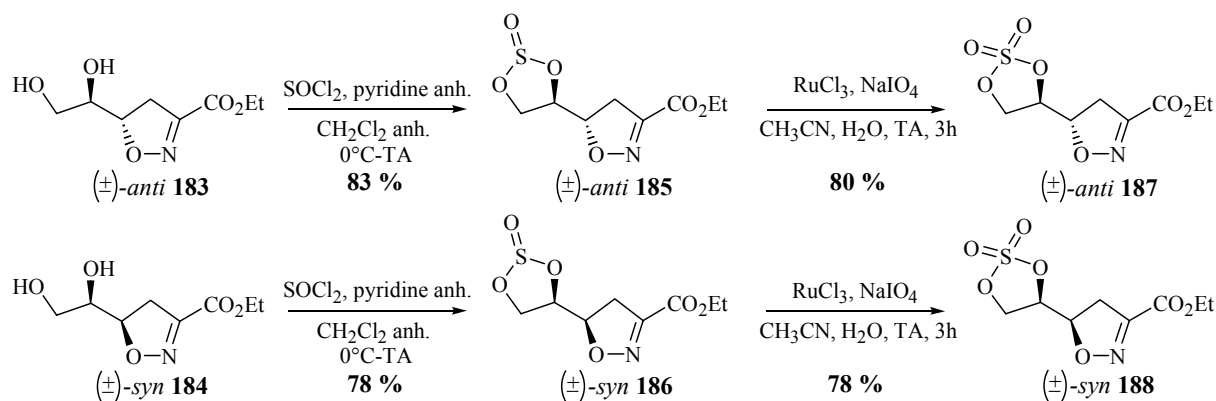


Schéma 79

Les données spectroscopiques de RMN et d'infrarouge obtenues pour les deux sulfites et les deux sulfates sont en accord avec les structures attendues. En effet, elles montrent la présence du groupement éthyle et de la fonction imine, ainsi que la disparition des hydroxyles. Les spectres de masse haute résolution réalisés les confirment définitivement ($[M + H]^+ = 250,0390$ pour les sulfites et $[M + \text{NH}_4]^+ = 283,0606$ pour les sulfates).

II.3.2.c. Réaction d'hydrogénolyse des isoxazoline sulfates

Différents essais d'hydrogénolyse de l'isoxazoline sulfate (±)-*anti* **187** ont été réalisés en milieu anhydre et basique conformément aux observations déjà effectuées. L'emploi de méthanol comme solvant a entraîné une transestérification et a conduit à un mélange d'esters éthylique et méthylique. La réaction a donc été effectuée dans l'éthanol. Mais elle a conduit à l'obtention d'un mélange de deux diastéréoisomères. En effet, si la cyclisation intramoléculaire est bien régiosélective, la réduction de l'imine intermédiaire n'est peut-être pas stéréosélective, contrairement à la série avec $R = \text{CH}_2\text{OBn}$. En vue d'améliorer cette

⁸⁸ Gravestock, M. B. ; Paton, R. M. ; Todd, C. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 2723-2730.

stéréosélectivité, d'autres essais ont été réalisés dans le THF. Mais, de nouveau, deux pipéridines ont été obtenues. Cependant nous avons observé, par spectroscopie de RMN du produit brut, la formation avec ce solvant d'un nombre moins important de sous-produits. Il sera nécessaire de vérifier s'il n'y a pas épimérisation de l'iminosucre au cours de la réaction. Les deux pipéridines (\pm)-**189** et (\pm)-**190**, ainsi obtenues, ont pu être séparées par chromatographie sur gel de silice avec des rendements respectifs de 33 % et 44 %, soit un rapport diastéréoisomérique de 43:57 (**Schéma 80**).

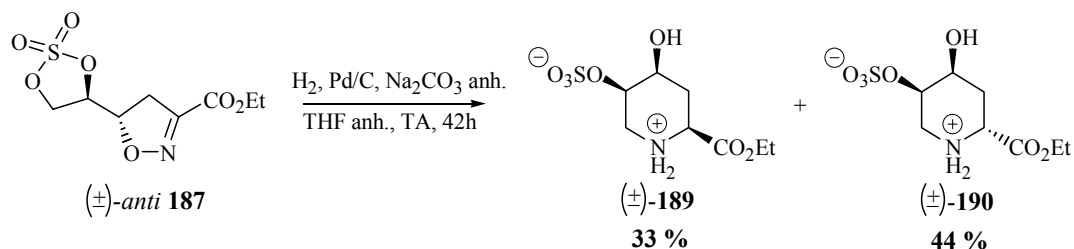


Schéma 80

L'iminosucre zwitterionique (\pm)-**189** a été caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution ($[M - H + 2Na]^+ = 314,0300$) et par RMN. Le spectre de RMN du ¹H ressemble fortement à celui obtenu, dans la série avec R = CH₂OBn, pour la pipéridine zwitterionique (\pm)-**147** de configuration D,L-*manno*. On peut donc proposer la même stéréochimie pour ce produit (**Figure 46**).

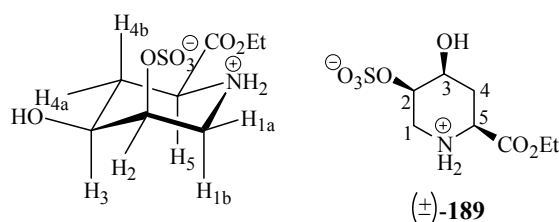


Figure 46

Les constantes de couplage mesurées sont en accord avec cette conformation. En effet, le signal correspondant au proton H_{4b} est un pseudo quadruplet avec une grande constante de couplage (environ 12 Hz), tandis que le proton H₂ donne un pseudo singulet, car il ne présente que des petites constantes de couplage.

L'autre iminosucre a également été caractérisé par spectroscopie de RMN. Les spectres du ¹H et du ¹³C obtenus sont en accord avec la structure proposée. Mais en raison de la mauvaise résolution du spectre du ¹H, les constantes de couplage sont difficiles à déterminer précisément. Nous ne pouvons donc pas proposer avec ce spectre une conformation préférentielle pour cette pipéridine. Elle a cependant pu être déterminée par la suite grâce au spectre de la pipéridine désulfatée (**Figure 48**).

Un seul essai d'hydrogénolyse de l'isoxazoline sulfate (\pm)-*syn* **188** a été effectué dans le THF anhydre et en présence de carbonate de sodium. Comme dans le cas où R = CH₂OBn, il semble que la réaction soit nettement moins propre qu'avec l'isoxazoline (\pm)-*anti* **187**. Les différents produits obtenus n'ont pas pu être séparés convenablement et leurs structures n'ont donc pas été élucidées.

Les deux iminosucres obtenus (\pm)-**189** et (\pm)-**190** sont de structure proche avec le produit naturel **191**, extrait d'éponges marines (**Figure 47**)⁸⁹. Il a été montré que ce composé est un ligand sélectif des récepteurs du glutamate de type acide *N*-méthyl-D-aspartique.

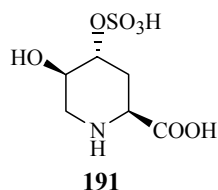
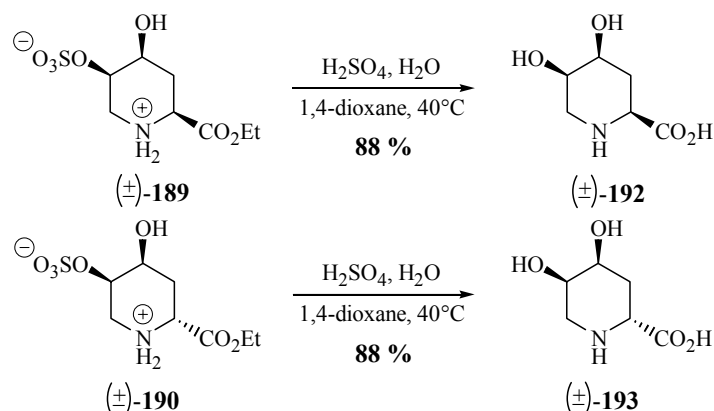


Figure 47

Les déplacements chimiques proposés pour ce produit sont en accord avec ceux déterminés pour nos iminosucres, en tenant compte de l'inversion des groupements sulfate et hydroxyle et de l'absence de l'ester éthylique.

II.3.2.d. Obtention des iminosucres carboxyliques

Les deux pipéridines zwitterioniques (\pm)-**189** et (\pm)-**190** ont été désulfatées en milieu fortement acide dans le dioxane et ont donné les deux iminosucres carboxyliques (\pm)-**192** et (\pm)-**193** avec un rendement de 88 % dans les deux cas (**Schéma 81**). Le milieu employé a logiquement entraîné, en plus de la désulfatation, l'hydrolyse de l'ester.



Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C obtenus pour ces deux composés montrent la disparition du groupement éthyle. Les déplacements chimiques du H_2 et du C_2 sont nettement inférieurs à ceux obtenus pour le produit de départ, ce qui montre que la désulfatation a bien eu lieu. Le spectre de ^1H de l'iminosucre (\pm)-**193** permet de mesurer les constantes de couplage et de proposer une conformation préférentielle pour ce composé (**Figure 48**). En effet, on observe pour le proton H_{4b} un doublet de doublets dédoublé avec deux grandes constantes de couplage (environ 11 Hz et 15 Hz) et pour H_2 un doublet de doublets dédoublé avec une seule grande constante de couplage (environ 10 Hz).

⁸⁹ Sakai, R. ; Matsubara, H. ; Shimamoto, K. ; Jimbo, M. ; Kamiya, H. ; Namikoshi, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 784-787.

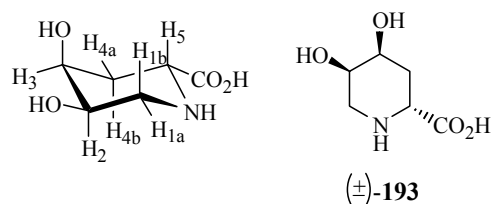


Figure 48

De nombreux dérivés diversement hydroxylés de l'acide pipécolique **194** ont été isolés de plantes, notamment le composé optiquement actif **195** des feuilles de *Calliandra pittieri*⁹⁰ et le composé optiquement actif **196** des feuilles de *Calliandra haematocephalla* et de *Derris elliptica*⁹¹ (**Figure 49**).

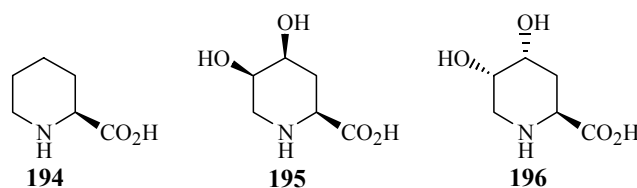


Figure 49

Nous ne pouvons pas comparer les données spectroscopiques obtenues pour nos produits racémiques avec les données publiées, car les spectres de RMN n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions. On relève cependant de fortes similitudes. A notre connaissance, il n'existe pas de synthèses récentes des produits **195** et **196** racémiques ou optiquement actifs.

De plus, les iminosucres synthétisés peuvent également être considérés comme des analogues azotés d'acides uroniques. Ainsi le mélange racémique (+)-**192**, de configuration D,L-*manno*, est un analogue de l'acide mannopyranuronique et le mélange racémique (+)-**193**, de configuration D,L-*allo*, est un analogue de l'acide allopyranuronique (**Figure 50**). On peut donc supposer que ces composés seront actifs vis-à-vis des glycosidases hydrolysant les acides uroniques, comme par exemple les glucuronidases.

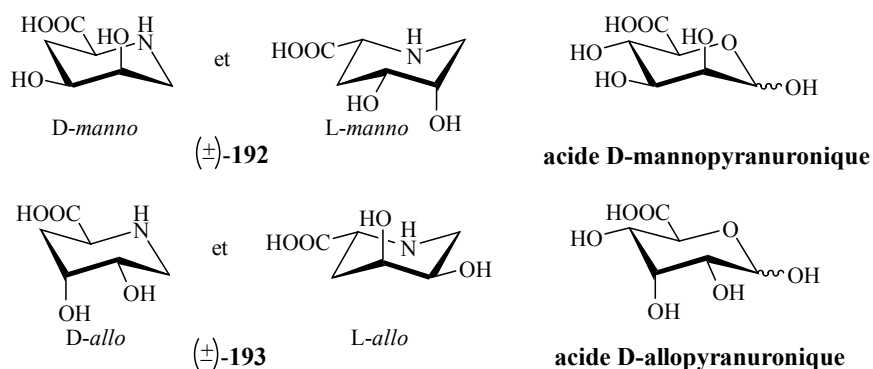


Figure 50

⁹⁰ Bleecker, A. B. ; Romeo, J. T. *Phytochemistry*, **1983**, 22, 1025-1026.

⁹¹ Marlier M. ; Dardenne, G. ; Casimir, J. *Phytochemistry*, **1976**, 15, 183-185.

Nous avons donc obtenu dans la série *anti* deux iminosucres carboxyliques racémiques en six étapes avec de bons rendements. En effet, contrairement au cas des iminosucres benzylés, la réaction d'hydrogénolyse de l'isoxazoline sulfate (\pm)-*anti* **187** a conduit à l'obtention d'un mélange de diastéréoisomères séparables par chromatographie sur gel de silice. Nous disposons aussi de l'isoxazoline sulfate issue de la série *syn*. Elle a été synthétisée en quatre étapes avec également de bons rendements, excepté lors de l'étape de cycloaddition. Les deux iminosucres issus de cette isoxazoline sulfate pourront être obtenus par hydrogénolyse, même si les difficultés rencontrées dans la série *syn* avec R = CH₂OBn semblent se reproduire aussi dans cette série.

Notre méthodologie a donc été validée en version racémique *anti*. Quant à la série *syn*, il reste encore deux étapes à réaliser. Par manque de temps, nous n'avons pas pu appliquer ces résultats en synthèse énantiosélective.

III. Synthèse des sulfates cycliques

Pour évaluer plus particulièrement l'influence de la nature de l'hétérocycle sur l'inhibition des glycosidases, nous avons choisi de synthétiser le sulfate cyclique **71**, dérivé du L-érythritol et permettant d'obtenir une chaîne sulfatée identique à celle du salacinol. Nous avons également travaillé avec le sulfate cyclique **77**, dérivé du D-érythritol et donnant la chaîne énantiomère de celle du salacinol. Cela nous permettra aussi d'étudier l'influence de la stéréochimie de cette chaîne sur l'inhibition (**Schéma 82**).

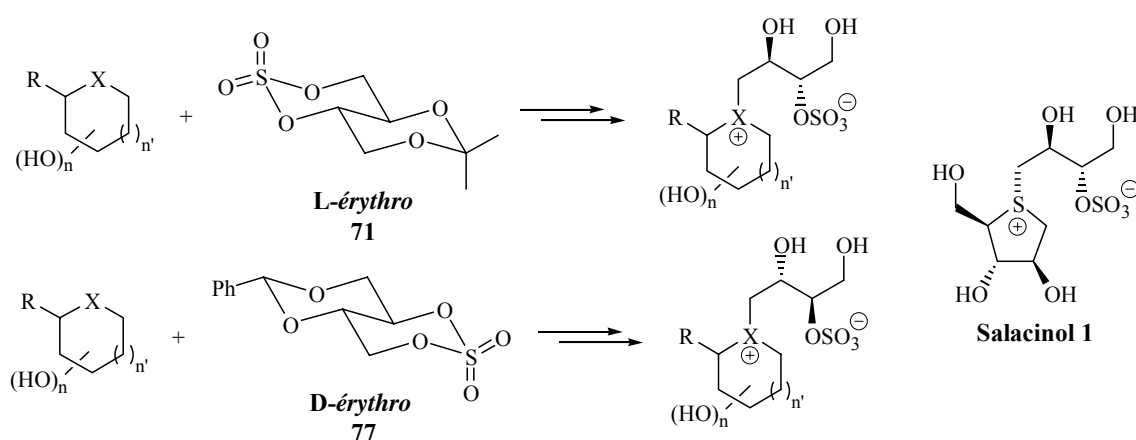


Schéma 82

III.1. Stratégie de synthèse

Les sulfates cycliques dérivés du L- et du D-érythritol peuvent être obtenus en quatre étapes à partir respectivement du L- et du D-glucose. Cependant, le coût très élevé du L-glucose nous a incité à utiliser une méthode de synthèse nous permettant d'obtenir ces deux sulfates à partir du D-glucose. Cette méthode, décrite sans mode opératoire, ni caractérisation

des produits par Muraoka *et al.*⁶⁰ a été présentée lors de l'étude bibliographique (**Schéma 30**). Elle est basée sur la synthèse d'un intermédiaire commun : le 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **199**. Le sulfate cyclique de la série D-érythro **77** est obtenu directement à partir de ce diol. Le sulfate cyclique de la série L-érythro **71** est obtenu de la même manière à partir du 2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **202**. Ce dérivé du L-érythritol est obtenu par protection et déprotection sélective de l'intermédiaire commun **199**, synthétisé à partir du D-glucose. Ces étapes permettent de passer d'un dérivé du D-érythritol à un dérivé du L-érythritol (**Schéma 83**).

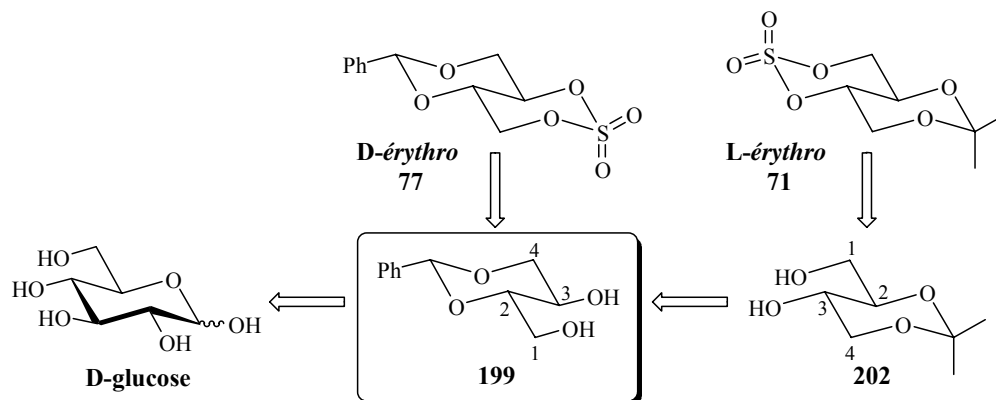


Schéma 83

III.2. Synthèse de l'intermédiaire commun

Le 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **199** est l'intermédiaire commun aux synthèses permettant d'obtenir les deux sulfates cycliques des séries D- et L-érythro. Il est obtenu à partir du 4,6-*O*-benzylidène-D-glucose **197** par coupure oxydante et réduction *in situ* de l'aldéhyde formé.

Le 4,6-*O*-benzylidène-D-glucose **197** a été obtenu avec un rendement de 31 % à partir du D-glucose par action de benzaldéhyde diméthylacétal en présence d'un catalyseur acide dans le DMF, selon le protocole décrit par Barili *et al.*⁹² (**Schéma 84**). Ces auteurs mentionnent un rendement de 72 % que nous n'avons jamais pu reproduire, malgré les différents essais réalisés.

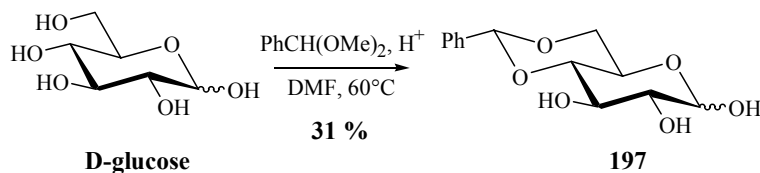


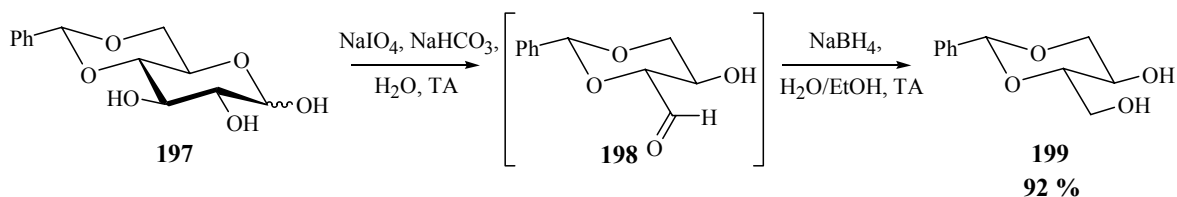
Schéma 84

Les données spectroscopiques de ce composé sont en accord avec celles mentionnées dans l'article⁹².

⁶⁰ Muraoka, O. ; Ying, S. ; Yoshikai, K. ; Matsuura, Y. ; Yamada, E. ; Minematsu, T. ; Tanabe, G. ; Matsuda, H. ; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1503-1505.

⁹² Barili, P. L. ; Berti, G. ; Catelani, G. ; Cini, C. ; D'Andrea, F. ; Mastrorilli, E. *Carbohydr. Res.* **1995**, *278*, 43-57.

Le 4,6-*O*-benzylidène-D-glucose **197** a ensuite subi une coupure oxydante par du periodate de sodium en milieu basique fournissant l'aldéhyde **198**, qui a ensuite été réduit *in situ* par du borohydrure de sodium pour donner le 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **199**. Le rendement global de cette réaction est de 92 % (**Schéma 85**).

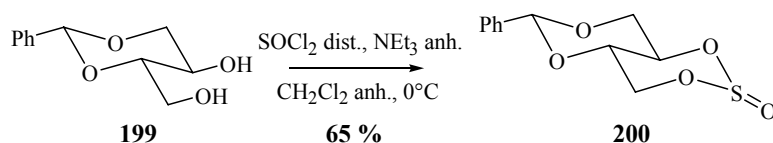


Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C pour ce composé, ainsi que son pouvoir rotatoire, sont conformes aux données de la littérature⁵⁵.

III.3. Synthèse du sulfate cyclique de la série D-érythro

A partir du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **199**, on peut préparer le sulfate cyclique **77** correspondant en deux étapes. De la même manière que pour les isoxazolines, il faut d'abord synthétiser le sulfite cyclique, puis l'oxyder en sulfate cyclique.

Pour obtenir le sulfite cyclique, nous avons utilisé, dans un premier temps, le mode opératoire décrit par Pinto et coll.⁵⁵. En effet, ils ont préparé le sulfite désiré **200** par action de chlorure de thionyle en présence de triéthylamine avec un rendement de 82 %. Bien que ce mode opératoire soit similaire à celui utilisé lors de la synthèse des isoxazolines sulfites, ce sulfite 1,3-cyclique s'est révélé plus difficile à synthétiser que les sulfites 1,2-cycliques précédents. En effet, nous avons effectué différents essais de mise au point et rencontré de nombreux problèmes pour obtenir ce produit avec un rendement similaire à celui de la littérature. Il semble en fait très instable et se dégrade facilement au cours du traitement et de la purification. Ainsi, notre rendement pour isoler ce produit n'a jamais dépassé 65 % (**Schéma 86**).

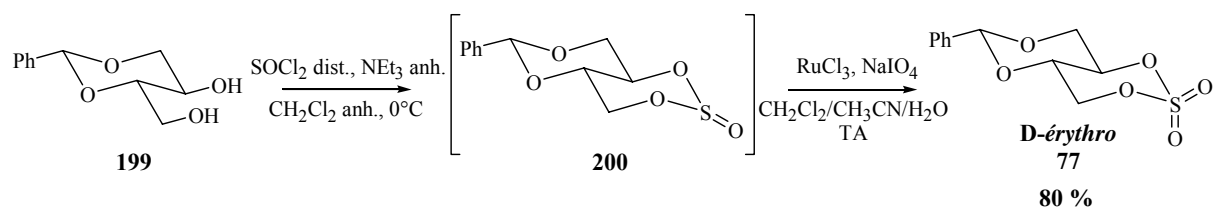


Les spectres de RMN obtenus pour ce produit sont en accord avec ceux de la littérature⁵⁵.

Par la suite, nous avons réalisé l'étape suivante, l'oxydation en sulfate cyclique, directement sur le sulfite brut, obtenu après simple évaporation du milieu réactionnel. Cette oxydation s'est effectuée au moyen du système catalytique au ruthénium déjà utilisé lors de la synthèse des isoxazolines sulfates. Nous avons obtenu le sulfate cyclique de la série D-érythro

⁵⁵ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2312-2317.

77 avec un rendement de 80 % à partir du diol **199** (**Schéma 87**). Cette méthodologie améliore donc nettement le rendement obtenu pour ces deux étapes.



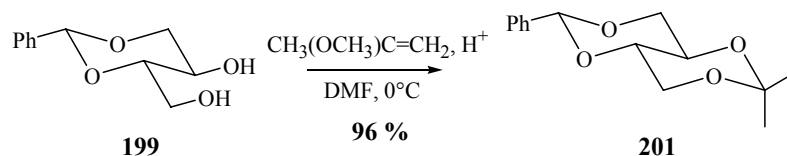
Les données spectroscopiques, ainsi que le pouvoir rotatoire du sulfate **77**, sont conformes aux données de la littérature⁵⁵.

Nous avons donc synthétisé le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** en réduisant le nombre d'étapes à trois, avec de bons rendements, excepté pour la première étape de protection du glucose. Notre synthèse est reproductible et a été effectuée sur plusieurs grammes.

III.4. Synthèse du sulfate cyclique de la série *L*-érythro

La synthèse du sulfate cyclique de la série *L*-érythro nécessite dans un premier temps de passer d'un dérivé du D-érythritol à un dérivé du L-érythritol. Pour cela, le 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **199**, intermédiaire commun aux deux synthèses, est protégé, puis déprotégé sélectivement.

Ainsi le diol **199** a été protégé sous la forme d'un acétonide par action de méthoxypropène en présence d'un catalyseur acide dans le DMF à 0°C. Le 2,4-*O*-benzylidène-1,3-*O*-isopropylidène-D-érythritol ou 1,3-*O*-benzylidène-2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **201** a ainsi été obtenu avec un rendement de 96 % (**Schéma 88**).



Les spectres de RMN obtenus sont en accord avec la structure attendue. Les carbones correspondants aux deux groupements protecteurs sont bien visibles en RMN du ¹³C ($\delta = 102,0$ ppm et $100,0$ ppm respectivement).

Le composé **201** a ensuite été déprotégé sélectivement par hydrogénolyse dans l'éthanol en présence de palladium sur charbon avec un rendement de 88 % (**Schéma 89**). Cette

⁵⁵ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2312-2317.

réaction a été effectuée sur plusieurs grammes de produit et a été assez lente. Un renouvellement du catalyseur en cours de réaction s'est avéré nécessaire.

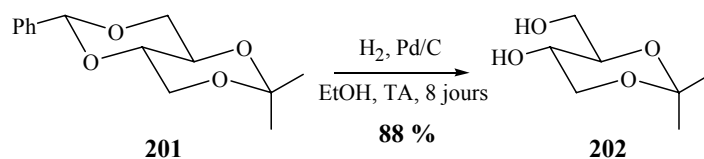


Schéma 89

Les spectres de RMN réalisés montrent la disparition des signaux correspondants aux protons et aux carbones aromatiques. Les groupements méthyles sont toujours présents.

Etant donné les problèmes rencontrés lors de la synthèse du sulfite cyclique de la série D-érythro, nous avons réalisé les deux étapes successivement et dans les mêmes conditions. Nous avons ainsi obtenu le sulfate cyclique de la série L-érythro avec un rendement de 69 % à partir du diol **202** (Schéma 90).

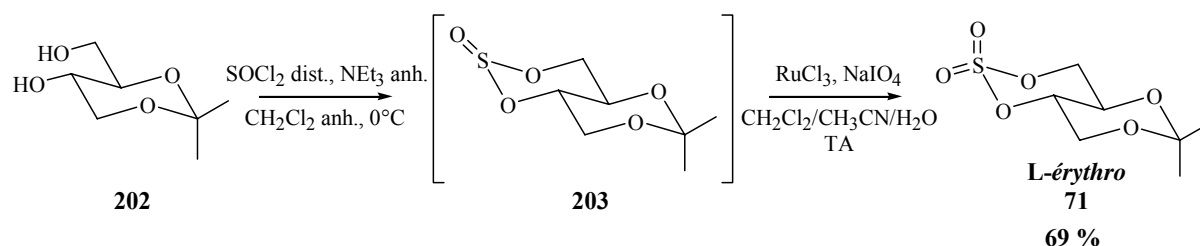


Schéma 90

Ce composé a été caractérisé par spectroscopie de RMN du ^1H et du ^{13}C . Les spectres obtenus sont en accord avec la structure du produit et les déplacements chimiques sont similaires à ceux obtenus pour le sulfate cyclique de la série D-érythro.

Nous avons donc obtenu le sulfate cyclique du 2,4-O-isopropylidène-L-érythritol **71** en cinq étapes avec également de bons rendements. Ces synthèses sont reproductibles et ont été réalisées à l'échelle du gramme. La réaction de couplage avec les deux sulfates cycliques synthétisés nous permettra d'obtenir une chaîne sulfatée identique à celle du salacinol et son énantiomère et d'étudier l'influence de la stéréochimie de cette chaîne sur l'inhibition.

IV. Synthèse des zwitterions

Nous disposons donc des deux hétérocycles azotés optiquement actifs **172** et **173**, analogues respectivement de la D-désoxymannojirimycine et de la L-désoxynojirimycine, ainsi que de six hétérocycles soufrés synthétisés dans le laboratoire des Glucides de l'Université de Picardie à Amiens (Figure 51). Ces différents hétérocycles, ainsi que la morpholine, ont été couplés avec l'un des deux ou les deux sulfates cycliques synthétisés, afin d'obtenir de nouveaux analogues du salacinol potentiellement inhibiteurs de glycosidases.

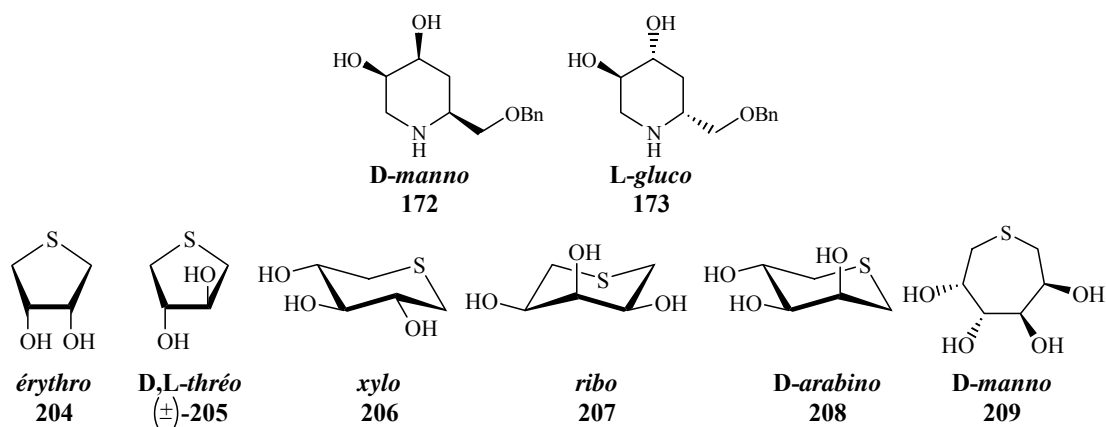


Figure 51

Nous rappelons que la stratégie couramment employée pour la synthèse de ces analogues implique l'attaque nucléophile de l'hétéroatome du cycle **A** sur le carbone le moins encombré du sulfate cyclique **B**. Une étape supplémentaire de déprotection des groupements hydroxyles est nécessaire pour l'obtention de ces composés (**Schéma 91**).

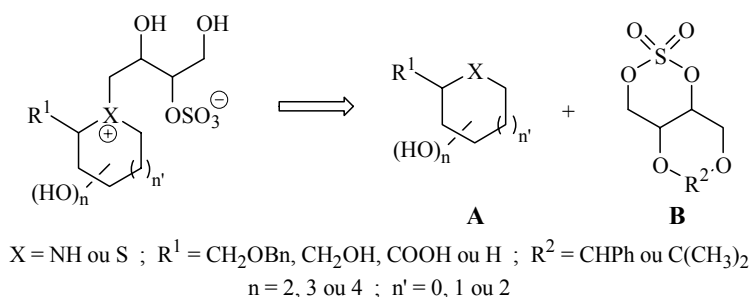


Schéma 91

IV.1. Zwitterions azotés

IV.1.1. Avec la morpholine

Pour nos premiers essais de couplage, nous avons choisi de travailler avec un composé modèle, la morpholine. Nous avons réalisé son couplage avec les deux sulfates cycliques **77** et **71** dans le dichlorométhane anhydre à température ambiante. Etant donnée notre expérience sur la manipulation délicate des sulfates cycliques, ces réactions ont été effectuées en présence de carbonate de sodium anhydre permettant de tamponner le milieu. Elles ont permis l'obtention des deux zwitterions azotés **210** et **211** avec des rendements quantitatif et de 82 % respectivement (**Schéma 92**). On peut noter que la réaction avec le sulfate cyclique de la série *D-érythro* **77** a été plus rapide que celle avec le sulfate cyclique de la série *L-érythro* **71**. Cette différence de réactivité semble donc liée à la nature du groupement protecteur.

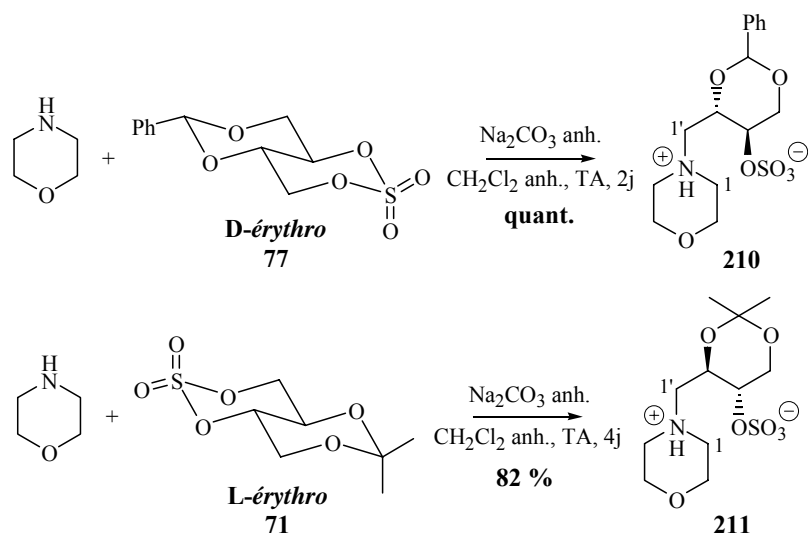


Schéma 92

Ces zwitterions ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge et de RMN. La comparaison entre les déplacements chimiques des deux produits avant couplage et ceux des composés zwitterioniques obtenus montre que la réaction a bien eu lieu. En effet, on observe un déblindage des carbones C_1 (55 ppm par rapport à 47 ppm pour la morpholine), mais surtout un blindage des protons $H_{1'}$ (3 ppm par rapport à 4,6 ppm pour les sulfates cycliques) et des carbones $C_{1'}$ (60 ppm par rapport à 70 ppm pour les sulfates cycliques), attestant de l'ouverture du sulfate cyclique par l'atome d'azote.

Les zwitterions ont ensuite été déprotégés par hydrogénéolyse pour le composé **210** et par hydrolyse au moyen d'une résine acide pour le composé **211**. Les composés **212** et **213** ont ainsi été isolés avec des rendements respectifs de 88 % et 97 % (Schéma 93). L'hydrolyse de l'acétonide s'est révélée assez lente, mais le produit obtenu **213** n'a pas nécessité de purification.

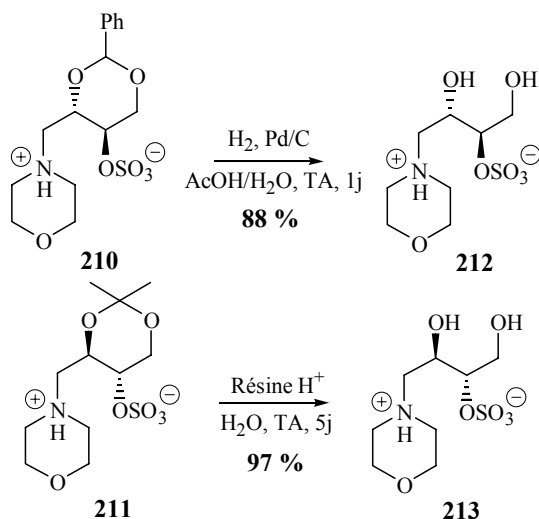


Schéma 93

Les spectres infrarouge et de RMN de ces zwitterions montrent la disparition des groupements benzylidène et isopropylidène et l'apparition des hydroxyles. Ces deux produits ont également été caractérisés par spectrométrie de masse haute résolution ($[M + \text{Na}]^+ = 294,0627$ et $294,0615$ respectivement).

Ces réactions avec la morpholine se sont très bien déroulées et laissent donc envisager des couplages aisés avec les autres hétérocycles azotés.

IV.1.2. Avec les iminosucres synthétisés

IV.1.2.a. Mise au point de la réaction de couplage avec un iminosucre racémique

Pour la réaction avec les pipéridines synthétisées, nous avons réalisé la mise au point du couplage avec l'iminosucre racémique (\pm)-**152**, issue de la série *anti*, et le sulfate cyclique de la série D-*érythro* **77**, plus rapide à synthétiser. Les hétérocycles polyhydroxylés n'étant pas solubles dans le dichlorométhane, nous avons utilisé du méthanol anhydre comme solvant, selon les conditions opératoires décrites par Pinto et coll. (**Schéma 27**)⁵⁹. Mais les rendements des différents essais réalisés n'ont jamais dépassé les 60 %. En effet, comme les auteurs l'ont mentionné dans leur article, il s'est formé lors de cette réaction le produit secondaire **214** résultant de l'ouverture en milieu basique du sulfate cyclique par le méthanol (**Figure 52**).

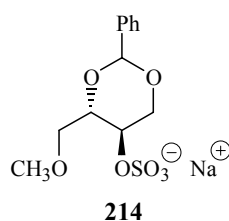
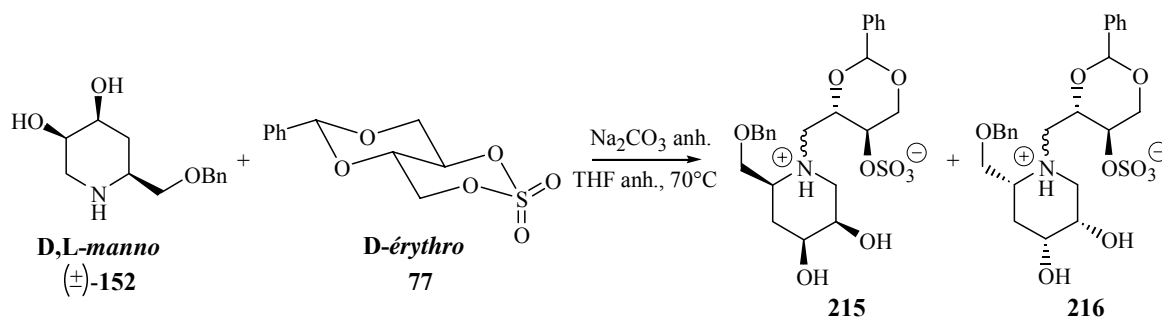


Figure 52

Nous avons donc finalement opté pour l'utilisation de THF anhydre en présence de carbonate de sodium anhydre. Ainsi le couplage de la pipéridine racémique (\pm)-**152** et du sulfate cyclique **77** a donné les deux diastéréoisomères **215** et **216** (**Schéma 94**). On a observé la formation d'un précipité, qui s'est révélé à plusieurs reprises être constitué d'un seul des deux diastéréoisomères, mais cette séparation n'a pas toujours été reproductible.



Les spectres de RMN réalisés sur le produit qui a précipité ont montré, de la même façon que précédemment, que le couplage a bien eu lieu. Ce produit n'a pas nécessité de purification. Par contre, le résidu provenant du filtrat a été purifié par chromatographie sur gel de silice, afin d'éliminer le sulfate cyclique en excès. Les spectres de RMN du ¹H obtenus

⁵⁹ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6268-6271.

pour ce composé n'ont pas pu être interprétés, car de nombreux signaux étaient fortement élargis. Ce phénomène a également été observé récemment par Pinto et coll. pour certains de leurs zwitterions azotés^{58,93}. Ils ont montré par des expériences de NOE à une dimension, l'existence, à pH neutre et à l'échelle de temps RMN, d'un équilibre entre la forme zwitterionique **216** et l'amine libre **217**. Et comme l'inversion de configuration de l'atome d'azote est très rapide, elle permet la présence simultanée des deux zwitterions **216(R)** et **216(S)** (Schéma 95). Cela se traduit en RMN du ¹H par des signaux élargis et en RMN du ¹³C par des signaux manquants. La réalisation de ces spectres en milieu basique permet d'éviter cet échange. En effet, le produit est alors principalement sous la forme amine libre et on observe en RMN la configuration moyenne de l'atome d'azote, correspondant à l'équilibre rapide entre **217(R)** et **217(S)**. Ce phénomène a été observé pour la plupart de nos zwitterions azotés. C'est pour cette raison que les spectres de RMN de ces produits ont été réalisés en présence de carbonate de sodium.

