



HAL
open science

Synthèse d' α -C-galactosylcéramides difluorés et évaluation de leurs propriétés immunorégulatrices pour le traitement des maladies autoimmunes systémiques

Sophie Colombel

► **To cite this version:**

Sophie Colombel. Synthèse d' α -C-galactosylcéramides difluorés et évaluation de leurs propriétés immunorégulatrices pour le traitement des maladies autoimmunes systémiques. Autre. INSA de Rouen, 2012. Français. NNT : 2012ISAM0014 . tel-00776792

HAL Id: tel-00776792

<https://theses.hal.science/tel-00776792>

Submitted on 16 Jan 2013

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.



ÉCOLE DOCTORALE NORMANDE DE CHIMIE

THÈSE

Présentée à

L'Institut National des Sciences Appliquées de Rouen

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN CHIMIE

Spécialité Chimie Organique

Par

Sophie COLOMBEL

**Synthèse d' α -C-galactosylcéramides difluorés et
évaluation de leurs propriétés immunorégulatrices pour le
traitement des maladies autoimmunes systémiques**

Soutenue publiquement le 18 octobre 2012

Devant le jury composé de

Rapporteurs :

Dr. David Gueyrard, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard, Lyon 1.

Dr. Jean-François Poisson, Chargé de Recherche CNRS à l'Université Joseph Fourier, Grenoble.

Examineurs :

Pr. Christophe Hoarau, Professeur à l'INSA de Rouen.

Dr. Géraldine Deliencourt-Godefroy, Directrice de TFChem à Val de Reuil.

Dr. Fanny Monneaux, Chargé de Recherche CNRS à l'Université de Strasbourg.

Pr. Xavier Pannecoucke, Professeur à l'INSA de Rouen. (Directeur de thèse)

Dr. Eric Leclerc, Chargé de Recherche CNRS à l'INSA de Rouen. (Directeur de thèse)

Remerciements

Je souhaite exprimer ma gratitude à Monsieur David Gueyrard, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard de Lyon, Monsieur Jean-François Poisson, Chargé de Recherche CNRS à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, Monsieur Christophe Hoarau, Professeur à l'INSA de Rouen, Mme Géraldine Deliencourt-Godefroy, directrice de TFChem à Val-de-Reuil et Mme Fanny Monneaux, Chargé de Recherche à l'Université de Strasbourg, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « Synthèse de biomolécules fluorées » de l'UMR 6014 CNRS COBRA, à l'Institut de Chimie Organique Fine (IRCOF) sous la direction du Professeur Xavier Pannecoucke. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse.

Je remercie également le Docteur Eric Leclerc, Chargé de Recherche CNRS, pour avoir suivi mon travail durant ces trois années, ainsi que pour sa disponibilité, sa bonne humeur et son soutien.

Je tiens également à remercier les autres permanents de l'équipe, Thomas Poisson, Maître de Conférences à l'INSA de Rouen, Philippe Jubault, Professeur à l'INSA de Rouen, Samuel Couve-Bonnaire, Maître de Conférences à l'INSA de Rouen, Jean-Philippe Bouillon, Professeur à l'Université de Rouen et Dominique Cahard, Directeur de Recherche CNRS. Merci à tous pour leurs précieux conseils et leurs encouragements.

Je remercie le Docteur Fanny Monneaux, Chargé de Recherche CNRS à l'IBMC de Strasbourg, pour son aide et sa disponibilité lors de mon séjour au sein de son laboratoire où nous avons mené ensemble les évaluations immunologiques des analogues. Je remercie également le Professeur Hassan Oulyadi, le Docteur Muriel Sebban et le Docteur Gaël Coadou pour avoir participé à ce projet. Collaborer avec l'ensemble de ces partenaires fut extrêmement enrichissant.

Un grand merci également à Annick Leboisselier pour les analyses élémentaires, Laëtitia Bailly pour les analyses de masse, Roland Viallon pour la réparation de verrerie, Jean-Luc Lecat pour la gestion du laboratoire et plus particulièrement à Elisabeth Roger (Babette), la meilleure technicienne.

Je tiens également à remercier deux personnes en particulier qui m'ont soutenu et qui ont toujours été auprès de moi dans les bons comme dans les mauvais moments : le Docteur Cécile Verrier et Emilie Villiers (Mimile), ma collègue de bureau, qui m'a supportée durant toute ma thèse.

Je tiens à remercier les nombreux doctorants et post-doctorants que j'ai côtoyé pendant mes trois années et avec qui j'ai passé de très bons moments. Au 1^{er} étage : Gaëlle, Pavel, Marie-Charlotte, Vincent, Nathalie, Sara, Mimile Post-doc, Alex, Sophie, Audrey, Hussein, Rabah ainsi que tous les SMS : Audrey, Anaïs, G1, G2, Silvia, Morgane, Olivier, Steu, Pika, Damien. Au 2^{ème} étage : Philippe, le roux, Post-doc, Romain et Grand Julien. Au 3^{ème} étage : Aurélie, Pierrick, Anne-Sophie, Cédric, Laure, Anthony, Mister Glandelle, Tony, Alex, Raphaël, Abdallah. Les anciens : Jo (mon grand frère), Gaëlle, Chouchou, Laeti, Gillou, Olivier, Batou, Rudy (mon colloc pendant 1 mois), Lulu, Agathe, Jean Loulou (mon chinois préféré). Les TFChem : Géraldine, Léna, Hyacinthe, Gaboo, Tibo.

Enfin, je tiens à remercier très chaleureusement Mathieu pour m'avoir soutenue toutes ces années et ma famille pour avoir cru en moi pendant toutes mes années d'études et sans qui cette thèse n'aurait pas été accomplie.

Sommaire

Liste des abréviations.....	7
CHAPITRE I.....	11
INTRODUCTION.....	11
1. INTRODUCTION GENERALE.....	13
2. LES GLYCOCONJUGUES : DES GLYCOSIDES SIMPLES AUX GALACTOSYLCERAMIDES.....	14
2.1. <i>Le rôle crucial des dérivés glycosidiques dans de nombreuses fonctions biologiques</i>	14
2.2. <i>Le KRN 7000 et ses analogues</i>	17
2.2.1. Origine du KRN 7000.....	17
2.2.2. Mécanisme d'action des α -GalCer.....	18
2.3. <i>Synthèse des analogues glycosidiques du KRN 7000</i>	21
2.3.1. Les O-GalCer.....	21
2.3.1.1. Modifications de la partie glycoside et du lien osidique.....	22
2.3.1.2. Modifications de la partie céramide.....	28
a. Modifications de la partie phytosphingosine.....	29
b. Modifications des chaînes lipidiques.....	31
c. Modifications et substitutions de la fonction amide.....	35
2.3.2. Les CH ₂ -GalCer.....	38
2.3.3. Les S-GalCer.....	42
3. LE FLUOR ET SON UTILISATION EN CHIMIE MEDICINALE.....	44
3.1. <i>Propriétés de l'élément fluor et de la liaison C-F</i>	44
3.2. <i>Effet du fluor sur la réactivité des molécules organiques</i>	46
3.3. <i>Utilisation de groupements fluorés pour moduler les propriétés de molécules bioactives</i>	47
3.4. <i>Le fluor : intérêt industriel</i>	49
3.5. <i>Le groupement CF₂ comme mime de l'oxygène</i>	49
4. LES FLUORGLYCOSIDES.....	50
4.1. <i>Généralités sur les fluorosucres</i>	50
4.1.1. Synthèses de CF ₂ -carbasucres.....	50
4.1.2. Synthèses de CFH-glycosides.....	53
4.2. <i>Synthèses de CF₂-glycosides</i>	54
4.2.1. Oléfination d'une lactone.....	54
4.2.2. Addition d'un éther d'énol silylé.....	55
4.2.3. Addition radicalaire sur un glycal.....	56
4.2.4. Fluorations nucléophile et électrophile.....	56
4.2.5. Synthèse de CF ₂ -disaccharides.....	57
4.2.6. Travaux du laboratoire.....	59
5. PRESENTATION DU PROJET DE SYNTHÈSE D'ANALOGUES FLUORES D' α -GALCER.....	63
CHAPITRE II.....	65
SYNTHÈSE DES PREMIERS ANALOGUES DIFLUORES DE GALCER.....	65
1. SYNTHÈSE DE L' α -CF ₂ -GALACTOSE.....	67
1.1. <i>Addition de radicaux électrophiles sur des 2-benzyloxy-D-glycals</i>	67
1.1.1. Mise au point de l'addition radicalaire et étendue de la réaction.....	68
1.1.2. Rappels concernant les radicaux fluoroalkyles et rationalisation des résultats.....	72
1.1.3. Réduction de la fonction cétone.....	74
1.2. <i>Fonctionnalisation des α-CF₂-galactosides</i>	79
1.2.1. Réactions de Horner-Wadsworth-Emmons.....	80
1.2.2. Réactions d'échange Br/Li et addition nucléophile intramoléculaire.....	81
2. SYNTHÈSE DE LA CHAÎNE PHYTOSPHINGOSINE.....	85
2.1. <i>Bibliographie</i>	85
2.2. <i>Synthèse de la partie céramide</i>	89
3. SYNTHÈSE D'ANALOGUES DIFLUORES DE GALCER.....	98
3.1. <i>Couplage entre l'acide carboxylique et le galactose et échange halogène/métal</i>	98
3.2. <i>Réduction de l'hémi-acétal</i>	101
3.3. <i>Synthèse d'analogues d'α-galactosylcéramides</i>	103
CHAPITRE III.....	109

ASPECTS BIOLOGIQUES ET EVALUATIONS DES PREMIERS ANALOGUES	109
1. INTERACTIONS CELLULES NKT/ α -GALCER/CPA	111
1.1. <i>Les lymphocytes</i>	111
1.2. <i>Complexation avec la molécule CD1d</i>	114
1.2.1. La glycoprotéine CD1d	114
1.2.2. Le complexe ligand/CD1d	115
1.3. <i>Interactions du complexe CD1d/GalCer avec le TCR</i>	116
1.4. <i>Les cytokines</i>	119
2. TESTS IMMUNOLOGIQUES SUR NOS ANALOGUES.....	121
2.1. <i>Introduction</i>	121
2.2. <i>Tests immunologiques</i>	123
2.2.1. Protocole expérimental.....	123
2.2.2. Résultats	124
Définitions	126
CHAPITRE IV	129
VERS LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES EXACTS DIFLUORES DE GALCER.....	129
1. STRATEGIE ENVISAGÉE.....	131
2. PROTECTION SELECTIVE EN POSITION 2	132
3. FORMATION D'UN COMPOSE CYCLIQUE EN 2'/3'	133
3.1. <i>Via une protection acétonide</i>	133
3.2. <i>Via une protection sulfamidate</i>	137
4. CONCLUSIONS	141
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	143
1. CONCLUSION	145
2. PERSPECTIVES	146
Références bibliographiques	149
EXPERIMENTAL SECTION	157
1. GENERAL METHODS.....	159
2. SYNTHESIS OF α -CF ₂ -GALACTOSE.....	160
2.1. <i>Preparation of the 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-glycals</i>	160
2.2. <i>Addition of dibromodifluoromethane to 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-galactal</i>	163
2.3. <i>Reduction of the carbonyl to obtain CF₂-galactose</i>	165
3. SYNTHESIS OF PHYTOSPHIGOSINE CHAIN	167
3.1. <i>Synthesis of Garner's aldehyde</i>	167
3.2. <i>Wittig reaction</i>	170
3.3. <i>Osmylation reaction</i>	173
3.4. <i>Synthesis of the carboxylic acid</i>	177
3.4.1. Synthesis of silyl derivatives.....	177
3.4.2. Synthesis of benzyl derivatives.....	182
3.4.3. Synthesis of a fully protected derivative	198
4. SYNTHESIS OF α -CF ₂ -GALACTOSYLCERAMIDES ANALOGUES	202
4.1. <i>Coupling between the carboxylic acid and the galactose</i>	202
4.2. <i>Intramolecular cyclisation and reduction of the hemiacetal</i>	205
4.3. <i>Peptidic coupling</i>	209
4.4. <i>Hydrogenation</i>	216
4.5. <i>Selective protection of hydroxyle group (O-2')</i>	220
ANNEXES	225

Liste des abréviations

Ac : acétate

AcOEt/AE : acétate d'éthyle

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AGL : agélasphine

AIBN : azobis-*iso*-butyronitrile

APTS : acide *para*-toluènesulfonique

Arg : arginine

ARN : acide ribonucléique

Asp : aspartique

Bn : benzyle

Boc : *tert*-butyloxycarbonyle

Bz : benzoyle

CAN : nitrate de cérium et d'ammonium

Cat : catalytique

CD1 : cluster de différenciation 1

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

DAST : trifluorure de diéthylamine sulfure

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarboxydiimide

DCE : dichloroéthane

DIBAH : hydrure de diisobutylaluminium

DIPC : *N,N'*-diisopropyl-carbodiimide

DLP : peroxyde de dilauroyle

DMAP : diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

E1_{CB} : élimination monomoléculaire par condensation basique

EDCI : 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide

équiv. : équivalent

Et : éthyle

GalCer : galactosylcéramide

Gly : glycine

GSL : glycosphingolipide

HOESY : heteronuclear overhauser enhancement spectroscopy

HOMO : plus haute orbitale moléculaire occupée (highest occupied molecular orbital)

HWE : Horner-Wadsworth-Emmons

IBX : acide 2-iodoxybenzoïque

IFN- γ : Interféron- γ

IL : Interleukine

Im. : imidazole

***i*-Pr** : *iso*-propyle

LDA : di-*iso*-propylamidure de lithium

***m*-CPBA** : acide *méta*-chloroperbenzoïque

Me : méthyle

MOM : éther méthoxyméthyle

MPV : Meerwein-Ponndorf-Verley

NaO₃S : sulfite de sodium

***n*-Bu** : *n*-butyle

NKT : Natural Killer T

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NMO : *N*-méthylmorpholine-*N*-oxide

NOESY : nuclear overhauser enhancement spectroscopy

Nu : nucléophile

OsO₄ : tétraoxyde d'osmium

PDC : dichromate de pyridinium

Ph : phényle

Phe : phénylalanine

***p*-Tol** : *para*-toluidine

quant. : quantitatif

rdt : rendement

RMN : résonance magnétique nucléaire

Ser : sérine

SN₁ : substitution nucléophile monomoléculaire

SN₂ : substitution nucléophile bimoléculaire

TA : température ambiante

TBDMS/TBS : *tert*-butyldiméthylsilyle

TBDPS : *tert*-butyldiphénylsilyle

TCR : T cell récepteur

TEMPO : 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl

TES : triéthylsilyle

TFA : acide trifluoroacétique

Th : T helper

THF : tétrahydrofurane

Thr : thréonine

TIPS : tri-*iso*-propylsilyle

TMS : triméthylsilyle

Tr : trityle

Trp : tryptophane

TIBAL : tri-*iso*-butylaluminium

Tyr : tyrosine

VIH : virus de l'immunodéficience humain

Chapitre I

Introduction

1. Introduction générale

L'introduction d'atomes de fluor dans des biomolécules ou dans des molécules synthétiques possédant des activités biologiques importantes a fait l'objet d'intenses efforts de recherche depuis deux ou trois décennies. Les propriétés uniques du fluor (taille, électronégativité) et de la liaison C-F (énergie, longueur) permettent en effet de moduler considérablement les propriétés biologiques de ces molécules (affinité avec le récepteur, stabilité métabolique, vectorisation) tout en minimisant les modifications structurales.

D'autres part, les *O*-glycoconjugués, et d'une manière générale les dérivés glycosidiques, ont suscité un engouement équivalent dans le domaine de l'identification de nouveaux principes actifs. En effet, leur implication dans de nombreux processus biologiques, comme la reconnaissance intercellulaire ou les réponses immunitaires, leur confère des propriétés inédites et une efficacité vis-à-vis d'un large spectre de pathologies : le KRN 7000, immunostimulant puissant, ou l'antigène T_N, candidat à l'élaboration de vaccins anti-tumoraux, en sont deux exemples. Cependant, ces remarquables propriétés sont grevées par la médiocre stabilité *in vivo* des *O*-glycoconjugués (coupure du lien osidique). La conception de glycomimétiques non hydrolysables afin de stabiliser ces structures tout en conservant leur activité originale se révèle donc cruciale.

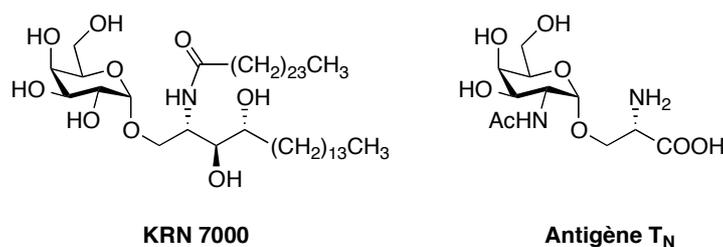


Figure 1 : Exemples de principes actifs *O*-glycoconjugués

Parmi les analogues envisageables, les C-glycosides et les carbasucres ont particulièrement retenu notre attention. Le remplacement d'un atome d'oxygène de la fonction acétalique par un lien carboné (CH₂) assure en effet une grande stabilité chimique et enzymatique. Cependant, il nous a paru judicieux d'envisager l'utilisation du groupement CF₂ comme mime de l'oxygène, l'électronégativité des atomes de fluor devant assurer une meilleure équivalence entre les deux groupements.

Les travaux réalisés au laboratoire ont en premier lieu porté sur la synthèse et l'utilisation des CF₂-glycosides comme glycomimétiques.

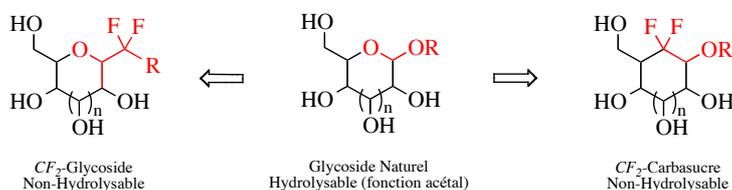


Schéma 1 : Analogues fluorés de glycosides

Plusieurs méthodologies de synthèse, permettant l'accès à des CF₂-glycosides fonctionnalisés, intermédiaires pour diverses séries de sucres α ou β , ont été développées au laboratoire ces dernières années. En parallèle, le potentiel de ces C-glycosides fluorés dans le cadre d'applications pharmaceutiques ou cosmétiques a plus récemment incité le laboratoire à envisager l'autre aspect de cette stratégie, à savoir le développement de CF₂-carbasucres comme nouveaux glycomimétiques fluorés.

Afin de mieux comprendre le contexte de cette étude, les glycosides et leur rôle dans diverses fonctions biologiques seront présentés, ainsi que les différentes propriétés du fluor et son utilisation en chimie médicinale. Les précédents bibliographiques sur les glycomimétiques fluorés et leur synthèse seront finalement discutés.

2. Les glycoconjugués : des glycosides simples aux galactosylcéramides

2.1. Le rôle crucial des dérivés glycosidiques dans de nombreuses fonctions biologiques

Les sucres sont parmi les composés naturels complexes les plus répandus et jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques. Les fonctions énergétiques (transport, stockage, production par le biais de polysaccharides type amidon ou glycogène) et structurelles (cellulose chez les végétaux et chitine chez les arthropodes) sont très connues. En ce qui concerne la biologie moléculaire, la découverte de nouvelles fonctions sur les glycoconjugués montre le rôle primordial des oses. En effet, la partie glycosidique des

glycoprotéines permet de modifier les propriétés physico-chimiques ou dynamiques des protéines correspondantes. Les glycolipides qui sont présents sur la membrane cellulaire peuvent également jouer un rôle dans la perméabilité cellulaire. Les glycosides, quant à eux, jouent un rôle majeur au niveau de la reconnaissance inter-cellulaire et notamment dans le fonctionnement du système immunitaire. Les glycoprotéines et les glycolipides, constituants de la paroi cellulaire, possèdent une partie saccharidique qui peut constituer le motif antigénique ou bien peut être reconnu par des récepteurs spécifiques : les lectines.

Cette implication dans de nombreux processus biologiques confère bien sûr aux glycoconjugués un potentiel thérapeutique élevé.¹ Beaucoup de ces structures, qu'elles soient glycopeptidiques ou glycolipidiques, représentent des cibles thérapeutiques intéressantes dans les dérèglements immunologiques (traitement de certaines maladies auto-immunes), les atteintes dermatologiques, quelques maladies virales ou infectieuses et certains types de cancers. Depuis plus de vingt ans, certains antigènes caractéristiques de cellules cancéreuses (l'antigène T_N) font l'objet de nombreux travaux² ainsi que les glycosphingolipides (GSL) qui sont impliqués dans de nombreux types de pathologies.³ Les α -galactosylcéramides, appartenant à la famille des GSL, font apparaître des propriétés immunorégulatrices et immunostimulantes intéressantes ainsi qu'une très grande activité vis-à-vis de certains types de cancers, de maladies infectieuses et de maladies autoimmunes.^{4,5} Certaines cellules du système immunitaire humain et animal (cellules NKT) reconnaissent ces glycolipides, pourtant extraits d'éponges marines et absents chez les mammifères, et entraînent des processus de régulation ou de stimulation aux effets notables.⁶

¹ (a) *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2nd ed.; Lindshorst, T. K., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002. (b) *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wong, C.-H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003.

² (a) Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. Synthetic Carbohydrate Vaccines. In *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wong, C.-H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003; Vol. 1, pp 381. (b) Danishefsky, S. J.; Allen, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836-863. (c) dziadek, S.; Hobel, A.; Schmitt, E.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630-7635. (d) Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5985-5988.

³ Wenekes, T.; van den Berg, R. J. H. N.; Boot, R. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. *G. Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8848-8849.

⁴ (a) Natori, T.; Morita, M.; Akimoto, K.; Koezuka, Y. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2771-2784. (b) Morita, M.; Motoki, K.; Akimoto, K.; Natori, T.; Sakai, T.; Sawa, E.; Yamaji, K.; Koezuka, Y.; Kobayashi, E.; Fukushima, H. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2176-2187. (c) Giaccone, G.; Punt, C. J. A.; Ando, Y.; Ruijter, R.; Nishi, N.; Peters, M.; von Blomberg, B. M. E.; Scheper, R. J.; van der Vliet, H. J. J.; van der Eertwegh, A. J. M.; Roelvink, M.; Beijnen, J.; Zwierzina, H.; Pinedo, H. M. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3702-3709.

⁵ (a) Grubor-Bauk, B.; Simmons, A.; Mayrhofer, G.; Speck, P. G. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 1430-1434. (b) Nieuwenhuis, E. E.; Matsumoto, T.; Exley, M.; Scheipman, R. A.; Glickman, J.; Bailey, D. T.; Corazza, N.; Colgan, S. P.; Onderdonk, A. B.; Blumberg, R. S. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 588-593. (c) Hong, S.; Wilson, M. T.; Serizawa, I.; Wu, L.; Singh, N.; Naidenko, O. V.; Miura, T.; Haba, T.; Scherer, D. C.; Wei, J.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; Van Kaer, L. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1052-1056.

⁶ Kronenberg, M. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 877-900.

Ces nucléosides ainsi que leurs analogues comptent parmi les glycoconjugués à fort potentiel thérapeutique et sont utilisés dans le traitement de maladies virales (herpès, hépatite B ou VIH) et de cancers. Ces espèces agissent en empêchant la production d'acides nucléiques cellulaires (antitumoraux) ou viraux (antiviraux) *via* l'un de leurs métabolites mono, di ou triphosphorylé par des kinases cellulaires.⁷ Par exemple, la 1-β-D-arabinofuranosyladénine (Vidarabine), analogue de l'adénosine dans lequel le motif D-ribose est remplacé par un D-arabinose, est un antiviral utilisé dans le traitement de l'herpès.⁸ Sa forme triphosphate se fixe sur la polymérase virale à la place du nucléoside naturel et empêche la synthèse de l'ADN viral. Par ailleurs, le premier médicament autorisé dans le traitement du sida est également un analogue de nucléoside et plus particulièrement de la thymidine : la Zidovudine ou azidothymidine (AZT). La synthèse de cette molécule a été publiée en 1964 par Horwitz,⁹ puis un brevet a été déposé en 1985 par la firme Burroughs Wellcome qui est actuellement GlaxoSmithKline. Son utilisation contre le VIH en trithérapie fut approuvée par la FDA en 1987. La forme triphosphate de cet antirétroviral inhibe la transcriptase inverse, enzyme qui est employée par le VIH pour synthétiser un brin d'ADN à partir de son ARN, cet ARN étant le précurseur de la réplication du VIH dans la cellule.¹⁰ Cette molécule est commercialisée sous le nom de Retrovir®, et également en association avec d'autres molécules sous le nom de Combivir® ou Tritivir®.

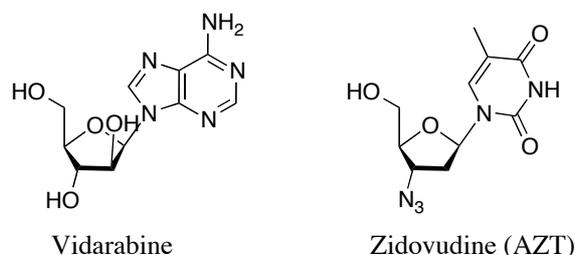


Figure 2 : Principes actifs nucléosidiques

Malgré ces nombreuses applications potentielles, l'utilisation des glycoconjugués comme agents thérapeutiques est limitée par deux inconvénients majeurs. Le premier concerne la synthèse de ces composés qui peut se révéler longue et difficile et le second est

⁷ (a) Mathé, C.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 276-281. (b) Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 105-111.

⁸ Shen, W.; Kim, J.-S.; Kisch, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 792-796.

⁹ Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2076-2078.

¹⁰ Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; Broder, S. *Science* **1990**, *249*, 1533-1544.

leur faible stabilité métabolique qui nuit à leur biodisponibilité et à une utilisation thérapeutique efficace. En effet, en milieu biologique, les glycosidases et les glycanases ont pour fonction de couper le lien osidique reliant la partie saccharide à l'aglycone, ce qui par conséquent conduit à une perte totale de l'information biologique ou immunogénique.

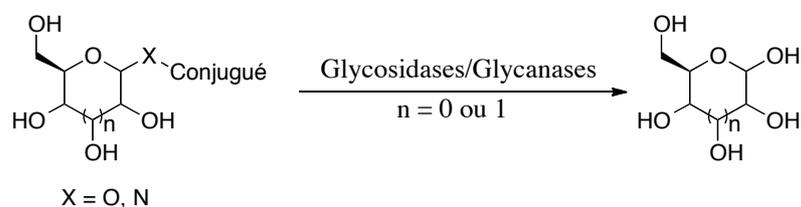


Schéma 2 : Hydrolyse de glycoconjugués *in vivo*

Le concept de glycomimétisme est alors apparu pour qualifier les composés pouvant remplacer les glycosides naturels et présentant l'avantage d'une structure plus simple, d'une synthèse plus facile ou d'une meilleure stabilité métabolique (idéalement, les trois à la fois) tout en conservant ou améliorant leur activité biologique.¹¹

2.2. Le KRN 7000 et ses analogues

2.2.1. Origine du KRN 7000

En 1993, un groupe de glycosphingolipides composé d' α -galactosylcéramides (α -GalCer) a été isolé d'une éponge marine appelée *Agelas Mauritanus* près d'Okinawa au Japon.¹² Ces sphingolipides, appelés Agélasphines, ont une structure possédant une tête polaire D-galactose et une partie céramide. Cette dernière est une phytosphingosine dont l'azote est couplé à un acide gras et est donc constituée de deux chaînes lipidiques. Le lien osidique est de configuration α alors que la plupart des GSL produits par les mammifères sont de configuration β .

Le groupe de Morita a pu confirmer par analyse (RMN ^1H et ^{13}C , IR, Spectrométrie de masse...) ces structures lors de la synthèse totale de l'agélasphine **AGL-9b**.¹³

¹¹ Sears, P.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300-2324.

¹² Natori, T.; Koezuka, Y.; Higa, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5591-5592.

¹³ Akimoto, K.; Natori, T.; Morita, M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5593-5595.

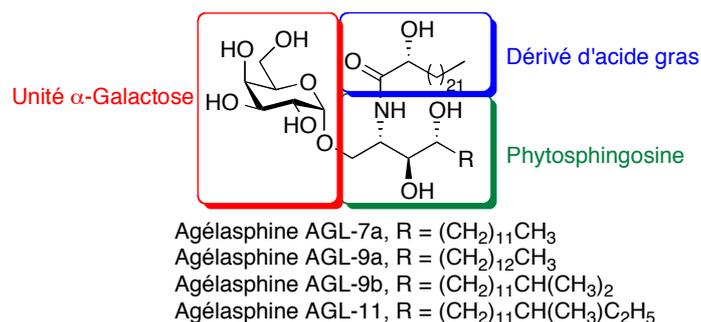


Figure 3 : Quelques exemples d'Agélasphines

L'Agélasphine **AGL-9b** a montré une excellente activité antitumorale *in vivo* sur des cellules cancéreuses de souris. Des études de relation structure/activité ont été effectuées par Brewery et son équipe, au vu des activités biologiques remarquables de ce composé. Parmi les nombreux analogues synthétisés, l'Agélasphine **AGL-562**, plus communément appelé KRN 7000 (ou α -GalCer), a montré la meilleure activité, ce qui en faisait un agent antitumoral très prometteur.⁴

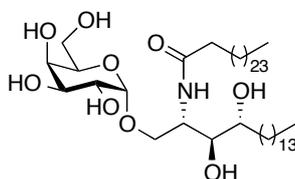


Figure 4 : Structure du KRN 7000

2.2.2. Mécanisme d'action des α -GalCer

Les α -galactosylcéramides possèdent, chez l'animal comme chez l'homme, des propriétés immunostimulantes et immunorégulatrices remarquables.⁴ Ces propriétés sont dues à l'interaction avec les cellules NKT dont ils provoquent l'expansion et l'activation.

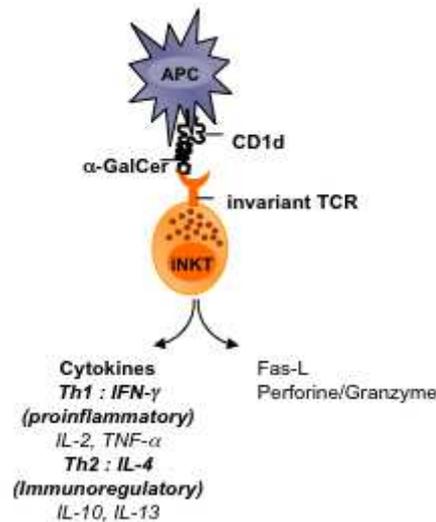


Figure 5

Ces cellules reconnaissent certains antigènes glycolipidiques et ont une affinité particulière avec les α -galactosylcéramides (α -GalCer). Le mécanisme d'action implique la formation d'un complexe ternaire entre une cellule présentatrice d'antigène (CPA), une cellule NKT et une molécule d' α -GalCer. Cette dernière se lie par sa partie lipidique au domaine CD1d des CPA et, par sa partie glycosidique, au récepteur TCR (T Cell Receptor) du NKT.⁵ Cette association est suivie par une rapide production de cytokines possédant diverses fonctions immunologiques. Les cytokines dites du type Th1 sont responsables de la réponse immunitaire pro-inflammatoire (efficace contre les maladies infectieuses et les tumeurs),¹⁴ alors que les cytokines du type Th2 sont responsables des fonctions immunorégulatrices (utilisées pour le traitement des maladies autoimmunes systémiques).¹⁵

¹⁴ (a) Godfrey, D. I.; Kronenberg, M. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1379-1388. (b) Borg, N. A.; Wun, K. S.; Kjer-Nielsen, L.; Wilce, M. C.; Pellicci, D. G.; Koh, R.; Besra, G. S.; Bharadwaj, J. M.; Godfrey, D. I.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. *Nature* **2007**, *448*, 44-49.

¹⁵ (a) Seino, K.; Motohashi, S.; Fujisawa, T.; Nakayama, T.; Tanigushi, M. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 807-812. (b) Linsen, L.; Somers, V.; Stinissen, P. *Hum. Immunol.* **2005**, *66*, 1193-1202.

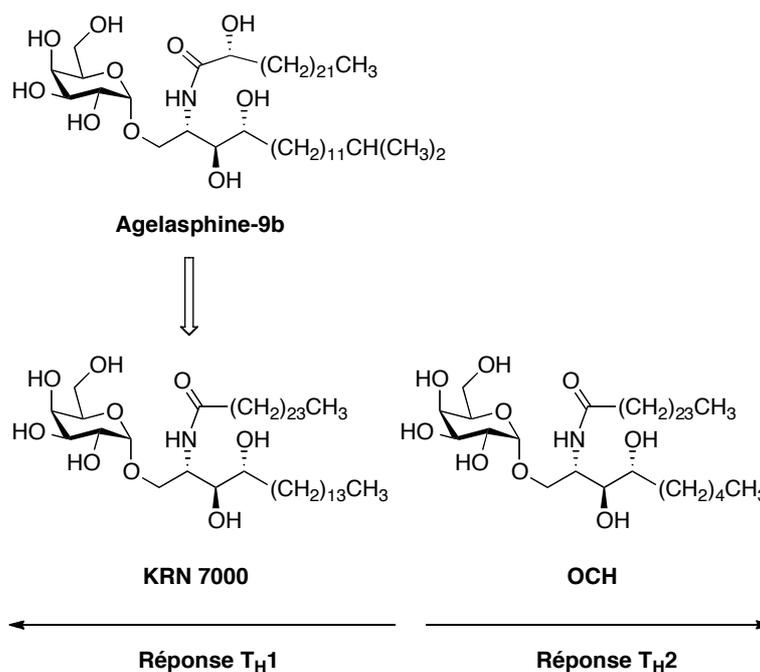


Schéma 3

Les résultats biologiques apportés par le changement des longueurs des chaînes de la partie céramide se sont avérés très intéressants. En effet, la structure des agélasphines (α -GalCers naturels) peut être simplifiée, le KRN7000 représentant la structure optimale lorsque l'activité pro-inflammatoire est recherchée.^{4b} Par ailleurs, la longueur des chaînes lipidiques a une influence sur la nature de la réponse immunitaire, la balance Th2/Th1 étant généralement infléchiée en faveur d'une réponse immunorégulatrice dans le cas de GalCer à courtes chaînes grasses comme l'OCH.¹⁶

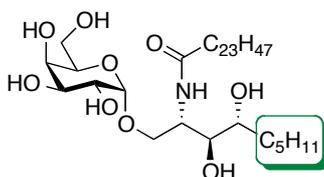


Figure 6 : Analogue OCH¹⁷

C'est pourquoi de nombreux chercheurs se sont penchés sur la synthèse de divers analogues pouvant favoriser une des deux réponses immunitaires.

¹⁶ Miyamoto, K.; Miyake, S.; Yamamutura, T. *Nature* **2001**, *413*, 531-534.

¹⁷ Murata, K.; Toba, T.; Nakanishi, K.; Takahashi, B.; Yamamura, T.; Miyake, S.; Annoura, H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2398-2401.

2.3. Synthèse des analogues glycosidiques du KRN 7000

2.3.1. Les O-GalCer.

L'activité biologique générée par les α -galactosylcéramides est due à deux mécanismes de reconnaissance cellulaire consécutifs. Le premier étant la reconnaissance de l' α -galactosylcéramide par la protéine CD1d et le second mettant en jeu la formation du complexe binaire précédemment formé avec le récepteur TCR des cellules NKT. Des données structurales par les rayons X ont permis de déterminer les différents points de contacts entre l' α -galactosylcéramide et les acides aminés présents dans le domaine CD1d dans un premier temps, et avec ceux situés sur le récepteur TCR dans un deuxième temps.¹⁸

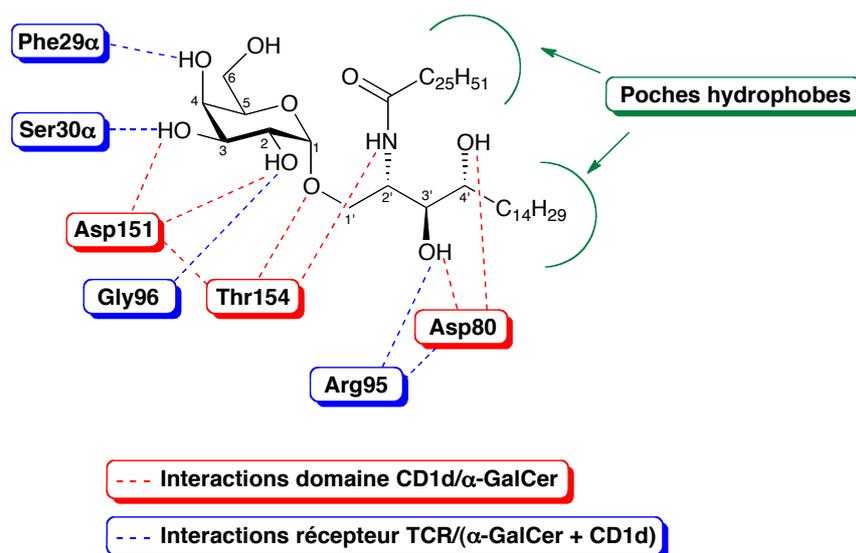


Figure 7 : Interactions domaine CD1d/ α -GalCer/TCR

La formation du complexe binaire implique une première interaction entre l'acide aminé Asp151 et les deux groupements hydroxyles sur le D-galactose en position 2 et 3. L'acide aminé Thr154 agit comme un donneur de liaison hydrogène avec l'Asp151 et comme un accepteur de liaison hydrogène avec l'amide situé sur la partie céramide. Enfin les deux fonctions alcools de la chaîne phytosphingosine (3'-OH et 4'-OH) forment des liaisons

¹⁸ (a) Koch, M.; Stronge, V. S.; Shepherd, D.; Gadola, S. D.; Mathew, B.; Ritter, G.; Fersht, A. R.; Besra, G. S.; Schmidt, R. R.; Jones, E. Y.; Cerundolo, V. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 819-826. (b) Zajonc, D. M.; Cantu III, C.; Matner, J.; Zhou, D.; Savage, P. B.; Bendelac, Y. A.; Wilson, Y. A.; Teyton, L. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 810-818.

hydrogènes avec l'Asp80. Parallèlement à ces travaux, une structure cristalline de molécules CD1d (modèle murin) a permis de donner une information structurale importante. En effet, la cavité de la molécule CD1d est divisée en deux poches comportant des chaînes latérales d'acides aminés majoritairement hydrophobes, adaptées pour accueillir des chaînes longues alkyles.¹⁹ Grâce à ces interactions, le KRN 7000 est ainsi stabilisé dans la protéine et le complexe CD1d/ α -GalCer peut interagir avec le récepteur TCR des cellules NKT. L'Arg95 du domaine CDR3 α forme une liaison hydrogène avec l'alcool situé en position 3' de la chaîne phytosphingosine ainsi qu'avec l'Asp80 du CD1d. Le Gly96 placé lui aussi sur la boucle CDR3 α interagit avec l'alcool en position 2 du sucre, ce qui montre une réelle importance de ces fonctions hydroxyles. De plus, l'acide aminé Ser30 α situé sur la boucle CDR1 α du TCR forme une liaison hydrogène avec l'alcool en position 3 du galactose alors que le groupement hydroxyle en position 4 du sucre interagit par liaisons H avec le Phe29 α situé lui aussi sur la boucle CDR1 α . Ces différents points de contacts sont complétés par de nombreuses interactions directes entre le CD1d et le TCR. Tous ces résultats montrent que les interactions entre le ligand et le domaine CD1d sont primordiales et qu'il existe des interactions clés permettant la formation du complexe ternaire avec le récepteur TCR des cellules NKT pour ainsi produire des cytokines.

Plusieurs modifications structurales ont été effectuées sur le KRN 7000 au niveau des parties saccharidique et céramide afin de moduler l'activité de ces différents analogues. Sans dresser de liste exhaustive, nous avons répertorié les principales modifications permettant de définir les caractéristiques structurales optimales pour l'activité biologique.