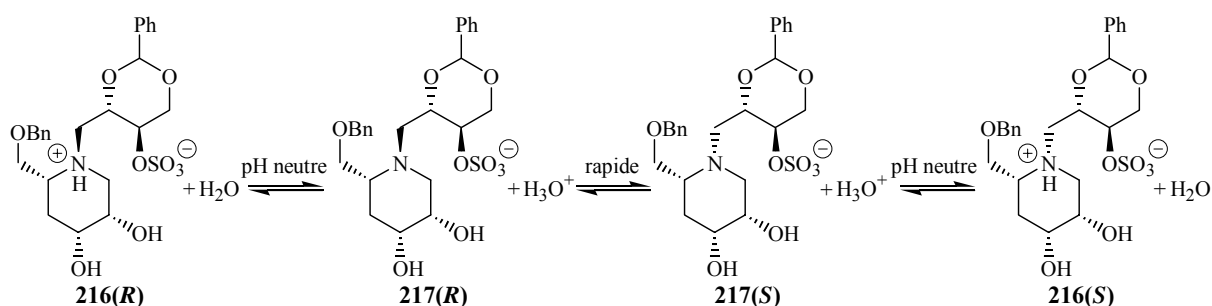


Schéma 95

Les spectres de RMN du produit, qui a précipité lors du couplage avec la pipéridine racémique, ne présentent pas de signaux élargis, en absence de carbonate de sodium. On peut donc conclure que ce produit a précipité sous la forme d'un sel de sodium et non pas sous forme zwitterionique. De plus, par comparaison avec les spectres obtenus par la suite pour le zwitterion provenant du couplage avec la pipéridine optiquement active (Schéma 97), on peut penser que le produit qui a précipité avec un rendement de 34 % est le sel de sodium **218**. Par contre, les spectres de RMN du résidu issu du filtrat ne sont pas interprétables en absence de carbonate de sodium et ils montrent l'obtention d'un mélange. Il s'agit donc des deux diastéréoisomères **215** et **216**, obtenus sous forme zwitterionique avec un rendement de 48 % (Schéma 96).

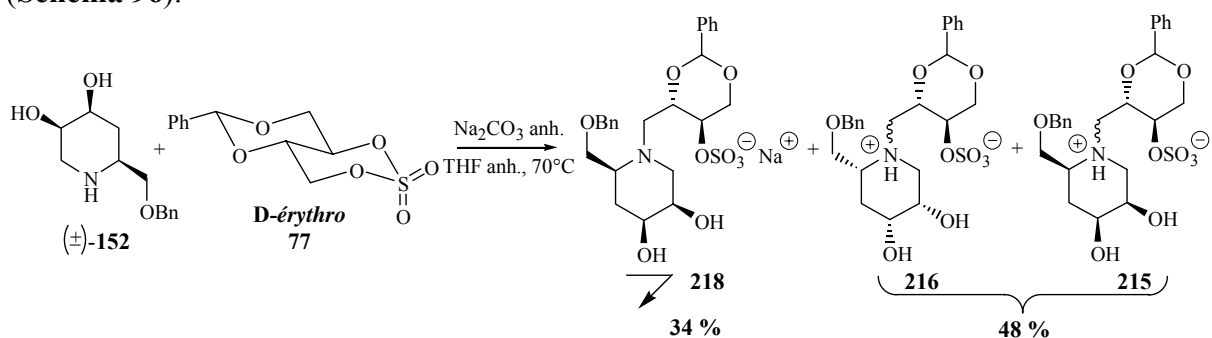


Schéma 96

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

⁹³ Veerapen, N. ; Yuan, Y. ; Sanders, D. A. R. ; Pinto, B. M. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2205-2217.

Comme nous avons décidé de privilégier les réactions avec les composés optiquement actifs, ces zwitterions n'ont pas été déprotégés et leurs propriétés inhibitrices n'ont donc pas pu être évaluées. Cependant, ces essais nous ont permis de trouver les conditions nécessaires à l'obtention des analogues azotés et de caractériser un phénomène important observable en RMN.

IV.1.2.b. Couplage des iminosucres optiquement actifs

Le couplage de la pipéridine optiquement active **172**, de configuration *D-manno*, avec les deux sulfates cycliques **77** et **71** a donné les zwitterions azotés **215** et **219** avec des rendements respectifs de 90 % et 87 % (**Schéma 97**). Dans le cas du couplage avec le sulfate cyclique de la série *D-érythro* **77**, le zwitterion **215** a précipité et n'a pas nécessité de purification. Curieusement, il s'agit bien du zwitterion qui a précipité, et non du sel de sodium comme dans le cas précédent. En effet, le spectre de RMN du ^1H de ce composé, réalisé en absence de carbonate de sodium, présente des signaux élargis résultant du phénomène d'échange (**Schéma 95**).

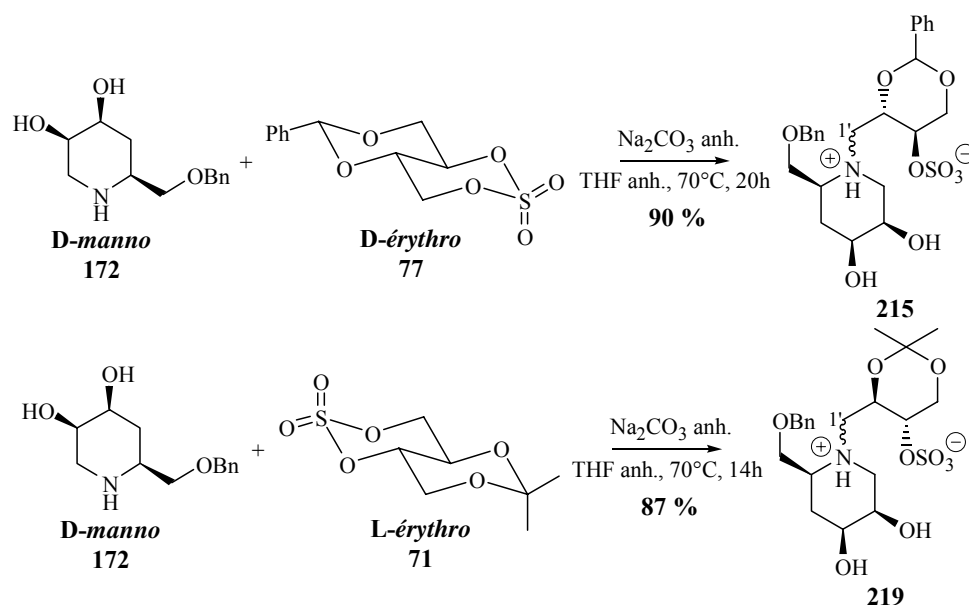
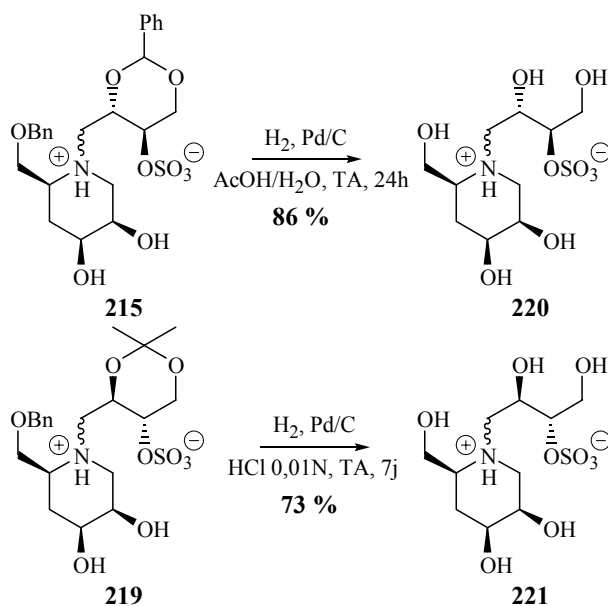


Schéma 97

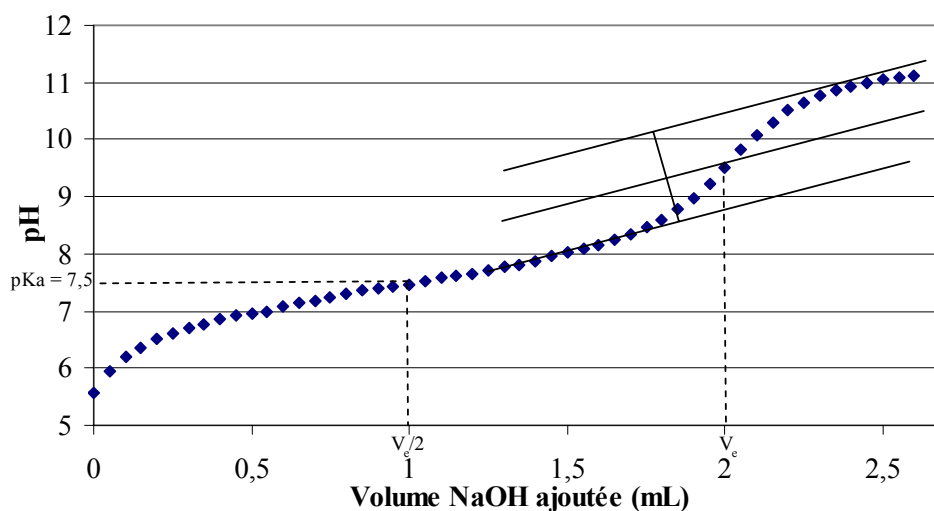
Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C réalisés en milieu basique sont en accord avec les structures proposées et montrent le blindage des signaux correspondants aux $\text{H}_{1'}$ vers 3 ppm et au $\text{C}_{1'}$ vers 55 ppm, comparés aux signaux obtenus pour les sulfates cycliques seuls.

Les zwitterions **215** et **219** ont ensuite été déprotégés par hydrogénolyse en milieu acide pour donner les composés **220** et **221** avec des rendements de 86 % et 73 % respectivement (**Schéma 98**). La déprotection des groupements hydroxyles a été beaucoup plus lente dans le cas du produit **219** protégé par un acétonide que pour **215** protégé par un benzylidène.



Les zwitterions **220** et **221** ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge, de RMN et par spectrométrie de masse haute résolution ($[M + Na]^+ = 354,0835$ et $[M - H + 2Na]^+ = 376,0648$ respectivement). Ces analyses ont montré la disparition des groupements benzylidène, benzyle et isopropylidène et l'apparition des hydroxyles.

Comme mentionné précédemment, les spectres de RMN du 1H de ces composés en milieu neutre présentent des signaux élargis, ce qui laisse penser que les produits obtenus sont effectivement zwitterioniques. Pour confirmer cela et pour avoir une idée plus précise du comportement de ces zwitterions, nous avons déterminé le pKa du composé **220**. Un dosage d'une solution de ce produit de concentration 8,5 mM par de la soude 0,01N nous a donné une valeur de pKa égale à 7,5 (**Graphique 5**).



Graphique 5

Le pH initial de la solution est de 5,6. Comparé à la valeur obtenue pour le pKa, on peut en déduire qu'en solution dans l'eau ce produit est effectivement majoritairement sous forme

zwitterionique, ce qui est cohérent avec les résultats observés en RMN. Dans la littérature³⁹, on trouve que le pKa de la désoxymannojirimycine **24** est de 7,2. Par analogie structurale et comme l'hydroxyle manquant de notre iminosucre est en position 4, assez éloigné de l'atome d'azote, on peut penser que le pKa de la 1,4-D-didésoxymannojirimycine **177** sera voisin de 7,2. Or curieusement pour le zwitterion **220**, on n'observe pas d'augmentation significative du pKa, malgré la présence du groupement sulfate stabilisant l'ammonium.

Pour connaître la configuration majoritaire de l'atome d'azote, lorsque le produit est sous forme amine libre, nous avons effectué une expérience de NOE à deux dimensions en présence de carbonate de sodium sur le produit **222**. Celle-ci a montré la présence de tâches de corrélation entre les protons H_{1'} et les protons H_{1a}, H_{1b} et H₅. Nous pouvons donc en déduire la conformation du zwitterion avec la liaison C_{1'}-N en équatorial, ce qui place la chaîne sulfatée en *trans* par rapport au groupement hydroxyméthyle de l'iminosucre (**Figure 53**).

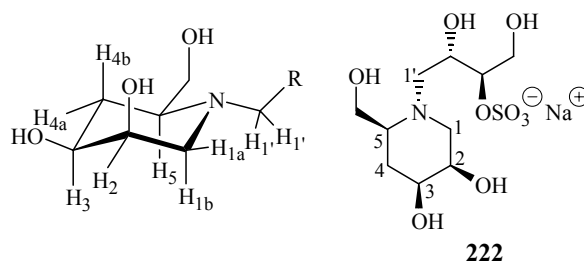


Figure 53

La pipéridine optiquement active **173**, de configuration *L-gluco*, a également été couplée avec les deux sulfates cycliques **77** et **71** dans le THF à reflux. Les zwitterions azotés **223** et **224** ont ainsi été obtenus avec des rendements respectifs de 74 % et 71 % (**Schéma 99**). Dans ce cas aussi, nous avons observé la précipitation du zwitterion **223** provenant du couplage avec le sulfate cyclique **77**, qui n'a donc pas nécessité de purification.

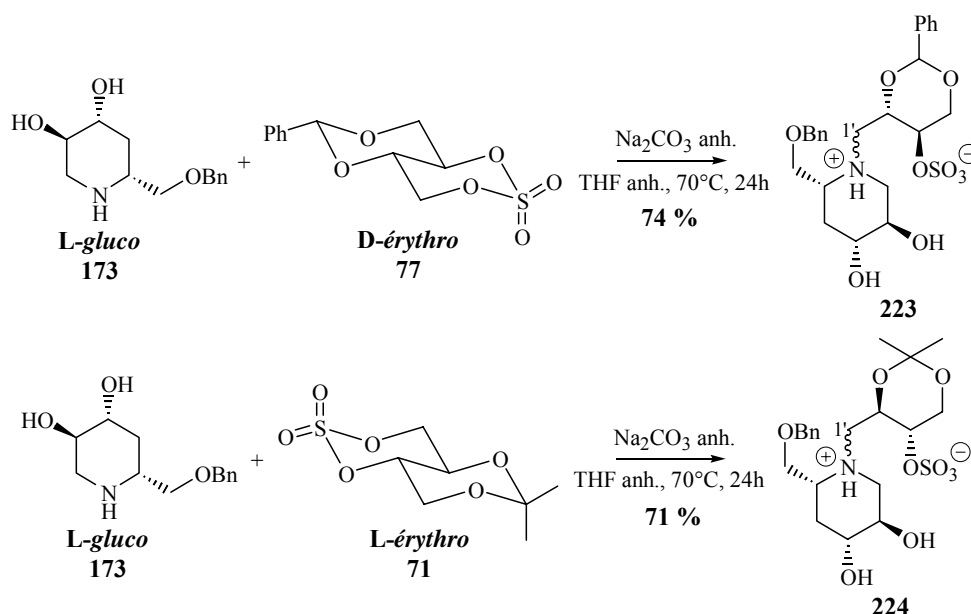


Schéma 99

³⁹ Ekhart, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Tauss, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C de ces zwitterions sont en accord avec les structures proposées et montrent de la même façon que pour les composés précédents, un blindage des signaux correspondants aux $\text{H}_{1'}$ vers 3 ppm et au $\text{C}_{1'}$ vers 55 ppm.

Les zwitterions **223** et **224** ont ensuite été déprotégés par hydrogénolyse en milieu acide pour donner les composés **225** et **226** avec des rendements de 78 % et 59 % respectivement (**Schéma 100**). La déprotection du zwitterion **224** s'est effectuée en deux temps. L'hydrogénolyse du groupement benzyle a été très rapide, alors que l'hydrolyse de l'acétonide a été plus lente.

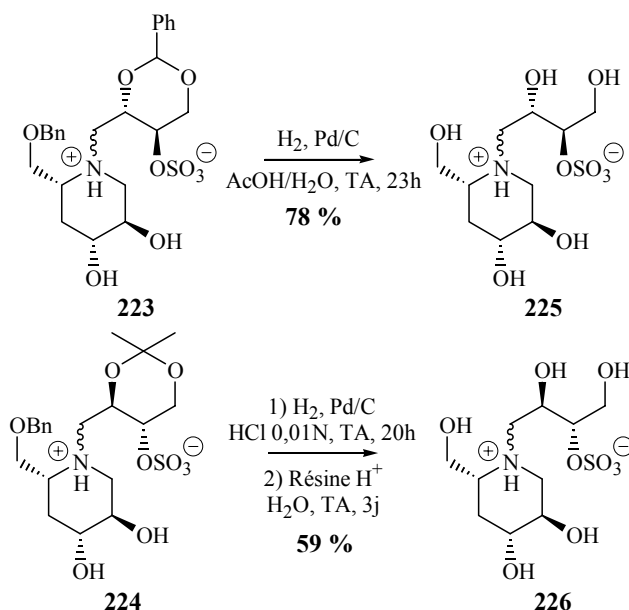


Schéma 100

Les données spectroscopiques obtenues pour ces zwitterions sont conformes aux structures proposées (masse haute résolution : $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 354,0846$ et $354,0839$ respectivement). Les spectres infrarouges et de RMN montrent la disparition des groupements benzyldène, benzyle et isopropylidène et l'apparition des hydroxyles.

Une expérience de NOE à deux dimensions a été réalisée en présence de carbonate de sodium sur le sel de sodium **227**, afin de connaître la configuration majoritaire de l'atome d'azote. Celle-ci montre la présence de tâches de corrélation entre les protons $\text{H}_{1'}$ et les protons H_{1a} , H_{1b} et H_5 . Nous pouvons donc en déduire la conformation du zwitterion avec la liaison $\text{C}_{1'}$ -N en équatorial, ce qui place la chaîne sulfatée en *trans* par rapport au groupement hydroxyméthyle de l'iminosucre (**Figure 54**).

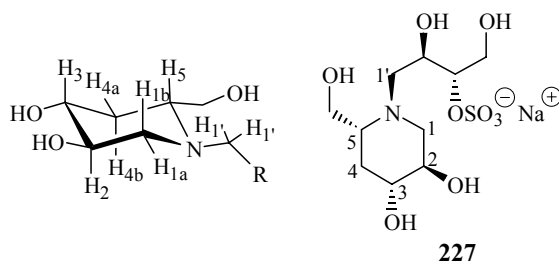


Figure 54

Par analogie, nous pouvons supposer pour les produits **228** et **229** que la liaison C₁-N se place en *trans* par rapport au groupement hydroxyméthyle, même si des expériences de NOE n'ont pas été réalisées (**Figure 55**).

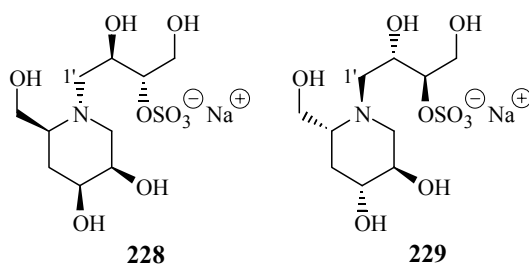


Figure 55

Nous disposons donc de six analogues azotés du salacinol à six chaînons, qui ont été obtenus avec de bons rendements. Les réactions de déprotection sont toutefois assez longues et nécessiteraient d'être optimisées.

IV.2. Zwitterions soufrés

Le Laboratoire des Glucides de l'Université de Picardie à Amiens nous a fourni six hétérocycles soufrés différents de configuration *érythro*, *D,L-thréo*, *xylo*, *ribo*, *D-arabino* et *D-manno* (**Figure 56**).

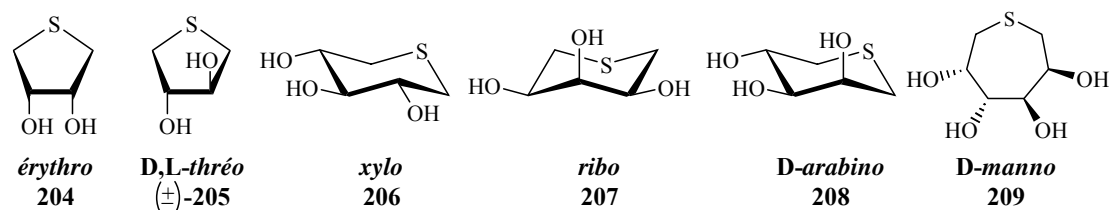


Figure 56

Ces hétérocycles ont été synthétisés dans ce laboratoire selon deux méthodologies différentes s'appuyant sur les alditoles correspondants. Les thiosucres de configuration *érythro* **204**, *D,L-thréo* **205** et *D-manno* **209** peuvent être synthétisés à partir des bis-sulfates cycliques, dérivés de ces alditoles, par cyclisation en présence de sulfure de sodium (**Schéma 101**)⁹⁴.

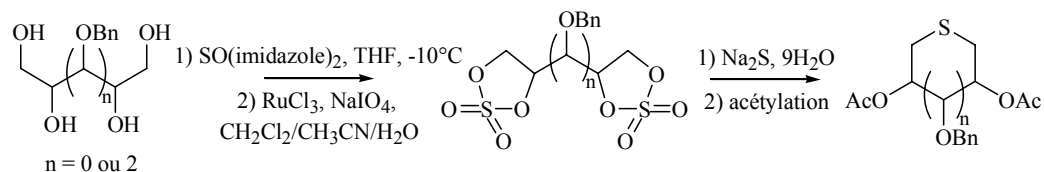


Schéma 101

⁹⁴ Glaçon, V. ; Benazza, M. ; Beaupère, D. ; Demailly, G. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5053-5056.

Cependant, cette méthodologie n'étant applicable qu'à des alditols portant deux paires de groupements hydroxyles libres, une autre voie de synthèse a été développée à partir des dérivés bromés des alditols correspondants. Ceux-ci sont acétylés, puis cyclisés en présence de sulfure de sodium avec des rendements de 78 % à 95 %, pour donner les six thiosucres désirés (**Schéma 102**)^{95,96}.

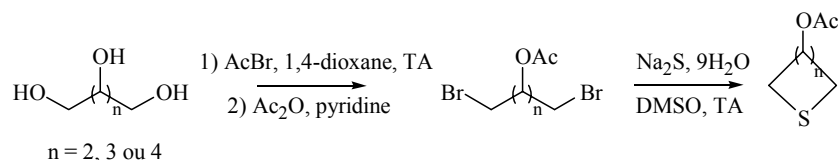
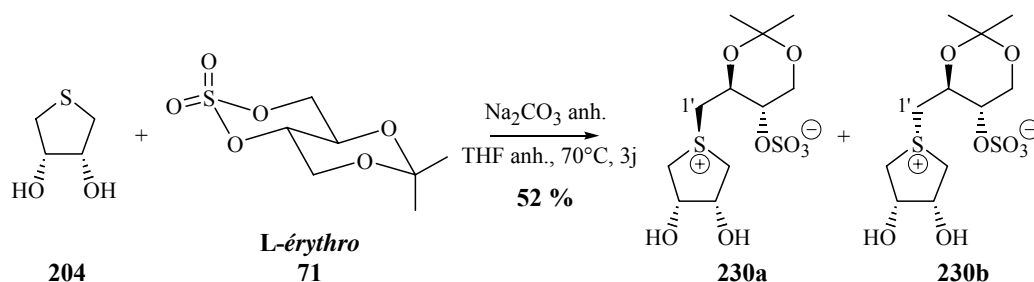


Schéma 102

IV.2.1. Thiosucres à cinq chaînons

Afin de limiter le nombre d'étapes pour l'obtention d'analogues soufrés du salacinol, nous avons choisi d'effectuer les couplages directement sur les thiosucres non protégés. Or Yuasa *et al.* ont aussi travaillé avec des hétérocycles soufrés non protégés dans le DMF à 45°C (**Schéma 14**)⁵⁴. Malheureusement, ces conditions opératoires appliquées à nos composés ne nous ont pas permis d'isoler les zwitterions désirés.

Nous avons donc réalisé cette réaction dans les conditions mises au point pour le couplage des iminosucres, à savoir l'utilisation de THF anhydre à 70°C. En parallèle, nous avons essayé les conditions décrites par Pinto et coll.⁵⁷ lors de leur amélioration de la synthèse du salacinol, c'est-à-dire l'emploi de HFIP à 65°C (**Schéma 21**). Le thiosucrose à cinq chaînons de configuration *érythro* **204** a été couplé sur le sulfate cyclique de la série *L-érythro* **71** selon ces deux protocoles. Le zwitterion **230** a été obtenu avec un rendement de 52 % en trois jours dans le THF, alors qu'il a été obtenu avec un rendement de 64 % en 21 heures dans le HFIP (**Schéma 103**). L'utilisation de HFIP a donc abouti plus rapidement à un meilleur rendement. Nous avons donc décidé d'utiliser ces conditions pour la synthèse des autres analogues soufrés.



⁹⁵ Halila, S. ; Benazza, M. ; Demailly, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3307-3310.

⁹⁶ Benazza, M. ; Halila, S. ; Viot, C. ; Danquigny, A. ; Pierru, C. ; Demailly, G. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2889-2895.

⁵⁴ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6615-6618.

⁵⁷ Ghavami, A. ; Sadalapure, K. S. ; Johnston, B. D. ; Lobera, M. ; Snider, B. B. ; Pinto, B. M. *Synlett* **2003**, 1259-1262.

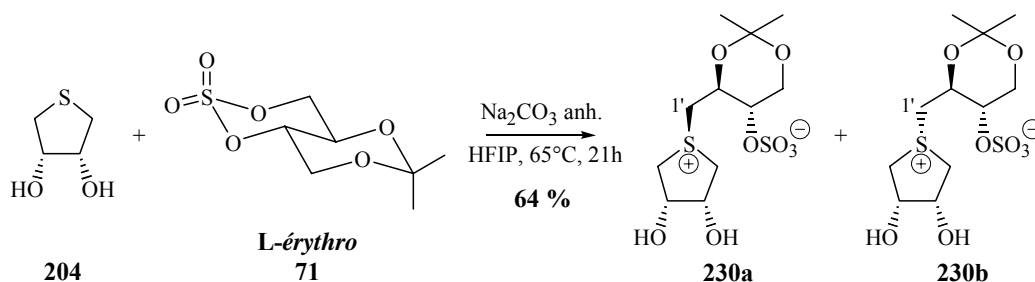


Schéma 103

Le zwitterion a été isolé sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères **230a** et **230b**, en raison de la création d'un centre asymétrique sur le soufre. Ces deux composés ont été obtenus dans des proportions de 83:17, déterminées par RMN du ^1H . Ils ne sont pas séparables par chromatographie sur gel de silice. Le mélange a donc été caractérisé par spectroscopie de RMN, qui montre la présence des groupements méthyles et l'apparition d'un signal caractéristique correspondant au $\text{C}_{1'}$ vers 50 ppm. On constate également un déblindage des signaux correspondants aux protons et carbones en α de l'atome de soufre par rapport aux déplacements chimiques observés pour le thiosucre.

Le thiosucre **204** a également été couplé sur le sulfate cyclique de la série D-érythro **77** dans le HFIP à 65°C avec un rendement de 62 % (**Schéma 104**). Le zwitterion obtenu **231** se trouve aussi sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères dans un rapport de 83:17.

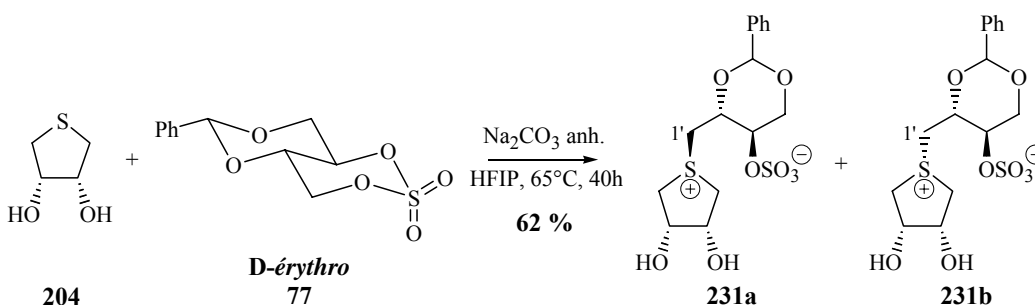
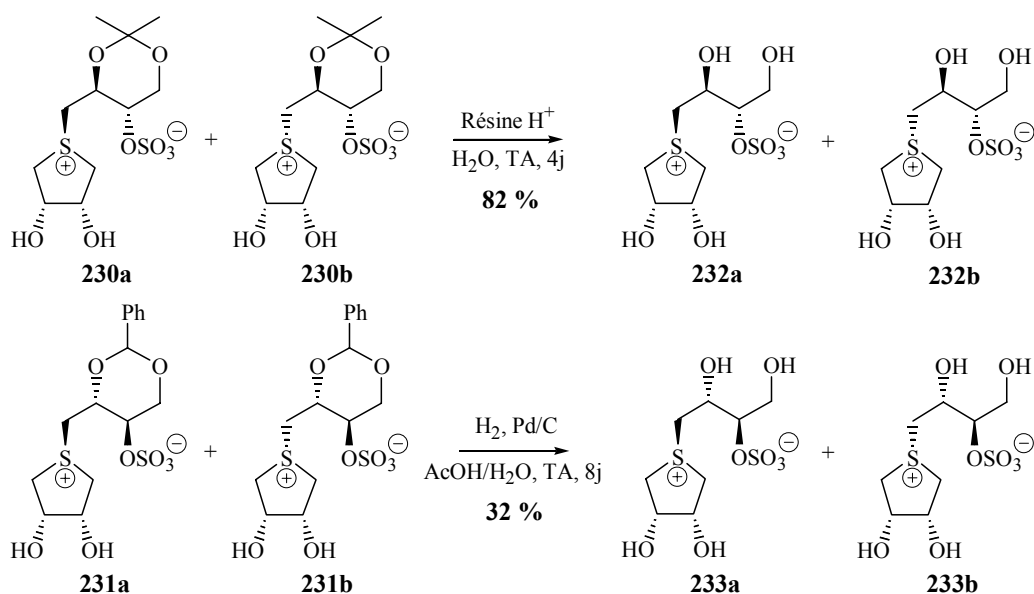


Schéma 104

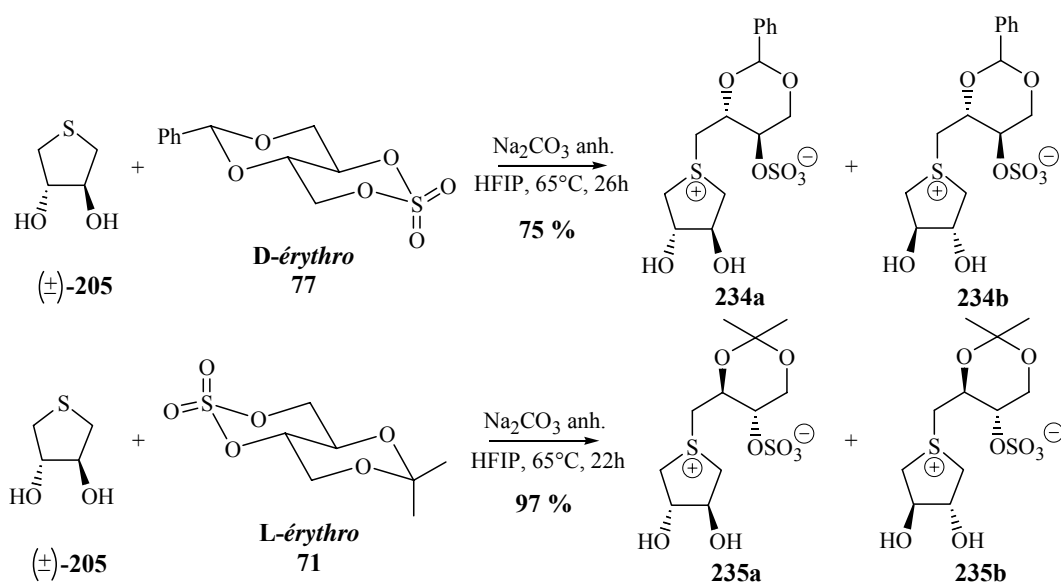
Ce mélange a été caractérisé par spectroscopie infrarouge et de RMN. Ces analyses montrent la présence des hydroxyles et du noyau aromatique. On retrouve également sur le spectre de RMN du ^{13}C le signal correspondant au $\text{C}_{1'}$ vers 50 ppm.

Les mélanges **230** et **231** ainsi obtenus ont été déprotégés par action d'une résine acide pour **230** et par hydrogénéolyse pour **231** avec des rendements respectifs de 82 % et 32 % (**Schéma 105**). Le rendement faible de la réaction d'hydrogénéolyse est probablement lié à un problème d'empoisonnement du catalyseur par des impuretés soufrées, provenant de la dégradation des zwitterions. Par manque de temps, ce rendement n'a pas pu être optimisé. Les zwitterions **232** et **233** ont été obtenus sous la forme de mélanges de diastéréoisomères non séparables dans des proportions voisines de celles des mélanges de départ (83:17 et 86:14 respectivement), la différence étant due à des pertes de produit lors de la manipulation.



Les données spectroscopiques obtenues sont en accord avec les structures proposées (masse haute résolution : $[M + Na]^+ = 327,0186$ et $327,0182$ respectivement). La RMN montre la disparition des groupements protecteurs isopropylidène et benzylidène.

Le second thiosucre à cinq chaînons (\pm)-**205** a été couplé avec les deux sulfates cycliques **77** et **71** dans le HFIP à 65°C avec des rendements de 75 % et 97 % respectivement (**Schéma 106**). Les produits obtenus **234** et **235** sont sous la forme de mélanges de deux diastéréoisomères en quantités égales et non séparables par chromatographie sur gel de silice. En raison de l'axe de symétrie C_2 du thiosucre (\pm)-**205**, l'atome de soufre dans ce cas n'est pas asymétrique et l'obtention des deux diastéréoisomères est due au mélange racémique de départ.



Les mélanges **234** et **235** ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge et de RMN. Comme précédemment, ces analyses montrent la présence simultanée des groupements hydroxyles et isopropylidène ou benzylidène. En RMN, le blindage des signaux correspondants aux C1' vers 50 ppm par rapport aux déplacements chimiques des carbones équivalents sur les sulfates cycliques confirme la réalisation du couplage.

Ces mélanges ont été déprotégés de la même façon que précédemment avec des rendements respectifs de 38 % et 51 %, qui n'ont pas été optimisés, pour donner les zwitterions **236** et **237** (Schéma 107).

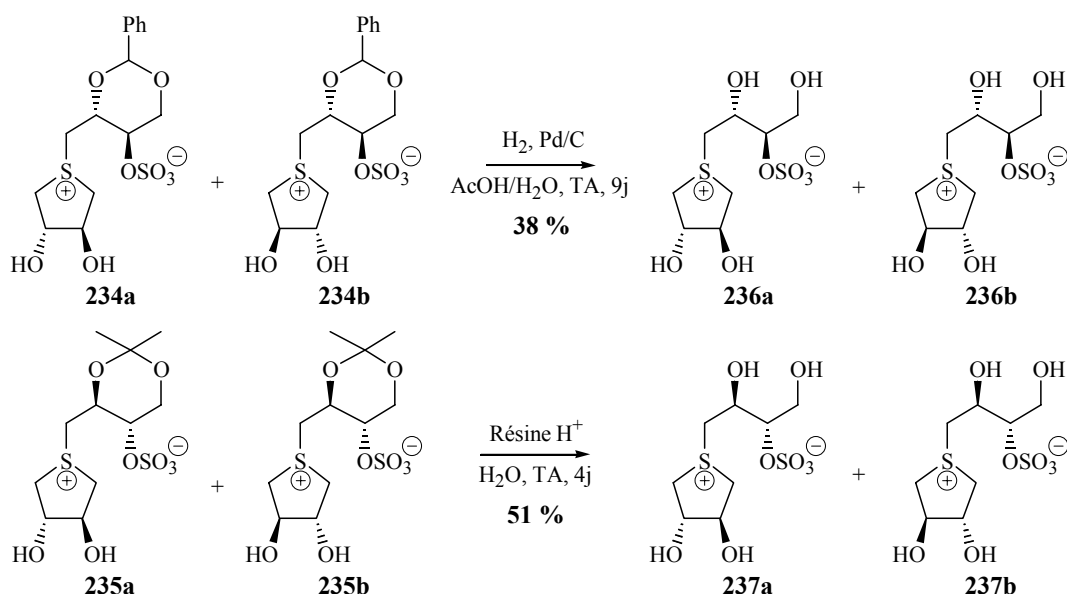


Schéma 107

Les spectres de masse haute résolution sont en accord avec la structure proposée ($[M + Na]^+ = 327,0179$ et $327,0188$ respectivement). Les spectres infrarouges et de RMN montrent la disparition des groupements benzylidène et isopropylidène, et la présence des groupements hydroxyles.

IV.2.2. Thiosucres à six chaînons

Etant donné les bons résultats observés pour les couplages avec les hétérocycles à cinq chaînons, nous avons appliqué les mêmes conditions opératoires aux thiosucres à six chaînons. Malheureusement, la réactivité de ceux-ci s'est révélée nettement moins importante et il semble qu'ils soient moins nucléophiles vis-à-vis des sulfates cycliques que les hétérocycles à cinq chaînons. Les rendements obtenus pour le couplage des hétérocycles de configuration *xylo* **206**, *ribo* **207** et *D-arabino* **208** avec le sulfate cyclique de la série *D-érythro* **77** sont respectivement de 38 %, 60 % et 41 % (Schéma 108). De plus, il n'a pas été du tout possible de coupler le sulfate cyclique de la série *L-érythro* **71**, malgré les différents essais réalisés. Nous avons déjà observé, dans le cas de la morpholine, une différence de réactivité en faveur du sulfate protégé par un groupement benzylidène.

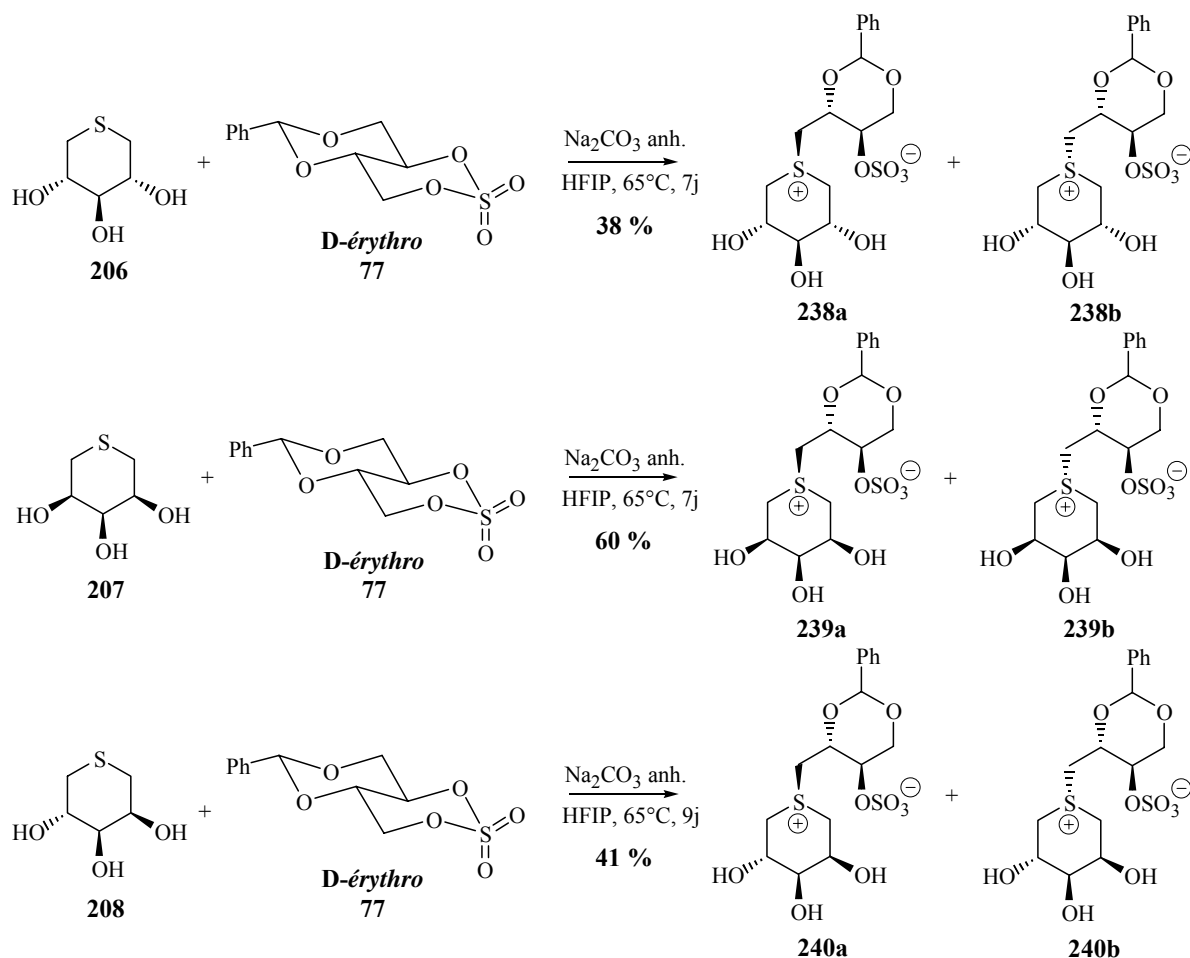
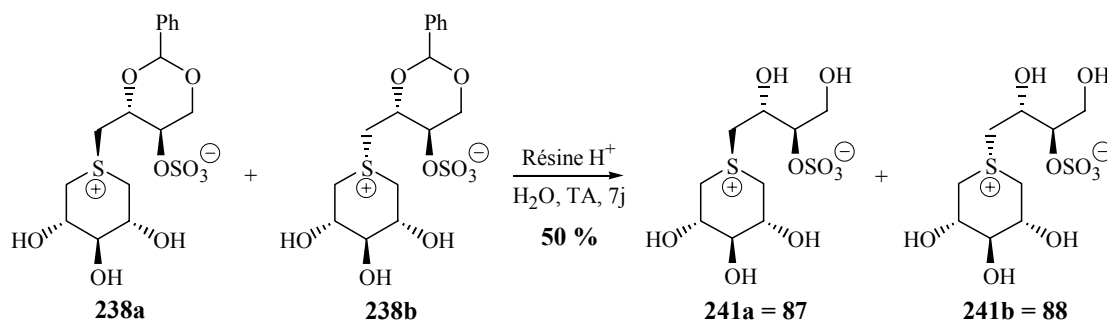
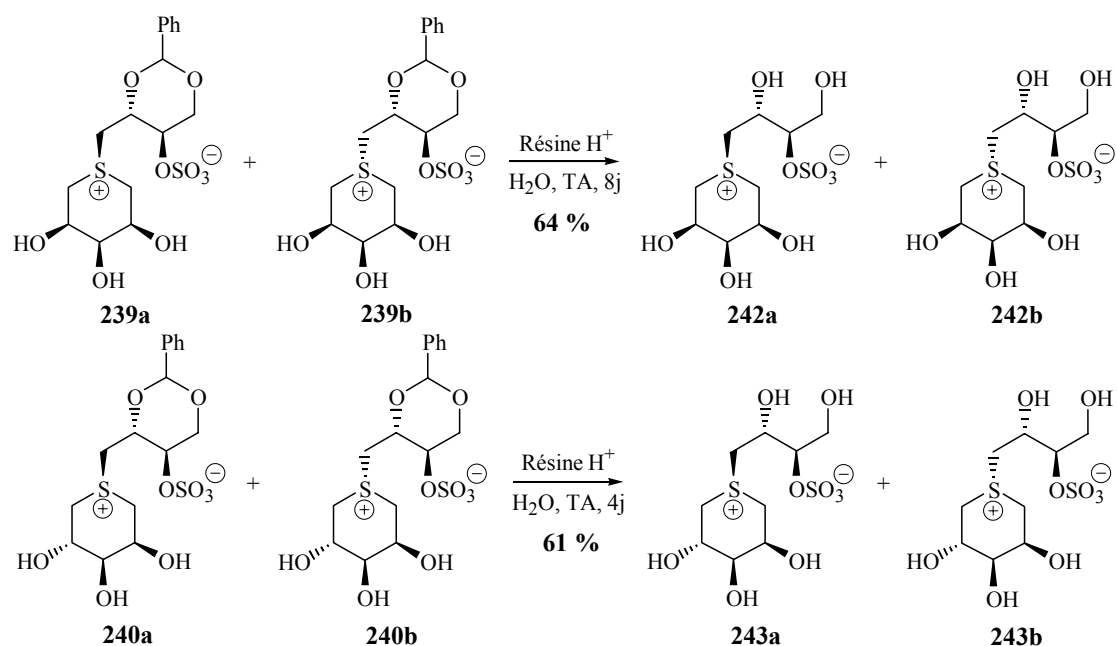


Schéma 108

Les zwitterions **238**, **239** et **240** ont été obtenus sous la forme de mélanges de diastéréoisomères, non séparables par chromatographie sur gel de silice et dans des proportions respectives de 70:30, 67:33 et 50:50. Les spectres de RMN réalisés sur ces composés montrent de la même façon que précédemment que la réaction de couplage a bien eu lieu.