2.3.1.1. Modifications de la partie glycoside et du lien osidique

La synthèse du β -galactosylcéramide ainsi que celles de l' α - et β -glucosylcéramides ont été effectuées afin de déterminer dans un premier temps l'influence de la configuration du centre anomérique puis dans un deuxième temps, celle du sucre. Les résultats des tests biologiques à savoir l'activité antitumorale *in vivo* sur des cellules cancéreuses de souris et la stimulation *in vitro* de l'activité des cellules NKT du système immunitaire ont montré que

¹⁹ Zeng, Z. H.; Castano, A. R.; Segelke, B. W.; Stura, E. A.; Peterson, P. A.; Wilson, I. A. *Science* **1997**, *277*, 339-345.

l' α -galactosylcéramide est beaucoup plus actif que son analogue β et que le D-galactose donne de meilleurs résultats par rapport au D-glucose.²⁰

L'importance des fonctions hydroxyles en position 2, 3, 4 et 6 du sucre a été testée par différents groupes en supprimant ces alcools ou bien en les substituant soit par des atomes de fluor ou soit par des groupes méthoxy ou sulfate.

La substitution d'un groupement hydroxyle en position 2 du sucre par un atome d'hydrogène a été réalisée par l'équipe de Costantino en 2002.²¹ Un peu plus tard, c'est le groupe de Tamarelli qui a modifié cette partie en introduisant dans un premier temps un groupement méthoxy²² puis dans un second temps un atome de fluor par fluoration électrophile sur un galactal.²³

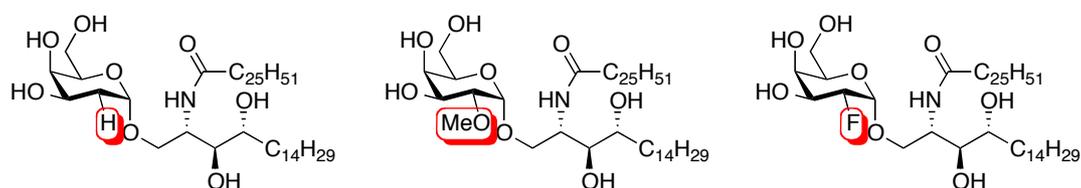


Figure 8 : Modifications en position 2 du sucre par Costantino et Tamarelli

L'évaluation biologique de ces trois composés révèle une activité quasi-inexistante par rapport aux agélasphines quant à la prolifération des cellules NKT. Ces résultats confirment que le groupement hydroxyle en position 2 du sucre est essentiel pour l'activité des α -galactosylcéramide et qu'il apparaît comme un substituant clé impliqué dans la liaison avec le récepteur TCR des cellules NKT.

Parallèlement à ces travaux, Wong et son équipe se sont intéressés à la modification de la position 3 du sucre et ont pour cela synthétisé deux nouveaux analogues de galactosylcéramide de configurations α et β comportant un groupement sulfate susceptible d'augmenter l'hydrosolubilité de la molécule.²⁴

²⁰ Kobayashi, E.; Motoki, K.; Yamagushi, Y.; Uchida, T.; Fukushima, H.; Koezuka, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 615-619.

²¹ Costantino, V.; Fattorusso, E.; Imperatore, C.; Mangoni, A. *Tetrahedron*, **2002**, 369-375.

²² Barbieri, L.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Aru, E.; Parapini, S.; Tamarelli, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 468-473.

²³ Barbieri, L.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Basilico, N.; Mondani, M.; Tamarelli, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3279-3285.

²⁴ Xing, G.-W.; Wu, D.; Poles, M. A.; Horowitz, A.; Tsuli, M.; Ho, D. D.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2907-2916.

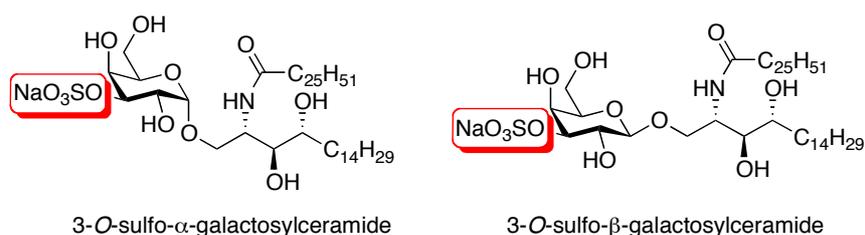


Figure 9 : Analogues d' α - et β -galactosylcéramides par Wong

Le 3-*O*-sulfo- α -galactosylcéramide mime exactement le KRN 7000 alors que son analogue β est un dérivé du sulfatide, un glycosphingolipide présent dans les membranes des cellules du système nerveux central et des reins.²⁵ Les résultats biologiques montrent que le composé de configuration α sécrète autant d'interféron- γ (IFN- γ) et d'interleukine-4 (IL-4) que le KRN 7000 ce qui laisse penser que cette modification avec un groupement sulfate n'a pas d'effet significatif sur la stimulation des cellules NKT. À l'inverse, l'analogue β ne présente aucune affinité avec ces cellules ce qui prouve que la liaison glycosidique α est primordiale pour leur activation.

Les liaisons hydrogènes entre le TCR des cellules NKT et le groupement hydroxyle en position 3 du sucre ne sont donc pas essentielles pour la production de cytokines. Suite à ces travaux, le groupe de Howell a décrit la synthèse de quatre analogues d' α -galactosylcéramide modifiés en position 3 ou 4 par un atome hydrogène ou de fluor.²⁶

²⁵ Zhu, X. H.; Hara, A.; Taketomi, T. *J. Biochem. (Tokyo)* **1991**, *110*, 241-245.

²⁶ Raju, R.; Castillo, B. F.; Richardson, S. K.; Thakur, M.; Severins, R.; Kronenberg, M.; Howell, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 4122-4125.

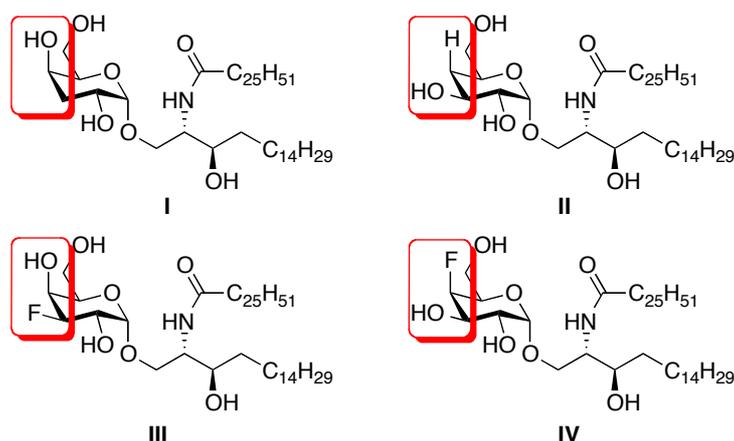


Figure 10 : Analogues déshydroxylés et fluorés d' α -galactosylcéramide de Howell

Ces molécules ont été testées sur des cellules NKT hybrides, constituées par la fusion d'un lymphocyte et d'une cellule cancéreuse, afin de connaître leur capacité à les stimuler et voir le niveau de production des interleukine-2 (IL-2) et pour finalement les comparer au KRN 7000. Les résultats montrent que les interactions par liaisons hydrogènes entre le récepteur TCR et les positions 2, 3 et 4 sur le sucre ne sont pas identiques. En effet, comme vu plus haut, la substitution d'un groupement hydroxyle en position 2 du sucre par un atome d'hydrogène ou de fluor montre une activité quasi-inexistante alors que ces mêmes substitutions en position 3 et 4 du sucre indiquent une interaction beaucoup plus forte avec le récepteur TCR. Les conséquences des modifications apportées sur les positions 3 et 4 du sucre sont plus subtiles et moins univoques que celles obtenues en modifiant la position 2. En effet, d'après les données structurales par rayon X, les groupements hydroxyles en position 2, 3 et 4 du galactose interagissent avec plusieurs acides aminés présents sur le récepteur TCR pour former des liaisons hydrogènes. La fonction alcool en position 2 établit un contact unique avec l'acide aminé Gly96 alors que les groupements hydroxyles en position 3 et 4 interagissent avec le même acide aminé Ser30 α présent sur le récepteur TCR. L'alcool en position 3 du sucre doit donc compenser partiellement l'absence de groupement hydroxyle en position 4 et *vice-versa*.

Une structure cristalline du complexe ternaire TCR/ α -GalCer/CD1d a montré que le groupement hydroxyle en 6 se positionne à l'extérieur de la cavité du récepteur TCR et du domaine CD1d. La formation de liaisons hydrogènes n'est donc pas envisageable avec ce dernier et la modulation de cette fonction semble par conséquent possible.^{14b} En 2002, le

groupe de Savage a substitué cet alcool par différents amides comportant des fluorophores dansylés et des dérivés de biotine.^{27,28}

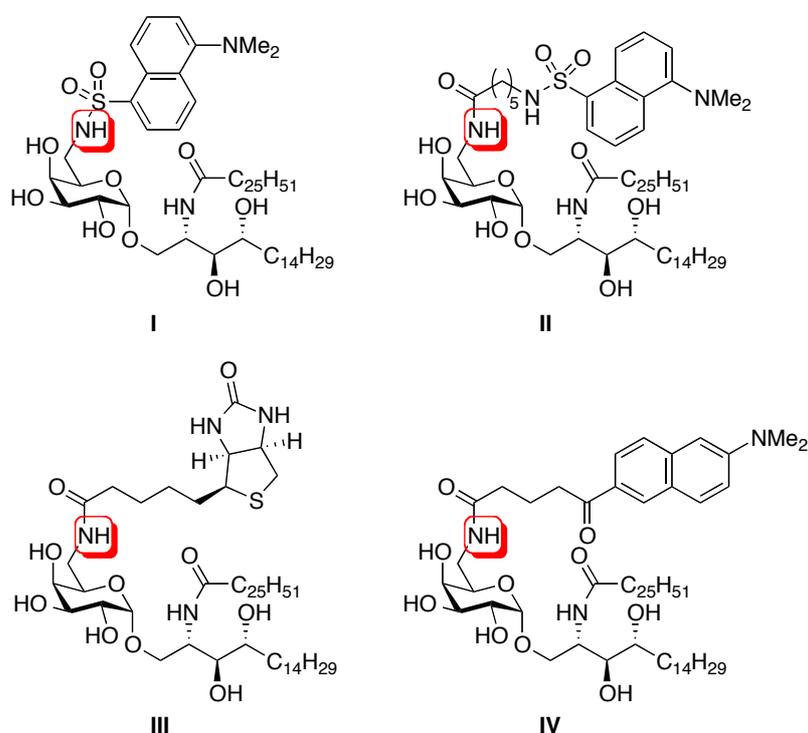


Figure 11 : Modifications de l'alcool en position 6 par Savage

Une étude biologique montre que les molécules **I**, **II** et **IV** ont une activité similaire au KRN 7000 et que seul le composé **III** est légèrement plus actif ce qui signifie que la substitution en cette position par des fluorophores permet de retenir les propriétés de stimulation des cellules NKT. Plus récemment, Van Calenbergh et son équipe ont eux aussi synthétisé plusieurs analogues d' α -galactosylcéramide comportant une fonction amide en position 6.²⁹ Les tests immunologiques ont montré que ces analogues sécrétaient majoritairement de l'IFN- γ avec des valeurs restant tout de même inférieures à celles du KRN 7000. Les dérivés de l'urée produisent quant à eux une quantité égale d'IFN- γ , voire supérieure dans certains cas, à celle induite par leur analogue hydroxylé.

²⁷ Zhou, X.-T.; Forestier, C.; Goff, R. D.; Li, C.; Teyton, L.; Bendelac, A.; Savage, P. B. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1267-1270.

²⁸ Xia, C.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Woodward, R. L.; Wang, J.; Wang, P. G. *Tetrahedron* **2009**, 6390-6395.

²⁹ Trappeniers, M.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Hillaert, U.; Linclau, B.; Elewaut, D.; Van Calenbergh, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16468-16469.

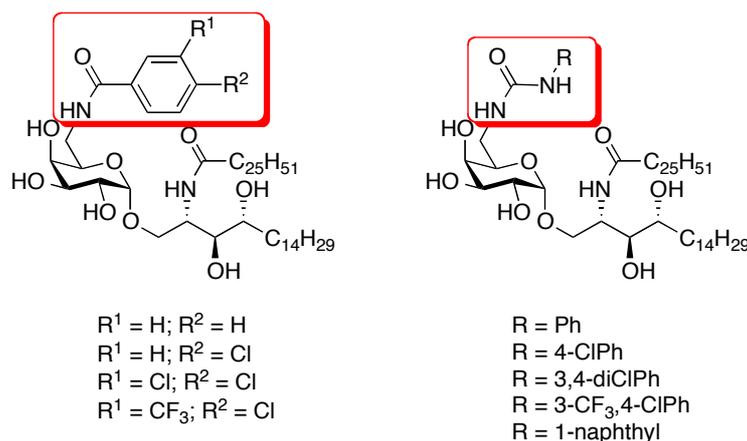


Figure 12

La même année, Mori et son équipe ont synthétisé sept analogues comportant des fonctions éthers, alkyles et fluorées et ont mesuré *in vivo* la concentration de cytokines sécrétées.³⁰ Ces nouveaux analogues induisent une production d'IFN- γ maximale au bout de 24h après injection alors que dans le cas du KRN 7000, le maximum est atteint au bout de 12h.

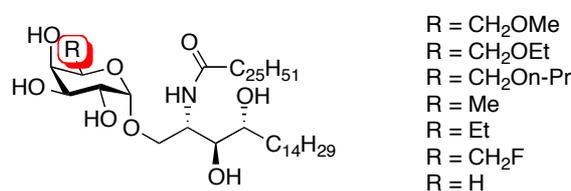


Figure 13 : Analogues de Mori

De plus, il a été montré que le dérivé méthoxyéther produisait une très grande quantité d'IL-12 qui est l'une des cytokines causant la production d'IFN- γ ce qui explique les fortes concentrations observées.

Durant cette même période, l'équipe de Mori a modifié le squelette du sucre en synthétisant des analogues carbacycliques du KRN 7000.^{31,32}

³⁰ Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Inoue, S.; Shiozaki, M.; Watarai, H.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6827-6830.

³¹ Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Hirokawa, T.; Inoue, S.; Watarai, H.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3343-3347.

³² Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Hirokawa, T.; Inoue, S.; Watarai, H.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6360-6373.

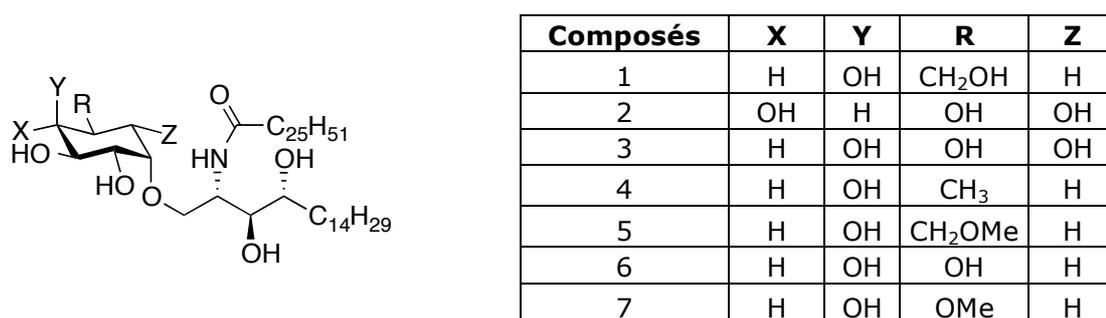


Figure 14 : analogues de carbasucre du KRN 7000 de Mori

Les évaluations biologiques de ces carbasucres indiquent que les composés **1**, **4**, **5**, **6** et **7** ont un potentiel de stimulation des lymphocytes très élevé pour produire des cytokines de type Th1 par rapport au KRN 7000 et que les molécules substituées en Z (composés **2** et **3**) ne présentent aucune activité. Il est à noter que les molécules **4** et **5** restent tout de même deux fois moins efficaces que leur analogue **1** au niveau de la production d'IFN- γ . La comparaison de modèles moléculaires des complexes CD1d de la souris avec le KRN 7000 ou avec la molécule **1** a montré que les conformations de ces deux composés au sein du complexe sont proches. Seule la présence ou l'absence d'oxygène est responsable de la différence d'activité.

Les modifications de la partie saccharidique montrent que les positions 2 et 3 du sucre ne peuvent être changées au vu des faibles résultats biologiques constatés lors de leurs transformations. En revanche, la modification de la position 6, notamment l'introduction d'amides aliphatiques, de fonctions esters ou éthers peut être envisagée car ces fonctions maintiennent une orientation ainsi que des liaisons hydrogènes similaires au KRN 7000.

2.3.1.2. Modifications de la partie céramide

Dans cette partie, nous discuterons des modifications apportées sur la chaîne phytosphingosine puis sur les chaînes lipidiques et enfin nous aborderons les transformations effectuées sur la fonction amide.

a. *Modifications de la partie phytosphingosine*

C'est en 2005 que les travaux de Howell sur la synthèse et l'évaluation d'analogues type sphinganine du KRN 7000 et de l'OCH ont démontré les premières exigences structurales concernant la partie phytosphingosine.³³

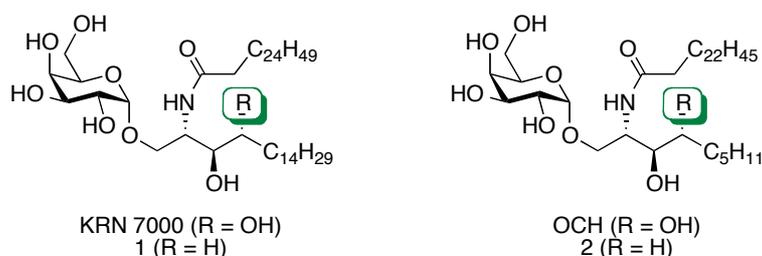


Figure 15 : Analogues du KRN 7000 et du OCH type sphinganine selon Howell

Ces analogues montrent une activité similaire à leur parent phytosphingosine. Plus récemment, Zajonc et al.^{18b} ont décrit la structure cristalline du domaine CD1d d'une souris complexé avec le KRN 7000 possédant une courte chaîne acyle. Ils ont pu déterminer que l'interaction entre la liaison hydrogène de l'Arg79 contenu dans le CD1d et le groupement hydroxyle situé en position 3 est cruciale. D'autre part, Kronenberg et son équipe³⁴ ont constaté qu'il n'y avait aucune activité lorsque les deux groupements hydroxyles en position 3' et 4' étaient supprimés. De plus, le 4'-déoxy α -GalCer montre une activité quasi similaire au KRN 7000. Au vu de ces résultats, il paraît évident que les interactions avec le 4'-OH ne sont pas primordiales et qu'elles n'influent en rien dans l'activité de ces analogues.

La configuration des deux alcools et de l'amide sur la partie céramide a également suscité beaucoup d'intérêt. Les huit stéréoisomères ont été synthétisés par le groupe de Park et évalués biologiquement.³⁵

³³ Ndonge, R. M.; Izmirian, D. P.; Dunn, M. F.; Yu, K. O. A.; Porcelli, S. A.; Khurana, A.; Kronenberg, M.; Richardson, S. K.; Howell, A. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10260-10270.

³⁴ Sidobre, S.; Hammond, K. J. L.; Bénazet-Sidobre, L.; Maltsev, S. D.; Richardson, S. K.; Ndonge, R. M.; Howell, A. R.; Sakai, T.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A.; Kronenberg, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, *101*, 12254-12259.

³⁵ Park, J. -J.; Lee, J. H.; Ghosh, S. C.; Bricard, G.; Venkataswamy, M. M.; Porcelli, S. A.; Chung, S. -K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3906-3909.