Ces mélanges ont été soumis à l'action d'une résine acide dans l'eau. Les zwitterions **241**, **242** et **243** ont été obtenus avec des rendements de 50 %, 64 % et 61 % et dans des proportions de 77:23, 80:20 et 50:50 respectivement (Schéma 109). Les rendements des déprotections en présence de résine acide sont légèrement meilleurs comparés à ceux obtenus précédemment par hydrogénéolyse. Cependant, ils restent modestes et les réactions sont très longues. Par manque de temps, nous n'avons pas pu les optimiser.

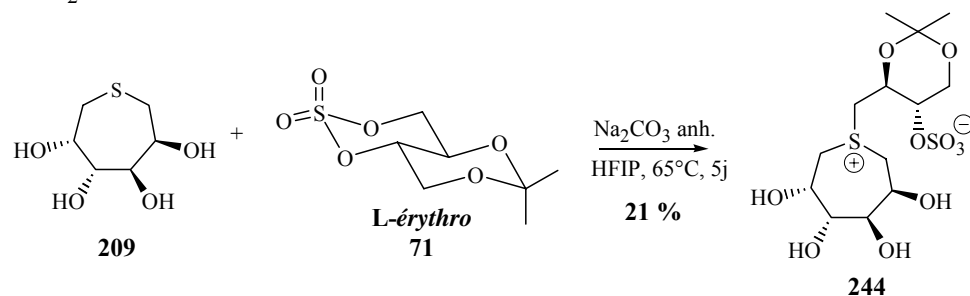




Les données spectroscopiques obtenues pour ces zwitterions sont en accord avec leurs structures (masse haute résolution : $[M + Na]^+ = 357,0293, 357,0289$ et $357,0290$ respectivement). Les spectres de RMN du mélange **241** sont conformes à ceux décrits par Pinto et coll. pour chacun des deux diastéréoisomères **87** et **88** (**Schéma 23**)⁵⁸. D'autre part, on peut déduire de cette comparaison, que nous avons obtenu majoritairement le même produit qu'eux, à savoir le composé **241a**.

IV.2.3. Thiosucres à sept chaînons

De même que pour les hétérocycles à six chaînons, les thiosucres à sept chaînons ne se sont pas révélés très réactifs dans les conditions choisies. Cependant, la réaction avec le sulfate cyclique de la série *L*-érythro **71** a pu avoir lieu et donner le produit de couplage **244** avec un rendement faible de 21 %. L'autre produit de couplage **245** a été obtenu avec un rendement de 63 % (**Schéma 110**). Dans ce cas aussi, nous observons donc une meilleure réactivité du sulfate de la série *D*-érythro. Ces zwitterions ne sont pas isolés sous la forme de mélanges de diastéréoisomères, car l'atome de soufre n'est pas asymétrique, en raison de l'axe de symétrie C_2 du thiosucre **209**.



⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

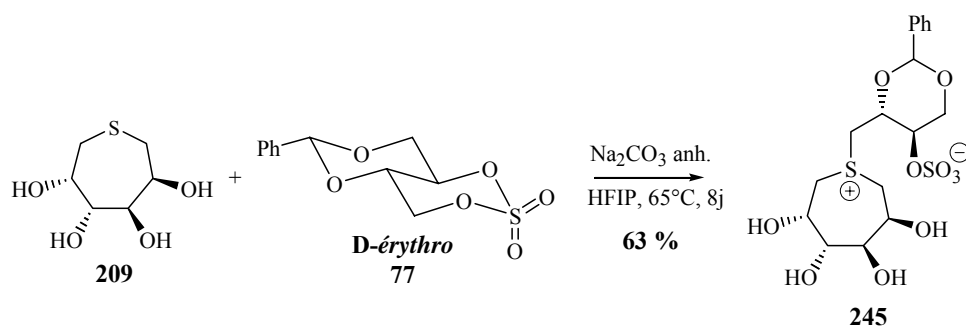


Schéma 110

Ces composés ont été caractérisés par spectroscopie de RMN du ^1H et du ^{13}C , qui montrent que le couplage a bien eu lieu.

Les zwitterions **244** et **245** obtenus ont été déprotégés par action d'une résine acide avec des rendements respectifs de 23 % et 76 % (Schéma 111). Le rendement médiocre observé pour la déprotection de **245** est probablement dû à une perte de produit lors de la purification. Il n'a pas été optimisé.

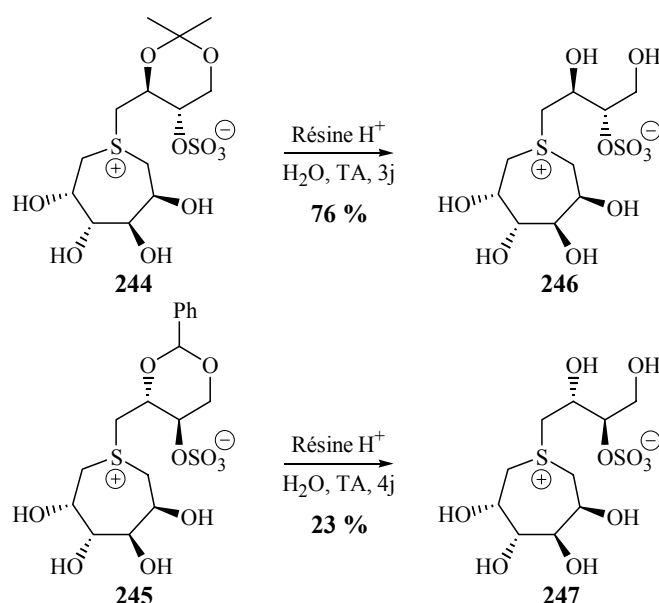


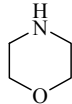
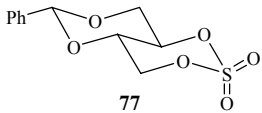
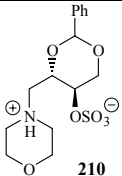
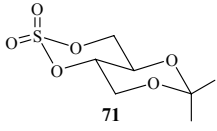
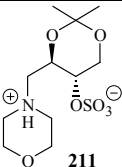
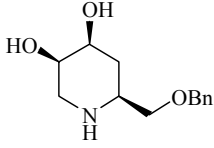
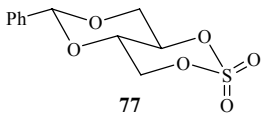
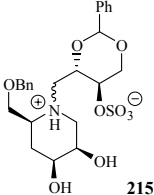
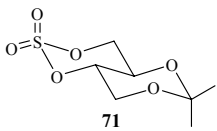
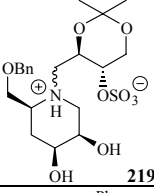
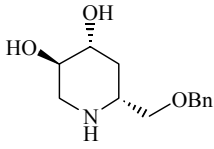
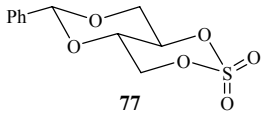
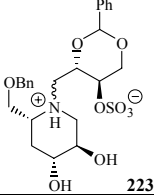
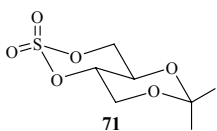
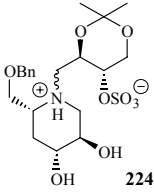
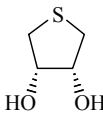
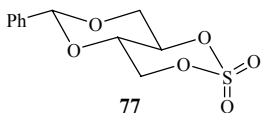
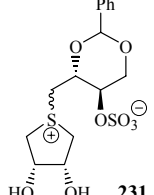
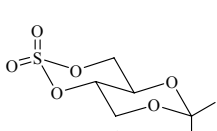
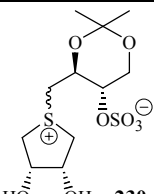
Schéma 111

Les analyses réalisées sur ces zwitterions confirment que les groupements benzylidène et isopropylidène ont bien été éliminés. Leurs structures ont été vérifiées par spectrométrie de masse haute résolution ($[\text{M} + \text{Na}]^+ = 387,0391$ et $387,0396$ respectivement).

Nous avons donc synthétisé neuf nouveaux analogues soufrés du salacinol, dont sept sont sous la forme de mélanges de diastéréoisomères, avec des rendements très variables lors de la réaction de couplage selon le thiosucre et le sulfate utilisés. De plus, les réactions de déprotection des zwitterions obtenus restent à optimiser.

IV.3. Tableau récapitulatif

Afin de faire un bilan des réactions de couplage réalisées et des différences de réactivité observées, les résultats obtenus ont été regroupés dans le tableau suivant (**Tableau 13**).

Hétérocycles	Sulfates cycliques	Zwitterions obtenus	Rendement
	 77	 210	quant.
	 71	 211	82 %
 D-manno 172	 77	 215	90 %
	 71	 219	87 %
 L-gluco 173	 77	 223	74 %
	 71	 224	71 %
 érythro 204	 77	 231	62 %
	 71	 230	64 %

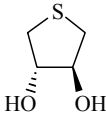
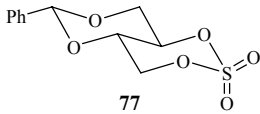
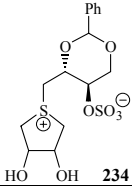
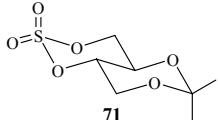
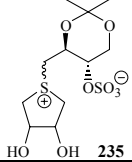
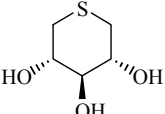
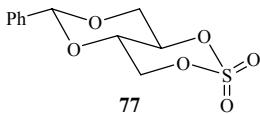
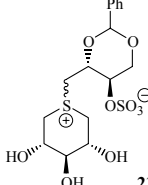
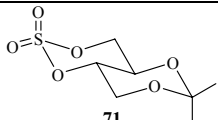
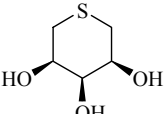
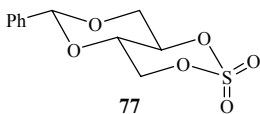
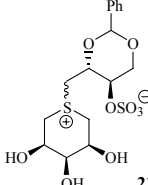
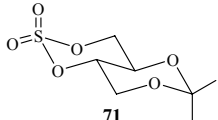
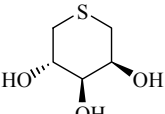
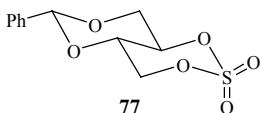
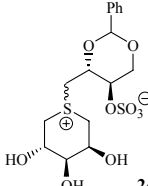
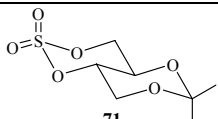
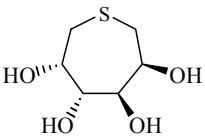
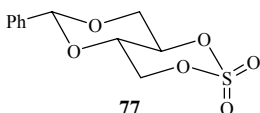
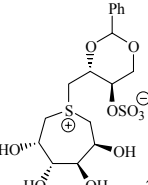
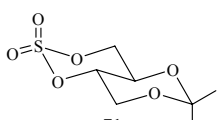
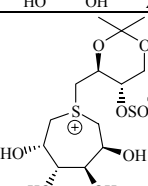
Hétérocycles	Sulfates cycliques	Zwitterions obtenus	Rendement
 D,L-thréo (±)-205	 77	 234	75 %
	 71	 235	97 %
 xylo 206	 77	 238	38 %
	 71	Pas de réaction	/
 ribo 207	 77	 239	60 %
	 71	Pas de réaction	/
 D-arabino 208	 77	 240	41 %
	 71	Pas de réaction	/
 D-manno 209	 77	 245	63 %
	 71	 244	21 %

Tableau 13

Les réactions de couplage avec les hétérocycles azotés ont été réalisées avec de bien meilleurs rendements qu'avec les hétérocycles soufrés, ce qui montre une nouvelle fois la plus grande nucléophilie de l'atome d'azote vis-à-vis des sulfates cycliques. Parmi les thiosucres, ce sont les cycles à cinq chaînons qui ont montré la meilleure réactivité. Les cycles à sept chaînons ont été moins réactifs, tandis que ceux à six ont donné les moins bons résultats. On peut penser que c'est la conformation des cycles à cinq chaînons, qui facilite l'attaque nucléophile de l'atome de soufre.

Si l'on considère maintenant les sulfates cycliques, on remarque que le sulfate de la série *D-érythro* **77** est en général plus réactif que celui de la série *L-érythro* **71**. On peut émettre l'hypothèse que cette différence de réactivité est liée à un encombrement plus important du groupement méthyle en position équatoriale par rapport au groupement phényle, ce qui gêne l'approche du nucléophile sur le carbone le moins encombré du sulfate cyclique.

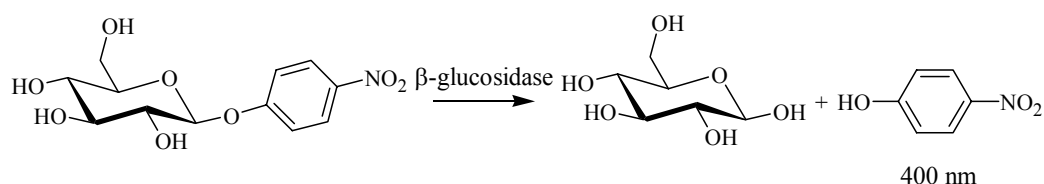
Pour augmenter le rendement des réactions de couplage avec les thiosucres, on peut envisager de protéger les groupements hydroxyles, afin de diminuer les réactions secondaires dues à leur présence. De plus, comme l'équipe de B. M. Pinto l'a montré⁵⁸, la protection de ces groupements pourrait éventuellement permettre de séparer les deux diastéréoisomères obtenus.

L'activité inhibitrice des différents zwitterions azotés et soufrés obtenus a été évaluée vis-à-vis de plusieurs glycosidases commerciales.

V. Evaluation des propriétés inhibitrices

Les propriétés inhibitrices des thiosucres synthétisés par le laboratoire d'Amiens, et de plusieurs de nos iminosucres racémiques ou optiquement actifs, ainsi que de tous les zwitterions déprotégés ont été évaluées sur différentes glycosidases commerciales.

Le principe général de ces tests consiste à utiliser, comme substrats des glycosidases, des composés libérant des produits détectables en ultraviolets ou dans le visible. Les substrats classiquement utilisés sont des nitrophénylglucopyranosides. En effet, au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible, il est possible de mesurer à 400 nm la vitesse de libération du nitrophénol (**Schéma 112**).



Ainsi, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la mesure de cette vitesse pour différentes concentrations en substrat et en inhibiteur nous permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et K_i .

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

V.1. Détermination des constantes de Michaelis

Nous avons travaillé avec six glycosidases commerciales : l' α -glucosidase de levure de boulanger, l' α -glucosidase de riz, la β -glucosidase d'amandes, l' α -galactosidase de grains de café vert, la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* et l' α -mannosidase de pois sabre. Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate 25 mM à pH 6,8 et à 25°C.

Commercialement, les activités de ces enzymes ne sont pas forcément définies par rapport aux nitrophénylglucopyranosides correspondants. Ainsi, l'activité de la β -glucosidase est définie par rapport au 2-(hydroxyméthyl)phényl- β -D-glucopyranoside, mais elle est très souvent utilisée avec le *p*-nitrophényl- β -D-glucopyranoside. De même, l' α -glucosidase de riz est une enzyme plus spécifique de substrats disaccharidiques et son activité est donnée par rapport au maltose, mais elle peut être mesurée avec du *p*-nitrophényl- α -D-glucopyranoside. Par contre, les activités de l' α -glucosidase de levure de boulanger, de l' α -galactosidase et de l' α -mannosidase sont définies par rapport au *p*-nitrophényl- α -D-glycopyranoside et celle de la β -galactosidase par rapport à l'*o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside.

Afin de connaître l'activité de l'enzyme vis-à-vis des substrats utilisés, il est nécessaire de déterminer les constantes de Michaelis correspondantes. Cela permet également de savoir quelles sont les quantités d'enzyme et de substrat nécessaires pour effectuer les mesures de vitesses.

Nous avons donc déterminé les K_m de ces enzymes en utilisant la méthodologie décrite dans la partie bibliographique (**Tableau 14**).

Enzymes	Substrats	K_m (mM)
α -glucosidase (levure de boulanger)	<i>p</i> -nitrophényl- α -D-glucopyranoside	0,139 \pm 0,009
α -glucosidase (riz)	<i>p</i> -nitrophényl- α -D-glucopyranoside	0,423 \pm 0,082
β -glucosidase (amandes)	<i>p</i> -nitrophényl- β -D-glucopyranoside	2,68 \pm 0,18
α -galactosidase (grains de café vert)	<i>p</i> -nitrophényl- α -D-galactopyranoside	0,492 \pm 0,031
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	<i>o</i> -nitrophényl- β -D-galactopyranoside	0,856 \pm 0,066
α -mannosidase (pois sabre)	<i>p</i> -nitrophényl- α -D-mannopyranoside	0,653 \pm 0,042

Tableau 14

Dans le cas particulier de l' α -glucosidase de riz, nous avons été confrontés à une vitesse d'hydrolyse très lente du *p*-nitrophényl- α -D-glucopyranoside. Donc afin de pouvoir mesurer la vitesse de libération du *p*-nitrophénol, nous avons dû travailler avec des concentrations élevées en substrat et sur un temps de mesure de vingt minutes, alors que cinq minutes seulement étaient nécessaires pour les autres enzymes.

L'erreur associée à ces constantes de Michaelis a été déterminée à l'aide de la relation suivante (**Equation 3**), où a est la pente, Δa l'erreur sur la pente, b l'ordonnée à l'origine et Δb l'erreur sur l'ordonnée à l'origine.

$$\text{Erreur} = \sqrt{\left(\frac{\Delta b}{a}\right)^2 + \left(\frac{b}{a^2} \Delta a\right)^2}$$

Equation 3

V.2. Iminosucres et thiosucres

V.2.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur

V.2.1.a. Principe

Dans un premier temps, nous avons déterminé le pourcentage d'activité restante de l'enzyme en présence de la molécule testée. Ce pourcentage nous permet d'estimer la valeur de la constante d'inhibition K_i . Il constitue en fait un premier test qualitatif du potentiel inhibiteur du composé.

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, la vitesse d'une réaction enzymatique est donnée par l'équation de Michaelis-Menten (**Equation 1**) :

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

D'autre part, l'équation donnant la vitesse d'une réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif (**Equation 2**) est :

$$v_i = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Or le pourcentage d'activité restante (%AR) est défini comme étant le rapport entre la vitesse de libération du nitrophénol en présence d'inhibiteur et cette même vitesse en absence d'inhibiteur (**Equation 4**).

$$\%AR = \frac{v_i}{v} \times 100 = \frac{[S] + K_m}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \times 100$$

Equation 4

Il est alors possible d'exprimer la constante d'inhibition K_i en fonction du %AR :

$$K_i = \frac{[I]}{\left(\frac{[S]}{K_m} + 1\right) \left(\frac{100}{\%AR} - 1\right)}$$

Lors de la détermination de ces pourcentages, les différentes vitesses ont été mesurées pour une concentration en substrat équivalente au K_m et pour une concentration en inhibiteur de 1 mM. L'équation précédente se simplifie donc pour donner :

$$K_i = \frac{1}{2 \times \left(\frac{100}{\%AR} - 1 \right)}$$

Ainsi, lorsque le pourcentage d'activité restante est inférieur à 66 %, le K_i est inférieur à 1 mM. S'il est compris entre 67 % et 86 %, le K_i est compris entre 1 mM et 3 mM. Les composés donnant un pourcentage supérieur à 86 % ont été considérés comme non inhibiteurs de l'enzyme testée. Ainsi seules les constantes d'inhibition inférieures à 3 mM ont été déterminées.

Il est important de souligner que deux mesures d'activité restante ont été effectuées pour chaque test : une première mesure après cinq minutes d'incubation de l'enzyme en présence de l'inhibiteur et une seconde après trente minutes d'incubation, afin de vérifier la réversibilité de l'inhibition.

V.2.1.b. Résultats

Nous avons mesuré le pourcentage d'activité restante de cinq des six glycosidases disponibles au laboratoire : l' α -glucosidase de levure de boulanger, la β -glucosidase, l' α -galactosidase, la β -galactosidase et l' α -mannosidase, en présence de chacun des thiosucres synthétisés dans le Laboratoire des Glucides d'Amiens, ainsi que pour différents iminosucres racémiques ou optiquement actifs synthétisés (**Figure 57**).

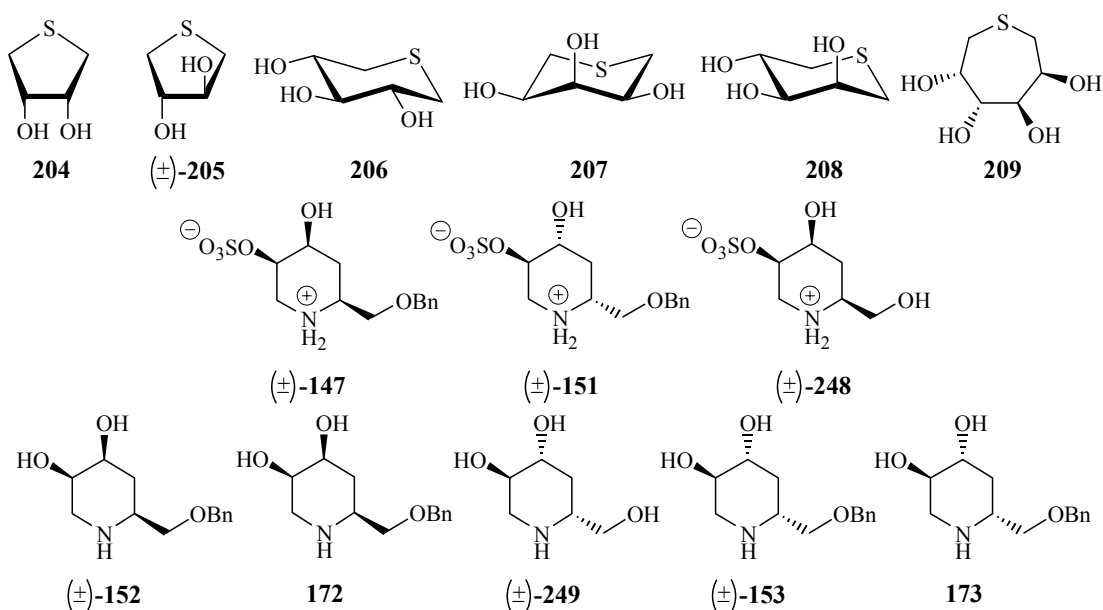
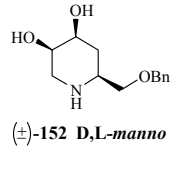
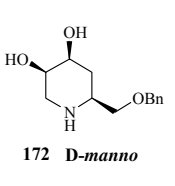
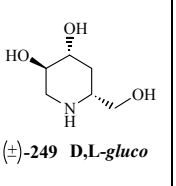
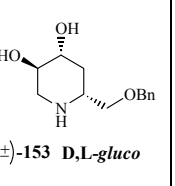
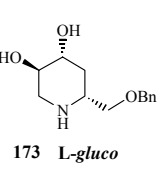


Figure 57

Les trois pipéridines zwitterioniques (\pm)-147, (\pm)-151 et (\pm)-248 testées n'ont pas montré d'activité significative vis-à-vis de ces enzymes, ce qui pourrait s'expliquer par la présence de la charge négative du groupement sulfate, modifiant les interactions à l'intérieur du site actif. De même, les six thiosucres ne sont pas inhibiteurs, ce qui a déjà été décrit pour l'un d'entre eux dans la littérature⁹⁷. Par contre, les analogues de la désoxymannojirimycine et de la L-désoxynojirimycine racémiques ou optiquement actifs ont donné de très bons résultats (**Tableau 15**). Et nous avons montré que tous les composés possédant une activité sont des inhibiteurs réversibles.

	 (\pm)-152 D,L-manno	 172 D-manno	 (\pm)-249 D,L-gluco	 (\pm)-153 D,L-gluco	 173 L-gluco
α -glucosidase (levure de boulanger)	40 %	86 %	90 %	103 %	25 %
β -glucosidase (amandes)	9 %	3 %	18 %	13 %	7 %
α -galactosidase (grains de café vert)	> 95 %	104 %	12 %	99 %	110 %
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	nd	5 %	75 %	83 %	66 %
α -mannosidase (pois sabre)	> 95 %	96 %	71 %	71 %	36 %

nd = non déterminé

Tableau 15

D'après ces premiers résultats, on remarque que les produits optiquement purs sont en général plus actifs que les produits racémiques correspondants, excepté pour les composés (\pm)-152 et 172 vis-à-vis de l' α -glucosidase. Dans ce cas, on peut penser que c'est l'iminosucre de configuration L-manno, qui est le plus actif. De plus, les résultats obtenus pour les produits (\pm)-153 et 173 vis-à-vis de l' α -glucosidase semblent vraiment surprenants. Car si le composé optiquement actif présente une activité sur cette enzyme, le produit racémique devrait également être inhibiteur. Ce résultat nécessitera d'être confirmé par des expériences supplémentaires.

V.2.2. Détermination des constantes d'inhibition

V.2.2.a. Principe

Lorsque le pourcentage d'activité restante est inférieur à 66 % et donc que le K_i est inférieur à 1 mM, nous avons déterminé cette constante précisément en utilisant la méthodologie décrite dans la partie bibliographique. Nous avons donc tracé les valeurs des différents K'_m , obtenus grâce à la représentation de Hanes-Woolf, en fonction de la concentration en inhibiteur.

Par contre, pour un pourcentage d'activité restante compris entre 67 % et 86 % et donc un K_i compris entre 1 mM et 3 mM, nous avons fait une détermination rapide de ce K_i . Ainsi, en

⁹⁷ Le Merrer, Y. ; Fuzier, M. ; Dosbaa, I. ; Foglietti, M.-J. ; Depeyay, J.-C. *Tetrahedron* **1997**, 53, 16731-16746.

utilisant, l'équation de définition de la constante de Michaelis apparente : $K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$, il est possible de calculer le K_i (**Equation 5**), en ne déterminant qu'un seul K'_m , obtenu pour une concentration donnée en inhibiteur.

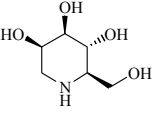
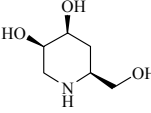
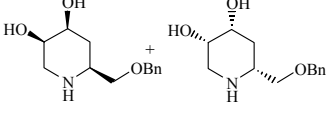
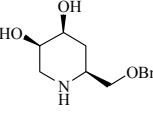
$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K'_m}{K_m} - 1}$$

Equation 5

Dans ce cas, nous n'avons pas déterminé l'erreur sur la valeur obtenue, ni vérifié que l'inhibition est compétitive.

V.2.2.b. Résultats

Les iminosucres (\pm)-**152** et **172**, de configuration *manno*, se sont révélés être des inhibiteurs compétitifs de toutes les enzymes testées. Nous avons cependant rencontré un phénomène particulier avec la β -glucosidase, qui sera présenté par la suite. Les constantes d'inhibition obtenues pour ces composés sont regroupées dans le tableau suivant et sont comparées aux données de la littérature concernant la désoxymannojirimycine **24** (DMJ)³⁹ et la didésoxymannojirimycine **177** (DDMJ)⁸⁰ (**Tableau 16**).

	K_i en μM (pH)			
	 DMJ 24	 DDMJ 177	 (\pm)-152 D,L-manno	 172 D-manno
α -glucosidase (levure de boulanger)	6,5* (6,8)	12 (6,8)	262 \pm 16 [#]	2650
β -glucosidase (amandes)	300 \pm 90 (6,8)	51 (6,8)	7,1 \pm 3,8 [#]	7,7 \pm 1,7 [#]
α -galactosidase (grains de café vert)	310*	NI ^a	NI ^b	NI ^b
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	nd	13 ^s (6,8)	nd	28,9 \pm 5,8 [#]
α -mannosidase (pois sabre)	68 (5,5)	NI ^a	NI ^b	NI ^b

^s = l'enzyme provient de *Escherichia coli*

[#] = inhibiteur compétitif

* = IC50

nd = non déterminé

NI^a = non inhibiteur ($K_i > 1$ mM)

NI^b = non inhibiteur ($K_i > 3$ mM)

Tableau 16

La désoxymannojirimycine **24** est un très bon inhibiteur de l' α -glucosidase et, dans une moindre mesure, de l' α -mannosidase. Par contre, son activité est plus faible vis-à-vis de la β -

³⁹ Ekhart, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Taus, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.

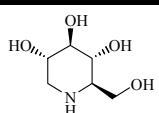
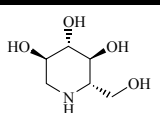
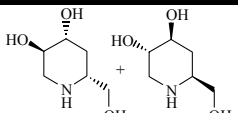
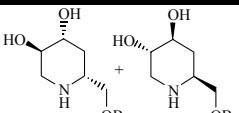
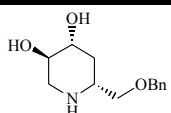
⁸⁰ Andersen, S. M. ; Ekhart, C. ; Lundt, I. ; Stütz, A. E. *Carbohydr. Res.* **2000**, 326, 22-33.

glucosidase et de l' α -galactosidase. La didésoxymannojirimycine **177** est quant à elle un très bon inhibiteur de l' α - et de la β -glucosidase, ainsi que de la β -galactosidase d'*Escherichia coli*. La perte du groupement hydroxyle en position 4 provoque donc la disparition de l'inhibition vis-à-vis de l' α -galactosidase et de l' α -mannosidase. On observe donc une modification de la sélectivité en faveur des β -glycosidases.

L'iminosucre **172**, que nous avons synthétisé, ne se différencie de la DDMJ que par la présence du groupement benzyle en position 6. Et il a le même comportement inhibiteur, puisqu'il inhibe les mêmes enzymes. Cependant, la présence du groupement benzyle entraîne une diminution importante de l'activité vis-à-vis de l' α -glucosidase. Par contre, l'inhibition de la β -glucosidase est nettement améliorée. Cela est peut-être lié au fait que la présence du groupement benzyle permet de se rapprocher de la structure des substrats naturels de cette enzyme de type arylglycosides.

Si l'on compare maintenant les résultats obtenus pour le produit racémique (\pm)-**152** et le produit optiquement actif **172**, on remarque que le racémique est un bien meilleur inhibiteur de l' α -glucosidase que le composé optiquement actif. On peut donc en déduire que le composé de configuration *L-manno*, présent dans le mélange racémique, est plus actif que son énantiomère **172**. Par contre, il semble que les deux énantiomères soient tous les deux de bons inhibiteurs de la β -glucosidase.

Nous avons également déterminé les constantes d'inhibition des iminosucres (\pm)-**249**, (\pm)-**153** et **173**, de configuration *gluco*. Ces composés se sont également révélés être des inhibiteurs compétitifs des enzymes testées. Nous pouvons comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature³⁹ concernant la désoxynojirimycine **23** (DNJ) et la *L*-désoxynojirimycine **250** (*L*-DNJ) (**Tableau 17**). Les constantes d'inhibition vis-à-vis de la β -galactosidase et de l' α -mannosidase pour le composé racémique (\pm)-**249**, dont nous ne disposons pas en quantité suffisante, sont des estimations calculées à partir des pourcentages d'activité restante obtenus.

	K_i en μM (pH)				
	 DNJ 23	 <i>L</i> -DNJ 250	 (\pm)- 249 <i>D,L-gluco</i>	 (\pm)- 153 <i>D,L-gluco</i>	 173 <i>L-gluco</i>
α -glucosidase (levure)	25 \pm 4 (6,8)	nd	NI	NI	198 \pm 44 [#]
β -glucosidase (amandes)	47 \pm 7 (6,8)	454* (5,0)	226 \pm 78 [#]	27,6 \pm 11,1 [#]	17,3 \pm 4,2 [#]
α -galactosidase (grains de café vert)	nd	264* (7,3)	70,9 \pm 5,2 [#]	NI	NI
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	nd	nd	1493 [£]	1441	1086 \pm 401 [#]
α -mannosidase (pois sabre)	400 (6,5)	nd	1218 [£]	1124	209 \pm 50 [#]

[#] = inhibiteur compétitif
[£] = estimation

nd = non déterminé
 NI = non inhibiteur ($K_i > 3$ mM)

Tableau 17

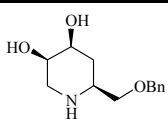
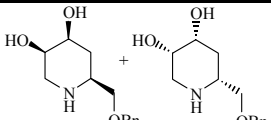
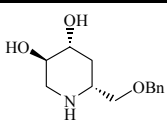
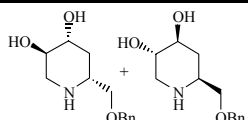
³⁹ Ekhardt, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Tauss, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.

La désoxynojirimycine **23** est un bon inhibiteur sélectif des glucosidases. Elle présente également une légère activité vis-à-vis de l' α -mannosidase. La L-désoxynojirimycine **250** est quant à elle nettement moins active sur la β -glucosidase. Mais elle est légèrement inhibitrice de l' α -galactosidase.

Comme précédemment, l'influence du groupement benzyle peut être étudiée, en comparant les résultats obtenus entre les produits racémiques (\pm)-**249** et (\pm)-**153**. La présence de ce groupement semble n'avoir aucune conséquence sur la faible inhibition de la β -galactosidase et de l' α -mannosidase. Par contre, celle-ci entraîne une perte d'activité vis-à-vis de l' α -galactosidase, ainsi qu'un gain vis-à-vis de la β -glucosidase, qui pourrait s'expliquer de la même façon que précédemment.

Si l'on compare maintenant le composé racémique (\pm)-**153** et le composé optiquement actif **173**, on peut supposer que le produit **173**, de configuration L-*gluco*, est plus actif que son énantiomère vis-à-vis de l' α -mannosidase. Par contre, il semble que les deux énantiomères soient inhibiteurs de la β -glucosidase et de la β -galactosidase. Dans le cas de l' α -glucosidase, nous ne pouvons pas conclure, en raison du problème déjà évoqué lors de la détermination des pourcentages d'activité restante. De même, les résultats obtenus pour (\pm)-**249** vis-à-vis de cette enzyme semblent surprenants. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les résultats présentés.

Enfin, on peut également comparer les propriétés inhibitrices des produits **172** et (\pm)-**152**, de configuration *manno*, avec les composés **173** et (\pm)-**153**, de configuration *gluco* (Tableau 18).

	K_i en μM			
	 172 D-manno	 (\pm)-152 D,L-manno	 173 L-gluco	 (\pm)-153 D,L-gluco
α -glucosidase (levure de boulanger)	2650	$262 \pm 16^\#$	$198 \pm 44^\#$	NI
β -glucosidase (amandes)	$7,7 \pm 1,7^\#$	$7,1 \pm 3,8^\#$	$17,3 \pm 4,2^\#$	$27,6 \pm 11,1^\#$
α -galactosidase (grains de café vert)	NI	NI	NI	NI
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	$28,9 \pm 5,8^\#$	nd	$1086 \pm 401^\#$	1441
α -mannosidase (pois sabre)	NI	NI	$209 \pm 50^\#$	1124

$^\#$ = inhibiteur compétitif

nd = non déterminé

NI = non inhibiteur ($K_i > 3 \text{ mM}$)

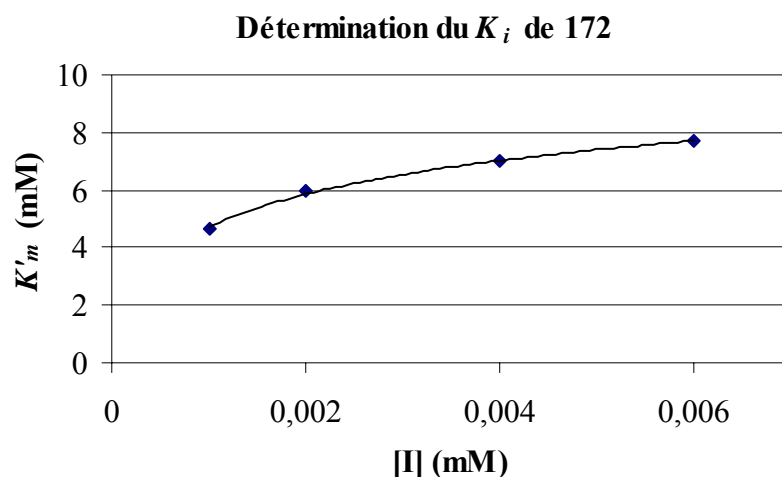
Tableau 18

On constate tout d'abord que ces produits sont de bons inhibiteurs de la β -glucosidase, mais qu'ils ne sont pas du tout actifs vis-à-vis de l' α -galactosidase. Curieusement, le produit optiquement actif **172**, de configuration D-*manno*, n'est pas inhibiteur de l' α -mannosidase, alors que **173**, de configuration L-*gluco*, l'est. Enfin, puisque **172** n'est pas actif vis-à-vis de

l' α -glucosidase, mais que le mélange racémique (\pm)-**152** l'est, l'énantiomère de **172**, de configuration *L-manno*, doit probablement inhiber cette enzyme. Comme le produit **173**, de configuration *L-gluco*, est également inhibiteur, on peut donc penser que la configuration de l'hydroxyle en position 2 n'est pas fondamentale pour l'inhibition de l' α -glucosidase de levure de boulanger.

V.2.2.c. Cas particulier de la β -glucosidase d'amandes

Pour l'étude de l'inhibition de la β -glucosidase d'amandes par ces iminosucres, nous avons été confrontés à un comportement particulier de cette enzyme. En effet, lors de la détermination des K'_m associés à différentes concentrations en inhibiteur, nous avons effectivement obtenu des droites parallèles, signes d'une inhibition compétitive. Mais, le tracé de ces K'_m en fonction de la concentration en inhibiteur ne nous a pas donné une droite, mais une courbe, comme le montre l'exemple du composé **172** (**Graphique 6**).