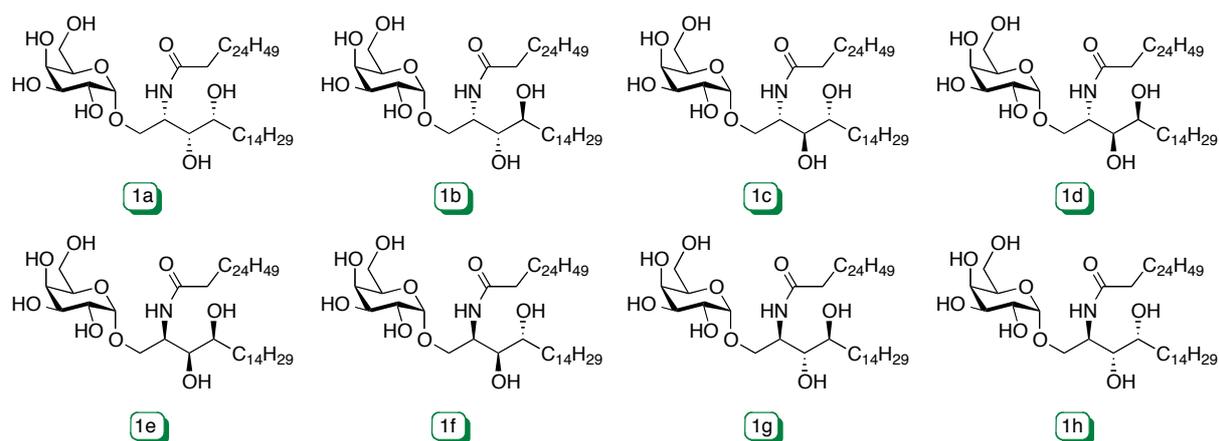


Figure 16 : Stéréomères de Park

L'activité biologique de ces isomères a été évaluée sur des cellules NKT murines et humaines par la mesure de prolifération des cellules et de production d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-13. Les stéréoisomères dérivés de la L-sérine (molécules **1a**, **1b**, **1c** et **1d**) possèdent tous une activité alors que les isomères issus de la D-sérine (molécules **1e**, **1f**, **1g** et **1h**) aucune. De plus, l'isomère **1d** et le KRN 7000 (**1c**) ont des activités comparables ce qui a été confirmé par le groupe de Van Calenbergh³⁶ lors de tests *in vitro* sur des cellules NKT de souris. Ceci démontre à nouveau le peu d'influence de la position 4' sur l'activité. Les configurations des centres stéréogènes C-2' et C-3' de la chaîne phytosphingosine apparaissent par contre cruciales pour l'activité, avec une contribution plus importante de la position 2'.

Bien que le groupement hydroxyle en position 4' de la chaîne céramide ait beaucoup moins d'importance sur l'activité que celui en position 3', Linclau et son équipe ont synthétisé l'analogue 4'-déoxy-4',4'-difluoro du KRN 7000.³⁷ Les résultats biologiques montrent une production similaire d'IFN- γ ainsi qu'une réduction prononcée de sécrétion d'IL-4 par rapport au KRN 7000. La présence d'un groupement difluoré en cette position améliore certainement la capacité de former des liaisons hydrogènes entre le OH en 3' et l'Asp80 du domaine CD1d tout en réduisant significativement sa capacité à accepter des liaisons hydrogènes de l'Arg95 situé sur le récepteur TCR. Il est certes spéculatif d'imaginer que la liaison au TCR est plus importante pour une réponse Th1 (IFN- γ) que pour une réponse Th2 (IL-4) mais la question se pose néanmoins au vu de ces résultats.

³⁶ Trappeniens, M.; Goormans, S.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Linclau, B.; Al-Shamkhani, A.; Elliot, T.; Ottensmeier, C.; Werner, J. M.; Elewaut, D.; Van Calenbergh, S. *ChemMedChem*. **2008**, *3*, 1061-1070.

³⁷ Leung, L.; Tomassi, C.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Elewaut, D.; Elliott, T.; Al-Shamkhani, A.; Ottensmeier, C.; Van Calenbergh, S.; Werner, J.; Williams, T.; Linclau, B. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4433-4436.

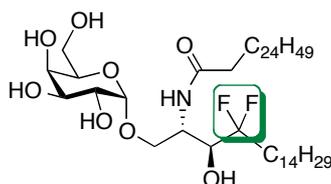


Figure 17 : Analogue 4'-déoxy-4',4'-difluoro-KRN 7000 de Linclau

Van Calenbergh et son équipe ont récemment étudié la modification de certains éléments directement impliqués dans la reconnaissance avec le récepteur TCR, en remplaçant les groupements hydroxyyles en position 3' ou 4' par une fonction amine.³⁸

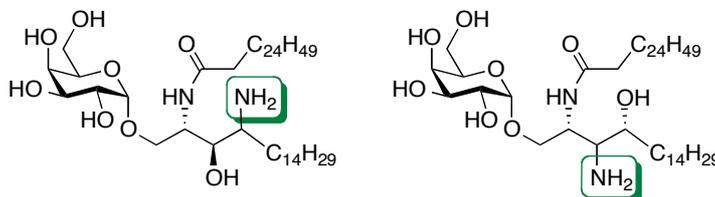


Figure 18 : Analogues d' α -amino-GalCer modifiés de Van Calenbergh

Quelle que soit la configuration de ce centre, la substitution de l'alcool en position 3' de la chaîne céramide par une amine conduit à une très faible production de cytokines comparé au KRN 7000. En ce qui concerne les deux analogues possédant une fonction amine en position 4', l'activité est modérée et très en dessous de celle du KRN 7000, ce qui est surprenant au vu du peu d'influence que cette position a montré jusqu'à présent.

b. Modifications des chaînes lipidiques

Nous avons vu précédemment que l'analogue OCH possède une chaîne courte sur la partie phytosphingosine et qu'il induit préférentiellement une réponse de type Th2 (maladies autoimmunes).¹⁷ En 2004, Savage et son équipe ont également observé que raccourcir aussi bien l'acide gras que la partie phytosphingosine conduisait à une réponse de type Th2 sur des

³⁸ Trappeniers, M.; Chofor, R.; Aspeslagh, S.; Li, Y.; Linclau, B.; Zajonc, D. M.; Elewaut, D.; Van Calenbergh, S. *Org. Lett.* **2010**, *13*, 2928-2931.

cellules murines ou humaines.³⁹ D'après Oki,⁴⁰ ces résultats seraient dus à une plus faible stabilité du complexe α -GalCer/CD1d vis-à-vis du récepteur des cellules NKT. Les IFN- γ semblent requérir une plus longue stimulation que ne le demandent les IL-4.

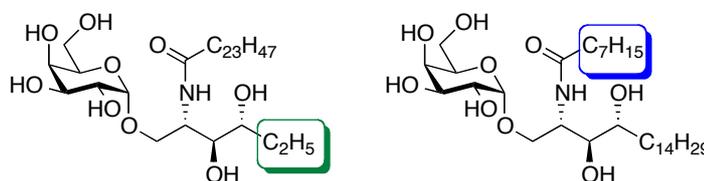


Figure 19 : Diminution de l'acide gras et de la partie phytosphingosine

Ces résultats prouvent qu'il y a une corrélation entre la longueur des chaînes lipidiques et la libération d'une certaine catégorie de cytokines. Afin de connaître l'effet des variations de ces chaînes lipidiques sur la libération des cytokines, l'équipe de Porcelli a synthétisé des analogues d' α -GalCer comportant sur la chaîne grasse une ou plusieurs insaturations de configuration E ou Z.⁴¹

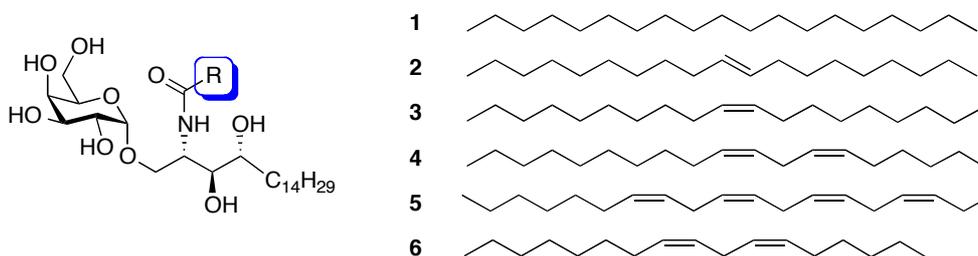


Figure 20 : Analogues insaturés de Porcelli

Ces analogues insaturés ont montré une faculté à produire majoritairement des IL-4 (réponse de type Th2) similaire voire supérieure au KRN 7000. Ce résultat peut s'expliquer par la conformation de la chaîne de l'acide gras, en présence de doubles liaisons, dans les cavités du domaine CD1d. C'est en 2009 qu'Howell a repris ces travaux en incorporant toujours sur la chaîne grasse deux insaturations en C10 et C12.⁴²

³⁹ Goff R. D.; Gao, Y.; Mattner, J.; Yin, N.; Cantu, (III) C.; Teyton, L.; Bendelac, A.; Savage, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13602-13603.

⁴⁰ Oki, S.; Chiba, A.; Yamamura, T.; Miyake, S. *J. Clin. Invest.* **2004**, *11*, 1631-1640.

⁴¹ Yu, K. O. A.; Im, J. S.; Molano, A.; Dutronc, Y.; Illarionov, P. A.; Forestier, C.; Fujiwara, N.; Arias, I.; Miyake, S.; Yamamura, T.; Chang, Y. -T.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 3383-3388.

⁴² Velmourougane, G.; Raju, R.; Bricard, G.; Im, J. S.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A.; Howell, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3386-3388.

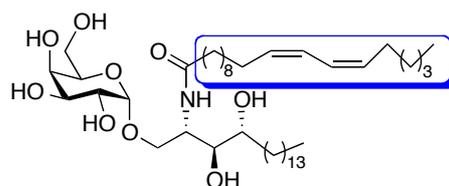
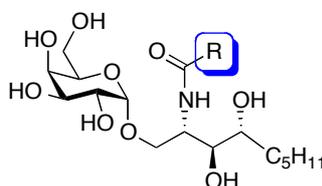


Figure 21

Les résultats biologiques ont montré une réponse immunitaire de type Th2, sur les cellules NKT de souris, identique aux analogues synthétisés par Porcelli. Cependant, les tests effectués sur les cellules NKT d'humains se sont avérés peu encourageants à cause d'une faible stimulation cellulaire.

Le raccourcissement de la chaîne phytosphingosine ne semble pas être nécessaire et n'est pas suffisant pour observer une réponse de type Th2. En effet, l'équipe d'Annoura a démontré que la production d'IL-4 (réponse de type Th2) augmentait considérablement lorsque la chaîne dérivée d'acide gras était courte c'est-à-dire lorsqu'elle était constituée de 18 à 24 carbones contrairement aux chaînes plus longues (de 25 à 27 carbones) qui engendrent une réponse de type Th1 favorisant la sécrétion d'IFN- γ .⁴³



R = C₁₉H₃₉, C₂₀H₄₁, C₂₁H₄₃, C₂₂H₄₅, C₂₃H₄₇, C₂₄H₄₉ Réponse de type Th2

R = C₂₅H₅₁, C₂₆H₅₃, C₂₇H₅₅ Réponse de type Th1

Figure 22

De plus, l'insertion d'un cyclopentyle ou d'un groupement phényle sur la chaîne phytosphingosine n'a dévoilé aucune amélioration de l'activité. Récemment, Wong et son équipe ont étudié l'ajout de groupements aromatiques à l'extrémité de chaîne.^{44,45} L'addition de chaînes courtes, 2 et 4 carbones, sur la partie acide gras révèle une production significative

⁴³ Toba, T.; Murata, K.; Nakanishi, K.; Takahashi, B.; Takemoto, N.; Akabane, M.; Nakatsuka, T.; Imajo, S.; Yamamura, T.; Miyake, S.; Annoura, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2781-2784.

⁴⁴ Fujio, M.; Wu, D.; Garcia-Navarro, R.; Ho, D. D.; Tsuji, M.; Wong, C. -H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9022-9023.

⁴⁵ Chang, Y. -J.; Huang, J. -R.; Tsai, Y. -C.; Hung, J. -T.; Wu, D.; Fujio, M.; Wong, C. H.; Yu, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 10299-10304.

d'IFN- γ (réponse de type Th1) alors que l'ajout de 3 carbones en cette même position montre une activité réduite comparée au KRN 7000. La stabilisation de ce complexe binaire doit s'effectuer grâce au π -stacking entre le groupement aromatique en fin de chaîne et les acides aminés (Phe18 et Phe77), cependant celle-ci doit être moins efficace lorsque les chaînes phytosphingosines et acide gras sont constituées respectivement de 21 et 3 atomes de carbone.

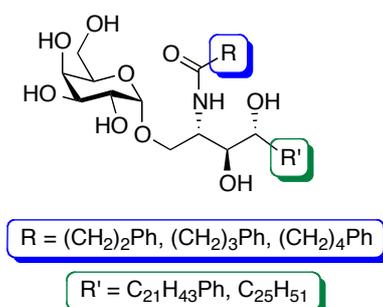


Figure 23

Par ailleurs, lorsque la chaîne lipidique est constituée de 25 atomes de carbone avec un groupement aromatique, l'activité est identique au KRN 7000.⁴⁶ Suite à ces travaux, Chung et son équipe ont synthétisé une série d'analogues possédant un groupement aromatique terminal sur la partie céramide qui, aussi surprenant que cela puisse paraître, ne montrait aucune activité.

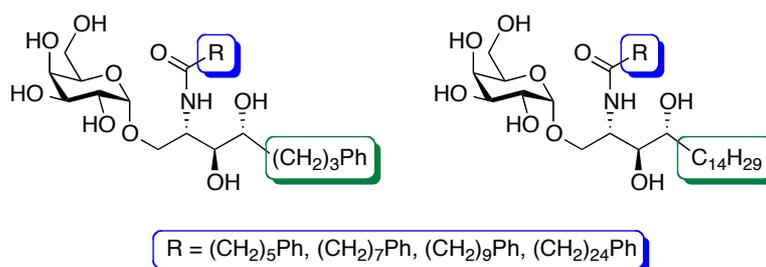


Figure 24

⁴⁶ Park, J. -J.; Lee, J. H.; Seo, K. -C.; Bricard, G.; Venkataswamy, M. M.; Porcelli, S. A.; Chung, S. -K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 814-818.

c. *Modifications et substitutions de la fonction amide*

Le remplacement isostérique de la fonction amide paraît intéressant en vue d'obtenir des informations sur les interactions de cette fonction avec les sites de liaisons et tenter d'améliorer l'activité. Ces modifications ont cependant été peu étudiées et n'ont pas conduit à des résultats immunologiques très significatifs. En 2006, Kim et son équipe ont préparé une série d'analogues d' α -GalCer dans laquelle la fonction amide est substituée par un motif triazole.⁴⁷

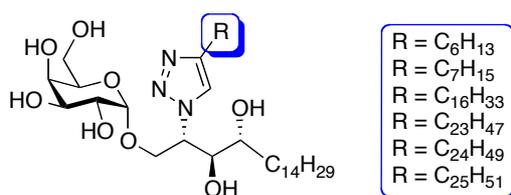


Figure 25

Parmi les isostères connus du groupement amide, les 1,2,3-triazoles sont devenus très populaires en chimie médicinale, notamment depuis l'introduction du concept de « click chemistry » par Sharpless. L'utilisation de cette fonction avec les α -GalCers se traduit par une production accrue de cytokines IL-4 au détriment des IFN- γ . Les analogues porteurs d'une longue chaîne aliphatique ont même un effet de stimulation comparable à celui de l' α -GalCer mais orientée en faveur d'une réponse de type Th2.

En 2008, le groupe de Mori s'est intéressé à la substitution de la fonction amide par une azétidine et une pyrrolidine.⁴⁸

⁴⁷ Lee, T.; Cho, M.; Ko, S. -Y.; Youn, H. -J.; Baek, D. J.; Cho, W. -J.; Kang, C. -H.; Kim, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 585-589.

⁴⁸ Fuhshuku, K. -I.; Hongo, N.; Tashiro, T.; Masuda, Y.; Nakagawa, R.; Seino, K. -I.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 950-964.

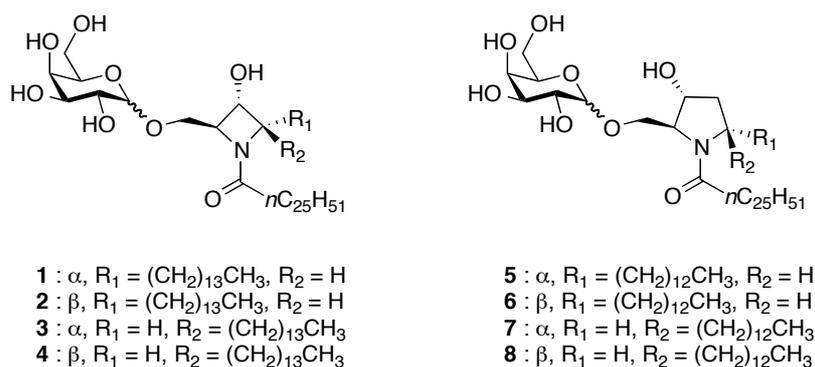


Figure 26 : Exemples d'analogues d'azétidine et de pyrrolidines de Mori

Les résultats biologiques ont montré, pour ces huit analogues, une activité plus faible vis-à-vis du KRN 7000. Parmi ces dérivés synthétisés, l'azétidine **1**, dont les groupements en position 2 et 4 de l'azétidine sont en *trans*, induit une sécrétion de cytokines par des cellules NKT murines et ce, à de faibles concentrations. La formation de cytokines dépend donc de la concentration et l'activité indique une réponse de type Th2, même à faibles concentrations, ce qui en fait un bon candidat.

Plus récemment, le groupe de Linclau⁴⁹ a introduit en α de la fonction amide un groupement difluoré qui serait susceptible d'augmenter l'acidité du proton porté par l'amide⁵⁰ et par conséquent renforcerait les liaisons hydrogènes. Ceci pourrait impliquer une stabilisation du complexe GalCer/CD1d et donc induire préférentiellement une réponse de type Th1.

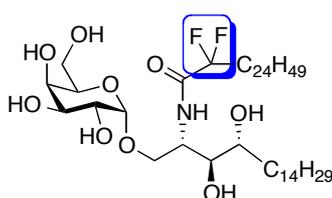


Figure 27 : Analogues difluorés de Linclau

Cependant, les résultats biologiques montrent un niveau similaire d'IL-4 et une baisse significative d'IFN- γ entre le KRN 7000 et cet analogue difluoré ce qui laisse penser que la

⁴⁹ Leung, L.; Tomassi, C.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Trappeniers, M.; Elewaut, D.; Gao, Y.; Elliott, T.; Al-Shamkhani, A.; Ottensmeier, C.; Werner, J. M.; Williams A.; Van Calenbergh, S.; Linclau, B. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 329-334.

⁵⁰ (a) Bordwell, F. G. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 456-463. (b) Taft, R. W.; Bordwell, F. G. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 463-469.

liaison hydrogène entre le N-H et le Thr154 ne joue pas un rôle majeur dans la stabilisation du complexe binaire.

En 2010, Shiozaki et son groupe ont remplacé la fonction amide de l' α -GalCer par des groupements esters et éthers. Leurs précédents travaux portaient sur le remplacement de diamides par des diesters et avaient abouti à des résultats très prometteurs en terme d'activité.⁵¹

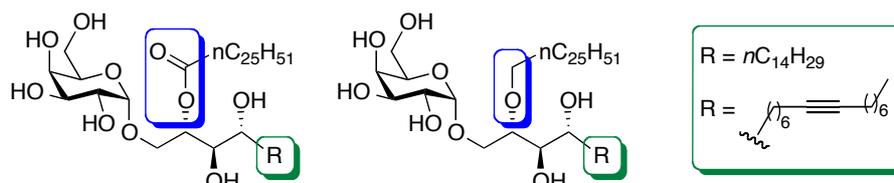


Figure 28 : Analogues synthétisés par le groupe de Shiozaki

Ce changement est cependant beaucoup moins fructueux dans le cas des α -GalCer. Une production d'IFN- γ très faible et une production d'IL-4 inférieure au KRN 7000 ont en effet été observées. Par ailleurs, aucune activité n'a été détectée pour les dérivés éthers, l'absence de carbonyle modifiant certainement la géométrie et l'orientation de la molécule à l'intérieur de la protéine CD1d.

Les diverses modifications apportées au KRN 7000 nous ont fourni beaucoup de renseignements sur les caractéristiques structurales permettant d'obtenir un résultat optimal. Les longueurs des chaînes lipidiques ou la substitution en position 6 du galactose sont notamment des pistes pour améliorer ou rendre plus sélective la réponse immunitaire. Une autre modification évidente est de changer le lien osidique dans le but de limiter la dégradation *in vivo* du sucre par les glycosidases.

⁵¹ Shiozaki, M.; Tashiro, T.; Koshino, H.; Nakagawa, R.; Inoue, S.; Shigeura, T.; Watarai, H.; Taniguchi, M.; Mori, K. *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 1663-1684.