Graphique 6

Pour estimer les constantes d'inhibition malgré l'obtention de ces courbes, nous avons calculé les K_i correspondants, en faisant une régression linéaire avec trois points, quatre points et cinq points. Lorsque nous disposons d'au moins cinq points, nous avons constaté à chaque fois que la moyenne des trois K_i obtenus est très proche de la valeur déterminée avec quatre points. Nous avons donc choisi de donner cette valeur avec l'erreur correspondante. Dans le cas de **172**, pour lequel nous ne disposons que de quatre points, nous avons donné la valeur de K_i obtenue avec ces quatre points.

L'obtention de courbes laisse penser que quelle que soit la quantité d'inhibiteur mis en présence de l'enzyme, on observe toujours une hydrolyse résiduelle du substrat. Or il ne s'agit pas d'une hydrolyse spontanée en absence d'enzyme. Car s'il est vrai que les *p*-nitrophénylglucopyranosides sont assez instables, l'hydrolyse spontanée se produit sur une échelle de temps très supérieure à celle de la mesure. Elle est donc négligeable. Dans la littérature^{13,98}, on trouve que la β -glucosidase d'amandes est commercialisée sous la forme

¹³ Sinnott, M. L. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202.

⁹⁸ Zechel, D. L. ; Boraston, A. B. ; Gloster, T. ; Boraston, C. M. ; Macdonald, J. M. ; Tillbrook, D. M. G. ; Stick, R. V. ; Davies, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14313-14323.

d'un mélange majoritairement constitué de deux isoenzymes, qui n'ont pas forcément le même comportement vis-à-vis de substrats ou d'inhibiteurs différents. Ainsi on peut supposer que le *p*-nitrophényl- β -D-glucopyranoside est substrat des deux isoenzymes présentes, alors que l'iminosucre testé n'en inhibe qu'une.

Pour confirmer cela, nous avons réalisé la détermination du K_i de **172**, en utilisant un substrat plus difficile à hydrolyser, qui aura peut-être moins d'affinité avec les différentes isoenzymes. Nous avons donc refait les tests avec du cellobiose **251**, qui est un disaccharide d'unités glucose liées par une liaison β -1,4. Or l'utilisation d'un substrat disaccharidique ne permet pas un suivi direct de la réaction d'hydrolyse enzymatique. En effet, le cellobiose par action de la β -glucosidase produit du glucose, qui ne peut pas être détecté par spectrophotométrie. On utilise donc un autre système enzymatique associant la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* et la peroxydase de radis noir. En présence de glucose oxydase, le glucose libéré est oxydé en gluconolactone et l'oxygène est réduit en peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est alors réduit à son tour en présence de la peroxydase. Cette réduction s'accompagne de l'oxydation d'un colorant : l'*o*-dianisidine, dont la forme oxydée peut être détectée par spectrophotométrie à 492 nm (**Schéma 113**)⁹⁹.

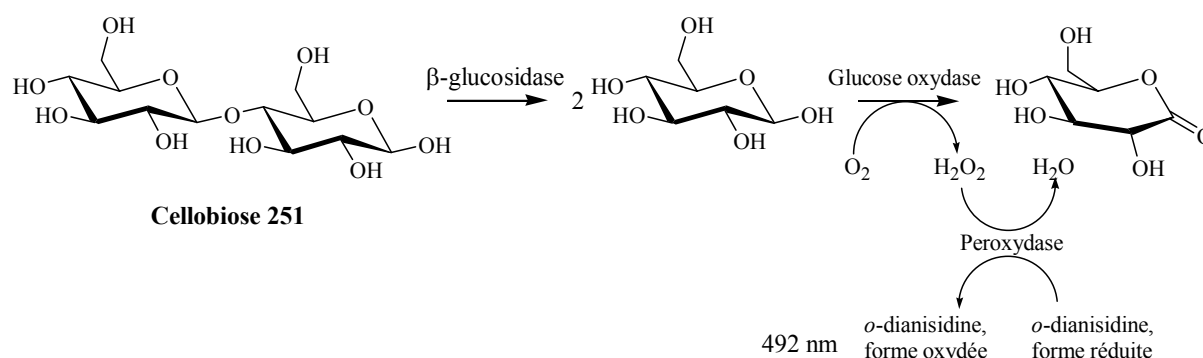
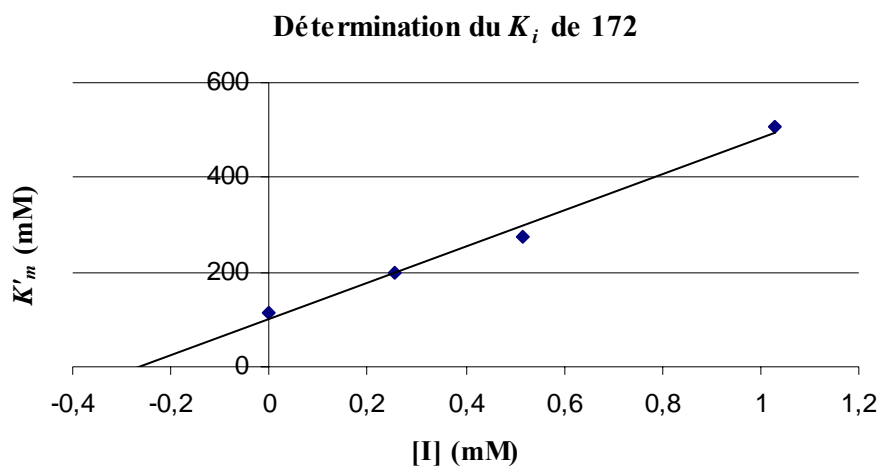


Schéma 113

Le cellobiose est donc mis en réaction à différentes concentrations en présence de β -glucosidase à 37°C. A intervalles de temps réguliers, des prélèvements sont effectués et le glucose est dosé, ce qui permet de calculer la vitesse d'hydrolyse du cellobiose et de déterminer la constante de Michaelis pour ce composé ($K_m = 114 \pm 29 \text{ mM}$). La valeur obtenue montre que le cellobiose n'est pas un bon substrat de la β -glucosidase.

Les mêmes expériences réalisées en présence de concentrations différentes en inhibiteurs permettent d'obtenir les constantes de Michaelis apparentes. On observe que les droites correspondantes sont parallèles, signes d'une inhibition compétitive. Cette fois, le tracé des valeurs de K'_m en fonction de la concentration en inhibiteur donne une droite, permettant de déterminer le K_i (**Graphique 7**). Nous trouvons une constante d'inhibition de $266 \pm 47 \mu\text{M}$, très supérieure à celle déterminée avec le *p*-nitrophényl- β -D-glucopyranoside ($7,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$).

⁹⁹ Fox, J. D. ; Robyt, J. F. *Anal. Biochem.* **1991**, 195, 93-96.



Graphique 7

Nous n'observons plus d'hydrolyse résiduelle du substrat, ce qui signifie que le cellobiose n'est substrat que d'une seule isoenzyme, celle qui est justement inhibée par l'iminosucre **172**. La constante d'inhibition obtenue montre que ce composé est un faible inhibiteur de cette isoenzyme, alors qu'il semble meilleur vis-à-vis du mélange.

V.3. Zwitterions

L'ensemble des zwitterions azotés et soufrés synthétisés a été testé sur les six glycosidases disponibles au laboratoire.

V.3.1. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur

Nous avons de la même façon que précédemment déterminé le pourcentage d'activité restante des enzymes en présence des molécules testées.

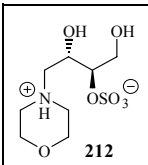
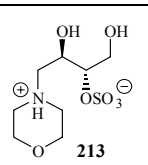
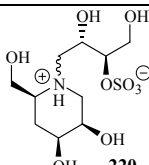
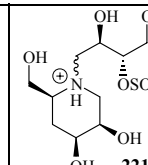
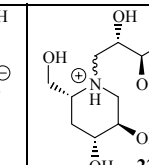
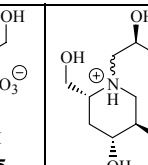
Dans le cas particulier de l' α -glucosidase de riz qui nécessite une quantité de substrat plus importante, nous avons déterminé ce pourcentage pour une concentration en substrat égale à $2K_m$. Et pour une concentration en inhibiteur de 1 mM, la relation donnant le K_i se simplifie de la façon suivante :

$$K_i = \frac{[I]}{\left(\frac{[S]}{K_m} + 1\right)\left(\frac{100}{\%AR} - 1\right)} = \frac{1}{3 \times \left(\frac{100}{\%AR} - 1\right)}$$

Ainsi un pourcentage d'activité restante inférieur à 75 % signifie que le K_i est inférieur à 1 mM. S'il est compris entre 76 % et 90 %, le K_i est compris entre 1 mM et 3 mM. Par contre, les composés donnant un pourcentage supérieur à 90 % ont été considérés comme non inhibiteurs de l'enzyme.

V.3.1.a. Zwitterions azotés

Les pourcentages d'activité restante obtenus en présence des six zwitterions azotés synthétisés sont donnés dans le tableau suivant (**Tableau 19**).

	 212	 213	 220	 221	 225	 226
α -glucosidase (levure de boulanger)	101 %	94 %	99 %	98 %	95 %	99 %
α -glucosidase (riz)	104 %	102 %	103 %	100 %	104 %	104 %
β -glucosidase (amandes)	108 %	106 %	100 %	102 %	93 %	93 %
α -galactosidase (grains de café vert)	96 %	83 %	113 %	111 %	97 %	97 %
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	100 %	100 %	103 %	102 %	109 %	nd
α -mannosidase (pois sabre)	104 %	96 %	103 %	95 %	100 %	92 %

nd = non déterminé

Tableau 19

Les résultats obtenus sont décevants, puisque seul le zwitterion **213** montre une légère activité vis-à-vis de l' α -galactosidase. La constante d'inhibition correspondante n'a pas pu être déterminée selon la méthode habituelle, car les deux droites obtenues en absence et en présence de l'inhibiteur ne sont pas parallèles. Il ne s'agit vraisemblablement pas d'un inhibiteur compétitif. Par manque de temps, une étude plus approfondie avec différentes concentrations en inhibiteur n'a pas pu être effectuée.

Les autres zwitterions azotés ne sont pas actifs sur les enzymes testées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus vis-à-vis d' α -glucosidases par les équipes de B. M. Pinto^{59,56,58} et O. Muraoka⁶⁰ pour leurs analogues azotés à cinq ou six chaînons. Ils sont cependant surprenants lorsque l'on considère les bons résultats obtenus avec la désoxynojirimycine et ses différents analogues. L'association entre un ion ammonium et un ion sulfate ne semble pas favorable.

V.3.1.b. Zwitterions soufrés

Les zwitterions soufrés montrent par contre des activités plus importantes. Ainsi les analogues à cinq chaînons **233** et **232**, dérivés du thiosucre de configuration *érythro*, montrent une activité satisfaisante vis-à-vis de la β -galactosidase. Cependant, les zwitterions **236** et

⁵⁹ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6268-6271.

⁵⁶ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Maddess, M. D. ; Chinapoo, S. M. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 937-942.

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

⁶⁰ Muraoka, O. ; Ying, S. ; Yoshikai, K. ; Matsuura, Y. ; Yamada, E. ; Minematsu, T. ; Tanabe, G. ; Matsuda, H. ; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1503-1505.

237, obtenus à partir du thiosucre racémique de configuration *thréo*, ne montrent qu'une légère activité sur la β -galactosidase et la β -glucosidase respectivement (**Tableau 20**).

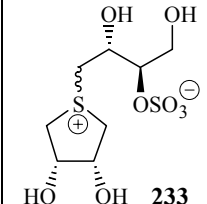
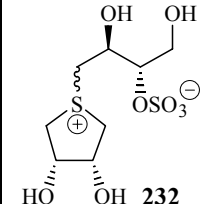
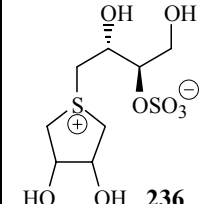
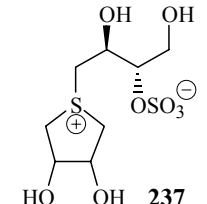
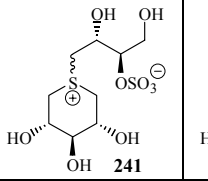
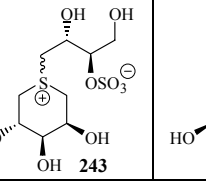
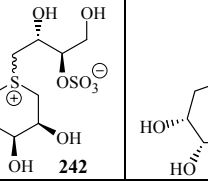
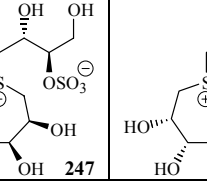
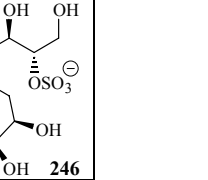
	 233	 232	 236	 237
α -glucosidase (levure de boulanger)	99 %	100 %	103 %	104 %
α -glucosidase (riz)	105 %	101 %	99 %	99 %
β -glucosidase (amandes)	84 %	114 %	94 %	74 %
α -galactosidase (grains de café vert)	107 %	88 %	102 %	100 %
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	36 %	45 %	83 %	106 %
α -mannosidase (pois sabre)	97 %	96 %	107 %	96 %

Tableau 20

Les zwitterions soufrés à six chaînons montrent également de bonnes activités, en particulier le zwitterion **241** qui semble être un très bon inhibiteur de la β -glucosidase. Les propriétés inhibitrices des zwitterions à sept chaînons sont moins importantes, puisque le composé **247** est légèrement inhibiteur de l' α -mannosidase, tandis que le composé **246** n'est actif sur aucune des enzymes testées (**Tableau 21**).

	 241	 243	 242	 247	 246
α -glucosidase (levure de boulanger)	105 %	104 %	102 %	nd	101 %
α -glucosidase (riz)	90 %	78 %	105 %	99 %	99 %
β -glucosidase (amandes)	3 %	100 %	98 %	98 %	98 %
α -galactosidase (grains de café vert)	103 %	99 %	nd	nd	98 %
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	91 %	102 %	63 %	101 %	93 %
α -mannosidase (pois sabre)	45 %	86 %	82 %	80 %	94 %

nd = non déterminé

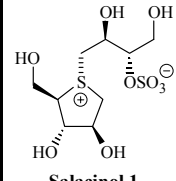
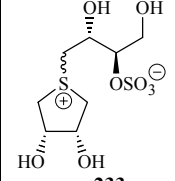
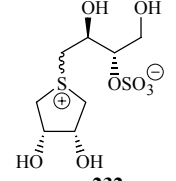
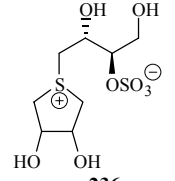
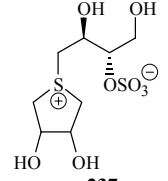
Tableau 21

Nous avons montré que tous les zwitterions possédant une activité sont des inhibiteurs réversibles.

V.3.2. Détermination des constantes d'inhibition

De la même façon que pour les iminosucres, nous avons déterminé les constantes d'inhibition associées aux zwitterions. Ainsi selon le pourcentage d'activité restante obtenu, nous avons effectué une détermination précise avec différents K'_m , soit une détermination rapide avec un seul K'_m .

Les K_i obtenus pour les zwitterions soufrés à cinq chaînons sont regroupés dans le tableau suivant et sont comparés aux résultats obtenus par Yuasa *et al.* pour le salacinol **1** (Tableau 22)⁶⁵. Dans le cas des déterminations précises de K_i , les droites obtenues à différentes concentrations en inhibiteur sont parallèles, les inhibiteurs correspondants sont donc compétitifs.

	K_i en mM (pH)				
	 Salacinol 1	 233	 232	 236	 237
α -glucosidase (levure de boulanger)	NI ^a	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b
α -glucosidase (riz)	0,0011* (6,8)	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b
β -glucosidase (amandes)	NI ^a	2,47	NI ^b	NI ^b	1,87
α -galactosidase (grains de café vert)	nd	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	nd	0,716 \pm 0,140 [#]	0,853 \pm 0,074 [#]	1,29	NI ^b
α -mannosidase (pois sabre)	2,1 ^s (4,5)	NI ^b	NI ^b	NI ^b	NI ^b

* = IC₅₀

^s = amandes, 40 % d'inhibition

[#] = inhibiteur compétitif

NI^a = non inhibiteur (moins de 50 % d'inhibition à 5 mM)

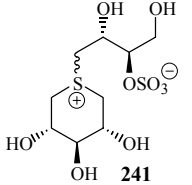
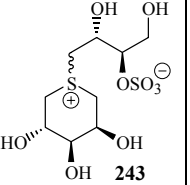
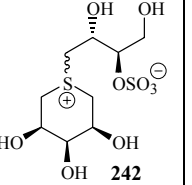
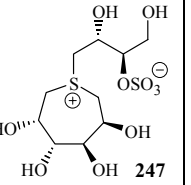
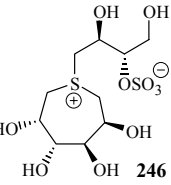
NI^b = non inhibiteur ($K_i > 3$ mM)

Tableau 22

Les analogues soufrés à cinq chaînons ne sont pas inhibiteurs de l'ensemble des α -glycosidases testées. Le salacinol étant un très bon inhibiteur de l' α -glucosidase de riz, on peut donc conclure que le groupement hydroxyméthyle est fondamental dans l'inhibition de cette enzyme. Les zwitterions **233** et **237** montrent une légère activité vis-à-vis de la β -glucosidase, alors que le salacinol n'est pas du tout actif. Enfin, les composés **233** et **232**, dérivés du thiosucre de configuration D-érythro, sont des inhibiteurs moyens de la β -galactosidase, qui ne semble donc pas très sensible à la stéréochimie de la chaîne sulfatée. Le zwitterion **236** est également légèrement actif sur cette enzyme.

⁶⁵ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1137-1139.

Les constantes d'inhibition déterminées pour les zwitterions soufrés à six et sept chaînons sont données dans le tableau suivant (**Tableau 23**). Comme précédemment, les droites obtenues, lors de la détermination précise des K_i , sont parallèles. Les inhibiteurs correspondants sont donc compétitifs. La constante d'inhibition du composé **242** vis-à-vis de la β -galactosidase est une estimation, car nous ne disposons pas d'une quantité suffisante de produit.

	K_i en mM				
					
α -glucosidase (levure de boulanger)	NI	NI	NI	nd	NI
α -glucosidase (riz)	1,41	1,32	NI	NI	NI
β -glucosidase (amandes)	0,016 \pm 0,001 [#]	NI	NI	NI	NI
α -galactosidase (grains de café vert)	NI	NI	nd	nd	NI
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	NI	NI	0,851 [£]	NI	NI
α -mannosidase (pois sabre)	0,467 \pm 0,097 [#]	NI (3,59)	1,34	1,83	NI

= inhibiteur compétitif
£ = estimation
NI = non inhibiteur ($K_i > 3$ mM)
nd = non déterminé

Tableau 23

Les composés **241** et **243** sont faiblement actifs vis-à-vis de l' α -glucosidase de riz. La présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire permet peut-être de compenser partiellement l'absence du groupement hydroxyméthyle, qui semble indispensable à l'inhibition de cette enzyme. Comme prévu par les pourcentages d'activité restante déterminés, le zwitterion **247** à sept chaînons est faiblement inhibiteur de l' α -mannosidase. Le composé **242** est également faiblement inhibiteur de cette enzyme, mais il a une meilleure activité vis-à-vis de la β -galactosidase. Enfin, le zwitterion à six chaînons **241**, dérivé du thiosucre de configuration *xylo*, faiblement inhibiteur de l' α -glucosidase de riz, est également un bon inhibiteur de l' α -mannosidase. Mais il est surtout un très bon inhibiteur compétitif de la β -glucosidase. Il s'agit du composé le plus actif parmi les zwitterions, que nous avons synthétisés. Or Pinto et coll. qui ont également réalisé la synthèse de ce produit, n'ont pas montré d'activité significative de ce produit vis-à-vis de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*⁵⁸. Lors de la détermination de son K_i avec le *p*-nitrophényl- β -D-glucoopyranoside comme substrat, nous n'avons rencontré aucun problème. Le tracé des K'_m en fonction de la concentration en inhibiteur a bien donné une droite, contrairement aux tests effectués avec les iminosucres. Cela signifie que ce composé inhibe les deux isoenzymes présentes dans la β -glucosidase d'amandes commerciale.

⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.

En conclusion, les analogues azotés du salacinol, que nous avons synthétisés, ne sont pas actifs vis-à-vis des glycosidases testées. Cela semble surprenant, lorsque l'on considère la puissante activité inhibitrice de la désoxynojirimycine et de ses différents analogues.

Par contre, les analogues soufrés sont des inhibiteurs moyens, mais sélectifs de ces enzymes. En effet, excepté le zwitterion **246** à sept chaînons, tous les composés soufrés présentent au moins une activité, même faible, sur une des glycosidases. L'inhibition observée est donc induite par la présence de l'ion sulfonium et de la chaîne sulfatée, puisque les thiosucres seuls ne sont pas inhibiteurs.

Globalement, les zwitterions à sept chaînons semblent moins actifs que les autres analogues. Mais il ne semble pas y avoir de relation directe entre l'inhibition et la taille du cycle. De même, la stéréochimie de la chaîne sulfatée paraît peu influencer l'activité. Par contre, la stéréochimie des groupements hydroxyles du cycle soufré semble plus importante. En effet, seul le zwitterion **241** a montré une forte inhibition vis-à-vis de la β -glucosidase d'amandes, ce qui est intéressant si l'on considère que le salacinol est un inhibiteur d' α -glucosidases. Et on peut remarquer que la configuration des groupements hydroxyles de ce composé correspond à celle du glucose. Cependant, le composé **243** n'est pas inhibiteur de l' α -mannosidase, alors que sa structure présente une analogie avec celle du mannose.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



L'objectif de ce travail était la synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues du salacinol, et l'évaluation de leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de différentes glycosidases.

Pour parvenir à cela, il nous fallait disposer de divers hétérocycles et sulfates cycliques, permettant de conduire aux zwitterions attendus par la méthodologie suivante (**Schéma 114**).

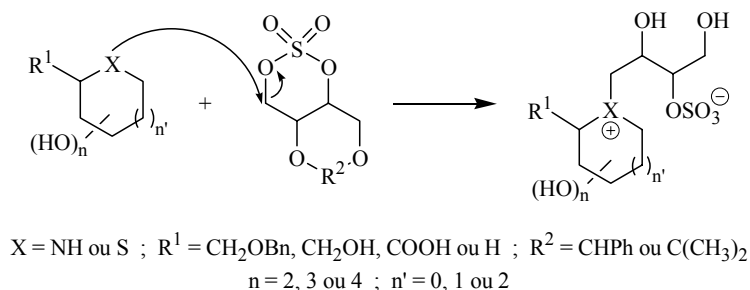


Schéma 114

Nous disposons de six hétérocycles soufrés synthétisés dans le Laboratoire des Glucides de l'Université de Picardie à Amiens. Pour faire varier la nature de l'hétérocycle, nous avons également préparé plusieurs pipéridines polyhydroxylées, analogues de sucres. Nous avons utilisé, pour cela, une méthode de synthèse originale basée sur l'utilisation d'isoxazolines et la réactivité des sulfates cycliques (**Schéma 115**).

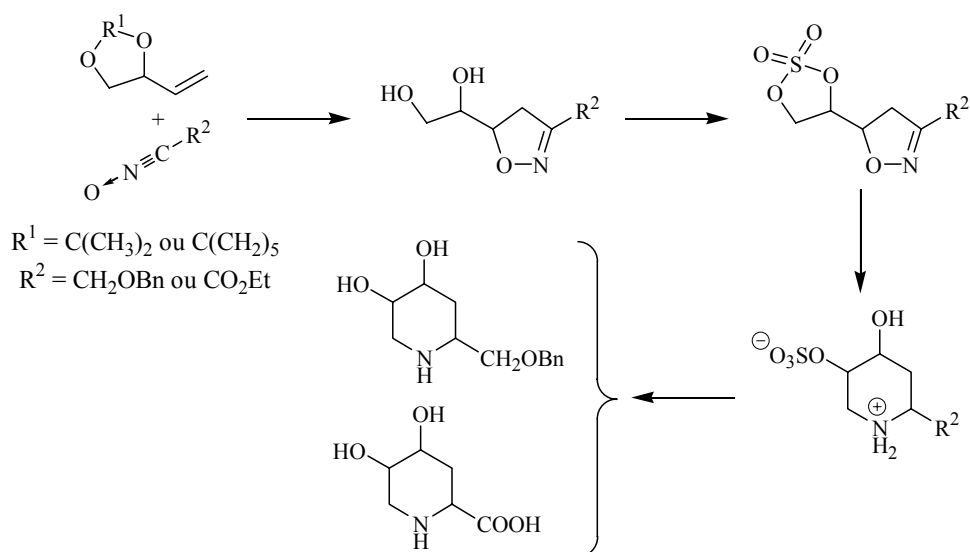


Schéma 115

Nous avons ainsi obtenu deux iminosucres benzylés optiquement actifs, analogues de la désoxymannojirimycine et de la L-désoxynojirimycine. Dans ce cas, l'étape clé d'hydrogénélyse de l'isoxazoline sulfate est régiosélective et stéréosélective. Nous avons également développé la synthèse de pipéridines racémiques, analogues de l'acide pipécolique. Pour cette série, l'étape d'hydrogénélyse est également régiosélective, mais elle n'est plus stéréosélective.

Nous avons aussi synthétisé à l'échelle du gramme deux sulfates cycliques, dérivés du L- et du D-érythritol, à partir du D-glucose (**Schéma 116**), nous permettant de greffer une chaîne sulfatée identique à celle du salacinol et son énantiomère.

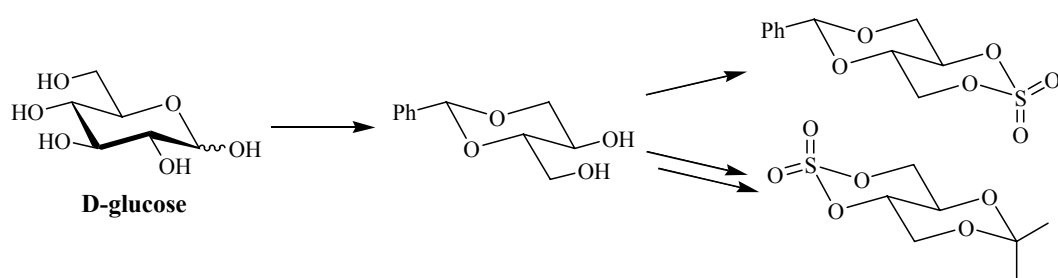


Schéma 116

Par couplage des différents iminosucres et thiosucres sur les sulfates cycliques, nous avons obtenu six zwitterions azotés et neuf zwitterions soufrés, dont sept sont sous la forme de mélanges de diastéréoisomères (**Figure 58**). Ces réactions de couplage se sont effectuées avec de bons rendements pour les iminosucres (71 % à 90 %) et avec des rendements plus variables pour les thiosucres (21 % à 97 %).

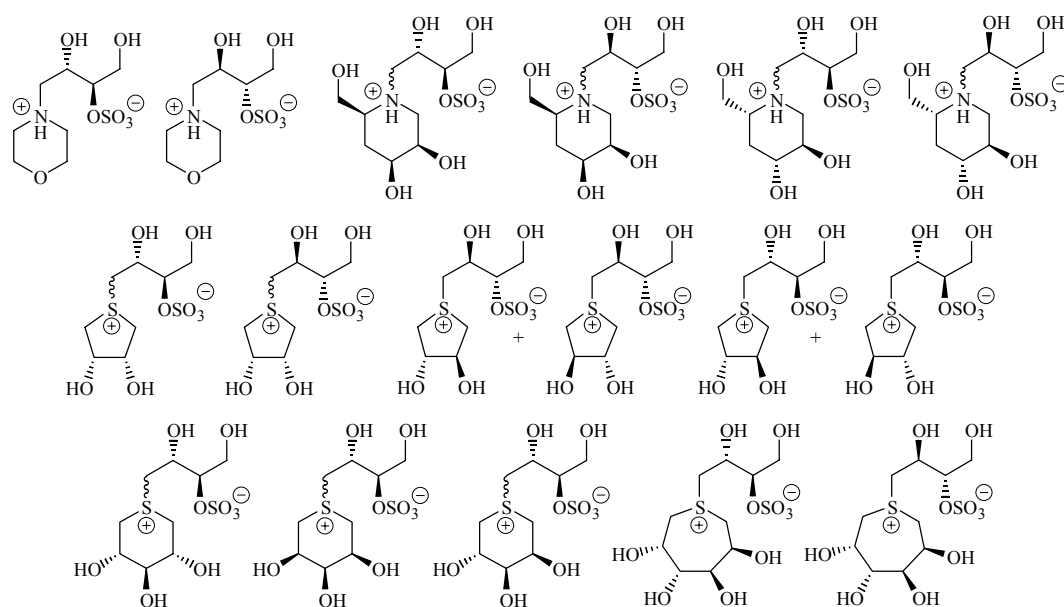


Figure 58

L'évaluation des propriétés inhibitrices des iminosucres, analogues de la désoxymannojirimycine et de la L-désoxynojirimycine, a montré le fort potentiel de ces composés. Par contre, les analogues soufrés du salacinol sont de plus faibles inhibiteurs des glycosidases testées, mais ils sont sélectifs. Néanmoins, un des zwitterions à six chaînons s'est révélé être très actif vis-à-vis de la β -glucosidase d'amandes, alors que le salacinol est un inhibiteur d' α -glucosidases. Les zwitterions azotés n'ont par contre pas montré de propriétés inhibitrices significatives. Nous avons donc apporté quelques éléments de réponses quant aux relations structure-activité de ce type de composés zwitterioniques. Ainsi la présence de l'ion sulfonium semble indispensable à l'inhibition des glycosidases.

L'objectif fixé initialement a donc été rempli. Il reste cependant encore de nombreux travaux à accomplir.

Ainsi, notre méthode de synthèse d'iminosucres peut être développée et étendue à d'autres pipéridines polyhydroxylées, notamment celles de configurations opposées *L-manno* et *D-gluco*. Pour cela, nous envisageons d'utiliser d'autres microorganismes ou d'autres systèmes d'enzymes isolées capables de réduire sélectivement la fonction carbonyle. Etant donné les problèmes d'inhibition rencontrés avec les cétones α,β -éthyléniques, nous pourrions effectuer ces réactions enzymatiques sur des cétones α,β -acétyléniques (**Schéma 117**).

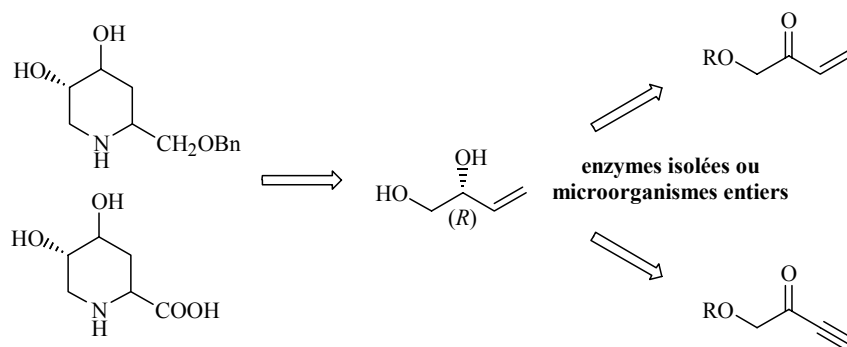


Schéma 117

Il sera de plus très intéressant de poursuivre l'étude de la réaction d'hydrogénolyse des isoxazoles sulfates, et plus particulièrement l'étude de la stéréosélectivité de la réduction de l'imine en fonction du groupement porté par l'isoxazoline (**Schéma 118**).

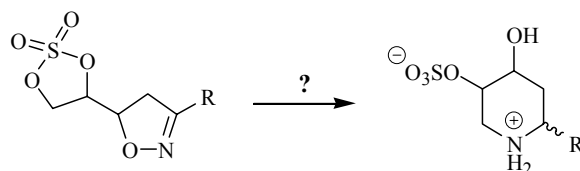


Schéma 118

La synthèse d'iminosucres hydroxylés en position 4 peut également être envisagée, soit par l'introduction d'un groupement hydroxyle sur l'isoxazoline obtenue par cycloaddition, soit par synthèse directe de l'isoxazoline hydroxylée (**Schéma 119**).

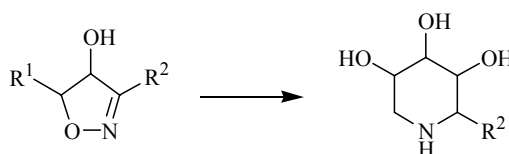


Schéma 119

L'ensemble de ces travaux nous permettra d'étendre notre gamme d'analogues du salacinol, potentiellement actifs. Il sera également intéressant de travailler sur des modifications de la chaîne sulfatée, ce qui n'a pas encore été exploité. Ainsi, nous pourrions étudier l'influence de sa longueur et de la position du groupement sulfate, en réalisant par exemple le couplage avec des sulfates 1,2-cycliques, comme le sulfate cyclique du glycérol, facile d'accès (**Schéma 120**).

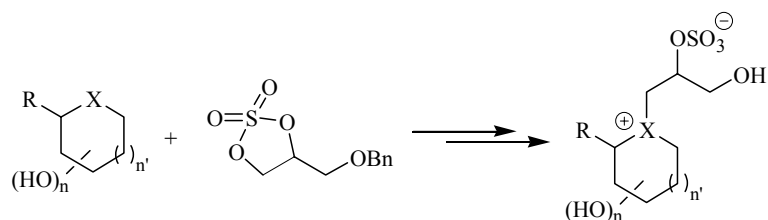


Schéma 120

Enfin, l'hydrolyse du groupement sulfate des zwitterions azotés peut être envisagée, car cela pourrait permettre de restaurer, voire même éventuellement d'améliorer les propriétés inhibitrices propres aux iminosucres (**Schéma 121**).

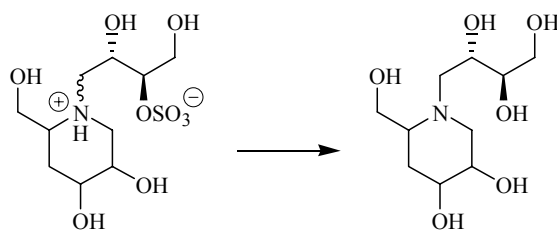


Schéma 121

PARTIE EXPERIMENTALE



SYNTHESE

I. Généralités

I.1. Nomenclature et numérotation

Dans la majorité des cas, la nomenclature utilisée est la nomenclature officielle recommandée par l'IUPAC. Cependant, lorsque c'est possible, la nomenclature spécifique appliquée aux glucides est privilégiée.

Par contre, la numérotation des atomes utilisée pour l'interprétation des spectres de RMN est le plus souvent arbitraire. Elle est mentionnée dans chaque cas sur les molécules encadrées.

I.2. Techniques chromatographiques

Les **chromatographies sur couches minces (CCM)** ont été effectuées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ (MERCK). La révélation a été faite, sauf mention contraire, par exposition sous rayons ultraviolets et par trempage dans une solution de vanilline suivi d'un chauffage. L'éluant utilisé est précisé dans chaque cas.

Les **chromatographies sur colonne** ont été réalisées sur gel de silice GEDURAN Kieselgel Si 60 (40-63 μm , MERCK) selon la technique de "chromatographie éclair". L'éluant utilisé est indiqué pour chaque composé.

Les **purifications sur résine** ont été effectuées sur une résine échangeuse de cations DOWEX 50WX8 (200-400 mesh ; FLUKA) sous forme H⁺, lavée à l'ammoniaque 1N et régénérée au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 3N.

I.3. Techniques spectroscopiques et d'analyse

Les **spectres infrarouges (IR)** ont été réalisés sur un appareil PERKIN ELMER 881 ou un appareil PERKIN-ELMER FT-IR Paragon 500 sous forme de film entre deux lames de NaCl, sous forme de pastille de KBr ou en solution dans le solvant indiqué. Les nombres d'onde sont donnés en cm^{-1} .

Les **spectres de masse** ont été réalisés sur un appareil Hewlett Packard 5989B. Le mode d'ionisation utilisé est mentionné dans chaque cas (IC : ionisation chimique ; IE : impact électronique ; ESI : électrospray).

Les **spectres de masse haute résolution** ont été effectués par le Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest de l'Université de Rennes I sur un spectromètre Haute Résolution MS/MS ZABSpec TOF Micromass, et par le Centre Régional de Mesures Physiques de Clermont-Ferrand sur un spectromètre Haute Résolution QTOF micro WATERS, en électrospray (ESI), en ionisation en phase liquide (LSIMS) ou en ionisation chimique (IC) en mode positif (+).

Les **spectres de Résonance Magnétique Nucléaire** (RMN) ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AVANCE 400 (^1H : 400 MHz ; ^{13}C : 100,6 MHz) ou BRUKER AVANCE 500 (pour les spectres HMBC longue distance). Les spectres du ^{13}C ont été réalisés en JMOD pour un plus grand confort d'interprétation. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et déterminés par rapport au solvant deutéré utilisé, qui est précisé pour chaque composé. Dans le cas de D_2O , les spectres de ^{13}C sont calibrés automatiquement par rapport à la fenêtre spectrale.

Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont les suivantes :

s : singulet	ddd : doublet de doublets dédoublé
se : singulet élargi	t : triplet
ps : pseudo singulet	td : triplet dédoublé
d : doublet	pt : pseudo triplet
pd : pseudo doublet	q : quadruplet
d_{AB} : doublet d'un système AB	pq : pseudo quadruplet
dd : doublet dédoublé	m : multiplet

Les spectres de RMN du ^1H ont été utilisés pour déterminer les rapports diastéréoisomériques des mélanges obtenus.

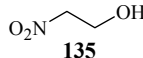
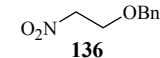
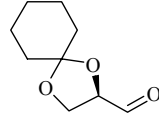
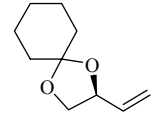
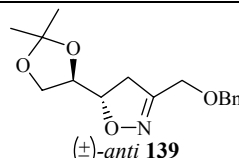
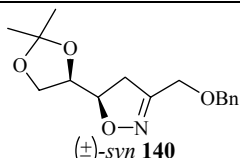
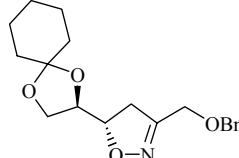
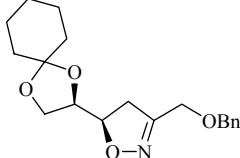
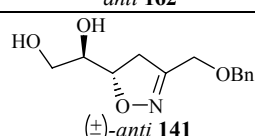
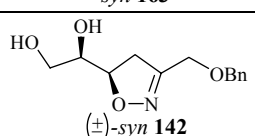
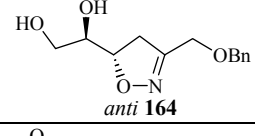
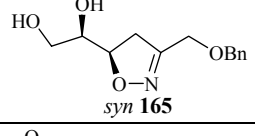
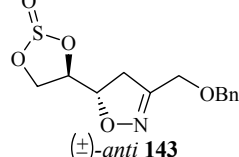
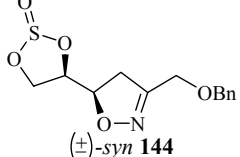
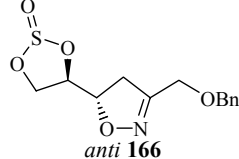
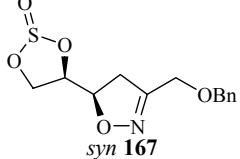
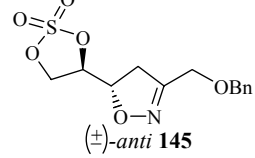
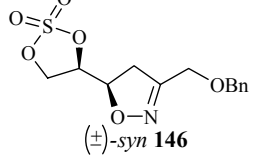
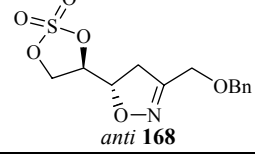
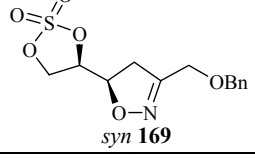
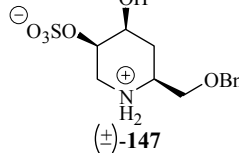
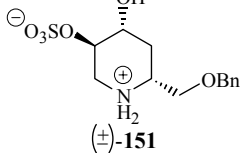
En RMN du ^{13}C pour les mélanges de zwitterions, certains signaux sont absents, car ils ne sont pas détectés ou parce qu'ils se superposent.