2.3.2. Les CH₂-GalCer

La première synthèse totale de l' α -C-galactosylcéramide a été reportée en 2002 par le groupe de Tomoyama de la société pharmaceutique Kirin.⁵² Ce brevet comporte la synthèse et l'évaluation biologique de onze dérivés glycosidiques.

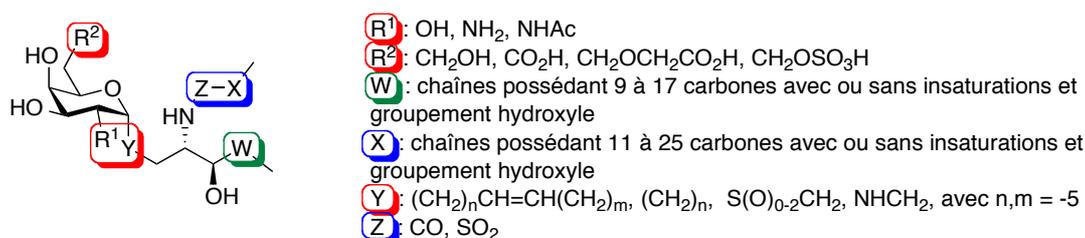


Figure 29 : Structures de dérivés glycosidiques de Tomoyama

Cette synthèse d'analogues α -C-GalCer a pour étape clé une réaction de Wittig entre l' α -D-galactose et la partie céramide totalement fonctionnalisée. Elle présente cependant quelques défauts, comme le nombre d'étapes (18 au total), un rendement global très faible ainsi que des résultats peu reproductibles.

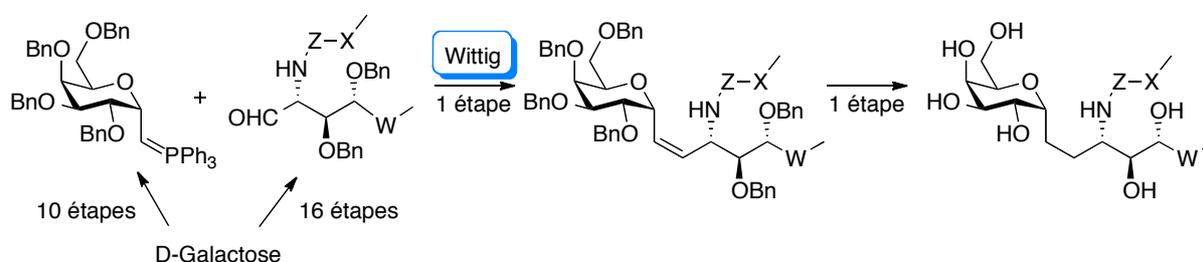
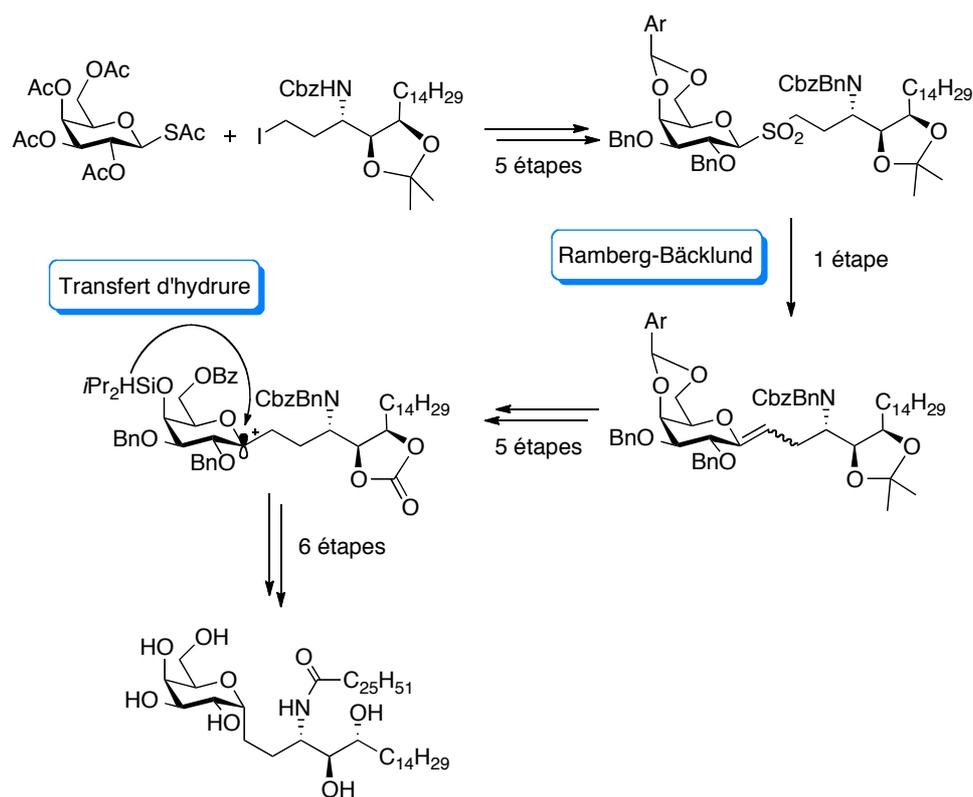


Schéma 4 : Synthèse générale des analogues d' α -C-GalCer de Tomoyama

Peu de temps après, l'équipe de Franck a publié une synthèse originale de l'analogue carboné du KRN 7000.⁵³ Le lien glycosidique a été formé par une réaction de Ramberg-Backlung suivi d'un transfert intramoléculaire d'hydrure pour donner accès à de nouveaux analogues d' α -C-GalCer.

⁵² Tomiyama, H.; Yanagisawa, T.; Nimura, M.; Noda, A.; Tomiyama, T. JP 2001/354666, 2002; Chem. Abst. 2002, 136, 37901x; US Patent Appl. 2002/0032158 A1, 14 Mars, 2002.

⁵³ Yang, G.; Schmieg, J.; Tsuji, M.; Franck, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3818-3822.

Schéma 5 : Synthèse de l'analogue α -C-GalCer de Franck

On peut noter tout de même quelques inconvénients majeurs dans cette stratégie comme le nombre d'étapes de synthèse qui s'élève à 26 et qui par conséquent aboutit à un rendement global faible. Cependant les résultats biologiques ont révélé des propriétés immunostimulantes remarquables. Cet analogue a en effet une activité 1000 fois plus puissante sur un modèle murin de malaria et 100 fois plus puissante vis-à-vis de certaines tumeurs murines que le KRN 7000 O-glycosidique.^{54,55}

La même année, Franck et son équipe ont publié une autre voie de synthèse avec pour étape clé une réaction de métathèse croisée.⁵⁶

⁵⁴ (a) Franck, R. W.; Tsuji, M. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 692-701. (b) Chen, G.; Chien, M.; Tsuji, M.; Franck, R. W. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1017-1022.

⁵⁵ Schmieg, J.; Yang, G.; Franck, R. W.; Tsuji, M. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1631-1641.

⁵⁶ Chen, G.; Schmieg, J.; Tsuji, M.; Franck, R. W. *Org. Lett.* **2004**, *22*, 4077-4080.

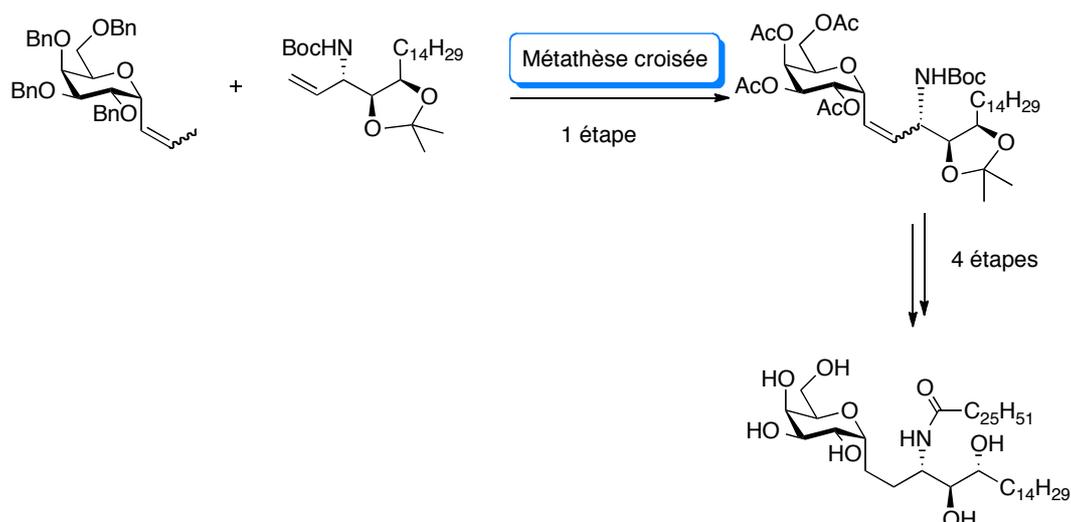


Schéma 6 : Synthèse d'α-C-GalCer par réaction de métathèse de Franck

Cette nouvelle synthèse d'α-C-galactosylcéramide est à la fois efficace et courte, un rendement global de 30% ayant été obtenu en seulement 11 étapes de synthèse. Comparée à la synthèse précédente, celle-ci peut être réalisée sur plus grande échelle afin d'effectuer des tests biologiques plus poussés.

En 2005, l'équipe d'Annoura a développé la synthèse de dérivés de C-GalCer en 12 étapes mettant en jeu un couplage entre un alcynure porté par le galactose et un aldéhyde fonctionnalisé.⁵⁷

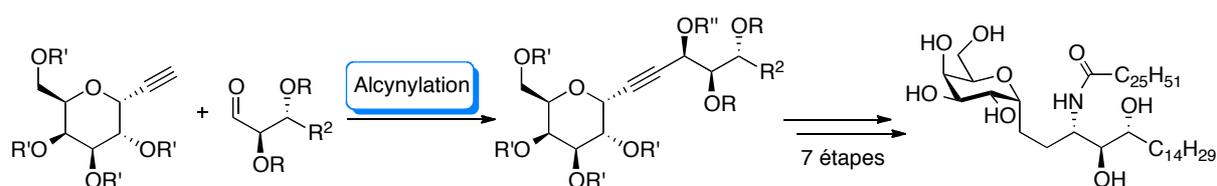


Schéma 7 : Synthèse d'α-C-GalCer par réaction d'alcynylation d'Annoura

Bien que cette stratégie soit efficace, la stéréosélectivité de la réaction de couplage reste insuffisante. En effet, deux diastéréomères sont formés et séparés sur colonne de silice, le majoritaire portant la configuration désirée est obtenu avec 47% de rendement et le minoritaire avec tout de même 30% de rendement.

⁵⁷ Toba, T.; Murata, K.; Yamamura, T.; Miyake, S.; Annoura, H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5043-5047.

Un an plus tard, Wipf et Pierce ont publié une synthèse linéaire de cet analogue mettant en jeu l'addition d'un vinylaluminium sur une sulfonimine portée par le dérivé galactose. Une époxidation suivie d'une séquence d'ouverture de ce cycle permet d'installer le diol et conduit au produit désiré en seulement 10 étapes.⁵⁸

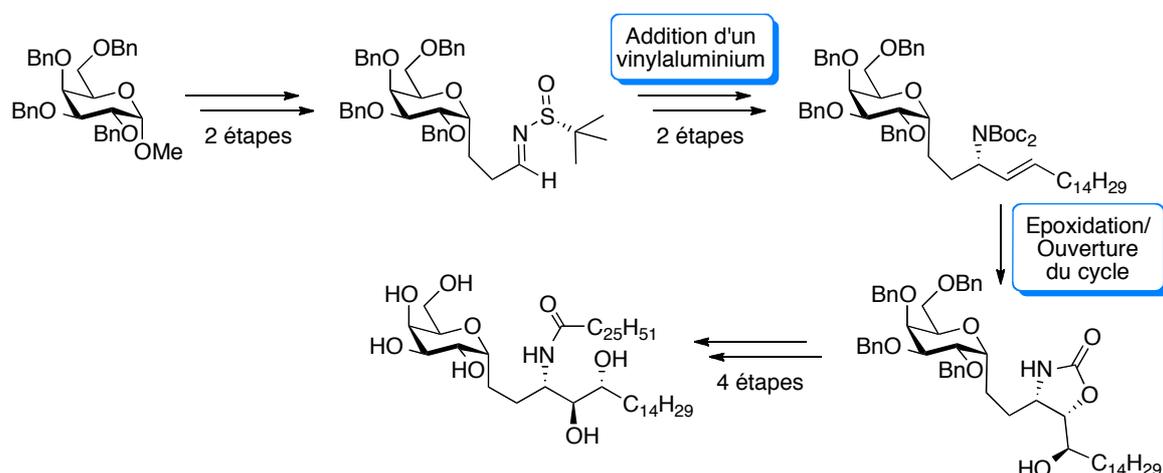


Schéma 8 : Synthèse d'α-C-GalCer de Wipf et Pierce

L'efficacité de cette synthèse permet d'obtenir un rendement global d'environ 20% malgré une étape d'époxydation modérément diastéréosélective.

C'est en 2010 que l'équipe de Bittman a développé une nouvelle stratégie de synthèse basée sur un couplage de type Sonogashira entre la partie saccharidique et la partie phytosphingosine.⁵⁹ Une époxidation asymétrique de Sharpless suivie d'une réaction d'ouverture intramoléculaire de l'époxyde permet d'installer le motif aminodiol. La molécule souhaitée est alors obtenue en 10 étapes et avec un rendement de plus de 6%.

⁵⁸ Wipf, P.; Pierce, J. G. *Org. Lett.* **2006**, *15*, 3375-3378.

⁵⁹ Liu, Z.; Byun, H. -S.; Bittman, R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2974-2977.

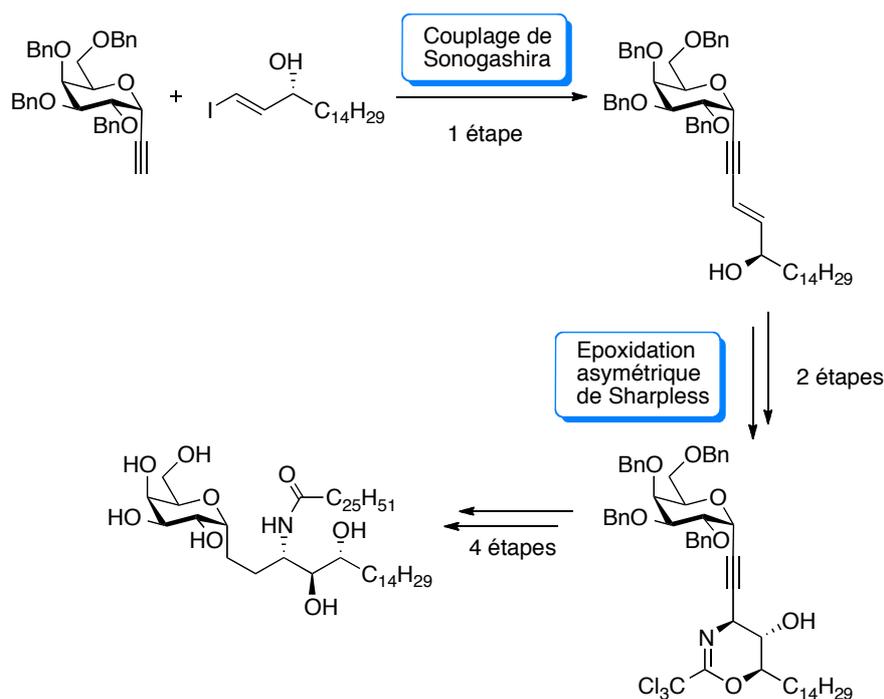


Schéma 9 : Synthèse d'α-C-GalCer de Bittman

L'analogue α-C-galactosylcéramide a donc montré une très forte activité anti-tumorale. Une autre façon de stabiliser les glycoconjugués est d'utiliser un lien soufré et plusieurs équipes se sont alors intéressées à la synthèse d'analogues thioglycosidiques du KRN 7000.

2.3.3. Les S-GalCer

Les thioglycosides, dans lesquels l'atome d'oxygène est remplacé par un atome de soufre, sont tolérés dans la plupart des systèmes biologiques. De plus, ce remplacement induit une augmentation de la stabilité du lien sucre-aglycone envers les dégradations enzymatiques et chimiques. Au vu des excellents résultats biologiques obtenus avec l'analogue α-CH₂-GalCer, on pourrait donc s'attendre à des résultats similaires avec l'analogue thioglycosidique. La première synthèse totale de l'analogue thioglycoside du KRN 7000 a été réalisée par l'équipe de Zhu en 2008.⁶⁰ Le couplage entre le thioglycoside et la chaîne phytosphingosine conduit à l'analogue désiré en 14 étapes avec un rendement global de 3%.

⁶⁰ Dere, R. T.; Zhu, X. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4641-4644.

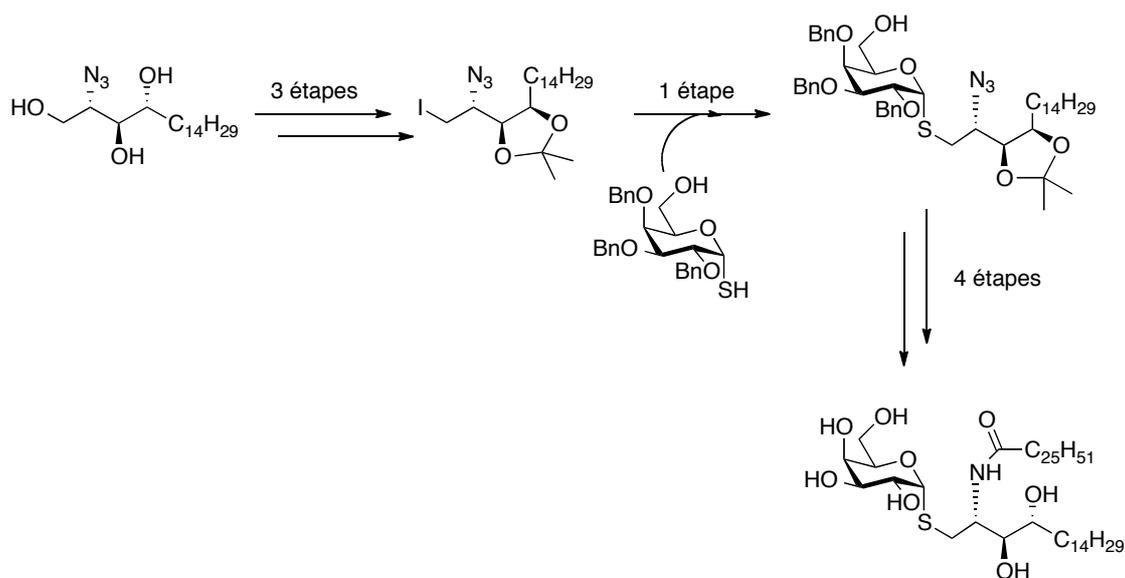


Schéma 10 : Synthèse de l'analogue α -S-GalCer de Zhu

La même année, Howell et son équipe ont décrit la synthèse de ce même analogue impliquant une substitution entre un thiosucre et un dérivé bromé de la chaîne phytosphingosine en 9 étapes avec 2% de rendement global.⁶¹

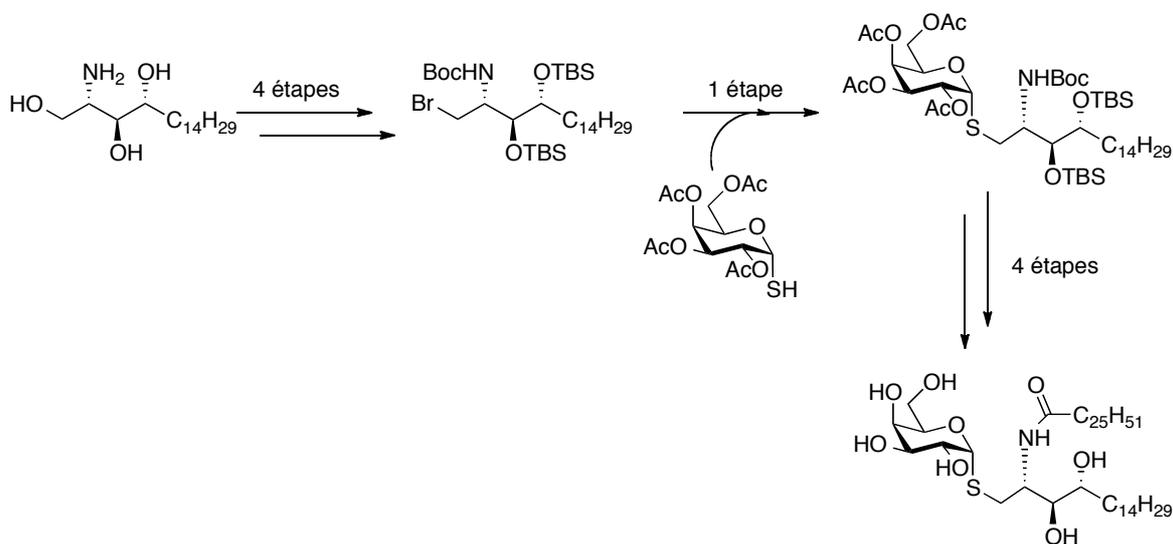


Schéma 11 : Synthèse de l'analogue α -S-GalCer de Howell

De façon surprenante, les tests biologiques *in vivo* et *in vitro* ont montré une absence totale d'activation des cellules NKT. La liaison C-S (182 pm) étant considérablement plus

⁶¹ Blauvelt, M. L.; Khalili, M.; Jaung, W.; Paulsen, J.; Anderson, A. C.; Wilson, S. B.; Howell, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6374-6376.

longue que la liaison C-O (143 pm), les deux liaisons C-S éloignent certainement beaucoup trop les parties saccharidiques et céramides, ce qui nuit à la formation d'un complexe CD1d/GalCer/TCR stable.

3. Le fluor et son utilisation en chimie médicinale

Depuis la découverte du fluor élémentaire par Henri Moissan en 1886,⁶² les composés organofluorés sont passés du stade de curiosités de laboratoire à une présence accrue dans de nombreux domaines tels que les matériaux, les polymères ou encore l'agrochimie mais également dans le domaine de la chimie médicinale. Ces dernières années, le nombre de publications se rapportant aux molécules organiques fluorées a également considérablement augmenté, notamment dans le domaine de la chimie médicinale.⁶³ Les propriétés de l'atome de fluor permettent de moduler l'activité des molécules à visée thérapeutique aussi bien d'un point de vue pharmacodynamique (reconnaissance et interactions avec la cible biologique) que d'un point de vue pharmacocinétique (absorption, biodistribution, stabilité métabolique...)⁶⁴ Afin de mieux comprendre l'intérêt de la fluoration de composés biologiques, la présentation des propriétés physicochimiques de cet élément est nécessaire.⁶⁵ Nous montrerons donc les propriétés de l'élément fluor et de la liaison C-F,⁶⁶ puis nous aborderons l'effet du fluor sur la réactivité des molécules organiques et nous verrons les conséquences de ces propriétés sur l'activité des molécules à visée thérapeutique. Nous discuterons ensuite de l'essor des molécules fluorées dans le domaine industriel et enfin, nous justifierions l'utilisation d'un groupement difluorométhyle comme mime de l'oxygène.

3.1. Propriétés de l'élément fluor et de la liaison C-F

L'atome de fluor se caractérise par l'électronégativité la plus élevée de tous les éléments ($\chi = 4$ selon Pauling). Son noyau électronique est composé de neuf protons et le nuage électronique est de structure $1s^2 2s^2 2p^5$. Le fluor possède un faible rayon de Van der

⁶² Moissan, H. *R. Acad. Sciences* **1886**, *102*, 1543.

⁶³ Shimizu M.; Hiyama T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 214-231.

⁶⁴ Ojima, I.; McCarthy, J.T. *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*, ACS Symposium Series 639, **1996**, 2.

⁶⁵ (a) O'hagan, D. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308-319. (b) Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. in *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, John Wiley & sons, Inc., Hoboken, **2008**, pp 72 et pp 279.

⁶⁶ Numéro complet du *ChemBioChem* **2004**, *5*, 557.

Waals, de taille intermédiaire entre l'hydrogène et l'oxygène. Ainsi, l'atome de fluor pourra être incorporé au sein d'une molécule organique en substituant un de ces atomes sans modification notable de la taille globale de la molécule. L'énergie d'ionisation est extrêmement élevée (énergie nécessaire pour arracher un électron, $I = -401.2 \text{ kcal mol}^{-1}$) et l'affinité électronique, au contraire, est très grande (absorption d'un électron fortement exothermique : $E_{ea} = +79.5 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Les propriétés de la liaison C-F résultent de ces caractéristiques. Du fait de la forte attraction qu'il exerce, la densité électronique est largement localisée sur l'atome de fluor, polarisant à l'extrême la liaison. Celle-ci possède alors un caractère ionique très marqué et pourrait être décrite comme une forte attraction électrostatique entre un $F^{\delta-}$ et un $C^{\delta+}$ plutôt que comme une liaison covalente. Ceci se traduit par une liaison courte (en moyenne 1.35 \AA) et de très haute énergie (en moyenne $105.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, la plus forte liaison de la chimie organique). Une conséquence plus inattendue est le renforcement de cette liaison lorsque le degré de fluoruration du carbone augmente (de 1.39 à 1.33 \AA et de 107 à $116 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en passant de CH_3F à CF_4). Ceci provient d'un accroissement de la charge partielle positive sur l'atome de carbone et donc un accroissement de l'attraction électrostatique avec les atomes de fluor qui lui sont liés.

X	H	C	O	F	Cl
Electronégativité (Pauling)	2.1	2.5	3.5	4.0	3.0
Rayon de Van der Waals (\AA)	1.2	1.7	1.52	1.47	1.74
Potentiel d'ionisation (kcal.mol^{-1})	313.6	240.5	314.0	401.2	299.0
Affinité électronique (kcal.mol^{-1})	17.7	29.0	33.8	79.5	83.3
Polarisabilité électronique (\AA^3)	0.667	1.76	0.82	0.557	2.18
Longueur C-X (\AA)	1.0	1.54	1.43	1.35	1.77
Energies de dissociations C-X (kcal.mol^{-1})	98.8	83.1	84.0	105.4	78.5

Tableau 1 : Quelques données relatives

3.2. Effet du fluor sur la réactivité des molécules organiques

La réactivité des molécules fluorées est alors fortement influencée par ces différentes caractéristiques. Ainsi, un composé fluoré, substitué par un ou plusieurs fluors, est un fort mauvais substrat pour les réactions de substitutions nucléophiles type S_N1 ou S_N2 et ce malgré la forte polarisation de la liaison C-F. Les réactions d'élimination type $E1_{CB}$ sont au contraire plutôt favorisées. La contradiction n'est qu'apparente : une charge partielle β de l'atome de fluor est fortement stabilisée par l'effet électroattracteur du fluor et la neutralisation des charges partielles des atomes de carbone par le biais d'une élimination irréversible d'un ion fluorure est assez favorable.

Si un atome de fluor augmente l'acidité des protons en β , il n'en va pas de même pour les protons en α . L'effet électroattracteur qui pourrait favoriser la naissance d'une charge partielle négative en cette position est en effet fortement compensé par la répulsion avec les doublets non liants du fluor que cette charge engendrerait (c'est d'ailleurs cette répulsion qui aboutit à la pyramidalisation de l'anion dérivé du fluoroforane). La présence de paires libres suggère la possibilité d'un effet π -donneur marqué du fluor qui permettrait de stabiliser les charges partielles positives en α . Si cette stabilisation existe, son amplitude est modeste comme l'atteste la très légère activation du fluorobenzène vis-à-vis des réactions de substitution électrophile.⁶⁷ Les charges partielles positives en β seront donc très déstabilisées par les effets électroattracteurs du fluor. La réactivité ainsi que les propriétés de la molécule seront gouvernées par les interactions électrostatiques, les effets électroattracteurs, π -donneurs, σ^* -accepteurs ou les interactions dipôle-dipôle engendrés par les atomes de fluor. C'est cette diversité qui donne aux composés fluorés cette réactivité et ces comportements parfois contradictoires. Les interactions électrostatiques et dipôle-dipôle sont à l'origine d'autres propriétés des molécules fluorées qui ne seront pas présentées ici en raison du faible éclairage qu'elles apporteraient sur la problématique qui nous intéresse.

⁶⁷ L'étude de la réaction de nitration du toluène, du fluorobenzène et du chlorobenzène a en effet montré que la formation de l'intermédiaire de Wheland est 5 fois plus rapide dans le cas du fluorobenzène que du chlorobenzène mais 163 fois moins rapide que dans le cas du toluène. Un groupement méthyle reste donc bien plus activant qu'un fluor : Rosenthal, J.; Schuster, D.I. *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 679-690.

3.3. Utilisation de groupements fluorés pour moduler les propriétés de molécules bioactives

L'introduction d'un ou de plusieurs atomes de fluor peut avoir des effets assez divers sur les molécules. L'atome de fluor peut induire, sur les molécules biologiques qui l'incorporent, des modifications au niveau des propriétés physiques, chimiques, biologiques conduisant dans certains cas à améliorer leur profil thérapeutique.⁶⁸

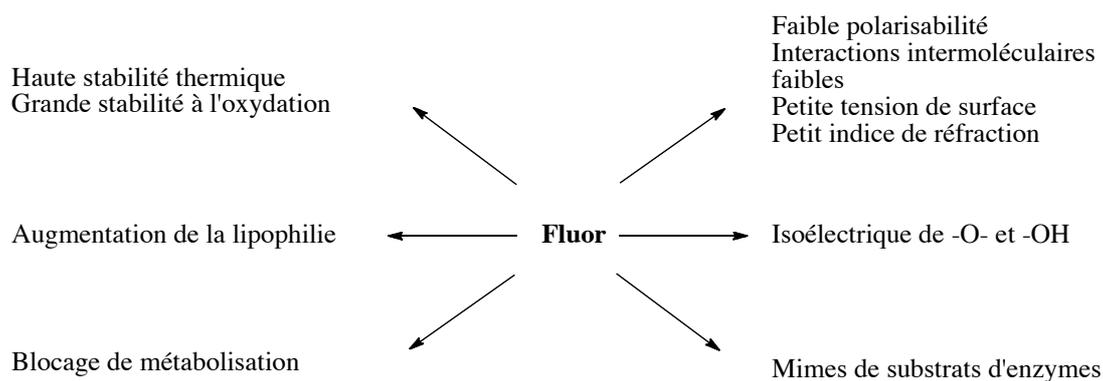


Figure 30

Nous avons référencé les principaux domaines dans lesquels ces modifications s'opèrent.

- *Augmentation de la lipophilie :*

La notion de lipophilie est importante car elle contrôle certains paramètres comme l'amélioration de la pénétration cellulaire (le cheminement dans l'organisme des principes actifs). En ce qui concerne les molécules aromatiques, la substitution d'un groupement par un atome de fluor ou de groupements fluorocarbonés permet généralement d'augmenter la lipophilie de la molécule et ainsi un meilleur transport du principe actif dans l'organisme. Ce principe n'est cependant pas général car dans le cas des composés aliphatiques, une fluoration partielle ou totale des carbones sp^3 de la molécule peut conduire à une augmentation de son hydrophobie tout en diminuant sa lipophilie. Les molécules perfluorées sont en effet souvent solubles dans des phases dites fluoreuses.

⁶⁸ Purser, S.; Moore, P.R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 320-330.

- *Modulation des propriétés acido-basiques :*

Grâce à l'effet électroattracteur des groupements fluorés, l'acidité des fonctions acides est fortement augmentée et la basicité des fonctions basiques diminuée. Par exemple, l'acide acétique est un acide faible dans l'eau ($pK_a = 4.8$) alors que ses analogues mono, di et tri fluorés sont bien plus forts ($pK_a = 2.59, 1.24$ et 0.23 respectivement). Ceci peut se traduire par l'augmentation de la biodisponibilité par voie orale d'une molécule grâce à l'abaissement de la basicité de fonctions type amine. A l'inverse, les analogues difluorophosphonates de phosphotyrosines sont de meilleurs analogues que leurs équivalents hydrogénés : l'augmentation de l'acidité induite par les atomes de fluor permet à l'acide phosphonique d'être dans la même zone de pK_a que la fonction qu'il mime.⁶⁹

- *Blocage des dégradations métaboliques :*

La petite taille de l'atome de fluor ainsi que la force de la liaison C-F ont souvent été utilisées pour substituer des positions normalement non fonctionnalisées (par exemple des liaisons C-H aromatiques) mais pouvant subir des dégradations métaboliques oxydantes diminuant ainsi la biodisponibilité de la molécule. De plus la fluoration d'une position voisine de la fonction touchée peut empêcher une dégradation hydrolytique comme dans le cas des 2-déoxy-2-fluoroglycosides dont la stabilité vis-à-vis des glycosidases est considérablement renforcée.⁷⁰ Dans cet exemple le fluor est considéré comme un mime d'un groupement hydroxyle, ce dernier étant plus proche au niveau de sa taille que l'atome d'hydrogène. Schlosser a récemment réévalué le volume stérique que génèrent les groupements fluorés et celui-ci a longtemps été minimisé.⁷¹ En effet, un groupement CF_3 semble être plus comparable à un groupement *iso*-propyle qu'à un groupement méthyle.⁷²

L'utilisation du ^{18}F en imagerie (FluoroDésoxyGlucose),⁷³ la conception d'inhibiteur par stabilisation ou déstabilisation d'intermédiaire de mécanismes biologiques et la synthèse

⁶⁹ Smyth, M. S.; Burke, T. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 551-554.

⁷⁰ (a) Withers, S. G.; Street, I. P.; Bird, P.; Dolphin, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7530-7531. (b) Withers, S. G.; Street, I. P. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 7929-7932.

⁷¹ (a) Schlosser, M.; Michel, M. *Tetrahedron* **1996**, 52, 99-108. (b) Mikami, K.; Itoh, Y.; Yamanaka, M. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1-16.

⁷² (a) Wolf, C.; König, W. A.; Roussel, C. *Liebigs Ann.* **1995**, 781. (b) Leroux, F. *ChemBioChem* **2004**, 5, 644-649.

⁷³ (a) Alavi, A.; Reivich, M. *Semin. Nucl. Med.* **2002**, 32, 2-5. (b) Warburg, O. *Science* **1956**, 123, 309. (c) Warburg, O. *The metabolism of tumors*. London : Arnold Constable, **1930**. (d) Beuthien-Baumann, B.; Harnacher, K.; Oberdorfer, F.; Steinbach, J. *Carbohydrate Res.* **2000**, 327, 107-118.

d'analogues de nucléosides pourraient aussi être évoquées. Grâce à l'ensemble de ces propriétés, le nombre de molécules fluorées en tant qu'agents thérapeutiques est aujourd'hui de plus en plus important.

3.4. Le fluor : intérêt industriel

Dans le domaine de la chimie pharmaceutique et dans l'agrochimie, la chimie du fluor est en pleine croissance. De 1980 à 2000, le nombre de molécules fluorées en études précliniques et cliniques est passé de 8% à 20% du total des molécules en développement. En 2002, plus de 100 médicaments fluorés étaient commercialisés ou en phase clinique II et III. En 2007, parmi les 19 composés approuvés par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (US FDA), 9 composés comportaient un atome de fluor.⁷⁴ Les principales familles de synthons utilisées sont les trifluorométhoxylés aromatiques (40%), les composés trifluoroaromatiques (35%), les composés trifluorométhylés aliphatiques (17%) et enfin les composés mono ou difluoro aromatiques (8%). Ces données confirment l'intérêt du secteur industriel pour de nouvelles molécules fluorées et montrent la faible représentation des dérivés mono et difluorés non aromatiques, ce qui est dû au manque de synthons mono et difluorés et à leurs difficultés de synthèse.

3.5. Le groupement CF₂ comme mime de l'oxygène

La forte électronégativité du fluor nous laisse entrevoir la possibilité de mimer des groupes fonctionnels ou des atomes tout aussi électronégatifs. Le rayon de Van der Waals de l'oxygène étant comparable à celui du fluor (1.52 Å vs 1.47 Å) et son électronégativité étant proche de celle du groupement CF₂ (3.5 vs 3.3),⁷⁵ ce dernier s'avère être un candidat particulièrement attrayant pour le remplacement d'un oxygène. En effet, lors des premières études menées en 1984 en remplaçant l'oxygène d'un analogue de phosphate dans des structures de type ADP, Blackburn a montré que le groupement CF₂ est un équivalent tétraédrique de l'oxygène (par la disposition spatiale des deux fluors).⁷⁶ Le groupement CF₂

⁷⁴ Filler, R.; Riputana, S. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 777-791.

⁷⁵ Wells, P.R. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1968**, *6*, 111.

⁷⁶ (a) Blackburn, G.M. *Chem. Ind. (London)*, **1981**, 184. (b) Blackburn, G.M.; Kent, D.E.; Kolkmann, F. J. *Chem. Soc. Perkin.*, **1984**, *1*, 1119-1125.

est notamment connu pour être un groupe résistant et donc permettre la synthèse de structures non hydrolysables.

4. Les fluoroglycosides

L'atome de fluor possède donc une taille et une électronégativité semblables à celles de l'oxygène, et il confère à la liaison C-F une forte stabilité permettant la synthèse de molécules aux propriétés nouvelles. En reliant ces propriétés à celles des dérivées glycosidiques décrites précédemment, il en résulte que le remplacement d'un atome d'oxygène par un groupement difluorométhyle sur les dérivés glycosidiques pourraient permettre l'obtention d'analogues de glycoconjugués dont la structure serait stabilisée, et ceci sans que leurs propriétés d'origine ne soient altérées. Le remplacement de l'atome d'oxygène en position anomérique ou intracyclique par un groupement CF₂ pourrait notamment permettre l'obtention de glycomimétiques non hydrolysables *in vivo* par les glycosidases et les glycanases. Ils possèderaient ainsi une meilleure stabilité métabolique et une biodisponibilité plus importante, et par conséquent une efficacité thérapeutique améliorée.

4.1. Généralités sur les fluorosucres

4.1.1. Synthèses de CF₂-carbasucres

L'équipe de Sinaÿ a synthétisé les premiers exemples connus de *gem*-difluorocarbasucre.⁷⁷ En effet, le réarrangement « sucre à carbocycle » a été appliqué avec succès à un difluorométhylène *exo*-glycal et a permis la préparation des analogues fluorocarbocycliques du D-glucose, du D-mannose et du D-galactose.

⁷⁷ (a) Deleuze, A.; Menozzi, C.; Sollogoub, M.; Sinaÿ, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6680-6683. (b) Sardinha, J.; Guieu, S.; Deleuze, A.; Fernández-Alonso, M. C.; Rauter, A. P.; Sinaÿ, P.; Marrot, J.; Jiménez-Barbero, J.; Sollogoub, M. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1689-1703. (c) Sardinha, J.; Rauter, A. P.; Sollogoub, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5548-5550.

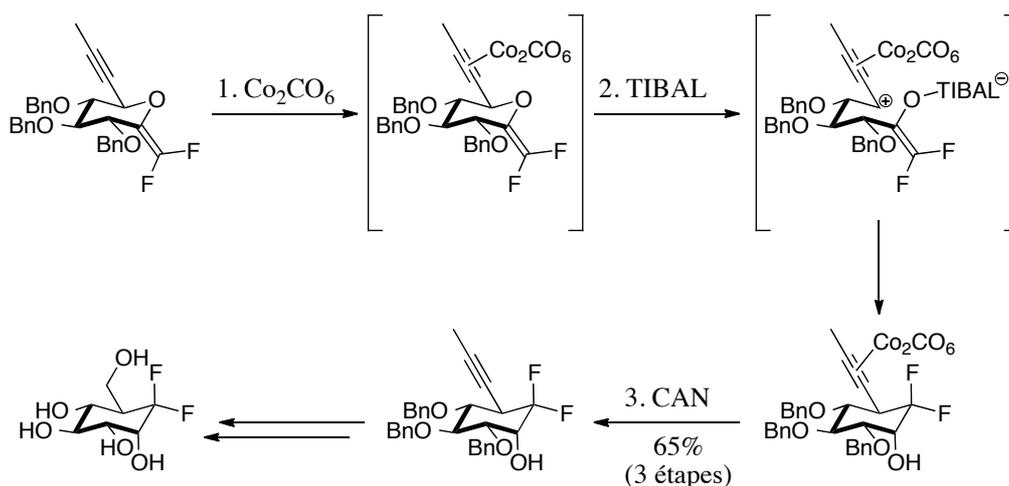


Schéma 12 : Les difluorocarbasucres de Sinaÿ et Sollogoub

Auparavant, plusieurs approches à des analogues fluorocarbo-cycliques de déoxypentoses et de déoxyhexoses avaient été publiées.⁷⁸ Les équipes de O-Yang et de Bravo/Cavicchio ont publié des réactions de cyclisations de radicaux difluorométhyles qui permettent une approche à des analogues déoxygenés de sucres.