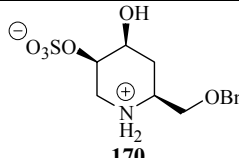
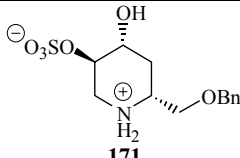
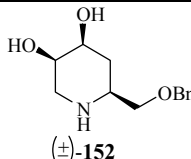
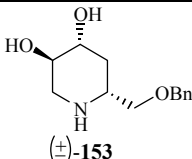
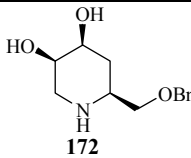
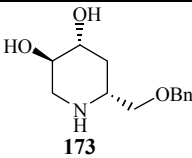
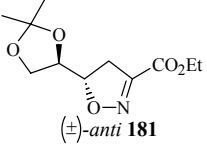
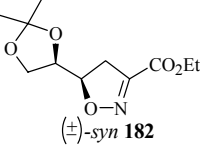
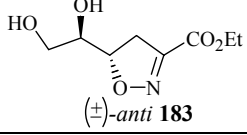
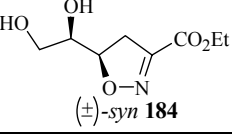
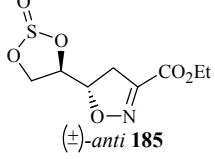
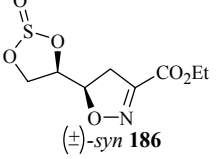
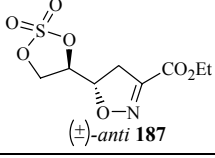
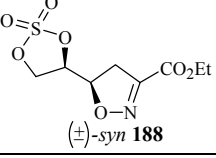
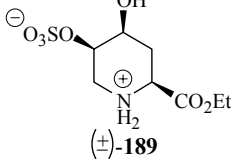
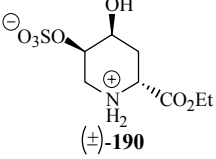
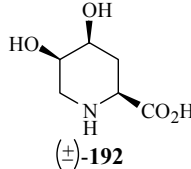
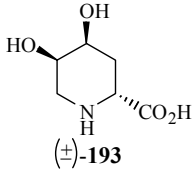
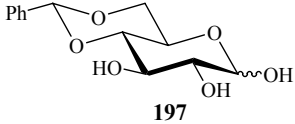
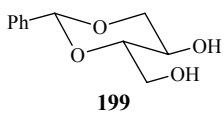
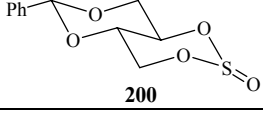
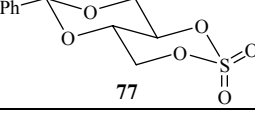
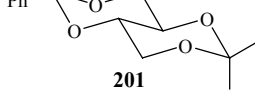
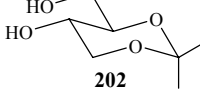
Les **pouvoirs rotatoires** ont été mesurés sur un polarimètre JASCO modèle DIP-370 à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm). La température de mesure est précisée pour chaque composé, ainsi que le solvant utilisé et la concentration qui est donnée en g/100 mL.

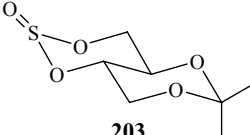
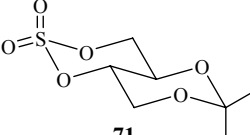
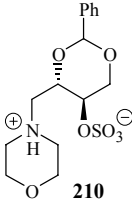
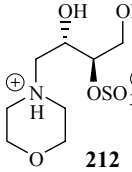
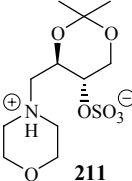
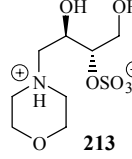
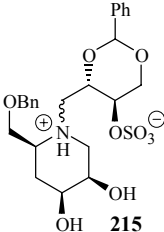
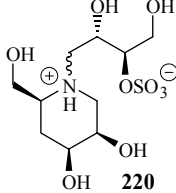
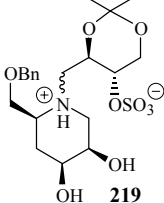
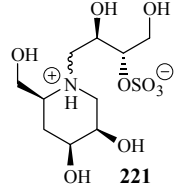
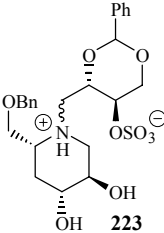
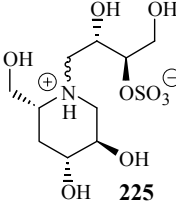
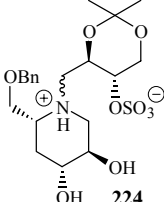
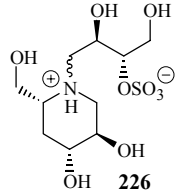
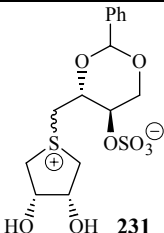
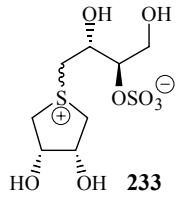
Les **points de fusion** ont été mesurés avec un microscope à platine chauffante REICHERT et sont non corrigés.

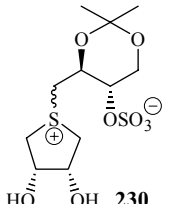
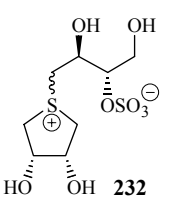
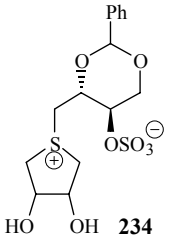
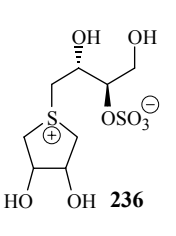
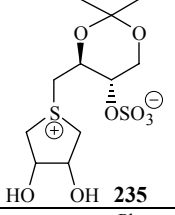
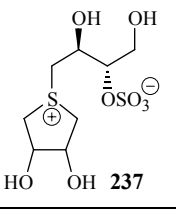
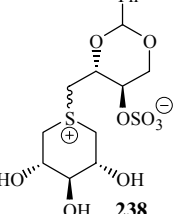
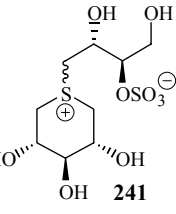
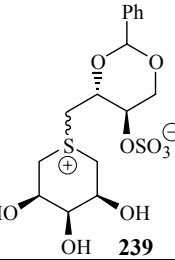
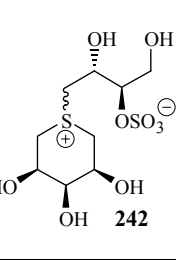
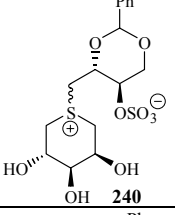
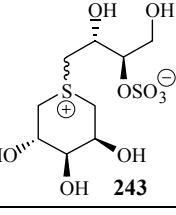
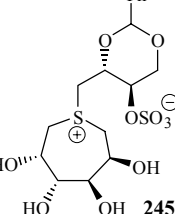
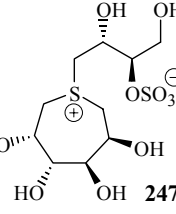
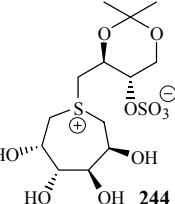
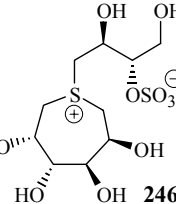
Les **analyses élémentaires** ont été effectuées par le Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison (Rhône).

II. Sommaire

 135	p. 151	 136	p. 152
 155	p. 153	 156	p. 154
 (±)-anti 139	p. 155	 (±)-syn 140	p. 156
 anti 162	p. 157	 syn 163	p. 158
 (±)-anti 141	p. 159	 (±)-syn 142	p. 160
 anti 164	p. 161	 syn 165	p. 161
 (±)-anti 143	p. 162	 (±)-syn 144	p. 163
 anti 166	p. 164	 syn 167	p. 164
 (±)-anti 145	p. 165	 (±)-syn 146	p. 166
 anti 168	p. 167	 syn 169	p. 167
 (±)-147	p. 168	 (±)-151	p. 169

 170	p. 170	 171	p. 170
 (±)-152	p. 171	 (±)-153	p. 172
 172	p. 173	 173	p. 173
 (±)-anti 181	p. 174	 (±)-syn 182	p. 174
 (±)-anti 183	p. 175	 (±)-syn 184	p. 176
 (±)-anti 185	p. 177	 (±)-syn 186	p. 178
 (±)-anti 187	p. 179	 (±)-syn 188	p. 180
 (±)-189	p. 181	 (±)-190	p. 182
 (±)-192	p. 183	 (±)-193	p. 184
 197	p. 185	 199	p. 186
 200	p. 187	 77	p. 188
 201	p. 189	 202	p. 190

 203	p. 191	 71	p. 192
 210	p. 193	 212	p. 194
 211	p. 195	 213	p. 196
 215	p. 197	 220	p. 198
 219	p. 199	 221	p. 200
 223	p. 201	 225	p. 202
 224	p. 203	 226	p. 204
 231	p. 205	 233	p. 207

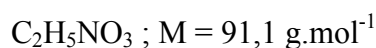
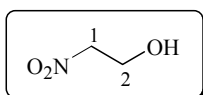
 230	p. 208	 232	p. 209
 234	p. 210	 236	p. 211
 235	p. 212	 237	p. 213
 238	p. 214	 241	p. 215
 239	p. 216	 242	p. 217
 240	p. 218	 243	p. 219
 245	p. 220	 247	p. 221
 244	p. 222	 246	p. 223

III. Synthèse des iminosucres

III.1. Synthèse des précurseurs

III.1.1. Synthèse du nitroéthanol protégé

2-nitroéthanol (135)



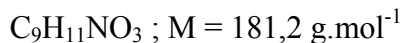
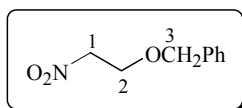
A une suspension de paraformaldéhyde (12,5 g ; 0,416 mol) dans du nitrométhane (250 mL ; 4,66 mol), est ajoutée goutte à goutte une solution de KOH 3N jusqu'à atteindre un pH de 8 (environ 1 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant une heure, puis son pH est ajusté à environ 4 par ajout d'acide sulfurique concentré. Le milieu est agité pendant une heure, puis le précipité formé est filtré. Le filtrat est concentré sous pression réduite pour éliminer l'excès de nitrométhane, puis distillé sous vide en présence de diphényléther pour limiter les risques d'explosion. Le mélange obtenu est décanté et la phase étherée est éliminée. La phase alcoolique est lavée deux fois avec du cyclohexane. On obtient 17,2 g de nitroéthanol sous la forme d'une huile incolore.

Rendement = 46 %.

R_f = 0,30 (CH₂Cl₂/MeOH : 98/2).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 3,03 (se, 1H, OH) ; 4,13 (m, 2H, H₂) ; 4,52 (m, 2H, H₁).

1-benzyloxy-2-nitroéthane (136)



A une solution de 2-nitroéthanol **135** (6,00 g ; 65,9 mmol) et de benzyl-2,2,2-trichloroacétimide (18,3 g ; 72,5 mmol ; 1,1 éq) dans 200 mL d'un mélange cyclohexane/dichlorométhane : 2/1 sous atmosphère d'argon, sont ajoutés 300 μL d'acide triflique (3,38 mmol ; 0,05 éq). La solution est agitée à température ambiante pendant une heure. Le précipité formé est filtré sur fritté et le filtrat est lavé avec une solution saturée de NaHCO_3 (50 mL) et avec de l'eau (50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 80/20) pour donner 11,3 g d'un liquide incolore.

Rendement = 94 %.

R_f = 0,29 (cyclohexane/AcOEt : 80/20).

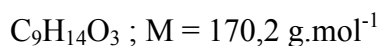
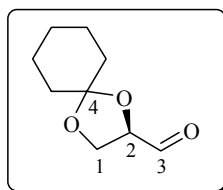
IR (film) ν : 3032 (C-H aromatique) ; 1556 et 1377 (N=O) ; 1215 et 1117 (C-O).

RMN ¹H (CDCl_3) δ : 3,95 (t, 2H, H₂, J = 5,0 Hz) ; 4,55 (t, 2H, H₁, J = 5,0 Hz) ; 4,58 (s, 2H, H₃) ; 7,35 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CDCl_3) δ : 65,4 (C₂) ; 73,5 (C₃) ; 75,2 (C₁) ; 127,8-128,1-128,6 (C_{arom}) ; 137,1 (C_{arom}).

III.1.2. Synthèse de l'alcène optiquement actif

2,3-*O*-cyclohexylidène-D-glycéraldéhyde (155)



A une solution de 1,2:5,6-di-*O*-cyclohexylidène-D-mannitol **154** (12,5 g ; 36,5 mmol) dans 55 mL d'acétonitrile aqueux à 60 % à 5°C, on ajoute du NaIO₄ par petites portions (15,7 g ; 73,4 mmol ; 2 éq). Une fois l'addition terminée (50 minutes), le mélange est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le précipité formé est filtré et rincé avec du dichlorométhane. On ajoute 50 mL d'eau au filtrat et on extrait avec du dichlorométhane (3 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec de l'eau (2 x 50 mL) et avec une solution saturée de NaCl (50 mL), puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par distillation sous pression réduite (56°C sous 0,7 mm Hg) pour donner 8,35 g d'un liquide incolore, immédiatement mis en réaction dans l'étape suivante.

Rendement = 67 %.

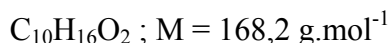
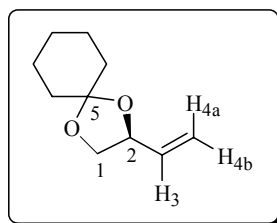
R_f = 0,27 (CH₂Cl₂/MeOH : 97/3).

IR (film) ν : 2668 (C-H aldéhyde) ; 1736 (C=O) ; 1097 (C-O).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,39-1,65 (m, 10H, 5CH₂) ; 4,06 (dd, 1H, H_{1b}, J_{1b-2} = 4,5 Hz, J_{1b-1a} = 8,5 Hz) ; 4,13 (dd, 1H, H_{1a}, J_{1a-2} = 7,5 Hz, J_{1a-1b} = 8,5 Hz) ; 4,35 (ddd, 1H, H₂, J₂₋₃ = 2,0 Hz, J_{2-1b} = 4,5 Hz, J_{2-1a} = 7,5 Hz) ; 9,69 (d, 1H, H₃, J₃₋₂ = 2,0 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 23,7-23,8-24,9-34,5-35,8 (CH₂) ; 65,1 (C₁) ; 79,5 (C₂) ; 111,9 (C₄) ; 202,0 (C₃).

(2S)-1,2-O-cyclohexylidènebut-3-ène-1,2-diol (156)



Une solution de tBuOK (5,48 g ; 48,8 mmol ; 1,4 éq) dans 62 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte à 0°C et sous atmosphère d'argon à une solution de bromure de méthyltriphenylphosphonium (17,6 g ; 49,3 mmol ; 1,4 éq) dans 82 mL de THF anhydre. Après agitation pendant 1h30, le mélange est refroidi à -78°C . On ajoute goutte à goutte une solution de 2,3-O-cyclohexylidène-D-glycéraldéhyde **155** (6,11 g ; 35,9 mmol) dans 52 mL de THF anhydre. Le mélange est agité une heure à -78°C , puis 14 heures à température ambiante. La réaction est arrêtée par ajout de 40 mL d'une solution saturée de NH_4Cl . Le précipité d'oxyde de triphénylphosphine est partiellement éliminé par filtration. Le filtrat est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de NaCl (2 x 50 mL), puis séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris plusieurs fois dans de l'éther froid afin de faire précipiter l'oxyde de triphénylphosphine, qui est éliminé par filtration. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/ AcOEt : 98/2). On obtient 5,47 g d'un liquide incolore.

Rendement = 91 %.

$R_f = 0,25$ (cyclohexane/AcOEt : 98/2).

$[\alpha]_D^{22} = +4,2$ ($c = 1,09$; AcOEt) {litt.⁸² : $[\alpha]_D = +4,0$ ($c = 1,7$; AcOEt)}

IR (film) ν : 3084 (C-H alcène) ; 1649 (C=C) ; 1107 (C-O).

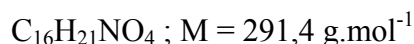
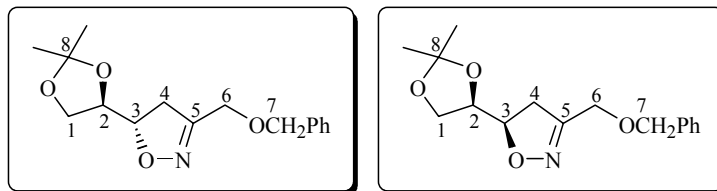
RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,41-1,63 (m, 10H, 5 CH_2) ; 3,58 (dd, 1H, H_{1b} , $J_{1b-2} = 7,0 \text{ Hz}$, $J_{1b-1a} = 8,0 \text{ Hz}$) ; 4,08 (dd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = 7,0 \text{ Hz}$, $J_{1a-1b} = 8,0 \text{ Hz}$) ; 4,50 (q, 1H, H_2 , $J = 7,0 \text{ Hz}$) ; 5,20 (dd, 1H, H_{4b} , $J_{4b-4a} = 1,0 \text{ Hz}$, $J_{4b-3} = 10,0 \text{ Hz}$) ; 5,31 (dd, 1H, H_{4a} , $J_{4a-4b} = 1,0 \text{ Hz}$, $J_{4a-3} = 17,0 \text{ Hz}$) ; 5,80 (ddd, 1H, H_3 , $J_{3-2} = 7,0 \text{ Hz}$, $J_{3-4b} = 10,0 \text{ Hz}$, $J_{3-4a} = 17,0 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 24,1-24,1-25,3-35,6-36,4 (CH_2) ; 69,1 (C_1) ; 77,2 (C_2) ; 110,2 (C_5) ; 118,0 (C_4) ; 136,4 (C_3).

⁸² Bergmeier, S. C. ; Stanchina, D. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2852-2859.

III.2. Synthèse des iminosucres avec R = CH₂OBn

(±)-*anti*-3-benzyloxyméthyl-5-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-isoxazoline (139)
et (±)-*syn*-3-benzyloxyméthyl-5-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-isoxazoline (140)



A une solution de benzyloxynitroéthane **136** (5,00 g ; 27,6 mmol) dans 290 mL de toluène anhydre sous atmosphère d'argon, on ajoute du (±)-2,2-diméthyl-4-vinyl-1,3-dioxolane **138** (3,90 g ; 30,4 mmol ; 1,1 éq), du 1,4-phenylènediisocyanate (13,3 g ; 82,8 mmol ; 3 éq) et de la triéthylamine (385 μL ; 2,76 mmol ; 0,1 éq). La solution est chauffée à reflux pendant 12 heures. On ajoute 29 mL d'eau et on chauffe à reflux durant 6 heures. Le précipité formé est filtré sur fritté, puis rincé avec un mélange cyclohexane/éther : 40/60. La phase aqueuse est éliminée par décantation et la phase organique est séchée sur MgSO₄, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/Et₂O : 40/60). On obtient 4,06 g de composé (±)-*anti* **139** sous la forme d'une huile légèrement jaune et 1,16 g de composé (±)-*syn* **140** sous la forme d'une huile incolore.

Composé (±)-*anti* 139 :

Rendement = 51 %.

R_f = 0,44 (cyclohexane/Et₂O : 40/60).

IR (film) ν : 3029 (C-H aromatique) ; 1625 (C=N) ; 1212 et 1074 (C-O).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,34 (s, 3H, CH₃) ; 1,42 (s, 3H, CH₃) ; 3,06 (dd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 6,8 Hz ; J_{4b-4a} = 17,5 Hz) ; 3,15 (dd, 1H, H_{4a}, J_{4a-3} = 10,2 Hz ; J_{4a-4b} = 17,5 Hz) ; 3,87 (dd, 1H, H_{1b}, J_{1b-2} = 4,9 Hz, J_{1b-1a} = 8,5 Hz) ; 4,03 (td, 1H, H₂, J_{2-1b} = 4,9 Hz, J_{2-1a} = J₂₋₃ = 6,2 Hz) ; 4,11 (dd, 1H, H_{1a}, J_{1a-2} = 6,2 Hz, J_{1a-1b} = 8,5 Hz) ; 4,29 (s, 2H, H₆) ; 4,53 (s, 2H, H₇) ; 4,50-4,57 (m, 1H, H₃) ; 7,28-7,38 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 25,2 (CH₃) ; 26,8 (CH₃) ; 38,0 (C₄) ; 64,5 (C₆) ; 67,2 (C₁) ; 72,8 (C₇) ; 76,1 (C₂) ; 80,9 (C₃) ; 109,8 (C₈) ; 128,0-128,1-128,6 (C_{arom}) ; 137,3 (C_{arom}) ; 156,7 (C₅).

Analyse élémentaire : C₁₆H₂₁NO₄ (291,4)

	C %	H %	N %
Calculés :	65,96	7,26	4,81
Trouvés :	65,79	7,22	5,02

Composé (±)-syn 140 :

Rendement = 14 %.

R_f = 0,26 (cyclohexane/Et₂O : 40/60).

IR (film) ν : 3032 (C-H aromatique) ; 1626 (C=N) ; 1213 et 1076 (C-O).

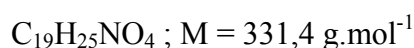
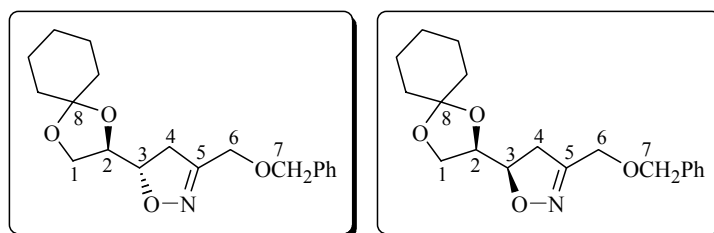
RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,36 (s, 3H, CH₃) ; 1,43 (s, 3H, CH₃) ; 2,96 (dd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 7,8 Hz, J_{4a-4b} = 17,6 Hz) ; 3,10 (dd, 1H, H_{4a}, J_{4a-3} = 11,0 Hz, J_{4a-4b} = 17,6 Hz) ; 3,84 (dd, 1H, H_{1b}, J_{1b-2} = 6,7 Hz, J_{1b-1a} = 8,5 Hz) ; 4,05 (dd, 1H, H_{1a}, J_{1a-2} = 6,7 Hz, J_{1a-1b} = 8,5 Hz) ; 4,22 (td, 1H, H₂, J₂₋₃ = 4,7 Hz, J_{2-1b} = J_{2-1a} = 6,7 Hz) ; 4,30 (s, 2H, H₆) ; 4,50 (d_{AB}, 1H, H_{7b}, J_{AB} = 11,7 Hz) ; 4,55 (d_{AB}, 1H, H_{7a}, J_{AB} = 11,7 Hz) ; 4,67 (ddd, 1H, H₃, J₃₋₂ = 4,7 Hz, J_{3-4b} = 7,8 Hz, J_{3-4a} = 11,0 Hz) ; 7,29-7,38 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 25,4 (CH₃) ; 26,3 (CH₃) ; 37,2 (C₄) ; 64,4 (C₆) ; 65,4 (C₁) ; 72,6 (C₇) ; 76,7 (C₂) ; 79,9 (C₃) ; 110,1 (C₈) ; 128,0-128,1-128,6 (C_{arom}) ; 137,4 (C_{arom}) ; 156,4 (C₅).

Analyse élémentaire : C₁₆H₂₁NO₄ (291,4)

	C %	H %	N %
Calculés :	65,96	7,26	4,81
Trouvés :	65,98	7,29	5,02

**(5*S*)-3-benzyloxyméthyl-5-[(1*R*)-1,2-*O*-cyclohexylidène-1,2-dihydroxyéthyl]-2-isoxazoline (162) et
(5*R*)-3-benzyloxyméthyl-5-[(1*R*)-1,2-*O*-cyclohexylidène-1,2-dihydroxyéthyl]-2-isoxazoline (163)**



A une solution de benzyloxynitroéthane **136** (4,19 g ; 23,1 mmol) dans 235 mL de toluène anhydre sous atmosphère d'argon, on ajoute du (2*S*)-1,2-*O*-cyclohexylidènebut-3-ène-1,2-diol **156** (4,28 g ; 25,5 mmol ; 1,1 éq), du 1,4-phenylènediisocyanate (11,3 g ; 69,8 mmol ; 3 éq) et de la triéthylamine (320 μL ; 2,30 mmol ; 0,1 éq). La solution est chauffée à reflux pendant 23 heures. On ajoute 25 mL d'eau et on chauffe à reflux durant 7 heures. Le précipité formé est filtré sur fritté, puis rincé avec du cyclohexane. La phase aqueuse est éliminée par décantation et la phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/ Et_2O : 60/40). On obtient 3,15 g de composé *anti* **162** sous la forme d'une huile légèrement jaune et 1,10 g de composé *syn* **163** sous la forme d'une huile légèrement jaune.

Composé *anti* 162 :

Rendement = 41 %.

R_f = 0,18 (cyclohexane/ Et_2O : 70/30).

$[\alpha]_D^{25} = +59,8$ ($c = 1,25$; CHCl_3).

IR (film) ν : 3030 (C-H aromatique) ; 1626 (C=N) ; 1099 (C-O).

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,52-1,63 (m, 10H, 5 CH_2) ; 3,09 (dd, 1H, H_{4b} , $J_{4b-3} = 7,0$ Hz, $J_{4b-4a} = 17,5$ Hz) ; 3,15 (dd, 1H, H_{4a} , $J_{4a-3} = 9,8$ Hz, $J_{4a-4b} = 17,5$ Hz) ; 3,87 (dd, 1H, H_{1b} , $J_{1b-2} = 4,8$ Hz, $J_{1b-1a} = 8,5$ Hz) ; 3,99-4,04 (m, 1H, H_2) ; 4,10 (dd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = 6,2$ Hz, $J_{1a-1b} = 8,5$ Hz) ; 4,29 (s, 2H, H_6) ; 4,53 (s, 2H, H_7) ; 4,49-4,58 (m, 1H, H_3) ; 7,28-7,38 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 23,6-23,8-25,0-34,5-36,3 (CH_2) ; 37,8 (C_4) ; 64,3 (C_6) ; 66,6 (C_1) ; 72,5 (C_7) ; 75,5 (C_2) ; 80,8 (C_3) ; 110,1 (C_8) ; 127,7-127,8-128,4 (C_{arom}) ; 137,2 (C_{arom}) ; 156,5 (C_5).

Masse (IC) : 332 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Composé syn 163 :

Rendement = 14 %.

R_f = 0,11 (cyclohexane/Et₂O : 70/30).

$[\alpha]_D^{25} = -85,1$ (c = 1,28 ; CHCl₃).

IR (film) ν : 3030 (C-H aromatique) ; 1626 (C=N) ; 1071 (C-O).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,44-1,67 (m, 10H, 5CH₂) ; 3,00 (dd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 7,9 Hz, J_{4b-4a} = 17,4 Hz) ; 3,10 (dd, 1H, H_{4a}, J_{4a-3} = 10,9 Hz, J_{4a-4b} = 17,4 Hz) ; 3,84 (dd, 1H, H_{1b}, J_{1b-2} = 6,5 Hz, J_{1b-1a} = 8,4 Hz) ; 4,04 (dd, 1H, H_{1a}, J_{1a-2} = 6,5 Hz, J_{1a-1b} = 8,4 Hz) ; 4,21 (td, 1H, H₂, J₂₋₃ = 4,4 Hz, J_{2-1b} = J_{2-1a} = 6,5 Hz) ; 4,30 (s, 2H, H₆) ; 4,50 (d_{AB}, 1H, H_{7b}, J_{AB} = 11,7 Hz) ; 4,55 (d_{AB}, 1H, H_{7a}, J_{AB} = 11,7 Hz) ; 4,66 (ddd, 1H, H₃, J₃₋₂ = 4,4 Hz, J_{3-4b} = 7,9 Hz, J_{3-4a} = 10,9 Hz) ; 7,30-7,39 (m, 5H, H_{arom}).

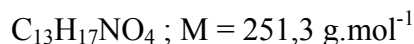
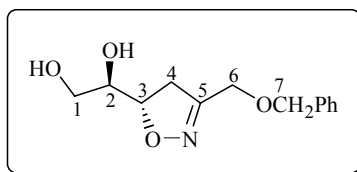
RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 23,6-23,8-25,0-34,7-35,7 (CH₂) ; 37,0 (C₄) ; 64,2 (C₆) ; 64,8 (C₁) ; 72,3 (C₇) ; 76,1 (C₂) ; 79,7 (C₃) ; 110,3 (C₈) ; 127,8-128,3 (C_{arom}) ; 137,2 (C_{arom}) ; 156,2 (C₅).

Masse (IC) : 332 [M+H]⁺.

Analyse élémentaire : C₁₉H₂₅NO₄ (331,4)

	C %	H %	N %
Calculés :	68,86	7,60	4,23
Trouvés :	69,01	7,70	4,25

(±)-anti-3-benzyloxyméthyl-5-(1,2-dihydroxyéthyl)-2-isoxazoline (141)



A une solution de l'isoxazoline (±)-*anti* **139** (3,66 g ; 12,6 mmol) dans 150 mL de méthanol, on ajoute 1,63 g de résine acide (Amberlyst 15). Le mélange est agité à température ambiante pendant 19 heures, puis la résine est filtrée et rincée avec du méthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est remis en réaction dans 150 mL de méthanol en présence de 1,63 g de résine acide. Le mélange est agité à température ambiante pendant 23 heures, puis la résine est filtrée et rincée avec du méthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 93/7). On obtient 2,44 g d'une huile qui cristallise progressivement en un solide blanc.

Rendement = 77 %.

R_f = 0,20 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 93/7).

PF = 41°C.

IR (CCl_4) ν : 3602 (O-H) ; 3030 (C-H aromatique) ; 1216 et 1092 (C-O).

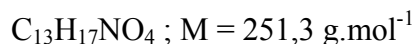
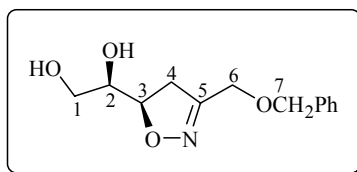
RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 2,09 (se, 2H, OH) ; 3,04 (dd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 10,7 Hz, J_{4b-4a} = 17,6 Hz) ; 3,14 (dd, 1H, H_{4a}, J_{4a-3} = 8,1 Hz, J_{4a-4b} = 17,6 Hz) ; 3,63 (dd, 1H, H_{1b}, J_{1b-2} = 6,2 Hz, J_{1b-1a} = 11,3 Hz) ; 3,74 (dd, 1H, H_{1a}, J_{1a-2} = 3,7 Hz, J_{1a-1b} = 11,3 Hz) ; 3,82-3,86 (m, 1H, H₂) ; 4,28 (s, 2H, H₆) ; 4,53 (s, 2H, H₇) ; 4,59 (ddd, 1H, H₃, J₃₋₂ = 5,1 Hz, J_{3-4a} = 8,1 Hz, J_{3-4b} = 10,7 Hz) ; 7,29-7,38 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 36,4 (C₄) ; 63,2 (C₁) ; 64,5 (C₆) ; 71,9 (C₂) ; 72,9 (C₇) ; 80,9 (C₃) ; 128,0-128,1-128,6 (C_{arom}) ; 137,2 (C_{arom}) ; 157,4 (C₅).

Analyse élémentaire : $C_{13}H_{17}NO_4$ (251,3)

	C %	H %	N %	O %
Calculés :	62,14	6,82	5,57	25,47
Trouvés :	62,11	6,86	5,51	25,54

(±)-syn-3-benzyloxyméthyl-5-(1,2-dihydroxyéthyl)-2-isoxazoline (142)



A une solution de l'isoxazoline (±)-syn **140** (3,30 g ; 11,3 mmol) dans 135 mL de méthanol, on ajoute 1,47 g de résine acide (Amberlyst 15). Le mélange est agité à température ambiante pendant 19 heures, puis la résine est filtrée et rincée avec du méthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est remis en réaction dans 135 mL de méthanol en présence de 1,85 g de résine acide. Le mélange est agité à température ambiante pendant 30 heures, puis la résine est filtrée et rincée avec du méthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 95/5). On obtient 2,67 g d'une huile qui cristallise progressivement en un solide légèrement jaune.

Rendement = 94 %.

R_f = 0,16 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 95/5).

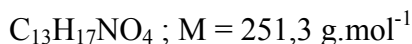
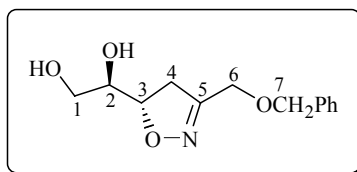
PF = 58°C.

IR ($CHCl_3$) ν : 3562 et 3451 (O-H) ; 1627 (C=N) ; 1097 (C-O).

RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 2,35 (se, 1H, OH) ; 2,42 (se, 1H, OH) ; 3,03 (dd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 7,9 Hz, J_{4b-4a} = 17,4 Hz) ; 3,14 (dd, 1H, H_{4a}, J_{4a-3} = 10,8 Hz, J_{4a-4b} = 17,4 Hz) ; 3,63 (dd, 1H, H_{1b}, J = 4,7 Hz, J = 9,2 Hz) ; 3,68-3,77 (m, 2H, H_{1a} et H₂) ; 4,29 (s, 2H, H₆) ; 4,51 (d_{AB}, 1H, H_{7b}, J_{AB} = 11,8 Hz) ; 4,55 (d_{AB}, 1H, H_{7a}, J_{AB} = 11,8 Hz) ; 4,68 (ddd, 1H, H₃, J₃₋₂ = 4,3 Hz, J_{3-4b} = 7,9 Hz, J_{3-4a} = 10,8 Hz) ; 7,28-7,38 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 37,5 (C₄) ; 63,6 (C₁) ; 64,3 (C₆) ; 72,7 (C₂) ; 73,0 (C₇) ; 80,8 (C₃) ; 127,9-128,0-128,5 (C_{arom}) ; 137,2 (C_{arom}) ; 157,3 (C₅).

(5S)-3-benzyloxyméthyl-5-[(1R)-1,2-dihydroxyéthyl]-2-isoxazoline (164)



A une solution de l'isoxazoline *anti* **162** optiquement active (2,95 g ; 8,91 mmol) dans 74 mL d'un mélange acide acétique/eau (50/50), on ajoute 1,19 g de résine acide (Amberlyst 15). Le mélange est agité à température ambiante pendant 15 heures, puis la résine est filtrée et rincée avec du méthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et coévaporé à l'eau pour éliminer l'acide acétique. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 93/7). On obtient 1,81 g d'une huile qui cristallise progressivement en un solide blanc.

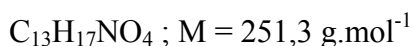
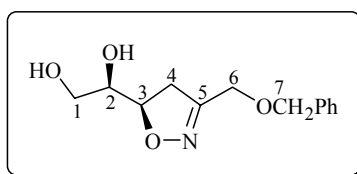
Rendement = 81 %.

$$[\alpha]_D^{22} = +79,8 \text{ (c = 1,20 ; MeOH)} \{ \text{litt.}^{70} : [\alpha]_D^{25} = +84,5 \text{ (c = 1,0 ; MeOH)} \}$$

Les spectres de RMN du 1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour le diol racémique (\pm)-*anti* **141**.

.....

(5R)-3-benzyloxyméthyl-5-[(1R)-1,2-dihydroxyéthyl]-2-isoxazoline (165)



A une solution de l'isoxazoline *syn* **163** optiquement active (588 mg ; 1,77 mmol) dans 22 mL d'un mélange acide acétique/eau (50/50), on ajoute 710 mg de résine acide (Amberlyst 15). Le mélange est agité à température ambiante pendant 68 heures, puis la résine est filtrée et rincée avec du méthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et coévaporé à l'eau pour éliminer l'acide acétique. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 95/5). On obtient 397 mg d'une huile qui cristallise progressivement en un solide blanc.

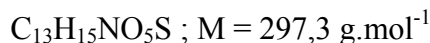
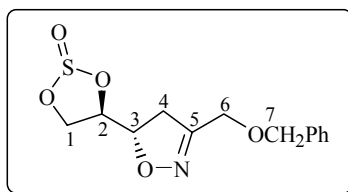
Rendement = 89 %.

$$[\alpha]_D^{25} = -120,7 \text{ (c = 1,11 ; MeOH)} \{ \text{litt.}^{70} : [\alpha]_D^{25} = -119,5 \text{ (c = 1,7 ; MeOH)} \}$$

Les spectres de RMN du 1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour le diol racémique (\pm)-*syn* **142**.

⁷⁰ Gefflaut, T. ; Martin, C. ; Delor, S. ; Besse, P. ; Veschambre, H. ; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2296-2301.

(±)-anti-3-benzyloxyméthyl-5-(2-oxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl)-2-isoxazoline (143)



A une solution de diol (±)-*anti* **141** (1,29 g ; 5,13 mmol) et de pyridine anhydre (1,25 mL ; 15,4 mmol ; 3 éq) dans 50 mL de dichlorométhane anhydre à 0°C et sous atmosphère d'argon, est ajoutée goutte à goutte une solution de chlorure de thionyle (0,45 mL ; 6,16 mmol ; 1,2 éq) dans 10 mL de dichlorométhane anhydre. Une fois l'addition terminée (20 minutes), le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures. Le milieu est lavé avec de l'eau (2 x 25 mL) et avec une solution saturée de NaCl (30 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 60/40) pour donner 1,34 g d'une huile légèrement jaune, sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (67:33).

Rendement = 88 %.

$R_f = 0,36$ (cyclohexane/AcOEt : 60/40).

IR (film) ν : 1628 (C=N) ; 1209 (S=O) ; 1093 (C-O).

RMN 1H ($CDCl_3$) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 3,06 (dd, 1H, H_{4b} , $J_{4b-3} = 5,8 \text{ Hz}$, $J_{4b-4a} = 17,8 \text{ Hz}$) ; 3,19-3,32 (m, 1H, H_{4a}) ; 4,30 (s, 2H, H_6) ; 4,47 (dd, 1H, H_{1b} , $J_{1b-2} = 3,8 \text{ Hz}$, $J_{1b-1a} = 9,0 \text{ Hz}$) ; 4,51 (ddd, 1H, H_3 , $J_{3-4b} = 5,8 \text{ Hz}$, $J_{3-2} = 8,4 \text{ Hz}$, $J_{3-4a} = 10,4 \text{ Hz}$) ; 4,55 (s, 2H, H_7) ; 4,69 (ddd, 1H, H_2 , $J_{2-1b} = 3,8 \text{ Hz}$, $J_{2-1a} = 6,2 \text{ Hz}$, $J_{2-3} = 8,4 \text{ Hz}$) ; 4,78 (dd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = 6,2 \text{ Hz}$, $J_{1a-1b} = 9,0 \text{ Hz}$) ; 7,30-7,40 (m, 5H, H_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 3,19-3,32 (m, 2H, H_{4b} et H_{4a}) ; 4,30 (s, 2H, H_6) ; 4,41 (pq, 1H, H_3 , $J = 7,5 \text{ Hz}$) ; 4,55 (s, 2H, H_7) ; 4,57-4,65 (m, 2H, H_{1a} et H_{1b}) ; 4,88 (ddd, 1H, H_2 , $J = 6,6 \text{ Hz}$, $J_{2-3} = 7,5 \text{ Hz}$, $J = 9,9 \text{ Hz}$) ; 7,30-7,40 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 38,6 (C_4) ; 64,2 (C_6) ; 69,1 (C_1) ; 73,0 (C_7) ; 77,1 (C_3) ; 80,2 (C_2) ; 127,9-128,6 (C_{arom}) ; 137,0 (C_{arom}) ; 157,1 (C_5).

Diastéréoisomère minoritaire :

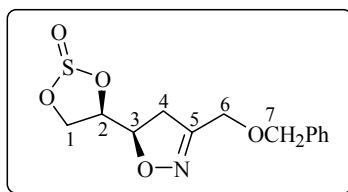
δ : 38,7 (C_4) ; 64,1 (C_6) ; 70,1 (C_1) ; 73,0 (C_7) ; 77,5 (C_3) ; 81,6 (C_2) ; 127,9-128,6 (C_{arom}) ; 137,1 (C_{arom}) ; 157,2 (C_5).

Masse (IC) : 298 [$M+H$] $^+$.

Analyse élémentaire :

	$C_{13}H_{15}NO_5S$ (297,3)			
	C %	H %	N %	S %
Calculés :	52,52	5,08	4,71	10,78
Trouvés :	52,68	5,13	4,74	10,76

(±)-*syn*-3-benzyloxyméthyl-5-(2-oxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl)-2-isoxazoline (144)



$C_{13}H_{15}NO_5S$; $M = 297,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A une solution de diol (±)-*syn* **142** (2,34 g ; 9,31 mmol) et de pyridine anhydre (2,25 mL ; 27,9 mmol ; 3 éq) dans 80 mL de dichlorométhane anhydre à 0°C et sous atmosphère d'argon, est ajoutée goutte à goutte une solution de chlorure de thionyle (0,81 mL ; 11,2 mmol ; 1,2 éq) dans 15 mL de dichlorométhane anhydre. Une fois l'addition terminée (45 minutes), le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures. Le milieu est lavé avec de l'eau (2 x 30 mL) et avec une solution saturée de NaCl (30 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 60/40) pour donner 2,34 g d'une huile incolore, sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (64:36).

Rendement = 84 %.

$R_f = 0,26$ (Cyclohexane/AcOEt : 60/40).

IR (film) ν : 1628 (C=N) ; 1209 (S=O) ; 1093 (C-O).

RMN 1H ($CDCl_3$) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 3,07 (dd, H, H_{4b} , $J = 7,1 \text{ Hz}$, $J = 17,6 \text{ Hz}$) ; 3,12-3,29 (m, 1H, H_{4a}) ; 4,30 (s, 2H, H_6) ; 4,40 (dd, 1H, H_{1b} , $J = 5,7 \text{ Hz}$, $J = 8,6 \text{ Hz}$) ; 4,48-4,58 (m, 2H, H_7) ; 4,73-4,79 (m, 2H, H_3 et H_{1a}) ; 4,94-5,03 (m, 1H, H_2) ; 7,30-7,39 (m, 5H, H_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 3,12-3,29 (m, 2H, H_{4b} et H_{4a}) ; 4,30 (s, 2H, H_6) ; 4,48-4,58 (m, 4H, 2 H_7 , H_{1b} et H_{1a}) ; 4,60-4,65 (m, 1H, H_3) ; 4,94-5,03 (m, 1H, H_2) ; 7,30-7,39 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 37,5 (C_4) ; 64,1 (C_6) ; 68,5 (C_1) ; 72,8 (C_7) ; 77,6 (C_3) ; 79,9 (C_2) ; 128,0-128,6 (C_{arom}) ; 156,6 (C_5).