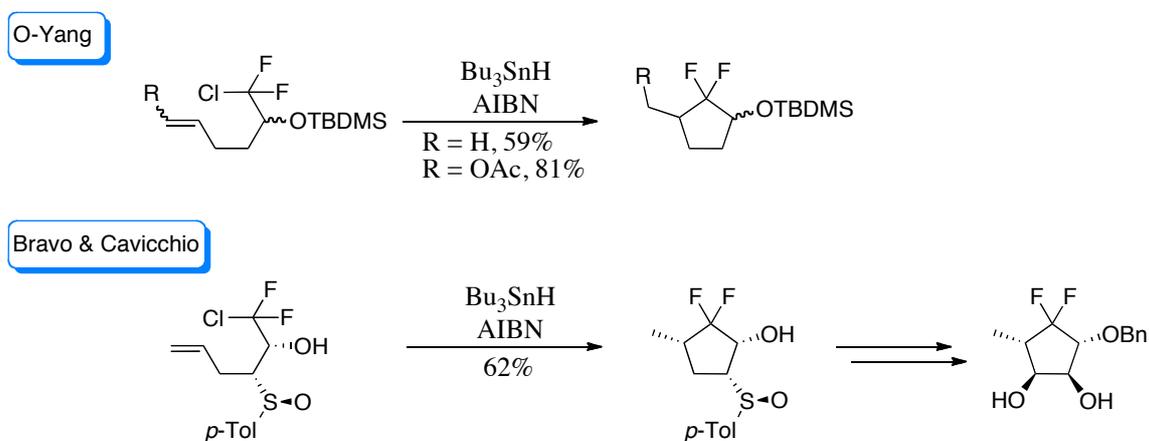


Schéma 13 : Les premières approches de O-Yang et Bravo/Cavicchio

Quelques approches à des mimes fluorocarbo-cycliques d'hexoses avaient également été publiées parallèlement aux travaux de Sinaÿ. Ces travaux ont donné lieu à des analogues d'aminosucres inhabituels ou de 6-déoxysucres en série racémique.⁷⁹ L'approche de Singh

⁷⁸ (a) Barth, F.; O-Yang, C. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5873-5876. (b) Arnone, A.; Bravo, P.; Cavicchio, G.; Frigerio, M.; Viani, F. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8523-8540.

⁷⁹ (a) Jiang, S.; Singh, G.; Batsanov, A.S. *Tetrahedron: Asymm.* **2000**, *11*, 3873-3877. (b) Audouard, C.; Fawcett, J.; Griffith, G. A.; Kérouédan, E.; Miah, A.; Percy, J. M.; Yang, H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4269-4272. (c) Anderl, T.; Audouard, C.; Miah, A.; Percy, J. M.; Rinaudo, G.; Singh, K. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 5200-5206.

fait intervenir une réaction de cycloaddition [3+2] d'une nitrone obtenue après difluoroallylation d'une D-ribose. L'équipe de Percy a quant à elle utilisé un réarrangement de Claisen suivi d'une métathèse cyclisante pour construire le squelette carbosucre.

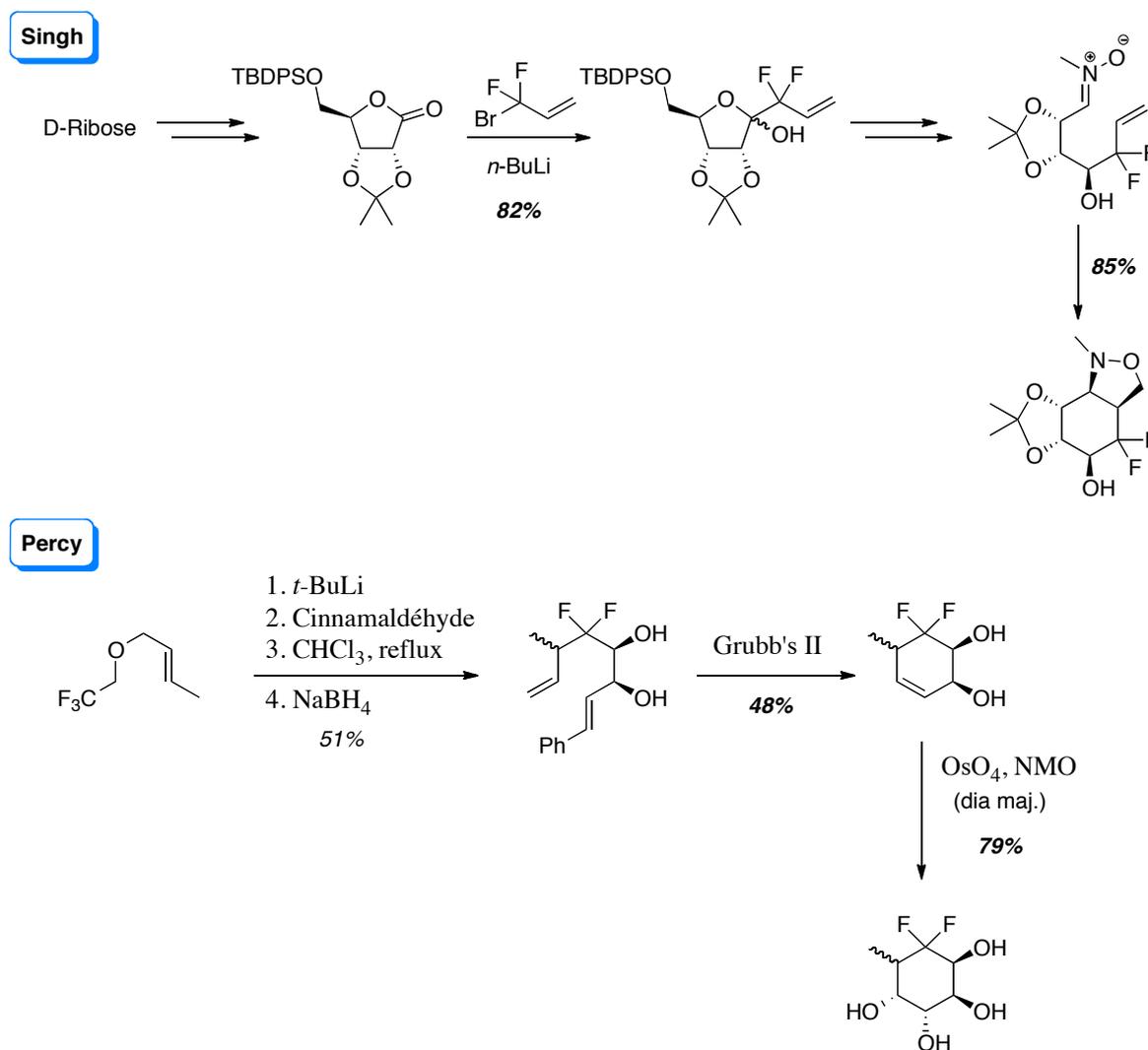
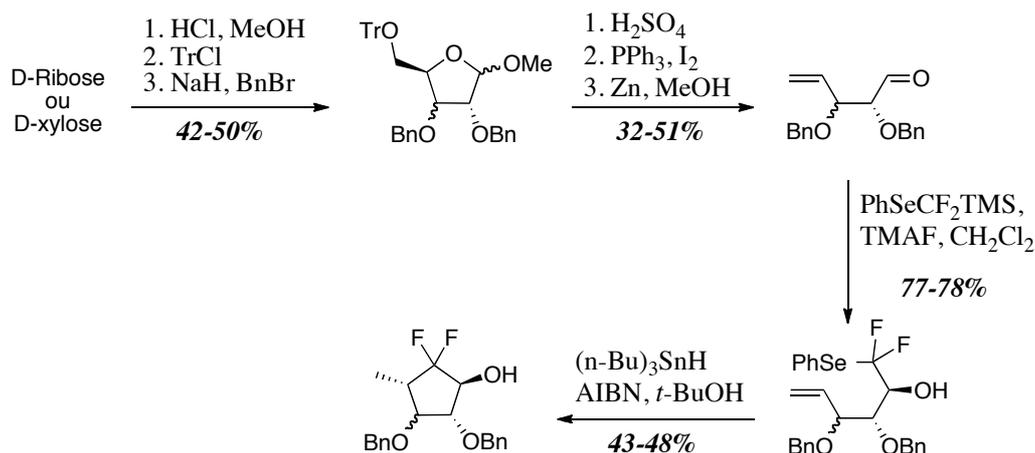


Schéma 14 : Les analogues d'hexoses de Singh et Percy

Au laboratoire, les travaux de synthèse de *gem*-difluorocarbasucres ont commencé avec la thèse de Gaëlle Fourrière qui a synthétisé ces composés par cyclisation radicalaire en vue de l'application à la synthèse d'analogues de principes actifs nucléosidiques.⁸⁰

⁸⁰ (a) Fourrière, G.; Lalot, J.; Van Hijfte, N.; Quirion, J. C.; Leclerc, E. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7048-7050.
 (b) Fourrière, G.; Van Hijfte, N.; Lalot, J.; Dutech, G.; Fragnet, B.; Coadou, G.; Quirion, J. C.; Leclerc, E. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3963-3972.


 Schéma 15 : Synthèse de 5-déoxy-CF₂-carbasucres

4.1.2. Synthèses de CFH-glycosides

L'équipe de Vogel a publié la première synthèse de fluoro-C-disaccharide.⁸¹ L'introduction du fluor se fait de manière classique à savoir par fluoration d'un alcool en présence de DAST. Des études conformationnelles ont été réalisées sur ce composé ainsi que des études structurales. Une des constatations a été que le fluoro-C-glycoside est beaucoup plus flexible que le O-glycoside correspondant mais aussi que la conformation majoritaire est différente.

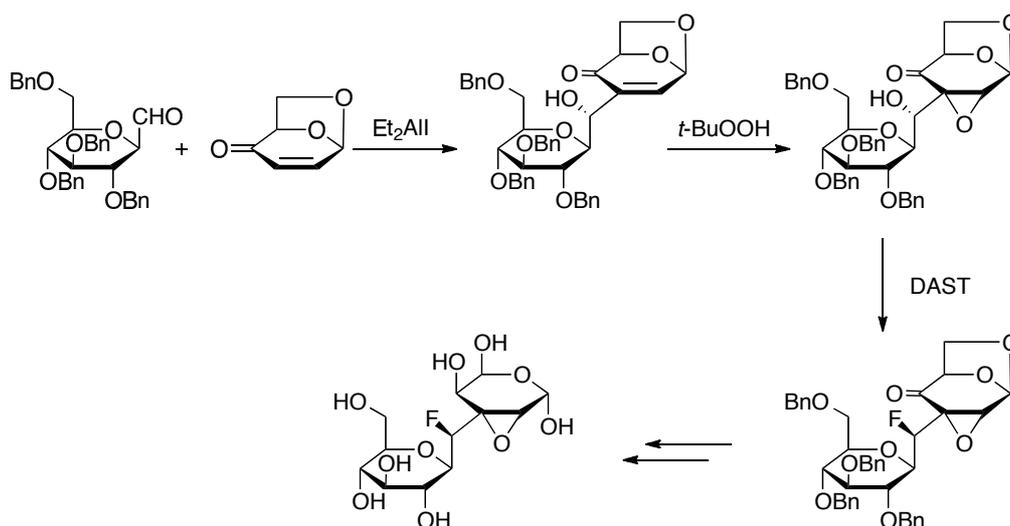


Schéma 16 : Le fluoro-C-disaccharide de Vogel

⁸¹ Jimenez-Barbero, J.; Demange, R.; Schenk, K.; Vogel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5132-5138.

Ces mêmes conclusions ont récemment été publiées par Jimenez-Barbero et son équipe.⁸²

4.2. Synthèses de CF₂-glycosides

4.2.1. Oléfination d'une lactone

L'utilisation du groupement difluorométhylène comme remplacement de l'atome d'oxygène anomérique a été explorée pour la première fois par le groupe de Motherwell en 1989.⁸³ Leur approche était basée sur la préparation d'un difluoro-*exo*-glycal et son utilisation dans des réactions radicalaires. Outre leur réduction, l'addition de radicaux carbonés non-fonctionnalisés, de radicaux soufrés ou phosphorés, ces travaux ont également conduit à la synthèse d'un analogue de glycosylaminoacide. L'addition d'un dérivé halogéné de sérine sur un difluoro-*exo*-glycal de type hexofuranose a en effet permis la préparation du premier mime difluorométhylé de glycosylsérine.⁸⁴

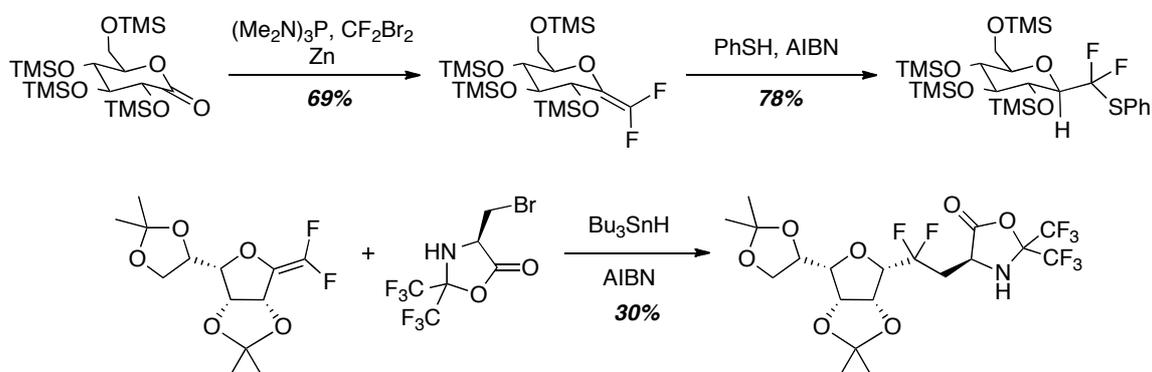


Schéma 17 : Les travaux précurseurs de Motherwell

Il est à noter que les premiers *gem*-difluoro-C-disaccharides ont pu être synthétisés à partir de ces éthers d'énols difluorés via une réaction radicalaire.⁸⁵ De plus, dans le cas des furanoses, la réduction du radical résultant de l'addition, et donc la configuration du centre anomérique, est uniquement contrôlée par l'encombrement stérique alors que dans le cas des

⁸² Pérez-Castells, J.; Hernández-Gay, J. J.; Dento, R. W.; Tony, K. A.; Mootoo, D. R.; Jiménez-Barbero, J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1087-1092.

⁸³ Motherwell, W. B.; Tozer, M.; Ross, B. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1437-1439.

⁸⁴ Herpin, T. F.; Motherwell, W. B.; Weibel, J. M. *Chem. Commun* **1997**, 923-924.

⁸⁵ Herpin, T.F.; Motherwell, W. B.; Tozer, M. T. *Tetrahedron : Asymmetry* **1994**, *5*, 2269-2282.

pyranoses, l'anomère β est exclusivement obtenu car il correspond à la réduction du radical le plus stable.

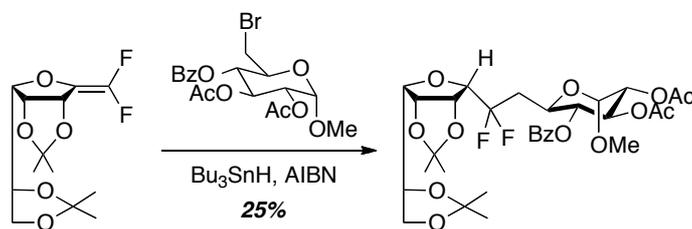


Schéma 18 : Synthèse des *gem*-difluoro-C-disaccharides

4.2.2. Addition d'un éther d'énol silylé

La seconde équipe à avoir synthétisé des analogues *gem*-difluorométhylés de glycosides est celle de Portella.⁸⁶ La méthode employée vise à additionner un éther d'énol silylé sur un sucre activé. L'addition du réactif de Rupert sur un acylsilane, suivi d'un réarrangement de Brook et d'une élimination du fluor conduisent à la formation *in situ* de cet éther de difluoroénol silylé. Ce dernier en présence d'un acide de Lewis réagit avec le tri-O-acétoxy-D-glucal selon une réaction de type Ferrier.

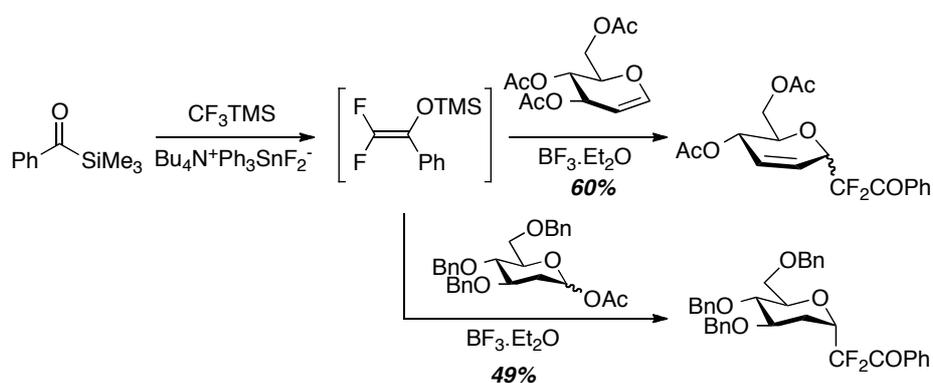


Schéma 19 : Approche de Portella

⁸⁶ (a) Brigaud, T.; Lefebvre, O.; Plantier-Royon, R.; Portella, C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6115-6116. (b) Berber, H.; Brigaud, T.; Lefebvre, O.; Plantier-Royon, R.; Portella, C. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 903-909.

Cette méthodologie n'a pu être appliquée qu'à des glycols ou des 2-déoxysucres et à notre connaissance, aucune fonctionnalisation du 2,3-anhydroglycoside obtenu n'a été publiée.

4.2.3. Addition radicalaire sur un glycol

L'équipe de Miethchen a récemment développé une nouvelle méthode d'obtention de *gem*-difluoro-C-glycosides *via* une approche radicalaire du bromochlorodifluorométhane sur des 2-acétoxyglycols en présence de dithionite de sodium, lequel assure ensuite la réduction du radical.⁸⁷

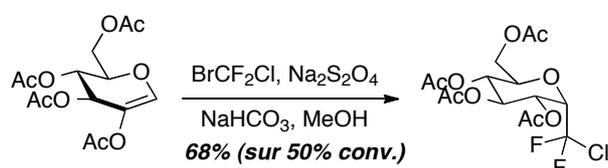


Schéma 20 : Approche de Miethchen

Un analogue d' α -D-glucose a ainsi pu être obtenu avec une bonne stéréosélectivité et un bon rendement mais sur une faible conversion. Aucune fonctionnalisation du groupement CF_2Cl , il est vrai peu réactif, n'a été décrite.

4.2.4. Fluorations nucléophile et électrophile

En 2006, une réaction de fluoration nucléophile a été réalisée par Augé et Lubin-Germain permettant l'accès à des β - CF_2 -glycosides avec comme étape préliminaire une réaction d'alcynylation du 1-formylglycosides.⁸⁸

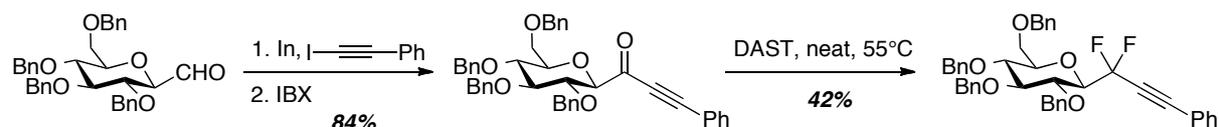


Schéma 21 : Approche de Augé et Lubin-Germain

⁸⁷ Wegert, A.; Miethchen, R.; Hein, M.; Reinke, H. *Synthesis* **2005**, 1850-1858.