Diastéréoisomère minoritaire :

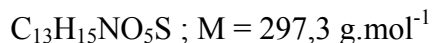
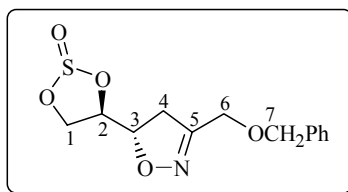
δ : 37,7 (C_4) ; 64,1 (C_6) ; 67,0 (C_1) ; 72,9 (C_7) ; 77,7 (C_3) ; 82,5 (C_2) ; 128,0-128,1 (C_{arom}).

Masse (IC) : 298 $[M+H]^+$.

Analyse élémentaire : $C_{13}H_{15}NO_5S$ (297,3)

	C %	H %	N %	S %
Calculés :	52,52	5,08	4,71	10,78
Trouvés :	52,36	5,29	4,68	10,73

(5S)-3-benzyloxyméthyl-5-[(4R)-2-oxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl]-2-isoxazoline (166)



Le sulfite optiquement actif **166** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-*anti* **143**.

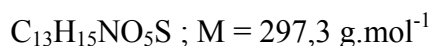
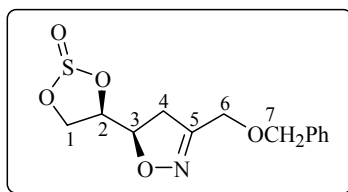
Rendement = 81 %.

$$[\alpha]_D^{22} = +43,6 \text{ (c = 1,37 ; CHCl}_3\text{)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour le sulfite racémique (\pm)-*anti* **143**.

.....

(5R)-3-benzyloxyméthyl-5-[(4R)-2-oxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl]-2-isoxazoline (167)



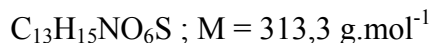
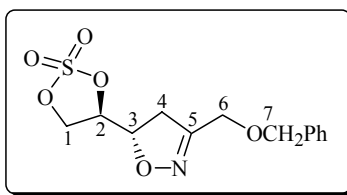
Le sulfite optiquement actif **167** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-*syn* **144**.

Rendement = 85 %.

$$[\alpha]_D^{25} = -157,6 \text{ (c = 1,15 ; CHCl}_3\text{)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour le sulfite racémique (\pm)-*syn* **144**.

(±)-*anti*-3-benzyloxyméthyl-5-(2,2-dioxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl)-2-isoxazoline (145)



A une solution de sulfite (±)-*anti* **143** (3,81 g ; 12,8 mmol) dans 140 mL d'acétonitrile contenant du RuO_2 (170 mg ; 1,28 mmol ; 0,1 éq), on ajoute une solution de $NaIO_4$ (4,11 g ; 19,2 mmol ; 1,5 éq) dans 30 mL d'eau. Le milieu est agité à température ambiante pendant 43 heures. Le mélange est extrait trois fois avec du dichlorométhane (50 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de $NaCl$ (75 mL), puis séchées sur $MgSO_4$. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/ $AcOEt$: 50/50). On obtient 3,36 g d'une huile légèrement jaune.

Rendement = 84 %.

R_f = 0,40 (cyclohexane/ $AcOEt$: 50/50).

IR (film) ν : 1389 (SO_2) ; 1210 et 1093 (C-O).

RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 3,09 (dd, 1H, H_{4b} , $J_{4b-3} = 5,5 \text{ Hz}$, $J_{4b-4a} = 17,9 \text{ Hz}$) ; 3,29 (dd, 1H, H_{4a} , $J_{4a-3} = 10,5 \text{ Hz}$, $J_{4a-4b} = 17,9 \text{ Hz}$) ; 4,28 (d_{AB} , 1H, H_{6b} , $J_{AB} = 12,8 \text{ Hz}$) ; 4,32 (d_{AB} , 1H, H_{6a} , $J_{AB} = 12,8 \text{ Hz}$) ; 4,53 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,9 \text{ Hz}$) ; 4,57 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,9 \text{ Hz}$) ; 4,57-4,64 (m, 2H, H_2 et H_{1b}) ; 4,77 (dd, 1H, H_{1a} , $J = 3,0 \text{ Hz}$, $J = 8,1 \text{ Hz}$) ; 4,82 (ddd, 1H, H_3 , $J_{3-4b} = 5,5 \text{ Hz}$, $J_{3-2} = 8,1 \text{ Hz}$, $J_{3-4a} = 10,5 \text{ Hz}$) ; 7,30-7,40 (m, 5H, H_{arom}).

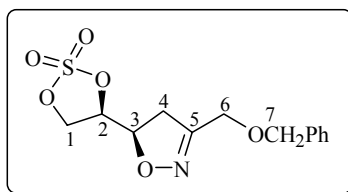
RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 38,7 (C_4) ; 64,0 (C_6) ; 70,4 (C_1) ; 73,3 (C_7) ; 77,6 (C_3) ; 79,3 (C_2) ; 128,0-128,2-128,6 (C_{arom}) ; 137,0 (C_{arom}) ; 157,1 (C_5).

Masse (IE) : 314 [$M+H$] $^+$.

Analyse élémentaire : $C_{13}H_{15}NO_6S$ (313,3)

	C %	H %	N %	S %
Calculés :	49,83	4,83	4,47	10,23
Trouvés :	48,72	5,05	4,33	10,07

(±)-*syn*-3-benzyloxyméthyl-5-(2,2-dioxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl)-2-isoxazoline (146)



$C_{13}H_{15}NO_6S$; $M = 313,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A une solution de sulfite (±)-*syn* **144** (0,26 g ; 0,875 mmol) dans 15 mL d'acétonitrile contenant du $RuCl_3$ (18,0 mg ; 0,087 mmol ; 0,1 éq), on ajoute une solution de $NaIO_4$ (0,28 g ; 1,30 mmol ; 1,5 éq) dans 5 mL d'eau. Le milieu est agité à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange est extrait trois fois avec du dichlorométhane (15 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de $NaCl$ (15 mL), puis séchées sur $MgSO_4$. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/ $AcOEt$: 50/50). On obtient 0,26 g d'une huile qui cristallise progressivement en un solide blanc.

Rendement = 96 %.

R_f = 0,26 (cyclohexane/ $AcOEt$: 50/50).

PF = 93°C.

IR (KBr) ν : 1389 (SO_2) ; 1210 et 1093 (C-O).

RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 3,12 (dd, 1H, H_{4b} , $J_{4b-3} = 6,9 \text{ Hz}$, $J_{4b-4a} = 17,8 \text{ Hz}$) ; 3,29 (dd, 1H, H_{4a} , $J_{4a-3} = 11,4 \text{ Hz}$, $J_{4a-4b} = 17,8 \text{ Hz}$) ; 4,31 (s, 2H, H_6) ; 4,53 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,9 \text{ Hz}$) ; 4,57 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,9 \text{ Hz}$) ; 4,65-4,73 (m, 2H, H_1) ; 4,83 (ddd, 1H, H_3 , $J_{3-2} = 3,3 \text{ Hz}$, $J_{3-4b} = 6,9 \text{ Hz}$, $J_{3-4a} = 11,4 \text{ Hz}$) ; 4,98 (td, 1H, H_2 , $J_{2-3} = 3,3 \text{ Hz}$, $J_{2-1b} = J_{2-1a} = 7,0 \text{ Hz}$) ; 7,30-7,39 (m, 5H, H_{arom}).

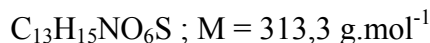
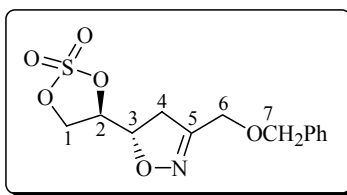
RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 37,3 (C_4) ; 64,0 (C_6) ; 68,8 (C_1) ; 73,1 (C_7) ; 76,6 (C_3) ; 80,6 (C_2) ; 128,2-128,3-128,8 (C_{arom}) ; 137,1 (C_{arom}) ; 156,7 (C_5).

Masse (IC) : 314 [$M+H$]⁺.

Analyse élémentaire : $C_{13}H_{15}NO_6S$ (313,3)

	C %	H %	N %	S %
Calculés :	49,83	4,83	4,47	10,23
Trouvés :	49,72	4,89	4,45	10,13

(5*S*)-3-benzyloxyméthyl-5-[(4*R*)-2,2-dioxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl]-2-isoxazoline (168)



Le sulfate optiquement actif **168** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-*anti* **145**.

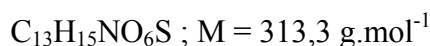
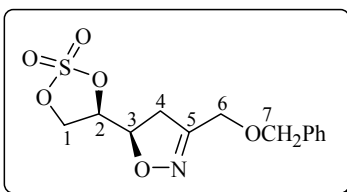
Rendement = 82 %.

$$[\alpha]_D^{25} = +48,6 \text{ (c = 1,06 ; CHCl}_3\text{)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour le sulfate racémique (\pm)-*anti* **145**.

.....

(5*S*)-3-benzyloxyméthyl-5-[(4*R*)-2,2-dioxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl]-2-isoxazoline (169)



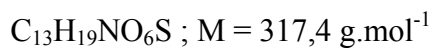
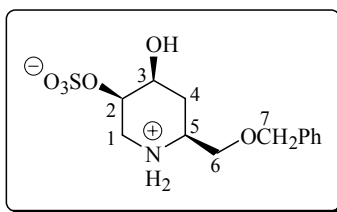
Le sulfate optiquement actif **169** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-*syn* **146**.

Rendement = 38 %.

$$[\alpha]_D^{25} = -129,0 \text{ (c = 1,08 ; CHCl}_3\text{)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour le sulfate racémique (\pm)-*syn* **146**.

1-amino-1,5-anhydro-6-O-benzyl-1,2,4-tridésoxy-D-mannitol-2-sulfate (170)



L'iminosucre zwitterionique optiquement actif **170** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-**147**.

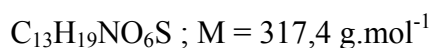
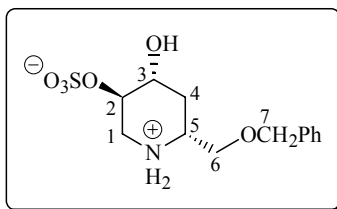
Rendement = 77 %.

$$[\alpha]_D^{25} = -10,8 \text{ (c = 0,98 ; H}_2\text{O)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour l'iminosucre racémique (\pm)-**147**.

.....

1-amino-1,5-anhydro-6-O-benzyl-1,2,4-tridésoxy-L-glucitol-2-sulfate (171)



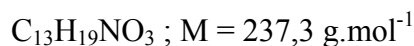
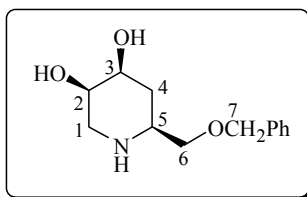
L'iminosucre zwitterionique optiquement actif **171** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-**151**.

Rendement = 34 %.

$$[\alpha]_D^{25} = -34,2 \text{ (c = 0,98 ; NH}_4\text{OH 0,1 N)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour l'iminosucre racémique (\pm)-**151**.

1-amino-1,5-anhydro-6-O-benzyl-1,4-didésoxy-D-mannitol (172)



L'iminosucre optiquement actif **172** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-**152**.

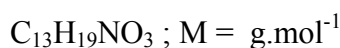
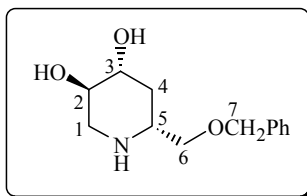
Rendement = 93 %.

$$[\alpha]_D^{21} = -21,5 \text{ (c = 0,98 ; H}_2\text{O)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour l'iminosucre racémique (\pm)-**152**.

.....

1-amino-1,5-anhydro-6-O-benzyl-1,4-didésoxy-L-glucitol (173)



L'iminosucre optiquement actif **173** a été synthétisé selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour le composé racémique (\pm)-**153**.

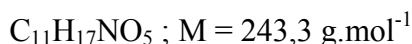
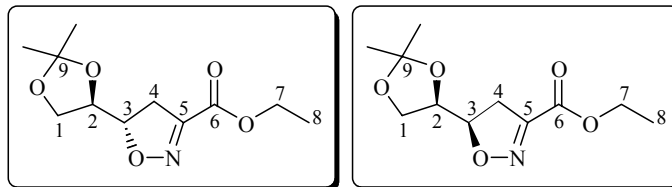
Rendement = 86 %.

$$[\alpha]_D^{21} = -28,5 \text{ (c = 0,99 ; H}_2\text{O)}.$$

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C sont conformes à ceux obtenus pour l'iminosucre racémique (\pm)-**153**.

III.3. Synthèse des iminosucres avec R = CO₂H

(±)-*anti*-5-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)-3-éthoxycarbonyl-2-isoxazoline (**181**)
et (±)-*syn*-5-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)-3-éthoxycarbonyl-2-isoxazoline (**182**)



A une solution de 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle **179** (21,3 g ; 140 mmol ; 3 éq) et de 2,2-diméthyl-4-vinyl-1,3-dioxolane **138** (6,00 g ; 46,8 mmol) dans 200 mL d'éther anhydre, on ajoute goutte à goutte sur 8 heures une solution de triéthylamine (19,6 mL ; 140 mmol ; 3 éq) dans 150 mL d'éther anhydre. On agite une heure à température ambiante. Le précipité de chlorhydrate de triéthylamine est filtré sur fritté et rincé avec de l'éther. Le filtrat est lavé avec de l'eau (2 x 75 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/Et₂O : 60/40). On obtient 6,85 g de composé (±)-*anti* **181** sous la forme d'une huile légèrement jaune et 2,31 g de composé (±)-*syn* **182** sous la forme d'une huile incolore.

Composé (±)-*anti* 181 :

Rendement = 61 %.

R_f = 0,31 (Cyclohexane/Et₂O : 60/40).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,34 (s, 3H, CH₃) ; 1,36 (t, 3H, H₈, J₈₋₇ = 7,0 Hz) ; 1,42 (s, 3H, CH₃) ; 3,24 (dd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 7,5 Hz, J_{4b-4a} = 18,0 Hz) ; 3,29 (dd, 1H, H_{4a}, J_{4a-3} = 10,5 Hz, J_{4a-4b} = 18,0 Hz) ; 3,79-3,85 (m, 1H, H_{1b}) ; 4,05-4,10 (m, 2H, H_{1a} et H₂) ; 4,35 (q, 2H, H₇, J₇₋₈ = 7,0 Hz) ; 4,73 (ddd, 1H, H₃, J₃₋₂ = 6,5 Hz, J_{3-4b} = 7,5 Hz, J_{3-4a} = 10,5 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14,0 (C₈) ; 24,9 (CH₃) ; 26,6 (CH₃) ; 36,0 (C₄) ; 62,1 (C₇) ; 66,7 (C₁) ; 75,5 (C₂) ; 83,5 (C₃) ; 109,9 (C₉) ; 151,7 (C₅) ; 160,3 (C₆).

Composé (±)-*syn* 182 :

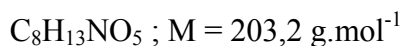
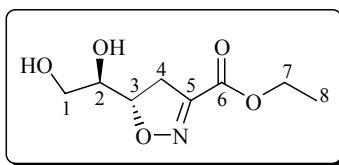
Rendement = 20 %.

R_f = 0,16 (Cyclohexane/Et₂O : 60/40).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,33 (s, 3H, CH₃) ; 1,35 (t, 3H, H₈, J₈₋₇ = 7,0 Hz) ; 1,41 (s, 3H, CH₃) ; 3,13 (dd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 8,5 Hz, J_{4b-4a} = 18,0 Hz) ; 3,26 (dd, 1H, H_{4a}, J_{4a-3} = 11,5 Hz, J_{4a-4b} = 18,0 Hz) ; 3,84 (dd, 1H, H_{1b}, J_{1b-2} = 6,5 Hz, J_{1b-1a} = 8,5 Hz) ; 4,06 (dd, 1H, H_{1a}, J_{1a-2} = 6,5 Hz, J_{1a-1b} = 8,5 Hz) ; 4,26 (td, 1H, H₂, J₂₋₃ = 4,5 Hz, J_{2-1a} = J_{2-1b} = 6,5 Hz) ; 4,35 (q, 2H, H₇, J₇₋₈ = 7,0 Hz) ; 4,85 (ddd, 1H, H₃, J₃₋₂ = 4,5 Hz, J_{3-4b} = 8,5 Hz, J_{3-4a} = 11,5 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14,1 (C₈) ; 25,2 (CH₃) ; 26,2 (CH₃) ; 35,4 (C₄) ; 62,1 (C₇) ; 65,2 (C₁) ; 76,2 (C₂) ; 82,6 (C₃) ; 110,2 (C₉) ; 151,5 (C₅) ; 160,4 (C₆).

(±)-anti-5-(1,2-dihydroxyéthyl)-3-éthoxycarbonyl-2-isoxazoline (183)



A une solution de l'isoxazoline (±)-*anti* **181** (6,73 g ; 27,7 mmol) dans 300 mL d'éthanol, on ajoute 3,58 g de résine acide (Amberlyst 15). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures, puis la résine est filtrée et rincée avec de l'éthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est remis en réaction dans 300 mL d'éthanol en présence de 3,58 g de résine acide. Le mélange est agité à température ambiante pendant 18 heures. La résine est filtrée et rincée avec de l'éthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est remis en réaction dans 300mL d'éthanol auquel on ajoute 3,58 g de résine acide. Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 heures. Le catalyseur est filtré et rincé avec de l'éthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 93/7). On obtient 4,99 g d'une huile incolore qui cristallise progressivement en un solide blanc.

Rendement = 89 %.

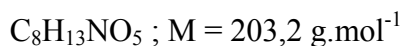
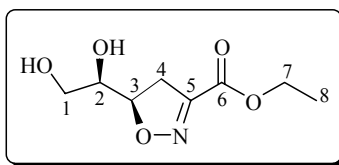
R_f = 0,23 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 93/7).

IR (KBr) ν : 3393 (O-H) ; 1724 (C=O) ; 1582 (C=N) ; 1253 et 1129 (C-O).

RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 1,36 (t, 3H, H₈, $J_{8-7} = 7,5 \text{ Hz}$) ; 2,93 (se, 2H, 2OH) ; 3,18 (dd, 1H, H_{4b}, $J_{4b-3} = 11,5 \text{ Hz}$, $J_{4b-4a} = 18,0 \text{ Hz}$) ; 3,31 (dd, 1H, H_{4a}, $J_{4a-3} = 8,5 \text{ Hz}$, $J_{4a-4b} = 18,0 \text{ Hz}$) ; 3,62 (dd, 1H, H_{1b}, $J_{1b-2} = 6,5 \text{ Hz}$, $J_{1b-1a} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 3,73 (dd, 1H, H_{1a}, $J_{1a-2} = 3,5 \text{ Hz}$, $J_{1a-1b} = 11,5 \text{ Hz}$) ; 3,88-3,92 (m, 1H, H₂) ; 4,33 (q, 2H, H₇, $J_{7-8} = 7,5 \text{ Hz}$) ; 4,80 (ddd, 1H, H₃, $J_{3-2} = 5,0 \text{ Hz}$, $J_{3-4a} = 8,5 \text{ Hz}$, $J_{3-4b} = 11,5 \text{ Hz}$).

RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 14,1 (C₈) ; 34,4 (C₄) ; 62,3 (C₇) ; 62,9 (C₁) ; 71,6 (C₂) ; 83,4 (C₃) ; 152,3 (C₅) ; 160,6 (C₆).

(±)-syn-5-(1,2-dihydroxyéthyl)-3-éthoxycarbonyl-2-isoxazoline (184)



A une solution de l'isoxazoline (±)-syn **182** (2,21 g ; 9,08 mmol) dans 110 mL d'éthanol, on ajoute 1,17 g de résine acide (Amberlyst 15). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures puis la résine est filtrée et rincée avec de l'éthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est remis en réaction dans 110 mL d'éthanol en présence de 1,17 g de résine acide. Le mélange est agité à température ambiante pendant 18 heures. Le catalyseur est filtré et rincé avec de l'éthanol. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 93/7) pour donner 1,55 g d'une huile incolore qui cristallise progressivement en un solide blanc.

Rendement = 84 %.

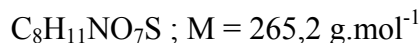
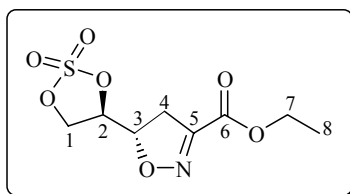
R_f = 0,20 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 93/7).

IR (KBr) ν : 3401 (O-H) ; 1722 (C=O) ; 1595 (C=N) ; 1258 et 1129 (C-O).

RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 1,35 (t, 3H, H₈, $J_{8-7} = 7,0$ Hz) ; 3,15 (se, 2H, 2OH) ; 3,19 (dd, 1H, H_{4b}, $J_{4b-3} = 9,0$ Hz, $J_{4b-4a} = 17,5$ Hz) ; 3,26 (dd, 1H, H_{4a}, $J_{4a-3} = 11,5$ Hz, $J_{4a-4b} = 17,5$ Hz) ; 3,72 (m, 3H, 2H₁ et H₂) ; 4,33 (q, 2H, H₇, $J_{7-8} = 7$ Hz) ; 4,86 (ddd, 1H, H₃, $J_{3-2} = 3,5$ Hz, $J_{3-4b} = 9,0$ Hz, $J_{3-4a} = 11,5$ Hz).

RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 14,0 (C₈) ; 35,5 (C₄) ; 62,1 (C₇) ; 63,2 (C₁) ; 72,9 (C₂) ; 83,8 (C₃) ; 152,2 (C₅) ; 160,4 (C₆).

(±)-anti-3-éthoxycarbonyl-5-(2,2-dioxo-1,3,2-dioxathiolan-4-yl)-2-isoxazoline (187)



A une solution de sulfite (±)-*anti* **185** (3,00 g ; 12,0 mmol) dans 120 mL d'acétonitrile contenant du $RuCl_3$ (250 mg ; 1,20 mmol ; 0,1 éq), on ajoute une solution de $NaIO_4$ (3,86 g ; 18,1 mmol ; 1,5 éq) dans 30 mL d'eau. Le milieu est agité à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange est extrait trois fois avec du dichlorométhane (80 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de $NaCl$ (60 mL), puis séchées sur $MgSO_4$. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : hexane/ $AcOEt$: 50/50). On obtient 2,56 g d'un solide blanc.

Rendement = 84 %.

R_f = 0,33 (hexane/ $AcOEt$: 50/50).

PF = 86°C.

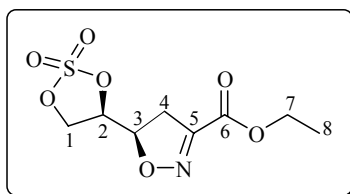
IR (KBr) ν : 1716 (C=O) ; 1596 (C=N) ; 1373 (SO_2) ; 1269 et 1230 (C-O).

RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 1,37 (t, 3H, H_8 , $J_{8-7} = 7,0 \text{ Hz}$) ; 3,29 (dd, 1H, H_{4b} , $J_{4b-3} = 6,5 \text{ Hz}$, $J_{4b-4} = 18,5 \text{ Hz}$) ; 3,49 (dd, 1H, H_{4a} , $J_{4a-3} = 11 \text{ Hz}$, $J_{4a-4b} = 18,5 \text{ Hz}$) ; 4,36 (q, 2H, H_7 , $J_{7-8} = 7,0 \text{ Hz}$) ; 4,67 (dd, 1H, H_{1b} , $J = 5,0 \text{ Hz}$, $J = 9,0 \text{ Hz}$) ; 4,74-4,84 (m, 2H, H_3 ou H_2 et H_{1a}) ; 5,01-5,10 (m, 1H, H_2 ou H_3).

RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 14,0 (C_8) ; 36,9 (C_4) ; 62,7 (C_7) ; 70,0 (C_1) ; 78,9 (C_2 ou C_3) ; 80,1 (C_3 ou C_2) ; 152,1 (C_5) ; 159,5 (C_6).

Masse haute résolution (IC⁺) : $[M + NH_4]^+$ masse théorique = 283,0600
masse trouvée = 283,0606

(±)-syn-3-éthoxycarbonyl-5-(2,2-dioxo-1,3-dioxo-2-thiolan-4-yl)-2-isoxazoline (188)



$$C_8H_{11}NO_7S ; M = 265,2 \text{ g.mol}^{-1}$$

A une solution de sulfite (±)-syn **186** (1,30 g ; 5,22 mmol) dans 60 mL d'acétonitrile contenant du $RuCl_3$ (108 mg ; 0,522 mmol ; 0,1 éq), on ajoute une solution de $NaIO_4$ (1,67 g ; 7,82 mmol ; 1,5 éq) dans 15 mL d'eau. Le milieu est agité à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange est extrait trois fois avec du dichlorométhane (50 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de $NaCl$ (60 mL), puis séchées sur $MgSO_4$. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : hexane/ $AcOEt$: 50/50). On obtient 1,08 g d'un solide blanc.

Rendement = 78 %.

R_f = 0,31 (hexane/ $AcOEt$: 50/50).

PF = 87°C.

IR (KBr) ν : 1733 (C=O) ; 1597 (C=N) ; 1382 (SO_2) ; 1256 et 1217 (C-O).

RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 1,38 (t, 3H, H_8 , $J_{8-7} = 7,0$ Hz) ; 3,29 (dd, 1H, H_{4b} , $J_{4b-3} = 7,5$ Hz, $J_{4b-4a} = 18,0$ Hz) ; 3,47 (dd, 1H, H_{4a} , $J_{4a-3} = 11,0$ Hz, $J_{4a-4b} = 18,0$ Hz) ; 4,36 (q, 2H, H_7 , $J_{7-8} = 7,0$ Hz) ; 4,72-4,81 (m, 2H, H_3 ou H_2 et H_{1b}) ; 4,99-5,09 (m, 1H, H_2 ou H_3 et H_{1a}).

RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 14,0 (C_8) ; 35,7 (C_4) ; 62,6 (C_7) ; 68,4 (C_1) ; 79,2 (C_2 ou C_3) ; 80,1 (C_3 ou C_2) ; 151,6 (C_5) ; 159,6 (C_6).

Masse haute résolution (IC+) : $[M + NH_4]^+$ masse théorique = 283,0600
masse trouvée = 283,0606

Composé (±)-190 :

Rendement = 44 %.

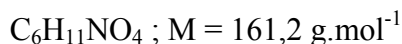
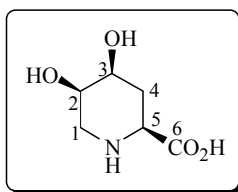
R_f = 0,26 (CH₂Cl₂/MeOH : 80/20) (rév. : solution de KMnO₄).

IR (KBr) ν : 3448 (O-H) ; 1741 (C=O) ; 1633 (NH₂⁺) ; 1264 et 1215 (OSO₃⁻) ; 1024 et 1004 (C-O).

RMN ¹H (D₂O) δ : 1,29 (t, 3H, H₈, J₈₋₇ = 6,9 Hz) ; 2,02-2,09 (m, 1H, H_{4b}) ; 2,32 (td, 1H, H_{4a}, J = 4,1 Hz, J_{4a-5} = 4,1 Hz, J = 14,6 Hz) ; 3,23-3,35 (m, 2H, H₁) ; 4,07 (dd, 1H, H₅, J_{5-4a} = 4,1 Hz, J_{5-4b} = 10,2 Hz) ; 4,24-4,33 (m, 3H, H₃ + 2H₇) ; 4,48-4,51 (m, 1H, H₂).

RMN ¹³C (D₂O) δ : 13,2 (C₈) ; 31,5 (C₄) ; 41,6 (C₁) ; 52,0 (C₅) ; 63,1 (C₇) ; 64,3 (C₃) ; 73,7 (C₂) ; 171,6 (C₆).

Acide (\pm)-1-amino-1,5-anhydro-1,4-didésoxy-D,L-mannopyranuronique (192)



Une solution de l'iminosucre zwitterionique (\pm)-**189** (52,1 mg ; 0,179 mmol) dans 2,8 mL de 1,4-dioxane est chauffée à 40°C en présence d'eau (60 μL) et d'acide sulfurique concentré (15 μL) pendant 6 jours. Le milieu est neutralisé par de l'ammoniaque 1N et concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur une résine échangeuse de cations éluee à l'eau distillée, puis à l'ammoniaque 1N, pour donner 25,4 mg d'un solide légèrement jaune.

Rendement = 88 %.

R_f = 0,29 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 35/50/15) (rév. : solution de KMnO_4).

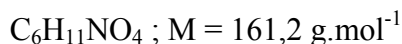
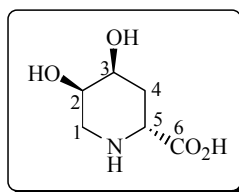
PF = décomposition.

IR (KBr) ν : 3322 et 3235 (O-H) ; 2709 et 2531 (NH_2^+) ; 1612 et 1575 (CO_2^-) ; 1086, 1068 et 1025 (C-O).

RMN ^1H (D_2O) δ : 1,98 (pq, 1H, H_{4b} , $J = 12,4 \text{ Hz}$) ; 2,27 (td, 1H, H_{4a} , $J_{4a-3} = J_{4a-5} = 3,4 \text{ Hz}$, $J_{4a-4b} = 12,4 \text{ Hz}$) ; 3,17 (dd, 1H, H_{1b} , $J_{1b-2} = 1,3 \text{ Hz}$, $J_{1b-1a} = 13,5 \text{ Hz}$) ; 3,43 (dd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = 3,3 \text{ Hz}$, $J_{1a-1b} = 13,5 \text{ Hz}$) ; 3,68 (dd, 1H, H_5 , $J_{5-4a} = 3,4 \text{ Hz}$, $J_{5-4b} = 12,4 \text{ Hz}$) ; 3,97 (ddd, 1H, H_3 , $J_{3-4a} = 3,4 \text{ Hz}$, $J_{3-2} = 4,6 \text{ Hz}$, $J_{3-4b} = 12,4 \text{ Hz}$) ; 4,11 (ps, 1H, H_2).

RMN ^{13}C (D_2O) δ : 28,4 (C_4) ; 46,9 (C_1) ; 57,7 (C_5) ; 64,5 (C_3) ; 67,3 (C_2) ; 173,1 (C_6).

Acide (±)-1-amino-1,5-anhydro-1,4-didésoxy-D,L-allopyranuronique (193)



Une solution de l'iminosucre zwitterionique (±)-**190** (75,7 mg ; 0,260 mmol) dans 4 mL de 1,4-dioxane est chauffée à 40°C en présence d'eau (88 µL) et d'acide sulfurique concentré (24 µL) pendant 9 jours. Le milieu est neutralisé par de l'ammoniaque 1N et concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur une résine échangeuse de cations élue à l'eau distillée, puis à l'ammoniaque 1N, pour donner 37,0 mg d'un solide hygroscopique légèrement jaune.

Rendement = 88 %.

R_f = 0,38 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O : 35/50/15) (rév. : solution de KMnO₄).

IR (KBr) ν : 3396 (O-H) ; 2557 (NH₂⁺) ; 1631 (CO₂⁻) ; 1091 (C-O).

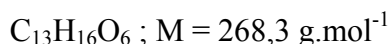
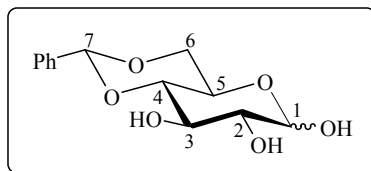
RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1,99 (ddd, 1H, H_{4b}, J_{4b-3} = 2,7 Hz, J_{4b-5} = 10,8 Hz, J_{4b-4a} = 14,8 Hz) ; 2,33 (ddd, 1H, H_{4a}, J_{4a-5} = 4,0 Hz, J_{4a-3} = 5,9 Hz, J_{4a-4b} = 14,8 Hz) ; 3,16 (dd, 1H, H_{1b}, J_{1b-2} = 9,7 Hz, J_{1b-1a} = 12,4 Hz) ; 3,30 (dd, 1H, H_{1a}, J_{1a-2} = 4,2 Hz, J_{1a-1b} = 12,4 Hz) ; 3,88 (dd, 1H, H₅, J_{5-4a} = 4,0 Hz, J_{5-4b} = 10,8 Hz) ; 3,99 (ddd, 1H, H₂, J₂₋₃ = 2,7 Hz, J_{2-1a} = 4,2 Hz, J_{2-1b} = 9,7 Hz) ; 4,09 (td, 1H, H₃, J₃₋₂ = J_{3-4b} = 2,7 Hz, J_{3-4a} = 5,9 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 30,5 (C₄) ; 42,3 (C₁) ; 53,5 (C₅) ; 65,0 (C₃ ou C₂) ; 65,1 (C₂ ou C₃) ; 173,5 (C₆).

IV. Synthèse des sulfates cycliques

IV.1. Synthèse de l'intermédiaire commun

4,6-*O*-benzylidène-D-glucopyranose (197)



Du D-glucose anhydre (100 g ; 555 mmol) est mis en réaction dans 400 mL de DMF anhydre en présence de benzaldéhyde diméthylacétal (100 g ; 657 mmol ; 1,2 éq) et d'acide *para*-toluènesulfonique (120 mg) selon le protocole décrit par Barili *et al.*⁹². On obtient 46,3 g d'un solide blanc.

Rendement = 31 %.

R_f = 0,32 (AcOEt).

RMN ¹H (CD₃OD) :

Anomère β :

δ : 3,25 (t, 1H, H₂, J₂₋₁ = J₂₋₃ = 8,4 Hz) ; 3,40-3,49 (m, 2H, H₄ et H₅) ; 3,62 (t, 1H, H₃, J₃₋₂ = J₃₋₄ = 8,4 Hz) ; 3,72 (pt, 1H, H_{6b}, J_{6b-5} = J_{6b-6a} = 10,3 Hz) ; 4,24 (dd, 1H, H_{6a}, J_{6a-5} = 4,5 Hz, J_{6a-6b} = 10,3 Hz) ; 4,59 (d, 1H, H₁, J₁₋₂ = 8,4 Hz) ; 5,55 (s, 1H, H₇) ; 7,30 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,50 (m, 2H, H_{arom}).

Anomère α :

δ : 3,40-3,49 (m, 2H, H₂ et H₄) ; 3,72 (pt, 1H, H_{6b}, J_{6b-5} = J_{6b-6a} = 9,7 Hz) ; 3,87 (t, 1H, H₃, J₃₋₂ = J₃₋₄ = 9,4 Hz) ; 3,96 (td, 1H, H₅, J_{5-6a} = 4,8 Hz, J_{5-6b} = J₅₋₄ = 9,7 Hz) ; 4,17 (dd, 1H, H_{6a}, J_{6a-5} = 4,8 Hz, J_{6a-6b} = 9,7 Hz) ; 5,14 (d, 1H, H₁, J₁₋₂ = 3,8 Hz) ; 5,55 (s, 1H, H₇) ; 7,30 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,50 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CD₃OD) :

Anomère β :

δ : 67,7 (C₅) ; 69,7 (C₆) ; 74,6 (C₃) ; 77,1 (C₂) ; 82,3 (C₄) ; 98,9 (C₁) ; 102,9 (C₇) ; 127,5-129,0-129,9 (C_{arom}) ; 139,1 ou 139,2 (C_{arom}).

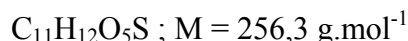
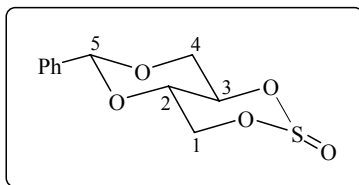
Anomère α :

δ : 63,5 (C₅) ; 70,2 (C₆) ; 71,8 (C₃) ; 74,4 (C₂) ; 83,0 (C₄) ; 94,7 (C₁) ; 102,9 (C₇) ; 127,5-129,0-129,9 (C_{arom}) ; 139,1 ou 139,2 (C_{arom}).

⁹² Barili, P. L. ; Berti, G. ; Catelani, G. ; Cini, C. ; D'Andrea, F. ; Mastrorilli, E. *Carbohydr. Res.* **1995**, 278, 43-57.

IV.2. Synthèse du sulfate cyclique de la série D-érythro

2,4-O-benzylidène-1,3-O-sulfinyl-D-érythritol (**200**)



A une solution du diol **199** (3,00 g ; 14,3 mmol) et de triéthylamine anhydre (5,4 mL ; 38,6 mmol ; 2,7 éq) dans 50 mL de dichlorométhane anhydre à 0°C et sous atmosphère d'argon, est ajoutée goutte à goutte une solution fraîchement distillée de chlorure de thionyle (1,4 mL ; 18,6 mmol ; 1,3 éq) dans 50 mL de dichlorométhane anhydre. Une fois l'addition terminée (1 heure), le milieu est concentré sous pression réduite pour donner un solide marron, immédiatement mis en réaction dans l'étape suivante.

$R_f = 0,21$ et $0,33$ (cyclohexane/AcOEt : 90/10).

Pour les analyses : une fois l'addition terminée, le milieu est additionné sur une solution saturée de NaHCO_3 . La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaCl , puis séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 90/10 + 0,1 % de NEt_3). On obtient un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (50:50).

RMN ^1H (CDCl_3) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 3,87-3,94 (m, 1H, H_{4b}) ; 4,06 (dd, 1H, H_{1b} , $J_{1b-2} = 4,7 \text{ Hz}$, $J_{1b-1a} = 10,4 \text{ Hz}$) ; 4,18 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1b} = 4,7 \text{ Hz}$, $J_{2-1a} = J_{2-3} = 10,4 \text{ Hz}$) ; 4,24-4,29 (m, 1H, H_{4a}) ; 4,84 (pt, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = J_{1a-1b} = 10,4 \text{ Hz}$) ; 5,08 (td, 1H, H_3 , $J = 4,9 \text{ Hz}$, $J = 10,4 \text{ Hz}$; $J_{3-2} = 10,4 \text{ Hz}$) ; 5,63 (s, 1H, H_5) ; 7,40-7,42 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,47-7,49 (m, 2H, H_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 3,87-3,94 (m, 1H, H_{4b}) ; 4,24-4,29 (m, 1H, H_{1b}) ; 4,30-4,37 (m, 1H, H_3) ; 4,40 (dd, 1H, H_{4a} , $J = 4,7 \text{ Hz}$, $J = 10,6 \text{ Hz}$) ; 4,46 (td, 1H, H_2 , $J_{2-1a} = 5,9 \text{ Hz}$, $J_{2-1b} = J_{2-3} = 9,1 \text{ Hz}$) ; 4,64 (dd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = 5,9 \text{ Hz}$, $J_{1a-1b} = 10,7 \text{ Hz}$) ; 5,69 (s, 1H, H_5) ; 7,40-7,42 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,47-7,49 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ^{13}C (CDCl_3) :

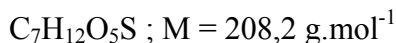
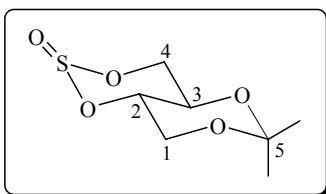
Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 59,7 (C_1) ; 63,5 (C_3) ; 67,8 (C_4) ; 73,3 (C_2) ; 102,5 (C_5) ; 126,2-128,5-129,6 (C_{arom}) ; 136,3 (C_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 64,6 (C_1) ; 68,3 (C_4) ; 68,6 (C_3) ; 72,1 (C_2) ; 102,0 (C_5) ; 126,2-128,5-129,6 (C_{arom}) ; 136,3 (C_{arom}).

2,4-*O*-isopropylidène-1,3-*O*-sulfinyl-L-érythritol (**203**)



A une solution du diol **202** (1,08 g ; 6,66 mmol) et de triéthylamine anhydre (2,8 mL ; 20,1 mmol ; 3 équ) dans 28 mL de dichlorométhane anhydre à 0°C et sous atmosphère d'argon, est ajoutée goutte à goutte une solution fraîchement distillée de chlorure de thionyle (680 µL ; 9,37 mmol ; 1,4 équ) dans 28 mL de dichlorométhane anhydre. Une fois l'addition terminée (45 minutes), le milieu est concentré sous pression réduite pour donner un solide marron, immédiatement mis en réaction dans l'étape suivante.

$R_f = 0,20$ et $0,32$ (cyclohexane/AcOEt : 90/10 + 0,1 % de NEt_3).

Pour les analyses : une fois l'addition terminée, le milieu est additionné sur une solution saturée de NaHCO_3 . La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaCl , puis séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 90/10 + 0,1 % de NEt_3). On obtient un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (50:50).

RMN ^1H (CDCl_3) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 1,40 (s, 3H, CH_3) ; 1,54 (s, 3H, CH_3) ; 3,79-3,91 (m, 3H, 2H_1 et H_{4b}) ; 4,09-4,21 (m, 1H, H_3) ; 4,67 (pt, 1H, H_{4a} , $J = 10,4$ Hz) ; 4,89 (td, 1H, H_2 , $J = 6,4$ Hz, $J = 9,7$ Hz, $J = 9,7$ Hz).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 1,40 (s, 3H, CH_3) ; 1,54 (s, 3H, CH_3) ; 3,79-3,91 (m, 1H, H_{1b}) ; 3,96 (dd, 1H, H_{1a} , $J = 5,5$ Hz, $J = 11,0$ Hz) ; 4,09-4,21 (m, 2H, H_{4b} et H_2) ; 4,40-4,49 (m, 2H, H_3 et H_{4a}).

RMN ^{13}C (CDCl_3) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 18,9 ou 19,0 (CH_3) ; 28,8 (CH_3) ; 60,4 (C_4) ; 61,1 (C_1) ; 64,7 (C_2) ; 66,3 ou 69,9 (C_3) ; 100,6 (C_5).

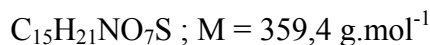
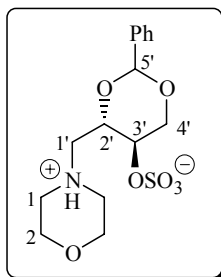
Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 18,9 ou 19,0 (CH_3) ; 28,8 (CH_3) ; 61,6 (C_1) ; 64,9 (C_3) ; 65,7 (C_4) ; 66,3 ou 69,9 (C_2) ; 100,6 (C_5).

V. Synthèse des zwitterions

V.1. Zwitterions azotés

2,4-*O*-benzylidène-1,3-didésoxy-1-morpholinium-D-érythritol-3-sulfate (210)



Le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (30,4 mg ; 0,112 mmol ; 1,2 éq) est dissous dans du dichlorométhane anhydre (0,5 mL) en présence de Na_2CO_3 anhydre (6,7 mg ; 0,063 mmol ; 0,7 éq) sous argon. On ajoute la morpholine (8 μL ; 0,092 mmol) et on agite à température ambiante pendant 2 jours. Le milieu est concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15). On obtient le produit désiré sous la forme d'un solide blanc (34,7 mg).

Rendement = quantitatif.

R_f = 0,28 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15).

PF = 143°C.

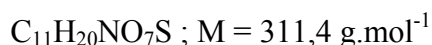
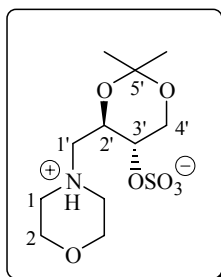
$[\alpha]_D^{25} = -36,8$ ($c = 1,00$; MeOH).

IR (KBr) ν : 2765 et 1619 (NH^+) ; 1243 (OSO_3^-) ; 1012 (C-O).

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 2,96-3,06 (m, 5H, 4H_1 et $\text{H}_{1'b}$) ; 3,38 (pd, 1H, $\text{H}_{1'a}$, $J = 13,8$ Hz) ; 3,74-3,84 (m, 5H, 4H_2 et $\text{H}_{4'b}$) ; 4,16 (td, 1H, $\text{H}_{2'}$, $J = 1,2$ Hz, $J = 8,2$ Hz, $J = 8,2$ Hz) ; 4,25 (td, 1H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-4'a} = 5,3$ Hz, $J = 9,8$ Hz, $J = 9,8$ Hz) ; 4,55 (dd, 1H, $\text{H}_{4'a}$, $J_{4'a-3'} = 5,3$ Hz, $J_{4'a-4'b} = 10,9$ Hz) ; 5,63 (s, 1H, $\text{H}_{5'}$) ; 7,33-7,37 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,46-7,49 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 54,8 (2C_1) ; 59,8 ($\text{C}_{1'}$) ; 66,3 (2C_2) ; 69,2 ($\text{C}_{3'}$) ; 70,3 ($\text{C}_{4'}$) ; 77,7 ($\text{C}_{2'}$) ; 102,3 ($\text{C}_{5'}$) ; 127,5-129,2-130,1 (C_{arom}) ; 138,9 (C_{arom}).

1,3-didésoxy-2,4-*O*-isopropylidène-1-morpholinium-L-érythritol-3-sulfate (211)



Le sulfate cyclique du 2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **71** (311 mg ; 1,39 mmol ; 1,2 équ) est dissous dans du dichlorométhane anhydre (6 mL) en présence de Na₂CO₃ anhydre (61,7 mg ; 0,582 mmol ; 0,5 équ) sous argon. On ajoute la morpholine (100 µL ; 1,15 mmol) et on agite à température ambiante pendant 4 jours. Le milieu est concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 85/15) pour donner 295 mg d'un solide blanc.

Rendement = 82 %.

R_f = 0,22 (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15).

PF = 190°C.

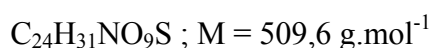
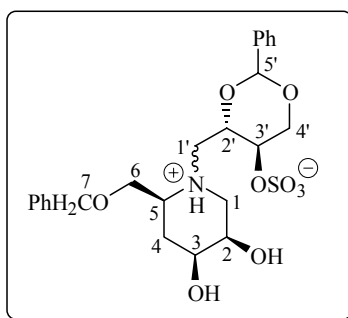
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +33,0$ (c = 1,07 ; MeOH).

IR (KBr) ν : 2785 et 1622 (NH⁺) ; 1279 et 1207 (OSO₃⁻) ; 1066 et 1010 (C-O).

RMN ¹H (CD₃OD + D₂O + Na₂CO₃) δ : 1,36 (s, 3H, CH₃) ; 1,51 (s, 3H, CH₃) ; 2,48 (dd, 1H, H_{1'b}, J_{1'b-2'} = 8,1 Hz, J_{1'b-1'a} = 13,9 Hz) ; 2,55-2,63 (m, 4H, 4H₁) ; 2,90 (pd, 1H, H_{1'a}, J_{1'a-1'b} = 13,9 Hz) ; 3,68-3,76 (m, 4H, 4H₂) ; 3,89 (dd, 1H, H_{4'b}, J_{4'b-3'} = 6,4 Hz, J_{4'b-4'a} = 11,4 Hz) ; 4,01-4,09 (m, 2H, H_{2'} et H_{3'}) ; 4,11 (dd, 1H, H_{4'a}, J_{4'a-3'} = 4,3 Hz, J_{4'a-4'b} = 11,4 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD + D₂O + Na₂CO₃) δ : 20,4 (CH₃) ; 27,8 (CH₃) ; 54,7 (2C₁) ; 60,6 (C_{1'}) ; 63,6 (C_{4'}) ; 67,3 (2C₂) ; 70,8 (C_{2'}) ; 72,6 (C_{3'}) ; 100,9 (C_{5'}).

1-[(1-amino-1,5-anhydro-6-*O*-benzyl-1,4-didésoxy-D-mannitol)-1-ium]-2,4-*O*-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (215)



L'iminosucre **172** (147 mg ; 0,619 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (212 mg ; 0,779 mmol ; 1,3 éq) sont dissous dans du THF (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (33,0 mg ; 0,311 mmol ; 0,5 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 20 heures. Le précipité blanc formé est filtré sur une membrane et rincé avec du THF (283 mg).

Rendement = 90 %.

R_f = 0,30 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15).

PF = 129°C.

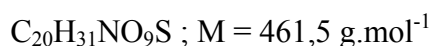
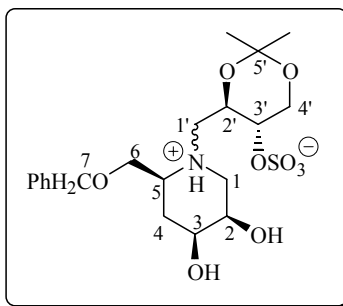
$[\alpha]_D^{21} = -52,7$ ($c = 0,98$; MeOH).

IR (KBr) ν : 3432 (O-H) ; 2872 et 1636 (NH^+) ; 1263 et 1234 (OSO_3^-) ; 1088 et 1013 (C-O).

RMN ¹H ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$) δ : 1,71-1,80 (m, 2H, H_{4b} et H_{4a}) ; 2,61-2,64 (m, 2H, H_5 et H_{1b}) ; 2,98 (dd, 1H, $\text{H}_{1'b}$, $J_{1'b-2'} = 8,2 \text{ Hz}$, $J_{1'b-1'a} = 15,1 \text{ Hz}$) ; 3,09 (dd, 1H, H_{1a} , $J = 3,8 \text{ Hz}$, $J = 13,0 \text{ Hz}$) ; 3,23 (pd, 1H, $\text{H}_{1'a}$, $J_{1'a-1'b} = 15,1 \text{ Hz}$) ; 3,57 (dd, 1H, H_{6b} , $J_{6b-5} = 3,7 \text{ Hz}$, $J_{6b-6a} = 10,2 \text{ Hz}$) ; 3,57-3,62 (m, 1H, H_3) ; 3,65 (dd, 1H, H_{6a} , $J_{6a-5} = 4,2 \text{ Hz}$, $J_{6a-6b} = 10,2 \text{ Hz}$) ; 3,71 (ps, 1H, H_2) ; 3,80 (pt, 1H, $\text{H}_{4'b}$, $J_{4'b-4'a} = J_{4'b-3'} = 10,4 \text{ Hz}$) ; 3,96-4,01 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$) ; 4,14 (td, 1H, $\text{H}_{3'}$, $J = 5,2 \text{ Hz}$, $J = 10,4 \text{ Hz}$, $J_{3'-4'b} = 10,4 \text{ Hz}$) ; 4,47 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,6 \text{ Hz}$) ; 4,53-4,56 (m, 1H, $\text{H}_{4'a}$) ; 4,56 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,6 \text{ Hz}$) ; 5,57 (s, 1H, $\text{H}_{5'}$) ; 7,27-7,38 (m, 8H, H_{arom}) ; 7,43-7,46 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ¹³C ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$) δ : 33,1 (C_4) ; 54,8 ($\text{C}_{1'}$) ; 58,4 (C_1) ; 58,8 (C_5) ; 69,3 (C_2) ; 69,7 ($\text{C}_{3'}$) ; 70,3 ($\text{C}_{4'}$) ; 70,7 (C_3) ; 72,8 (C_6) ; 74,2 (C_7) ; 77,9 ($\text{C}_{2'}$) ; 102,1 ($\text{C}_{5'}$) ; 127,3-128,9-129,3-129,5-130,1 (C_{arom}) ; 138,8-139,0 (C_{arom}).

1-[(1-amino-1,5-anhydro-6-*O*-benzyl-1,4-didésoxy-D-mannitol)-1-ium]-1,3-didésoxy-2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol-3-sulfate (219)



L'iminosucre **172** (150 mg ; 0,632 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **71** (168 mg ; 0,749 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du THF (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (34 mg ; 0,321 mmol ; 0,5 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 14 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 85/15) pour donner 255 mg d'un solide blanc.

Rendement = 87 %.

R_f = 0,21 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 85/15).

PF = 132°C.

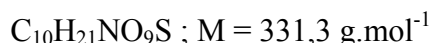
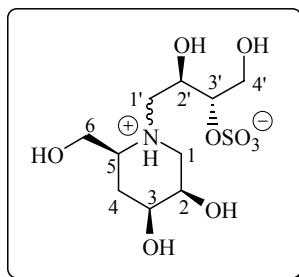
$[\alpha]_D^{25} = -1,7$ ($c = 1,01$; MeOH).

IR (KBr) ν : 3430 (O-H) ; 2882 et 1658 (NH^+) ; 1265 et 1226 (OSO_3^-) ; 1078 et 1010 (C-O).

RMN ¹H ($CD_3OD + D_2O + Na_2CO_3$) δ : 1,30 (s, 3H, CH_3) ; 1,44 (s, 3H, CH_3) ; 1,70-1,84 (m, 2H, H_{4b} et H_{4a}) ; 2,52-2,62 (m, 3H, H_{1b} , H_5 et $H_{1'b}$) ; 3,04 (dd, 1H, H_{1a} , $J = 4,0 \text{ Hz}$, $J = 12,6 \text{ Hz}$) ; 3,17 (pd, 1H, $H_{1'a}$, $J = 14,6 \text{ Hz}$) ; 3,55-3,62 (m, 2H, H_3 et H_{6b}) ; 3,71-3,76 (m, 2H, H_{6a} et H_2) ; 3,86 (dd, 1H, $H_{4'b}$, $J_{4'b-3'} = 6,7 \text{ Hz}$, $J_{4'b-4'a} = 11,6 \text{ Hz}$) ; 3,95-4,00 (m, 2H, $H_{2'}$ et $H_{3'}$) ; 4,07 (dd, 1H, $H_{4'a}$, $J_{4'a-3'} = 4,3 \text{ Hz}$, $J_{4'a-4'b} = 11,6 \text{ Hz}$) ; 4,54 (s, 2H, $2H_7$) ; 7,29-7,42 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ¹³C ($CD_3OD + D_2O + Na_2CO_3$) δ : 20,5 (CH_3) ; 27,7 (CH_3) ; 33,1 (C_4) ; 54,9 ($C_{1'}$) ; 57,7 (C_1) ; 59,7 (C_5) ; 63,7 ($C_{4'}$) ; 69,3 (C_2) ; 70,7 (C_3 ou $C_{2'}$) ; 71,0 (C_3 ou $C_{2'}$) ; 72,2 (C_6) ; 72,9 ($C_{3'}$) ; 74,3 (C_7) ; 100,7 ($C_{5'}$) ; 129,0-129,5 (C_{arom}) ; 138,9 (C_{arom}).

1-[(1-amino-1,5-anhydro-6-O-benzyl-1,4-didésoxy-D-mannitol)-1-ium]-1,3-didésoxy-L-érythritol-3-sulfate (221)



Le zwitterion **219** (129 mg ; 0,280 mmol) est dissous dans de l'acide chlorhydrique 0,01N (21 mL ; 0,210 mmol ; 0,8 éq). On ajoute du palladium sur charbon (98 mg) et le milieu est agité sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante pendant 7 jours. Le catalyseur est éliminé par filtration sur membrane et rincé avec de l'eau distillée. Le milieu est neutralisé par ajout d'ammoniaque 1N et concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié sur une résine échangeuse de cations élue à l'eau distillée. On obtient 67,4 mg d'une huile incolore.

Rendement = 73 %.

$R_f = 0,23$ ($CH_2Cl_2/MeOH/H_2O : 55/40/5$).

$[\alpha]_D^{25} = -4,9$ ($c = 1,11 ; H_2O$).

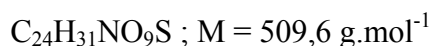
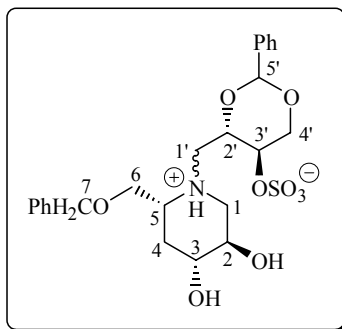
IR (KBr) ν : 3402 (O-H) ; 1636 (NH^+) ; 1251 et 1165 (OSO_3^-) ; 1061 et 1013 (C-O).

RMN 1H ($D_2O + Na_2CO_3$) δ : 1,69 (td, 1H, H_{4b} , $J = 10,8 \text{ Hz}$, $J = 10,8 \text{ Hz}$, $J_{4b-4a} = 12,9 \text{ Hz}$) ; 1,81 (td, 1H, H_{4a} , $J = 3,5 \text{ Hz}$, $J = 3,5 \text{ Hz}$, $J_{4a-4b} = 12,9 \text{ Hz}$) ; 2,54 (dd, 1H, $H_{1'b}$, $J_{1'b-2'} = 8,0 \text{ Hz}$, $J_{1'b-1'a} = 14,6 \text{ Hz}$) ; 2,56-2,59 (m, 1H, H_5) ; 2,58 (dd, 2H, H_{1b} , $J_{1b-2} = 1,8 \text{ Hz}$, $J_{1b-1a} = 13,0 \text{ Hz}$) ; 3,08 (dd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = 4,5 \text{ Hz}$, $J_{1a-1b} = 13,0 \text{ Hz}$) ; 3,10 (dd, 1H, $H_{1'a}$, $J_{1'a-2'} = 3,9 \text{ Hz}$, $J_{1'a-1'b} = 14,6 \text{ Hz}$) ; 3,68 (dd, 1H, H_{6b} , $J_{6b-5} = 4,9 \text{ Hz}$, $J_{6b-6a} = 11,6 \text{ Hz}$) ; 3,77 (dd, 1H, H_{6a} , $J_{6a-5} = 4,2 \text{ Hz}$, $J_{6a-6b} = 11,6 \text{ Hz}$) ; 3,78-3,82 (m, 1H, H_3) ; 3,82 (dd, 1H, $H_{4'b}$, $J_{4'b-3'} = 5,0 \text{ Hz}$, $J_{4'b-4'a} = 12,7 \text{ Hz}$) ; 3,87-3,89 (m, 1H, H_2) ; 3,91 (dd, 1H, $H_{4'a}$, $J_{4'a-3'} = 3,6 \text{ Hz}$, $J_{4'a-4'b} = 12,7 \text{ Hz}$) ; 4,13 (ddd, 1H, $H_{2'}$, $J_{2'-1'a} = 3,9 \text{ Hz}$, $J_{2'-3'} = 5,0 \text{ Hz}$, $J_{2'-1'b} = 8,0 \text{ Hz}$) ; 4,29 (td, 1H, $H_{3'}$, $J_{3'-4'a} = 3,6 \text{ Hz}$, $J_{3'-4'b} = J_{3'-2'} = 5,0 \text{ Hz}$).

RMN ^{13}C ($D_2O + Na_2CO_3$) δ : 30,4 (C_4) ; 54,8 ($C_{1'}$) ; 56,1 (C_1) ; 59,7 ($C_{4'}$) ; 60,3 (C_5) ; 62,9 (C_6) ; 67,6 ($C_{2'}$) ; 68,3 (C_2) ; 68,9 (C_3) ; 81,4 ($C_{3'}$).

Masse haute résolution (ESI+) : $[M - H + 2Na]^+$ masse théorique = 376,0654
 masse trouvée = 376,0648

1-[(1-amino-1,5-anhydro-6-*O*-benzyl-1,4-didésoxy-L-glucitol)-1-ium]-2,4-*O*-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (223)



L'iminosucre **173** (76,0 mg ; 0,320 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (113 mg ; 0,415 mmol ; 1,3 éq) sont dissous dans du THF (1 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (19,4 mg ; 0,183 mmol ; 0,6 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 24 heures. Le précipité blanc formé est filtré sur une membrane et rincé au THF (120 mg).

Rendement = 74 %.

R_f = 0,23 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 85/15).

PF = 208°C.

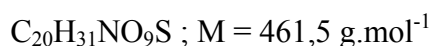
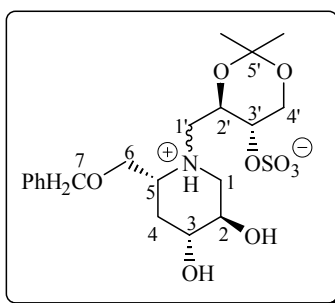
$[\alpha]_D^{25} = -33,3$ ($c = 0,48$; MeOH).

IR (KBr) ν : 3456 (O-H) ; 2872 et 1636 (NH^+) ; 1255 et 1213 (OSO_3^-) ; 1090, 1068 et 1005 (C-O).

RMN 1H ($CD_3OD + D_2O + Na_2CO_3$) δ : 1,45 (pq, 1H, H_{4b} , $J_{4b-4a} = 12,5 \text{ Hz}$) ; 2,01 (ddd, 1H, H_{4a} , $J = 2,4 \text{ Hz}$, $J = 4,8 \text{ Hz}$, $J_{4a-4b} = 12,5 \text{ Hz}$) ; 2,40 (pt, 1H, H_{1b} , $J_{1b-1a} = 11,2 \text{ Hz}$) ; 2,70-2,75 (m, 1H, H_5) ; 2,88 (dd, 1H, $H_{1'b}$, $J_{1'b-2'} = 7,2 \text{ Hz}$, $J_{1'b-1'a} = 15,5 \text{ Hz}$) ; 3,06 (dd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-2} = 4,8 \text{ Hz}$, $J_{1a-1b} = 11,2 \text{ Hz}$) ; 3,28 (pd, 1H, $H_{1'a}$, $J_{1'a-1'b} = 15,5 \text{ Hz}$) ; 3,32-3,39 (m, 1H, H_3) ; 3,48-3,52 (m, 1H, H_2) ; 3,56 (dd, 1H, H_{6b} , $J_{6b-5} = 5,9 \text{ Hz}$, $J_{6b-6a} = 9,7 \text{ Hz}$) ; 3,64 (dd, 1H, H_{6a} , $J_{6a-5} = 3,2 \text{ Hz}$, $J_{6a-6b} = 9,7 \text{ Hz}$) ; 3,80 (pt, 1H, $H_{4'b}$, $J_{4'b-4'a} = 10,6 \text{ Hz}$) ; 4,06-4,13 (m, 2H, $H_{2'}$ et $H_{3'}$) ; 4,34 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,9 \text{ Hz}$) ; 4,41 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,9 \text{ Hz}$) ; 4,54 (dd, 1H, $H_{4'a}$, $J_{4'a-3'} = 4,4 \text{ Hz}$, $J_{4'a-4'b} = 10,6 \text{ Hz}$) ; 5,57 (s, 1H, $H_{5'}$) ; 7,25-7,35 (m, 8H, H_{arom}) ; 7,40-7,43 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ^{13}C ($CD_3OD + D_2O + Na_2CO_3$) δ : 36,8 (C_4) ; 53,8 ($C_{1'}$) ; 58,5 (C_1) ; 59,2 (C_5) ; 69,2 ($C_{3'}$) ; 70,1 (C_4') ; 71,7 (C_6) ; 72,4 (C_2) ; 74,0 (C_7) ; 74,1 (C_3) ; 77,4 ($C_{2'}$) ; 101,8 ($C_{5'}$) ; 127,0-128,6-128,9-129,1-129,2-129,9 (C_{arom}) ; 138,4-139,0 (C_{arom}).

1-[(1-amino-1,5-anhydro-6-*O*-benzyl-1,4-didésoxy-L-glucitol)-1-ium]-1,3-didésoxy-2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol-3-sulfate (224)



L'iminosucre **173** (83,2 mg ; 0,351 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **71** (95,9 mg ; 0,428 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du THF (1 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (19,4 mg ; 0,183 mmol ; 0,5 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 24 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15) pour donner 115 mg d'un solide blanc.

Rendement = 71 %.

R_f = 0,16 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15).

PF = 112°C.

$[\alpha]_D^{23} = +11,4$ ($c = 1,08$; MeOH).

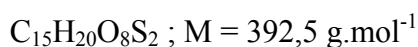
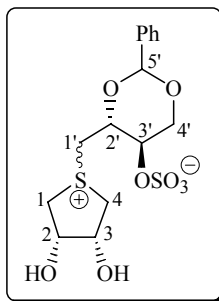
IR (KBr) ν : 3429 (O-H) ; 2863 et 1636 (NH^+) ; 1269 et 1226 (OSO_3^-) ; 1082 et 1011 (C-O).

RMN ^1H ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$) δ : 1,36 (s, 3H, CH_3) ; 1,45 (pq, 1H, H_{4b} , $J_{4b-4a} = 12,5$ Hz) ; 1,48 (s, 3H, CH_3) ; 1,98 (ddd, 1H, H_{4a} , $J = 2,5$ Hz, $J = 4,4$ Hz, $J_{4a-4b} = 12,5$ Hz) ; 2,31 (dd, 1H, H_{1b} , $J_{1b-2} = 10,6$ Hz, $J_{1b-1a} = 11,6$ Hz) ; 2,59-2,62 (m, 1H, H_5) ; 2,76 (dd, 1H, $\text{H}_{1'b}$, $J_{1'b-2'} = 8,0$ Hz, $J_{1'b-1'a} = 14,7$ Hz) ; 3,04 (pd, 1H, $\text{H}_{1'a}$, $J_{1'a-1'b} = 14,7$ Hz) ; 3,06 (pd, 1H, H_{1a} , $J_{1a-1b} = 11,6$ Hz) ; 3,34-3,45 (m, 2H, H_3 et H_2) ; 3,52 (dd, 1H, H_{6b} , $J_{6b-5} = 5,2$ Hz, $J_{6b-6a} = 10,3$ Hz) ; 3,62 (dd, 1H, H_{6a} , $J_{6a-5} = 4,1$ Hz, $J_{6a-6b} = 10,3$ Hz) ; 3,88 (dd, 1H, $\text{H}_{4'b}$, $J_{4'b-3'} = 6,5$ Hz, $J_{4'b-4'a} = 11,6$ Hz) ; 3,98-4,04 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$ et $\text{H}_{3'}$) ; 4,10 (dd, 1H, $\text{H}_{4'a}$, $J_{4'a-3'} = 4,0$ Hz, $J_{4'a-4'b} = 11,6$ Hz) ; 4,51 (d_{AB} , 1H, H_{7b} , $J_{AB} = 11,9$ Hz) ; 4,59 (d_{AB} , 1H, H_{7a} , $J_{AB} = 11,9$ Hz) ; 7,31-7,42 (m, 5H, H_{arom}).

RMN ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{CO}_3$) δ : 20,4 (CH_3) ; 27,8 (CH_3) ; 36,6 (C_4) ; 54,6 ($\text{C}_{1'}$) ; 59,2 (C_1) ; 59,3 (C_5) ; 63,7 ($\text{C}_{4'}$) ; 69,3 (C_2) ; 72,1 (C_6) ; 72,5 (C_3 ou $\text{C}_{2'}$) ; 72,7 (C_3 ou $\text{C}_{2'}$) ; 74,2 (C_7) ; 74,4 ($\text{C}_{3'}$).

V.2. Zwitterions soufrés

1-[(1,4-anhydro-1-thioérythritol)-1-ium]-2,4-*O*-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (231)



Le thiosucre **204** (72,6 mg ; 0,604 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (198 mg ; 0,727 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na₂CO₃ anhydre (15,0 mg ; 0,142 mmol ; 0,24 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 40 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 80/20) pour donner 148 mg d'un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (83:17) non séparables.

Rendement = 62 %.

R_f = 0,22 (CH₂Cl₂/MeOH : 80/20).

PF = 135°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -45,2$ (c = 0,91 ; MeOH).

IR (KBr) ν : 3404 (O-H) ; 1265 et 1233 (OSO₃⁻) ; 1094 et 1014 (C-O).

RMN ¹H (CD₃OD) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 3,35 (dd, 1H, H_{1b} ou H_{4b}, J = 5,6 Hz, J = 13,4 Hz) ; 3,40 (dd, 1H, H_{4b} ou H_{1b}, J = 5,1 Hz, J = 13,4 Hz) ; 3,69 (dd, 1H, H_{1a} ou H_{4a}, J = 5,6 Hz, J = 10,9 Hz) ; 3,71 (dd, 1H, H_{4a} ou H_{1a}, J = 5,1 Hz, J = 11,6 Hz) ; 3,83 (pt, 1H, H_{4'b}, J = 9,6 Hz) ; 4,10 (dd, 1H, H_{1'b}, J_{1'b-2'} = 5,1 Hz, J_{1'b-1'a} = 13,9 Hz) ; 4,29 (dd, 1H, H_{1'a}, J_{1'a-2'} = 3,4 Hz, J_{1'a-1'b} = 13,9 Hz) ; 4,34-4,39 (m, 1H, H_{2'}) ; 4,40-4,45 (m, 3H, H_{3'}, H₂ et H₃) ; 4,47-4,52 (m, 1H, H_{4'a}) ; 5,68 (s, 1H, H_{5'}) ; 7,36-7,40 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,45-7,49 (m, 2H, H_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 3,51-3,65 (m, 4H, 2H₁ et 2H₄) ; 3,79-3,87 (m, 1H, H_{4'b}) ; 3,94 (dd, 1H, H_{1'b}, J_{1'b-2'} = 5,9 Hz, J_{1'b-1'a} = 13,5 Hz) ; 4,04 (dd, 1H, H_{1'a}, J_{1'a-2'} = 3,2 Hz, J_{1'a-1'b} = 13,5 Hz) ; 4,34-4,39 (m, 1H, H_{2'}) ; 4,47-4,52 (m, 2H, H_{4'a} et H_{3'}) ; 4,55-4,60 (m, 2H, H₂ et H₃) ; 5,68 (s, 1H, H_{5'}) ; 7,36-7,40 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,45-7,49 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ^{13}C (CD₃OD) :

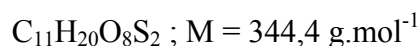
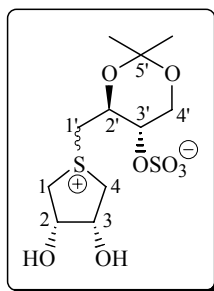
Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 45,8 (C₁ ou C₄) ; 46,0 (C₁ ou C₄) ; 50,2 (C_{1'}) ; 69,0 (C_{3'}) ; 69,9 (C_{4'}) ; 75,2 (C₂ ou C₃) ; 75,7 (C₂ ou C₃) ; 77,4 (C_{2'}) ; 102,7 (C_{5'}) ; 127,3-129,3-130,3 (C_{arom}) ; 138,4 (C_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 45,9 (C₁ ou C₄) ; 47,3 (C₁ ou C₄) ; 69,4 (C_{3'}) ; 74,5 (C₂ ou C₃) ; 74,7 (C₂ ou C₃) ; 77,2 (C_{2'}) ; 127,3-129,3-130,3 (C_{arom}).

1-[(1,4-anhydro-1-thioérythritol)-1-ium]-1,3-didésoxy-2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol-3-sulfate (230)



Le thiosucre **204** (23,7 mg ; 0,197 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **71** (53,3 mg ; 0,238 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (1 mL) sous argon en présence de Na₂CO₃ anhydre (4,6 mg ; 0,043 mmol ; 0,22 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 21 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 85/15) pour donner 43,3 mg d'un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (83:17) non séparables.

Rendement = 64 %.

R_f = 0,11 (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15).

RMN ¹H (CD₃OD) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 1,41 (s, 3H, CH₃) ; 1,53 (s, 3H, CH₃) ; 3,36-3,41 (m, 2H, H_{1b} et H_{4b}) ; 3,75 (2dd, 2H, H_{1a} et H_{4a}, J = 5,0 Hz, J = 12,9 Hz) ; 3,85 (dd, 1H, H_{4'b}, J_{4'b-3'} = 9,0 Hz, J_{4'b-4'a} = 11,5 Hz) ; 3,99 (dd, 1H, H_{1'b}, J_{1'b-2'} = 4,6 Hz, J_{1'b-1'a} = 13,6 Hz) ; 4,07 (dd, 1H, H_{4'a}, J_{4'a-3'} = 5,3 Hz, J_{4'a-4'b} = 11,5 Hz) ; 4,16 (dd, 1H, H_{1'a}, J_{1'a-2'} = 3,4 Hz, J_{1'a-1'b} = 13,6 Hz) ; 4,23-4,37 (m, 2H, H_{2'} et H_{3'}) ; 4,45-4,48 (m, 2H, H₂ et H₃).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 1,41 (s, 3H, CH₃) ; 1,53 (s, 3H, CH₃) ; 3,55-3,66 (m, 4H, 2H₁ et 2H₄) ; 3,81-3,87 (m, 2H, H_{4'b} et H_{1'b}) ; 3,92 (dd, 1H, H_{4'a}, J = 3,5 Hz, J = 13,4 Hz) ; 4,08 (dd, 1H, H_{1'a}, J = 5,3 Hz, J = 11,5 Hz) ; 4,23-4,37 (m, 2H, H_{2'} et H_{3'}) ; 4,57-4,62 (m, 2H, H₂ et H₃).

RMN ¹³C (CD₃OD) :

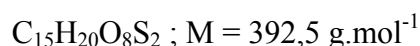
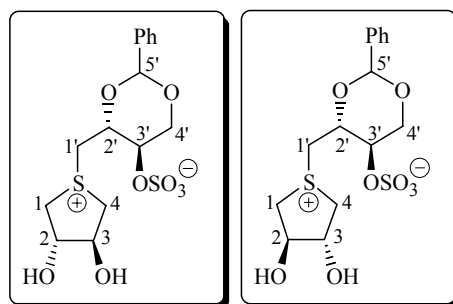
Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 19,6 (CH₃) ; 28,5 (CH₃) ; 45,6 (C₁ ou C₄) ; 46,1 (C₁ ou C₄) ; 50,7 (C_{1'}) ; 63,2 (C_{4'}) ; 70,4 (C_{2'} ou C_{3'}) ; 70,9 (C_{2'} ou C_{3'}) ; 75,1 (C₂ ou C₃) ; 75,6 (C₂ ou C₃) ; 101,2 (C_{5'}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 19,7 (CH₃) ; 28,4 (CH₃) ; 45,8 (C₁ ou C₄) ; 47,9 (C₁ ou C₄) ; 70,6 (C_{2'} ou C_{3'}) ; 74,5 (C₂ ou C₃) ; 74,7 (C₂ ou C₃).

1-[(1,4-anhydro-1-thiothréitol)-1-ium]-2,4-*O*-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (234a) et (234b)



Le thiosucre (\pm)-**205** (99,6 mg ; 0,829 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (271 mg ; 0,995 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (18,6 mg ; 0,175 mmol ; 0,21 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 26 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15) pour donner 243 mg d'un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères non séparables.

Rendement = 75 %.

R_f = 0,20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15).

PF = 143°C.

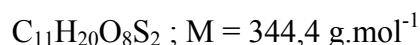
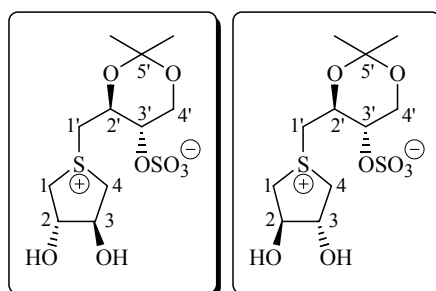
$[\alpha]_D^{24} = -42,0$ ($c = 1,27$; MeOH).

IR (KBr) ν : 3397 (O-H) ; 1263 et 1229 (OSO_3^-) ; 1092, 1054 et 1013 (C-O).

RMN ^1H (CD_3OD) δ : 3,47 (pd, 1H, H_{1b} ou H_{4b} , $J = 13,9$ Hz) ; 3,51 (pd, 1H, H_{4b} ou H_{1b} , $J = 13,9$ Hz) ; 3,70-3,74 (m, 2H, 2H_1) ; 3,76-3,86 (m, 6H, 2H_4 , H_{1a} , H_{4a} et $2\text{H}_{4'b}$) ; 3,98 (dd, 1H, $\text{H}_{1'b}$, $J_{1'b-2'} = 5,6$ Hz, $J_{1'b-1'a} = 13,6$ Hz) ; 4,03-4,12 (m, 2H, $2\text{H}_{1'}$) ; 4,18 (dd, 1H, $\text{H}_{1'a}$, $J_{1'a-2'} = 3,3$ Hz, $J_{1'a-1'b} = 13,6$ Hz) ; 4,34-4,38 (m, 2H, $2\text{H}_{2'}$) ; 4,40-4,47 (m, 2H, $2\text{H}_{3'}$) ; 4,47-4,53 (m, 2H, $2\text{H}_{4'a}$) ; 4,59 (ps, 2H, H_2 et H_3) ; 4,63 (ps, 2H, H_2 et H_3) ; 5,68 (s, 2H, $2\text{H}_{5'}$) ; 7,33-7,42 (m, 6H, H_{arom}) ; 7,47-7,51 (m, 4H, H_{arom}).

RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 49,1 (C_1 , C_4 ou $\text{C}_{1'}$) ; 49,3 (C_1 , C_4 ou $\text{C}_{1'}$) ; 49,4 (C_1 , C_4 ou $\text{C}_{1'}$) ; 49,6 ($\text{C}_{1'}$) ; 52,8 (C_1 ou C_4) ; 53,4 (C_1 ou C_4) ; 69,1 ($\text{C}_{3'}$) ; 69,9 ($\text{C}_{4'}$) ; 77,3 ($\text{C}_{2'}$) ; 77,5 ($\text{C}_{2'}$) ; 78,6 (C_2 ou C_3) ; 78,8 (C_2 ou C_3) ; 78,9 (C_2 ou C_3) ; 79,0 (C_2 ou C_3) ; 102,7 ($\text{C}_{5'}$) ; 102,8 ($\text{C}_{5'}$) ; 127,3-129,4-130,3 (C_{arom}) ; 138,4 (C_{arom}).

1-[(1,4-anhydro-1-thiothréitol)-1-ium]-1,3-didésoxy-2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol-3-sulfate (235a) et (235b)



Le thiosucre (\pm)-**205** (93,2 mg ; 0,776 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **71** (210 mg ; 0,937 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (16,3 mg ; 0,154 mmol ; 0,20 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 22 heures, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 80/20) pour donner 259 mg d'un solide blanc hygroscopique sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères non séparables.

Rendement = 97 %.

R_f = 0,31 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 80/20).

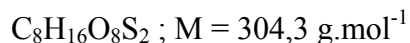
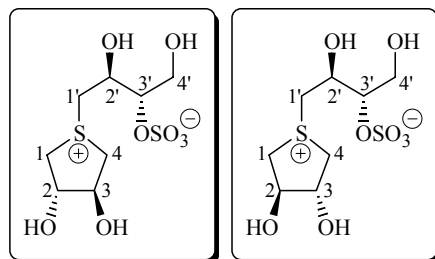
$[\alpha]_D^{24} = +43,3$ (c = 1,06 ; MeOH).

IR (KBr) ν : 3404 (O-H) ; 1268 et 1229 (OSO_3^-) ; 1051 et 1014 (C-O).

RMN ¹H (CD_3OD) δ : 1,42 (s, 6H, CH_3) ; 1,53 (s, 3H, CH_3) ; 1,54 (s, 3H, CH_3) ; 3,48 (pd, 1H, H_{1b} ou H_{4b} , J = 4,8 Hz) ; 3,51 (pd, 1H, H_{4b} ou H_{1b} , J = 4,5 Hz) ; 3,72-3,90 (m, 9H, $2H_{1,2}H_4$, H_{1a} , H_{4a} , $H_{1'b}$ et $2H_{4'b}$) ; 3,96 (pd, 2H, $2H_{1'}$, J = 4,0 Hz) ; 4,02-4,08 (m, 2H, $H_{4'a}$ et $H_{1'a}$) ; 4,10 (dd, 1H, $H_{4'a}$, J = 3,7 Hz, J = 5,2 Hz) ; 4,25-4,36 (m, 4H, $2H_{3'}$ et $2H_{2'}$) ; 4,61 (ps, 2H, H_2 et H_3) ; 4,65 (ps, 2H, H_2 et H_3).

RMN ¹³C (CD_3OD) δ : 19,6 (CH_3) ; 28,5 (CH_3) ; 49,2 (C_1 et C_4) ; 49,4 ($C_{1'}$) ; 50,2 ($C_{1'}$) ; 52,5 (C_1 ou C_4) ; 53,4 (C_1 ou C_4) ; 63,3 ($C_{4'}$) ; 70,6 ($C_{2'}$ ou $C_{3'}$) ; 70,7 ($C_{2'}$ ou $C_{3'}$) ; 70,9 ($C_{2'}$ ou $C_{3'}$) ; 78,6 (C_2 ou C_3) ; 78,7 (C_2 ou C_3) ; 78,9 (C_2 ou C_3) ; 79,0 (C_2 ou C_3).

1-[(1,4-anhydro-1-thiothréitol)-1-ium]-1,3-didésoxy-L-érythritol-3-sulfate (237a) et (237b)



Le mélange **235** (161 mg ; 0,467 mmol) est dissous dans 15 mL d'eau distillée. On ajoute 596 mg de résine DOWEX 50WX8 (16-40 mesh). Le milieu est agité à température ambiante pendant 4 jours. La résine est filtrée sur fritté et rincée avec de l'eau distillée. Le milieu est concentré sous pression réduite et purifié sur une résine échangeuse de cations élue à l'eau distillée. On obtient 72,2 mg d'une huile incolore sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères non séparables.

Rendement = 51 %.

$R_f = 0,52$ ($CH_2Cl_2/MeOH/H_2O : 55/40/5$).

$[\alpha]_D^{24} = +22,7$ ($c = 1,01 ; H_2O$).

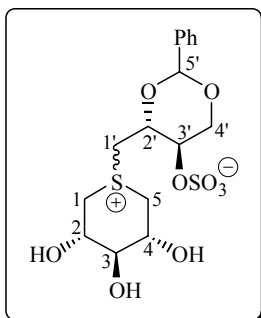
IR (KBr) ν : 3395 (O-H) ; 1254 et 1228 (OSO_3^-) ; 1054 et 1012 (C-O).

RMN 1H (D_2O) δ : 3,65 (pd, 1H, H_{1b} ou H_{4b} , $J = 14,6$ Hz) ; 3,68 (pd, 1H, H_{4b} ou H_{1b} , $J = 15,4$ Hz) ; 3,80-4,06 (m, 14H, $4H_{4'}$, $4H_{1'}$, H_{1a} , H_{4a} , $2H_1$ et $2H_4$) ; 4,35-4,45 (m, 4H, $2H_{3'}$ et $2H_{2'}$) ; 4,80 (ps, 2H, H_2 et H_3) ; 4,85 (ps, 2H, H_2 et H_3).

RMN ^{13}C (D_2O) δ : 47,3 (C_1 ou C_4) ; 47,6 (C_1 ou C_4) ; 50,2 (C_1 , C_4 ou $C_{1'}$) ; 50,4 (C_1 , C_4 ou $C_{1'}$) ; 50,5 (C_1 , C_4 ou $C_{1'}$) ; 51,1 (C_1 , C_4 ou $C_{1'}$) ; 59,6 ($C_{4'}$) ; 65,6 ($C_{2'}$) ; 65,9 ($C_{2'}$) ; 77,0 (C_2 ou C_3) ; 77,1 (C_2 ou C_3) ; 77,2 (C_2 ou C_3) ; 77,2 (C_2 ou C_3) ; 79,7 ($C_{3'}$) ; 79,9 ($C_{3'}$).

Masse haute résolution (ESI+) : $[M + Na]^+$ masse théorique = 327,0184
 masse trouvée = 327,0188

1-[(1,5-anhydro-1-thioxylitol)-1-ium]-2,4-*O*-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (238)



$$C_{16}H_{22}O_9S_2 ; M = 422,5 \text{ g.mol}^{-1}$$

Le thiosucre **206** (60,6 mg ; 0,403 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (135 mg ; 0,496 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na₂CO₃ anhydre (9,2 mg ; 0,087 mmol ; 0,22 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 7 jours, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 85/15) pour donner 64,8 mg d'un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (70:30) non séparables.

Rendement = 38 %.

R_f = 0,18 (CH₂Cl₂/MeOH : 85/15).

PF = 142°C.

$[\alpha]_D^{25} = -46,6$ (c = 1,02 ; MeOH).

IR (KBr) ν : 3406 (O-H) ; 1260 et 1225 (OSO₃⁻) ; 1094, 1069 et 1012 (C-O).

RMN ¹H (CD₃OD) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 3,47-3,52 (m, 2H, H_{1b} et H_{5b}) ; 3,67 (dd, 1H, H_{1a} ou H_{5a}, J = 2,5 Hz, J = 13,1 Hz) ; 3,70 (dd, 1H, H_{5a} ou H_{1a}, J = 2,3 Hz, J = 13,1 Hz) ; 3,75 (pt, 1H, H₃, J = 5,1 Hz) ; 3,79-3,88 (m, 1H, H_{4'b}) ; 3,91 (dd, 1H, H_{1'b}, J_{1'b-2'} = 4,9 Hz, J_{1'b-1'a} = 13,9 Hz) ; 4,01 (dd, 1H, H_{1'a}, J_{1'a-2'} = 3,2 Hz, J_{1'a-1'b} = 13,9 Hz) ; 4,16-4,21 (m, 2H, H₂ et H₄) ; 4,38-4,51 (m, 3H, H_{2'}, H_{3'} et H_{4'a}) ; 5,69 (s, 1H, H_{5'}) ; 7,34-7,41 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,45-7,50 (m, 2H, H_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 3,28-3,40 (m, 2H, H_{1b} et H_{5b}) ; 3,56-3,62 (m, 3H, H_{1a}, H_{5a} et H₃) ; 3,79-3,88 (m, 1H, H_{4'b}) ; 3,89-3,98 (m, 2H, H₂ et H₄) ; 4,04-4,12 (m, 2H, 2H_{1'}) ; 4,38-4,51 (m, 3H, H_{2'}, H_{3'} et H_{4'a}) ; 5,69 (s, 1H, H_{5'}) ; 7,34-7,41 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,45-7,50 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CD₃OD) :

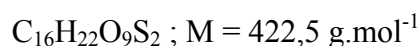
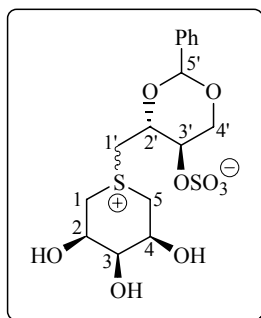
Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 41,7 (C₁ ou C₅) ; 42,5 (C₁ ou C₅) ; 43,8 (C_{1'}) ; 68,7 (C₂ et C₄) ; 69,2 (C_{3'}) ; 69,8 (C_{4'}) ; 69,9 (C₃) ; 77,0 (C_{2'}) ; 102,8 (C_{5'}) ; 127,3-129,4-130,4 (C_{arom}) ; 138,3 (C_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 39,7 (C₁ ou C₅) ; 40,3 (C₁ ou C₅) ; 45,8 (C_{1'}) ; 68,5 (C₂ ou C₄) ; 68,9 (C₂ ou C₄) ; 77,1 (C_{2'}) ; 127,3-129,4-130,4 (C_{arom}).

1-[(1,5-anhydro-1-thioribitol)-1-ium]-2,4-*O*-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (239)



Le thiosucre **207** (37,2 mg ; 0,248 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (82,1 mg ; 0,302 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (5,7 mg ; 0,054 mmol ; 0,22 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 7 jours, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 85/15) pour donner 63,3 mg d'un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (67:33) non séparables.

Rendement = 60 %.

R_f = 0,15 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 80/20).

PF = décomposition.

$[\alpha]_D^{25} = -37,6$ ($c = 0,25$; NaOH 0,01N (mauvaise solubilité)).

IR (KBr) ν : 3450 et 3388 (O-H) ; 1250 et 1231 (OSO_3^-) ; 1098 et 1014 (C-O).

RMN ¹H (CD_3OD) :

Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 3,23 (dd, 1H, H_{1b} ou H_{5b} , $J = 2,7 \text{ Hz}$, $J = 13,7 \text{ Hz}$) ; 3,28-3,31 (m, 1H, H_{5b} ou H_{1b}) ; 3,32-3,49 (m, 2H, H_{1a} et H_{5a}) ; 3,81-3,88 (m, 2H, $H_{1'b}$ et $H_{4'b}$) ; 3,96-4,08 (m, 2H, H_3 et $H_{1'a}$) ; 4,19-4,27 (m, 2H, H_2 et H_4) ; 4,38-4,51 (m, 3H, $H_{2'}$, $H_{3'}$ et $H_{4'a}$) ; 5,69 (s, 1H, $H_{5'}$) ; 7,36-7,41 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,45-7,50 (m, 2H, H_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 3,32-3,49 (m, 4H, $2H_1$ et $2H_5$) ; 3,81-3,88 (m, 1H, $H_{4'b}$) ; 3,96-4,08 (m, 4H, H_2 , H_3 , H_4 et $H_{1'b}$) ; 4,15 (dd, 1H, $H_{1'a}$, $J = 3,2 \text{ Hz}$, $J = 13,9 \text{ Hz}$) ; 4,38-4,51 (m, 3H, $H_{2'}$, $H_{3'}$ et $H_{4'a}$) ; 5,69 (s, 1H, $H_{5'}$) ; 7,36-7,41 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,45-7,50 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CD_3OD)

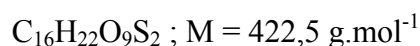
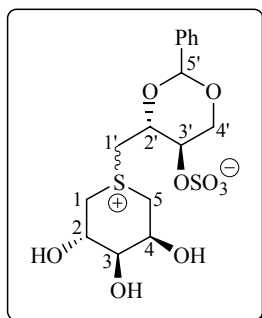
Diastéréoisomère majoritaire :

δ : 35,5 (C_1 et C_5) ; 40,4 ($C_{1'}$) ; 66,7 (C_2 ou C_4) ; 66,9 (C_2 ou C_4) ; 69,0 ($C_{3'}$) ; 69,9 ($C_{4'}$) ; 71,8 (C_3) ; 77,1 ($C_{2'}$) ; 102,8 ($C_{5'}$) ; 127,3-129,4-130,4 (C_{arom}) ; 138,3 (C_{arom}).

Diastéréoisomère minoritaire :

δ : 36,9 (C_1 ou C_5) ; 38,3 (C_1 ou C_5) ; 46,8 ($C_{1'}$) ; 67,5 (C_2 ou C_4) ; 67,6 (C_2 ou C_4) ; 69,1 ($C_{3'}$) ; 71,9 (C_3) ; 77,0 ($C_{2'}$) ; 127,3-129,4-130,4 (C_{arom}).

1-[(1,5-anhydro-1-thio-D-arabinitol)-1-ium]-2,4-O-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (240)



Le thiosucre **208** (50,0 mg ; 0,333 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (106 mg ; 0,389 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (7,3 mg ; 0,069 mmol ; 0,21 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 9 jours, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15) pour donner 58,1 mg d'un solide blanc sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères (50:50) non séparables.

Rendement = 41 %.

R_f = 0,19 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15).

PF = 141°C.

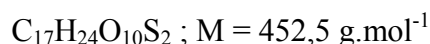
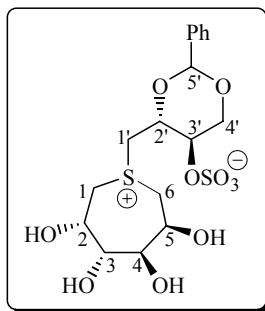
$[\alpha]_D^{25} = -48,0$ (c = 0,44 ; MeOH).

IR (KBr) ν : 3404 (O-H) ; 1263 et 1228 (OSO_3^-) ; 1092 et 1013 (C-O).

RMN ¹H (CD_3OD) δ : 3,23 (dd, 1H, H_{1b} ou H_{5b} , $J = 5,4 \text{ Hz}$, $J = 13,4 \text{ Hz}$) ; 3,25-3,30 (m, 1H, H_{5b} ou H_{1b}) ; 3,36-3,47 (m, 3H, H_{1b} , H_{5b} , H_{1a} ou H_{5a}) ; 3,52-3,62 (m, 3H, H_{5a} , H_{1a} , H_{5a} ou H_{1a}) ; 3,78-3,88 (m, 4H, 2H_3 et $2\text{H}_{4'b}$) ; 3,97 (dd, 1H, $\text{H}_{1'b}$, $J_{1'b-2'} = 4,6 \text{ Hz}$, $J_{1'b-1'a} = 14,1 \text{ Hz}$) ; 4,04 (dd, 1H, $\text{H}_{1'a}$, $J_{1'a-2'} = 3,3 \text{ Hz}$, $J_{1'a-1'b} = 14,1 \text{ Hz}$) ; 4,09 (dd, 1H, $\text{H}_{1'b}$, $J_{1'b-2'} = 3,9 \text{ Hz}$, $J_{1'b-1'a} = 14,4 \text{ Hz}$) ; 4,18 (dd, 1H, $\text{H}_{1'a}$, $J_{1'a-2'} = 3,6 \text{ Hz}$, $J_{1'a-1'b} = 14,4 \text{ Hz}$) ; 4,24-4,34 (m, 3H, H_2 , H_4 , H_2 ou H_4) ; 4,36-4,52 (m, 7H, $2\text{H}_2'$, H_4 ou H_2 , $2\text{H}_{4'a}$ et $2\text{H}_3'$) ; 5,67 (s, 1H, $\text{H}_{5'}$) ; 5,68 (s, 1H, $\text{H}_{5'}$) ; 7,37-7,42 (m, 6H, H_{arom}) ; 7,47-7,50 (m, 4H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CD_3OD) δ : 37,2 (C_1 ou C_5) ; 37,8 (C_1 ou C_5) ; 42,2 (C_1 ou C_5) ; 43,4 ($\text{C}_{1'}$) ; 45,6 ($\text{C}_{1'}$) ; 63,2 (C_4 ou C_2) ; 65,1 (C_4 ou C_2) ; 68,2 (C_2 , C_4 ou C_3') ; 68,7 (C_2 , C_4 ou C_3') ; 69,1 (C_2 , C_4 ou C_3') ; 69,4 (C_2 , C_4 ou C_3') ; 69,8 ($\text{C}_{4'}$) ; 70,6 (C_3) ; 71,7 (C_3) ; 77,0 ($\text{C}_{2'}$) ; 77,3 ($\text{C}_{2'}$) ; 102,7 ($\text{C}_{5'}$) ; 102,8 ($\text{C}_{5'}$) ; 127,3-129,4-130,3-130,4 (C_{arom}) ; 138,3 (C_{arom}).

1-[(1,6-anhydro-1-thio-D-mannitol)-1-ium]-2,4-O-benzylidène-1,3-didésoxy-D-érythritol-3-sulfate (245)



Le thiosucre **209** (52,9 mg ; 0,294 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-benzylidène-D-érythritol **77** (96,9 mg ; 0,356 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (2 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (6,2 mg ; 0,058 mmol ; 0,20 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 8 jours, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 85/15) pour donner 84,2 mg d'un solide blanc.

Rendement = 63 %.

R_f = 0,20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 80/20).

PF = 160°C.

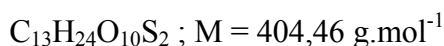
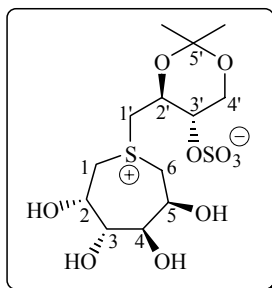
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -62,9$ (c = 0,92 ; MeOH).

IR (KBr) ν : 3388 (O-H) ; 1259 et 1219 (OSO_3^-) ; 1096, 1061 et 1014 (C-O).

RMN ¹H (CD_3OD) δ : 3,54 (dd, 1H, $\text{H}_{1\text{b}}$ ou $\text{H}_{6\text{b}}$, $J = 1,2 \text{ Hz}$, $J = 14,4 \text{ Hz}$) ; 3,66 (dd, 1H, $\text{H}_{1\text{a}}$ ou $\text{H}_{6\text{a}}$, $J = 8,0 \text{ Hz}$, $J = 14,4 \text{ Hz}$) ; 3,69-3,76 (m, 3H, H_3 , H_4 et $\text{H}_{6\text{b}}$ ou $\text{H}_{1\text{b}}$) ; 3,79-3,86 (m, 1H, $\text{H}_{4'\text{b}}$) ; 3,96 (dd, 1H, $\text{H}_{6\text{a}}$ ou $\text{H}_{1\text{a}}$, $J = 8,5 \text{ Hz}$, $J = 13,1 \text{ Hz}$) ; 3,98 (dd, 1H, $\text{H}_{1'\text{b}}$, $J_{1'\text{b}-2'} = 4,8 \text{ Hz}$, $J_{1'\text{b}-1'\text{a}} = 14,1 \text{ Hz}$) ; 4,11 (dd, 1H, $\text{H}_{1'\text{a}}$, $J_{1'\text{a}-2'} = 3,5 \text{ Hz}$, $J_{1'\text{a}-1'\text{b}} = 14,1 \text{ Hz}$) ; 4,33-4,37 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$) ; 4,40 (td, 1H, H_5 ou H_2 , $J = 1,5 \text{ Hz}$, $J = 1,5 \text{ Hz}$, $J = 8,6 \text{ Hz}$) ; 4,42-4,50 (m, 2H, $\text{H}_{3'}$ et $\text{H}_{4'\text{a}}$) ; 4,52-4,58 (m, 1H, H_2 ou H_5) ; 5,67 (s, 1H, $\text{H}_{5'}$) ; 7,34-7,41 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,46-7,50 (m, 2H, H_{arom}).

RMN ¹³C (CD_3OD) δ : 42,0 (C_1 ou C_6) ; 46,6 (C_6 ou C_1) ; 47,4 ($\text{C}_{1'}$) ; 68,3 (C_2 , C_5 ou $\text{C}_{3'}$) ; 69,0 (C_2 , C_5 ou $\text{C}_{3'}$) ; 69,9 ($\text{C}_{4'}$) ; 71,2 (C_2 ou C_5) ; 75,8 (C_4 ou C_3) ; 76,1 (C_4 ou C_3) ; 77,3 (C_2') ; 102,8 ($\text{C}_{5'}$) ; 127,3-129,4-130,3 (C_{arom}) ; 138,4 (C_{arom}).

1-[(1,6-anhydro-1-thio-D-mannitol)-1-ium]-1,3-didésoxy-2,4-O-isopropylidène-L-érythritol-3-sulfate (244)



Le thiosucre **209** (48,5 mg ; 0,269 mmol) et le sulfate cyclique du 2,4-*O*-isopropylidène-L-érythritol **71** (73,1 mg ; 0,326 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans du HFIP (1 mL) sous argon en présence de Na_2CO_3 anhydre (9,4 mg ; 0,089 mmol ; 0,33 éq). Le milieu est chauffé à reflux pendant 5 jours, puis concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$: 85/15) pour donner 23,3 mg d'un solide blanc.

Rendement = 21 %.

$R_f = 0,17$ ($CH_2Cl_2/MeOH$: 80/20).

PF = 168°C.

$[\alpha]_D^{25} = -9,5$ ($c = 1,08$; H_2O).

IR (KBr) ν : 3388 et 3349 (O-H) ; 1277 et 1226 (OSO_3^-) ; 1091, 1060 et 1012 (C-O).

RMN 1H (D_2O) δ : 1,46 (s, 3H, CH_3) ; 1,58 (s, 3H, CH_3) ; 3,62-3,66 (m, 1H, H_{1b} ou H_{6b}) ; 3,73-3,90 (m, 5H, H_{1a} ou H_{6a} , H_3 , $H_{1'b}$, H_4 et H_{6b} ou H_{1b}) ; 3,97 (dd, 1H, $H_{4'b}$, $J_{4'b-3'} = 9,1$ Hz, $J_{4'b-4'a} = 11,9$ Hz) ; 4,03-4,09 (m, 1H, H_{6a} ou H_{1a}) ; 4,08 (dd, 1H, $H_{1'a}$, $J_{1'a-2'} = 3,1$ Hz, $J_{1'a-1'b} = 14,1$ Hz) ; 4,11 (dd, 1H, $H_{4'a}$, $J_{4'a-3'} = 5,6$ Hz, $J_{4'a-4'b} = 11,9$ Hz) ; 4,37 (td, 1H, $H_{3'}$, $J_{3'-4'a} = 5,6$ Hz, $J_{3'-4'b} = J_{3'-2'} = 9,1$ Hz) ; 4,40 (td, 1H, $H_{2'}$, $J_{2'-1'a} = 3,1$ Hz, $J_{2'-1'b} = 6,4$ Hz, $J_{2'-3'} = 9,1$ Hz) ; 4,57-4,60 (m, 1H, H_5 ou H_2) ; 4,67-4,69 (m, 1H, H_2 ou H_5).

RMN ^{13}C (D_2O) δ : 18,8 (CH_3) ; 26,8 (CH_3) ; 39,7 (C_1 ou C_6) ; 43,7 (C_6 ou C_1) ; 44,8 ($C_{1'}$) ; 61,6 ($C_{4'}$) ; 66,9 (C_5 ou C_2) ; 68,8 ($C_{2'}$) ; 70,0 (C_2 ou C_5) ; 70,4 ($C_{3'}$) ; 74,2 (C_4 ou C_3) ; 74,3 (C_4 ou C_3) ; 100,8 ($C_{5'}$).

EVALUATION DES PROPRIETES INHIBITRICES

I. Généralités

L'ensemble des mesures a été réalisé sur un spectrophotomètre HITACHI U-2010, équipé d'un passeur thermorégulé, dans des cuves en polystyrène à usage unique.

Excepté pour les tests effectués avec la β -glucosidase et le cellobiose qui seront présentés à part, les expériences ont été réalisées à 25°C dans un tampon phosphate 25 mM à pH 6,8 (3,4 g de KH_2PO_4 ; KOH 1N ; qsp 1L d'eau) sur un volume total de 1 mL. Les variations de densité optique des solutions ont été suivies à 400 nm pendant cinq minutes, excepté pour l' α -glucosidase de riz, pour laquelle vingt minutes de mesure sont nécessaires.

Les enzymes utilisées sont commercialisées par la société Sigma :

- α -glucosidase de levure de boulanger ; solide ; activité spécifique : $7,6 \text{ U.mg}^{-1}$
- α -glucosidase de riz ; suspension dans une solution de sulfate d'ammonium ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; activité spécifique : 55 U.mg^{-1}
- β -glucosidase d'amandes ; solide ; activité spécifique : $12,4 \text{ U.mg}^{-1}$
- α -galactosidase de grains de café vert ; suspension dans une solution de sulfate d'ammonium ($5,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; activité spécifique : $11,6 \text{ U.mg}^{-1}$
- β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* ; solide ; activité spécifique : $11,7 \text{ U.mg}^{-1}$
- α -mannosidase de pois sabre (Jack beans) ; suspension dans une solution de sulfate d'ammonium ($5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) ; activité spécifique : 19 U.mg^{-1}
- Glucose oxydase d'*Aspergillus niger* ; solide ; activité spécifique : $15,5 \text{ U.mg}^{-1}$
- Peroxydase de radis noir ; solide ; activité spécifique : 113 U.mg^{-1}

Les substrats des glycosidases (*p*-nitrophényl- α -D-glucopyranoside, *p*-nitrophényl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophényl- α -D-galactopyranoside, *o*-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, *p*-nitrophényl- α -D-mannopyranoside) sont également commercialisés par la société Sigma.

Le cellobiose est commercialisé par Fluka et l'*o*-dianisidine par Sigma.

II. Détermination des constantes de Michaelis

Un volume de solution enzymatique est additionné à la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les concentrations indiquées dans le tableau suivant (**Tableau 24**).

Enzymes	Concentration enzymatique dans la cuve (U.mL ⁻¹)
α -glucosidase (levure de boulanger)	0,152
α -glucosidase (riz)	0,306
β -glucosidase (amandes)	0,273
α -galactosidase (grains de café vert)	0,018
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	1,638
α -mannosidase (pois sabre)	0,073

Tableau 24

Après cinq minutes d'incubation, une quantité variable de substrat est additionnée (**Tableau 25**) et la variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie. La pente de la droite obtenue ($\Delta DO/\Delta t$) permet de calculer la vitesse de la réaction enzymatique ($\epsilon = 18 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Enzymes	Concentration en substrat dans la cuve (mM)
α -glucosidase (levure de boulanger)	0,04 à 0,2
α -glucosidase (riz)	1 à 4
β -glucosidase (amandes)	0,25 à 2,5
α -galactosidase (grains de café vert)	0,2 à 1
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	0,25 à 2
α -mannosidase (pois sabre)	0,31 à 1,83

Tableau 25

La représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer les constantes de Michaelis de chaque glycosidase.

III. Activité restante de l'enzyme en présence d'inhibiteur

Un volume de solution enzymatique est incubé en présence d'une concentration de 1 mM en inhibiteur dans la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les concentrations indiquées dans le tableau suivant (**Tableau 26**).

Enzymes	Concentration enzymatique dans la cuve (U.mL ⁻¹)
α -glucosidase (levure de boulanger)	0,076
α -glucosidase (riz)	0,413
β -glucosidase (amandes)	0,136
α -galactosidase (grains de café vert)	0,018
β -galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	1,638
α -mannosidase (pois sabre)	0,073

Tableau 26

Une quantité de substrat est additionnée de façon à atteindre une concentration égale au K_m , après cinq et trente minutes d'incubation, pour vérifier la réversibilité de l'inhibition. La variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie et la vitesse de la réaction enzymatique en présence de l'inhibiteur est calculée.

Parallèlement à chacune de ces mesures, des mesures sont effectuées à cinq et trente minutes d'incubation sans inhibiteur. Le quotient de la vitesse obtenue en présence d'inhibiteur sur la vitesse obtenue en absence d'inhibiteur donne le pourcentage d'activité restante de l'enzyme.

En utilisant la relation suivante, le pourcentage d'activité restante permet d'estimer la valeur de la constante d'inhibition.

$$K_i = \frac{[I]}{\left(\frac{[S]}{K_m} + 1\right) \left(\frac{100}{\%AR} - 1\right)}$$

IV. Détermination des constantes d'inhibition

IV.1. Détermination précise

Un volume de solution enzymatique est incubé en présence de différentes concentrations en inhibiteur encadrant le K_i estimé, dans la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les mêmes concentrations enzymatiques que pour la détermination des K_m (**Tableau 24**).

Après cinq minutes d'incubation, une quantité variable de substrat est additionnée (**Tableau 25**). La variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie et la vitesse de la réaction enzymatique en présence de l'inhibiteur est calculée.

Pour chaque concentration en inhibiteur, la représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer les constantes de Michaelis apparentes. Le tracé de ces constantes en fonction de la concentration en inhibiteur permet de déterminer précisément les constantes d'inhibition.

IV.2. Détermination rapide

Un volume de solution enzymatique est incubé en présence d'une concentration de 1 mM en inhibiteur dans la quantité nécessaire de tampon de façon à atteindre les mêmes concentrations enzymatiques que pour la détermination des K_m (**Tableau 24**).

Après cinq minutes d'incubation, une quantité variable de substrat est additionnée (**Tableau 25**). La variation de la densité optique de la solution est suivie par spectrophotométrie et la vitesse de la réaction enzymatique en présence de l'inhibiteur est calculée.

La représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer la constante de Michaelis apparente correspondant à la concentration de 1 mM en inhibiteur.

La relation suivante permet de déterminer plus rapidement qu'avec la méthode précédente la valeur de la constante d'inhibition.

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K'_m}{K_m} - 1}$$

IV.3. Détermination avec la β -glucosidase et le cellobiose

IV.3.1. Préparation de la solution de dosage

Le réactif A contenant 8,5 mg de glucose oxydase et 1 mg de peroxydase dans 50 mL de tampon tris-phosphate-glycérol (36,3 g de tris ; 56,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 400 mL de glycérol ; qsp 1L d'eau) est préparé. Le réactif B contenant 13 mg d'*o*-dianisidine dans 50 mL du même tampon est également préparé.

La solution de dosage est réalisée juste avant les mesures en mélangeant des volumes équivalents de réactif A et de réactif B.

IV.3.2. Droite de standardisation

Dans un premier temps, il est nécessaire de faire une droite de standardisation permettant de relier la densité optique mesurée à la concentration en glucose libérée. Dans un volume total de 1 mL, une quantité variable de glucose (0,044 à 0,110 mM) est additionnée à 800 μL de la solution de dosage. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes. On ajoute 200 μL de HCl concentré et on mesure la densité optique à 492 nm.

IV.3.3. Détermination du K_m et du K_i

La β -glucosidase (0,032 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) est incubée en présence de concentrations variables en cellobiose (60 à 120 mM) dans la quantité nécessaire de tampon acétate 50 mM à pH 5 (2,85 mL d'acide acétique, NaOH 6N, qsp 1L d'eau) à 37°C. Des prélèvements de 600 μL sont effectués à 10 et 20 minutes et la réaction est arrêtée par ajout de 100 μL de HCl 2N. Un volume de 200 μL de cette nouvelle solution est incubé avec 800 μL de la solution de dosage à 37°C pendant trente minutes. On ajoute 200 μL de HCl concentré et on mesure la densité optique à 492 nm. Ces mesures permettent de calculer la vitesse de la réaction d'hydrolyse du cellobiose. La représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer la constante de Michaelis.

Le protocole précédent est renouvelé en présence de concentrations variables d'inhibiteurs (0,257 à 1,028 mM) et avec des prélèvements effectués à 15, 35 et 45 minutes. Pour chaque concentration en inhibiteur, la représentation de Hanes-Woolf des vitesses obtenues en fonction des différentes concentrations en substrat permet de déterminer les constantes de Michaelis apparentes. Le tracé de ces constantes en fonction de la concentration en inhibiteur permet de déterminer la constante d'inhibition.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- ¹ Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Shimada, H. ; Matsuda, H. ; Yamahara, J. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8367-8370.
- ² Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Yashiro, K. ; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1339-1340.
- ³ David, S. *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres* **1995**, InterEditions / CNRS Editions, 58-61.
- ⁴ Henrissat, B. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 309-316.
- ⁵ Coutinho, P. M. ; Henrissat, B. *Carbohydrate-Active Enzymes Server* **1999**, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>
- ⁶ Stryer, L. *La biochimie de Lubert Stryer* **1992**, Médecine-Sciences Flammarion.
- ⁷ Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- ⁸ Lennarz, W. J. *Biochemistry* **1987**, *26*, 7205-7210.
- ⁹ Koshland, D. E. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416-436.
- ¹⁰ Zechel, D. L. ; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11-18.
- ¹¹ McCarter, J. D. ; Withers, S. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885-892.
- ¹² Wang, Q. ; Graham, R. W. ; Trimbur, D. ; Warren, R. A. J. ; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11594-11595.
- ¹³ Sinnott, M. L. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202.
- ¹⁴ Vasella, A. ; Davies, G. J. ; Böhm, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 619-629.
- ¹⁵ Terwisscha van Scheltinga, A. C. ; Armand, S. ; Kalk, K. H. ; Isogai, A. ; Henrissat, B. ; Dijkstra, B. W. *Biochemistry* **1995**, *34*, 15619-15623.
- ¹⁶ Mark, B. L. ; Vocadlo, D. J. ; Knapp, S. ; Triggs-Raine, B. L. ; Withers S. G. ; James, M. N. G. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10330-10337.
- ¹⁷ Heightman, T. D. ; Vasella, A. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750-770.
- ¹⁸ Lawson, S. L. ; Wakarchuk, W. W. ; Withers S. G. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10110-10118.
- ¹⁹ Lawson, S. L. ; Wakarchuk, W. W. ; Withers S. G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2257-2265.
- ²⁰ Davies, G. J. ; Ducros, V. M.-A. ; Varrot, A. ; Zechel, D. L. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 523-527.
- ²¹ Sulzenbacher, G. ; Driguez, H. ; Henrissat, B. ; Schülein, M. ; Davies, G. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15280-15287.
- ²² Davies, G. J. ; Mackenzie, L. ; Varot, A. ; Dauter, M. ; Brzozowski, A. M. ; Schülein, M. ; Withers, S. G. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11707-11713.
- ²³ Numao, S. ; Kuntz, D. A. ; Withers, S. G. ; Rose, D. R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48074-48083.

- ²⁴ Vallée, F. ; Karaveg, K. ; Herscovics, A. ; Moremen, K. W. ; Howell, P. L. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 41287-41298.
- ²⁵ Kempton, J. B. ; Withers, S. G. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9961-9969.
- ²⁶ Lillelund, V. H. ; Jensen, H. H. ; Liang, X. ; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553.
- ²⁷ Withers, S. G. ; Namchuk, M. ; Mosi, R. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 188-206.
- ²⁸ Berecibar, A. ; Grandjean, C. ; Siriwardena, A. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 779-844.
- ²⁹ Li, B. ; Kawatkar, S. P. ; George, S. ; Strachan, H. ; Woods, R. J. ; Siriwardena, A. ; Moremen, K. W. ; Boons, G.-J. *Chembiochem* **2004**, *5*, 1220-1227.
- ³⁰ King, S. B. ; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 562-570.
- ³¹ Truscheit, E. ; Frommer, W. ; Junge, B. ; Müller, L. ; Schmidt, D. D. ; Wingender, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 744-761.
- ³² Chen, X. ; Fan, Y. ; Zheng, Y. ; Shen, Y. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1955-1977.
- ³³ Kameda, Y. ; Asano, N. ; Yoshikawa, M. ; Takeuchi, M. ; Yamaguchi, T. ; Matsui, K. ; Horii, S. ; Fukase, H. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1301-1307.
- ³⁴ Horii, S. ; Fukase, H. ; Matsuo, T. ; Kameda, Y. ; Asano, N. ; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1038-1046.
- ³⁵ Asano, N. ; Takeuchi, M. ; Kameda, Y. ; Matsui, K. ; Kono, Y. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 722-726.
- ³⁶ Simmonds, M. S. J. ; Kite, G. C. ; Porter, E. A. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 8-30.
- ³⁷ Watson, A. A. ; Fleet, G. W. J. ; Asano, N. ; Molyneux, R. J. ; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265-295.
- ³⁸ Legler, G. ; Jülich, E. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 61-72.
- ³⁹ Ekhardt, C. W. ; Fechter, M. H. ; Hadwiger, P. ; Mlaker, E. ; Stütz, A. E. ; Tauss, A. ; Wrodnigg, T. M. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 253-390.
- ⁴⁰ Miyake, Y. ; Ebata, M. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 153-158.
- ⁴¹ Asano, N. ; Oseki, K. ; Kizu, H. ; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3701-3706.
- ⁴² Asano, N. ; Kizu, H. ; Oseki, K. ; Tomioka, E. ; Matsui, K. ; Okamoto, M. ; Baba, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2349-2356.
- ⁴³ Yasuda, K. ; Kizu, H. ; Yamashita, T. ; Kameda, Y. ; Kato, A. ; Nash, R. J. ; Fleet, G. W. J. ; Molyneux, R. J. ; Asano, N. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 198-202.

- ⁴⁴ Kato, A. ; Kano, E. ; Adachi, I. ; Molyneux, R. J. ; Watson, A. A. ; Nash, R. J. ; Fleet, G. W. J. ; Wormald, M. R. ; Kizu, H. ; Ikeda, K. ; Asano, N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 325-331.
- ⁴⁵ Nash, R. J. ; Fellows, L. E. ; Dring, J. V. ; Fleet, G. W. J. ; Girdhar, A. ; Ramsden, N. G. ; Peach, J. M. ; Hegarty, M. P. ; Scofield, A. M. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 111-114.
- ⁴⁶ Tulsiani, D. R. P. ; Harris, T. M. ; Touster, O. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7936-7939.
- ⁴⁷ Yoshikawa, M. ; Morikawa, T. ; Matsuda, H. ; Tanabe, G. ; Muraoka, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1547-1554.
- ⁴⁸ Matsuda, H. ; Murakami, T. ; Yashiro, K. ; Yamahara, J. ; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1725-1729.
- ⁴⁹ Reese, E. T. ; Parrish, F. W. ; Ettliger, M. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 381-388.
- ⁵⁰ Legler, G. dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ; Stütz, A. E. **1999**, Wiley-VCH, 31-67.
- ⁵¹ Winchester, B. ; Fleet, G. W. J. *Glycobiology*, **1992**, *2*, 199-210.
- ⁵² Asano, N. ; Nash, R. J. ; Molyneux, R. J. ; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645-1680.
- ⁵³ Scheen, A. J. ; Lefebvre, P. J. *Drugs* **1998**, *55*, 225-236.
- ⁵⁴ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6615-6618.
- ⁵⁵ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2312-2317.
- ⁵⁶ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Maddess, M. D. ; Chinapoo, S. M. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 937-942.
- ⁵⁷ Ghavami, A. ; Sadalapure, K. S. ; Johnston, B. D. ; Lobera, M. ; Snider, B. B. ; Pinto, B. M. *Synlett* **2003**, 1259-1262.
- ⁵⁸ Szczepina, M. G. ; Johnston, B. D. ; Yuan, Y. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458-12469.
- ⁵⁹ Ghavami, A. ; Johnston, B. D. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6268-6271.
- ⁶⁰ Muraoka, O. ; Ying, S. ; Yoshikai, K. ; Matsuura, Y. ; Yamada, E. ; Minematsu, T. ; Tanabe, G. ; Matsuda, H. ; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1503-1505.
- ⁶¹ Johnston, B. D. ; Ghavami, A. ; Jensen, M. T. ; Svensson, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8245-8250.
- ⁶² Pinto, B. M. ; Johnston, B. D. ; Ghavami, A. *WO Patent 01/49674*, **2001**.
- ⁶³ Yuasa, H. ; Kajimoto, T. ; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8243-8246.

- ⁶⁴ Svansson, L. ; Johnston, B. D. ; Gu, J.-H. ; Patrick, B. ; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10769-10775.
- ⁶⁵ Yuasa, H. ; Takada, J. ; Hashimoto, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1137-1139.
- ⁶⁶ Ulgar, V. ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Bols, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1242-1246.
- ⁶⁷ Ulgar, V. ; López, Ó. ; Maya, I. ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Bols, M. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2801-2809.
- ⁶⁸ Noland, W. E. *Org. Synth.* **1961**, *41*, 67-71.
- ⁶⁹ Widmer, U. *Synthesis*, **1987**, 568-570.
- ⁷⁰ Gefflaut, T. ; Martin, C. ; Delor, S. ; Besse, P. ; Veschambre, H. ; Bolte, J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2296-2301.
- ⁷¹ Mukaiyama, T. ; Hoshino, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5339-5342.
- ⁷² Kantorowski, E. J. ; Brown, S. P. ; Kurth, M. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5272-5274.
- ⁷³ Kozikowski, A. P. ; Ghosh, A. K. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2762-2772.
- ⁷⁴ Kim, B. M. ; Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 655-658.
- ⁷⁵ Gao, Y. ; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7538-7539.
- ⁷⁶ Carlsen, P. H. J. ; Katsuki, T. ; Martin, V. S. ; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936-3938.
- ⁷⁷ Kanemasa, S. ; Tsuge, O. *Heterocycles* **1990**, *30*, 719-736.
- ⁷⁸ Schaller, C. ; Vogel, P. ; Jäger, V. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 25-35.
- ⁷⁹ Barco, A. ; Benetti, S. ; De Risi, C. ; Marchetti, P. ; Pollini, G. P. ; Zanirato, V. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5923-5930.
- ⁸⁰ Andersen, S. M. ; Ekhardt, C. ; Lundt, I. ; Stütz, A. E. *Carbohydr. Res.* **2000**, *326*, 22-33.
- ⁸¹ Lemaire, M. ; Veny, N. ; Gefflaut, T. ; Gallienne, E. ; Chênevert, R. ; Bolte, J. *Synlett* **2002**, 1359-1361.
- ⁸² Bergmeier, S. C. ; Stanchina, D. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2852-2859.
- ⁸³ Sugiyama, T. ; Sugawara, H. ; Watanabe, M. ; Yamashita, K. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 1841-1844.
- ⁸⁴ Boaz, N. W. ; Zimmerman, R. L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 153-156.
- ⁸⁵ Dallanoce, C. ; De Amici, M. ; Carrea, G. ; Secundo, F. ; Castellano, S. ; De Micheli, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2741-2751.
- ⁸⁶ Andersen, S. H. ; Das, N. B. ; Jorgensen, R. D. ; Kjeldsen, G. ; Knudsen, J. S. ; Sharma, S. C. ; Torssell, K. B. G. *Acta Chem. Scand. B* **1982**, *36*, 1-14.
- ⁸⁷ Kozikowski, A. P. ; Adamczyk, M. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 366-372.

- ⁸⁸ Gravestock, M. B. ; Paton, R. M. ; Todd, C. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2723-2730.
- ⁸⁹ Sakai, R. ; Matsubara, H. ; Shimamoto, K. ; Jimbo, M. ; Kamiya, H. ; Namikoshi, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 784-787.
- ⁹⁰ Bleecker, A. B. ; Romeo, J. T. *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 1025-1026.
- ⁹¹ Marlier M. ; Dardenne, G. ; Casimir, J. *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 183-185.
- ⁹² Barili, P. L. ; Berti, G. ; Catelani, G. ; Cini, C. ; D'Andrea, F. ; Mastrorilli, E. *Carbohydr. Res.* **1995**, *278*, 43-57.
- ⁹³ Veerapan, N. ; Yuan, Y. ; Sanders, D. A. R. ; Pinto, B. M. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2205-2217.
- ⁹⁴ Glaçon, V. ; Benazza, M. ; Beaupère, D. ; Demailly, G. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5053-5056.
- ⁹⁵ Halila, S. ; Benazza, M. ; Demailly, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3307-3310.
- ⁹⁶ Benazza, M. ; Halila, S. ; Viot, C. ; Danquigny, A. ; Pierru, C. ; Demailly, G. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2889-2895.
- ⁹⁷ Le Merrer, Y. ; Fuzier, M. ; Dosbaa, I. ; Foglietti, M.-J. ; Depezay, J.-C. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16731-16746.
- ⁹⁸ Zechel, D. L. ; Boraston, A. B. ; Gloster, T. ; Boraston, C. M. ; Macdonald, J. M. ; Tillbrook, D. M. G. ; Stick, R. V. ; Davies, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14313-14323.
- ⁹⁹ Fox, J. D. ; Robyt, J. F. *Anal. Biochem.* **1991**, *195*, 93-96.

RESUME

La synthèse d'inhibiteurs puissants et sélectifs de glycosidases, enzymes impliquées dans de nombreux processus biologiques, permet d'accéder à des agents thérapeutiques potentiels.

L'objectif de ce travail était de synthétiser de nouveaux analogues du salacinol, un puissant inhibiteur naturel d' α -glucosidases possédant une structure originale zwitterionique, et d'évaluer les propriétés inhibitrices des composés obtenus sur six glycosidases commerciales.

Nous avons donc préparé plusieurs iminosucres, analogues de la désoxynojirimycine et de l'acide pipécolique, par une méthode originale basée sur l'utilisation d'isoxazolines. Par couplage de ces iminosucres ou de différents thiosucres avec deux sulfates cycliques, nous avons synthétisé six nouveaux analogues azotés et neuf nouveaux analogues soufrés du salacinol. L'un de ces analogues soufrés s'est révélé être un très bon inhibiteur de la β -glucosidase d'amandes.

Mots-clés : inhibiteurs de glycosidases, salacinol, désoxynojirimycine, iminosucres, sulfates cycliques, zwitterions, constantes d'inhibition.

ABSTRACT

The synthesis of potent and selective inhibitors of glycosidases, enzymes which are crucial in many biological processes, give access to potential therapeutic agents.

The aim of this work was to synthesize new analogues of salacinol, a natural potent α -glucosidase inhibitor with an original zwitterionic structure, and to evaluate the inhibition properties of the prepared compounds towards six commercially available glycosidases.

Therefore we synthesized several iminosugars, deoxynojirimycin and pipercolic acid analogues, using an original method based on isoxazolines. The coupling reaction of these iminosugars or different thiosugars with two cyclic sulfates led to six new nitrogen and nine new sulfur salacinol analogues. One of these sulfur analogues showed very good inhibition of almonds β -glucosidase.

Key words : glycosidase inhibitors, salacinol, deoxynojirimycin, iminosugars, cyclic sulfates, zwitterions, inhibition studies.