⁸⁸ Picard, J.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Augé, J. *Synthesis* **2006**, 979-982.

Plus récemment, des analogues d' α - et β -aryl-D-galactosides ont été synthétisés par l'équipe de Vogel en utilisant des réactions de fluoration nucléophile.⁸⁹

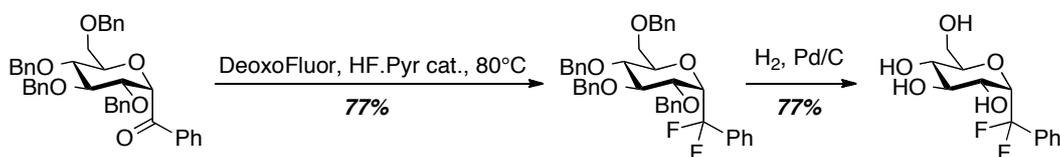


Schéma 22 : Synthèse d'analogues d'arylgalactosides par Vogel

Une étude d'analyse conformationnelle de ces composés a été entreprise par comparaison avec les molécules parentes oxygénées ainsi que l'analogue CH₂ (*vide infra*).

4.2.5. Synthèse de CF₂-disaccharides

Une méthode de synthèse originale a été développée par l'équipe de Mootoo, basée sur une cyclisation par addition d'un éther d'énol sur un oxocarbénium généré *in situ*. Cette approche a été appliquée à la synthèse d'analogues fluorocarbonés (CF₂ et CFH) de glycosides et de disaccharides. De plus, une partie de ces composés a fait l'objet d'une étude conformationnelle et de tests pour l'inhibition de sélectines (*vide infra*).⁹⁰

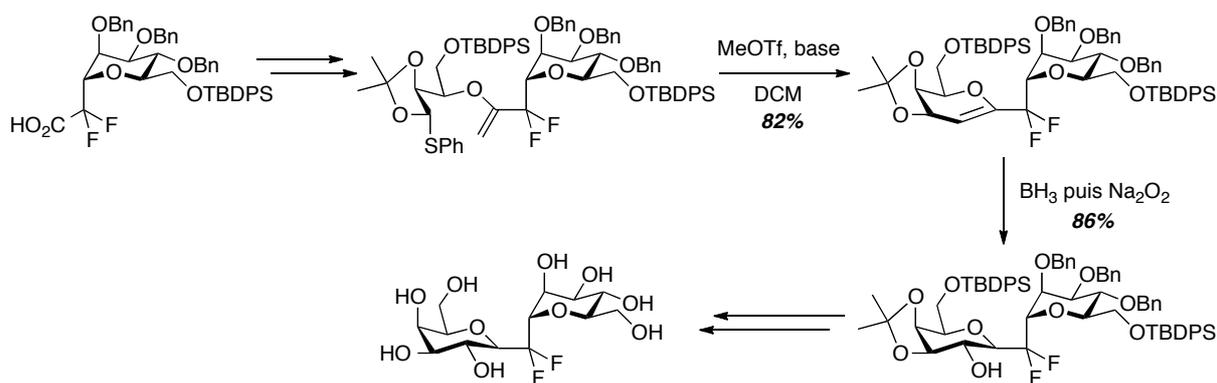


Schéma 23 : Synthèse de CF₂-disaccharides par Mootoo

⁸⁹ Kolympadi, M.; Fontanella, M.; Venturi, C.; André, S.; Gabius, H.-J.; Jiménez-Barbero, J.; Vogel, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2861-2873.

⁹⁰ (a) Tony, K. A.; Denton, R. W.; Dilhas, A.; Jiménez-Barbero, J.; Mootoo, D. R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1441-1444. (b) Denton, R. W.; Tony, K. A.; Hernández-Gay, J. J.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Mootoo, D. R. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1624-1635.

Un analogue difluorométhylé du ganglioside GM4, un glycosphingolipide impliqué dans de nombreux processus de reconnaissance cellulaire a été synthétisé par l'équipe de Sodeoka.⁹¹ L'introduction du groupement CF₂ en position anomérique par un réarrangement de type Ireland-Claisen est l'étape clé de cette synthèse.

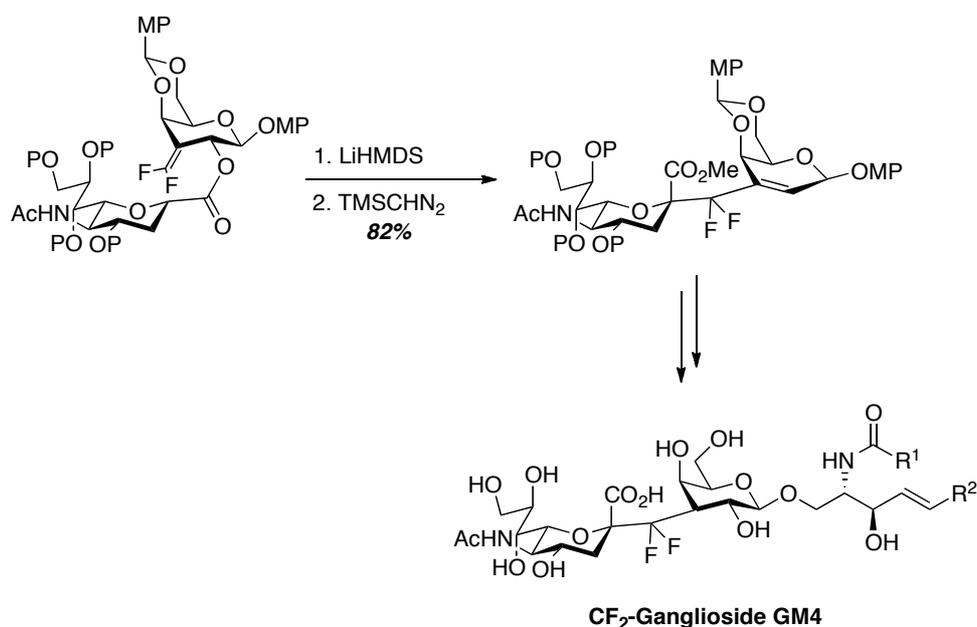


Schéma 24 : Analogue du ganglioside GM4 synthétisé par Sodeoka

Ce bref historique bibliographique, certes non exhaustif mais qui regroupe les travaux les plus importants dans le domaine, fait clairement ressortir le faible nombre d'approches par fluoration directe. Les deux exemples cités plus haut font intervenir des positions activées, benzylique ou propargylique et une utilisation de conditions assez drastiques : présence d'un large excès ou d'une utilisation comme solvant de l'agent de fluoration, application d'une température élevée. Les réactions de difluoration nucléophile peuvent en effet devenir assez difficiles sur des substrats encombrés. Il en résulte des conditions réactionnelles parfois peu compatibles avec des substrats fonctionnalisés comme les dérivés glycosidiques. C'est pourquoi une approche par synthon est généralement privilégiée pour la synthèse de ce type de composés.

⁹¹ Hirai, G.; Watanabe, T.; Yamaguchi, K.; Miyagi, T.; Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15420-15421.

4.2.6. Travaux du laboratoire

L'objectif du laboratoire était de développer des voies de synthèse d'intermédiaires du type **1** pour diverses séries de sucre (essentiellement glucose, galactose et mannose) et qui permettraient l'accès aux anomères α ou β à volonté. Ces intermédiaires devaient posséder un groupement fonctionnalisable (ou déjà fonctionnalisé) sur le lien difluorométhylène, le but ultime étant de se diriger vers la synthèse d'analogues de glycoconjugués à potentiel thérapeutique.

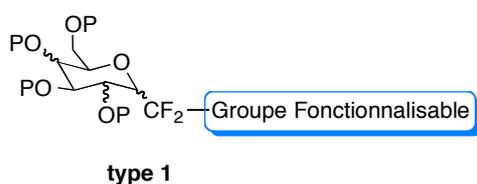
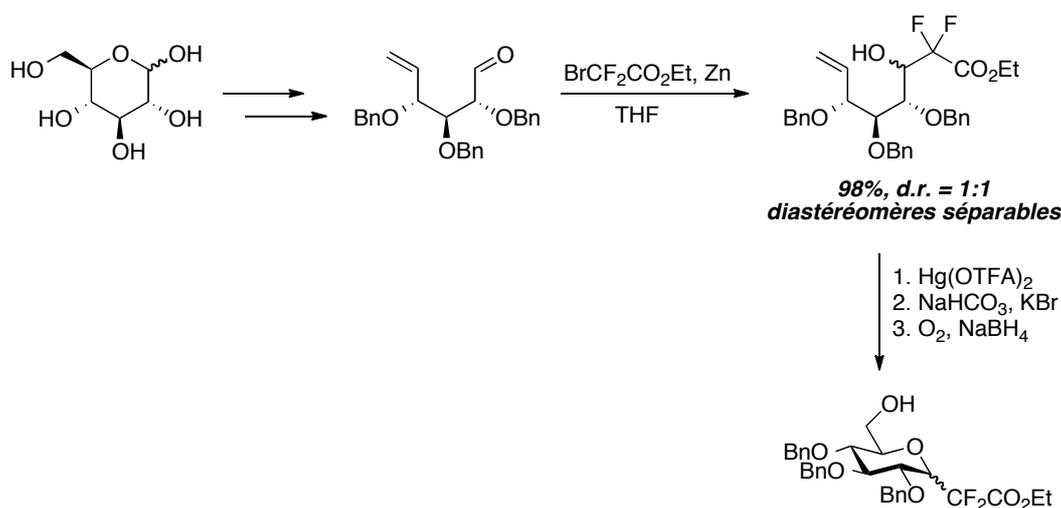


Figure 31

Au laboratoire, les travaux ont commencé avec la thèse de Stéphane Marcotte qui a obtenu un *gem*-difluoré du glucose.⁹²

Schéma 25 : Synthèse d'analogues *gem*-difluorés du glucose

La première étape consiste à ouvrir le cycle pyranosique afin d'obtenir un aldéhyde rendant l'introduction du groupement difluorométhyle possible par réaction de Réformatsky.

⁹² Marcotte, S.; D'Hooge, F.; Ramadas, S.; Feasson, C.; Pannecoucke, X.; Quirion, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5879-5882.

Cependant, certaines étapes présentent des difficultés comme la faible diastéréosélectivité de l'addition de l'organozincique sur l'aldéhyde ou les problèmes de stéréosélectivité au niveau du centre asymétrique C-5 lors de l'étape de cyclisation. La configuration de ce centre dépend en effet de la configuration du centre en C-4 et un basculement en série L est observé dans le cas du dérivé glucose.

Une autre approche a été étudiée au laboratoire consistant en l'addition d'un organozincique sur une lactone située en position anomérique.⁹³

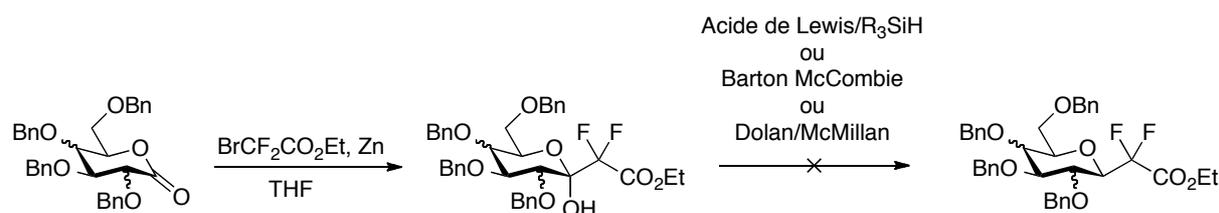


Schéma 26

Cette réaction présentait l'avantage de fournir en peu d'étapes un synthon CF_2 -glycoside. Cependant, les très nombreuses tentatives de réduction de la fonction hémiacétalique se sont soldées par des échecs. La naissance d'une charge partielle positive sur le carbone en α du CF_2 est en effet fortement défavorisée par l'effet inductif attracteur et rend impossible la formation de l'intermédiaire réactionnel. Les réductions radicalaires type Barton/McCombie ou Dolan/McMillan ont également été inefficaces : la formation et/ou la stabilité des thiocarbonates, xanthates ou oxalates nécessaires à ces processus sont cette fois en cause.

Une autre stratégie a été envisagée par réaction de Réformatsky utilisant des cétoaldéhydes comme électrophiles.⁹⁴ Des analogues fluorés de β -D-mannopyranosides et de β -D-galactopyranosides ont ainsi été obtenus par addition de bromodifluoroacétate d'éthyle.⁹⁵

⁹³ Cuenca, A.-B.; D'Hooge, F.; Gouge, V.; Castelot-Deliencourt, G.; Oulyadi, H.; Leclerc, E.; Jubault, P.; Pannecoucke, X.; Quirion, J.-C. *Synlett* **2005**, 2627-2630.

⁹⁴ (a) Adinolfi, M.; Barone, G.; De Lorenzo, F.; Iadonisi, A. *Synlett* **1999**, 336-338. (b) Boiron, A.; Zillig, P.; Faber, D.; Giese, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5877-5882.

⁹⁵ Karche, N.; Pierry, C.; Poulain, F.; Oulyadi, H.; Leclerc, E.; Pannecoucke, X.; Quirion, J.-C. *Synlett* **2007**, 123-126.

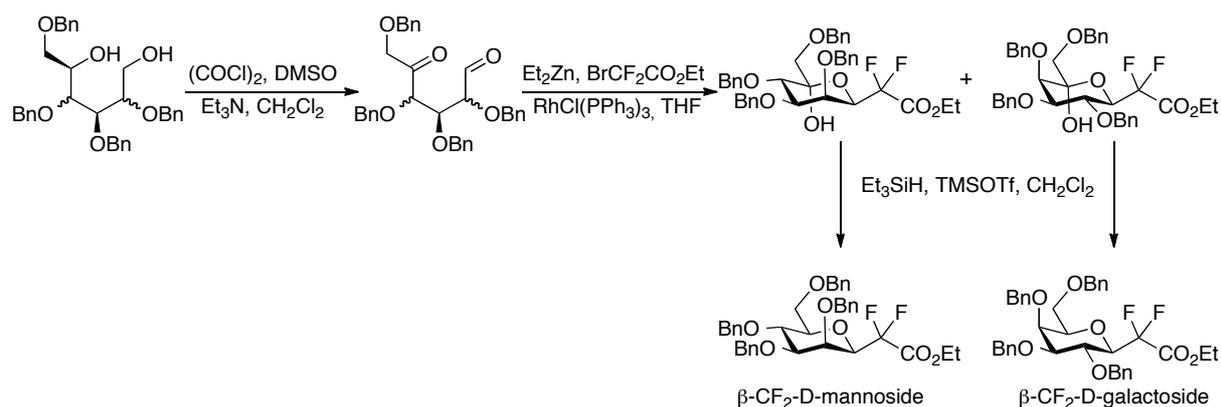
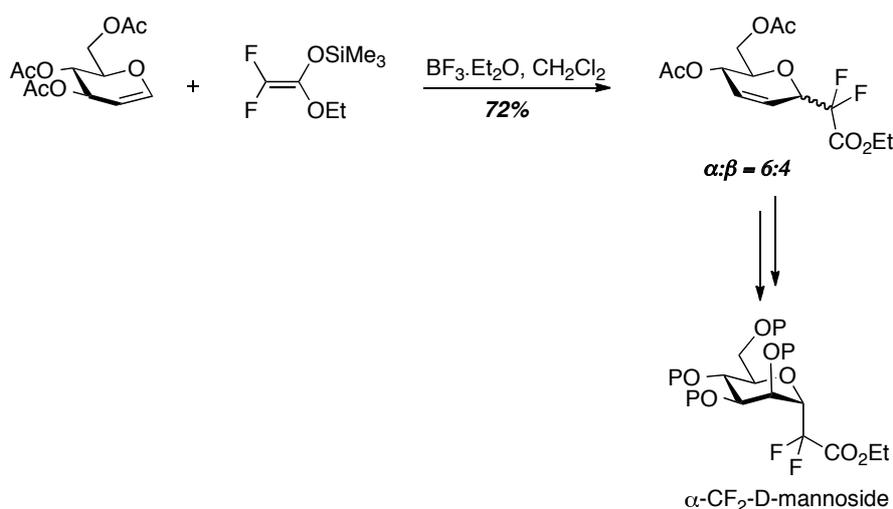


Schéma 27

Le groupe a développé une autre synthèse permettant l'accès à des analogues d' α -CF₂-D-mannopyranosylester par SN₂' de difluoroénoxysilane, préalablement synthétisé, sur le glycol correspondant suivie d'une dihydroxylation de la double liaison.⁹⁶


 Schéma 28 : Synthèse d' α -CF₂-D-mannoside

Une époxydation sur cette même double liaison suivie d'une ouverture de ce cycle par le TMSN₃ a permis de synthétiser des analogues du 2-désoxy-2-aminoglycosides.⁹⁷

⁹⁶ Poulain, F.; Serre, A.-L.; Lalot, J.; Leclerc, E.; Quirion, J.-C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2435-2438.

⁹⁷ Poulain, F.; Leclerc, E.; Quirion, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1803-1805.

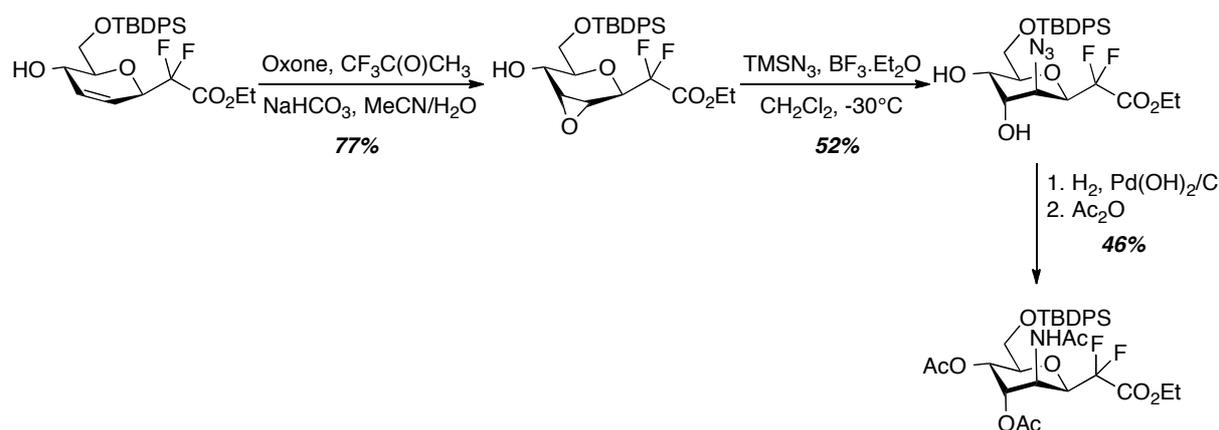
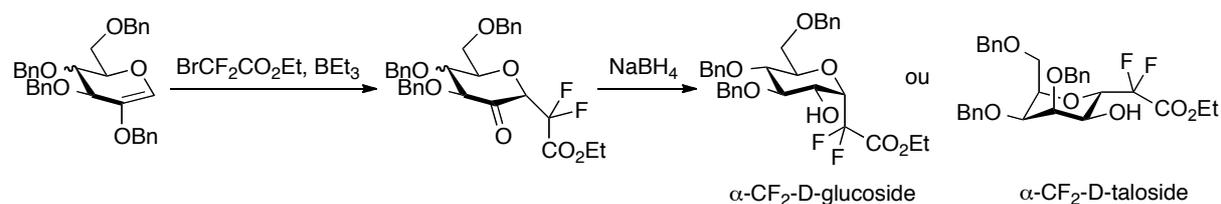


Schéma 29 : Synthèse d'analogues du 2-désoxy-2-aminoglycosides

Une autre approche a été étudiée au laboratoire. Celle-ci consiste en l'addition radicalaire du bromodifluoroacétate d'éthyle sur des 2-benzyloxyglycals suivie de la réduction du carbonyle en alcool afin d'obtenir les α -CF₂-D-glucopyranosylester et α -CF₂-D-talopyranosylester.⁹⁸


 Schéma 30 : Synthèse d' α -CF₂-glycosides par voie radicalaire

Une oléfination de Horner-Wadsworth-Emmons a été réalisée afin de mettre en place des fonctionnalités qui pourraient s'avérer utiles dans la synthèse d'analogues non-hydrolysables de O-glycoconjugués comme l' α -galactosylcéramide.

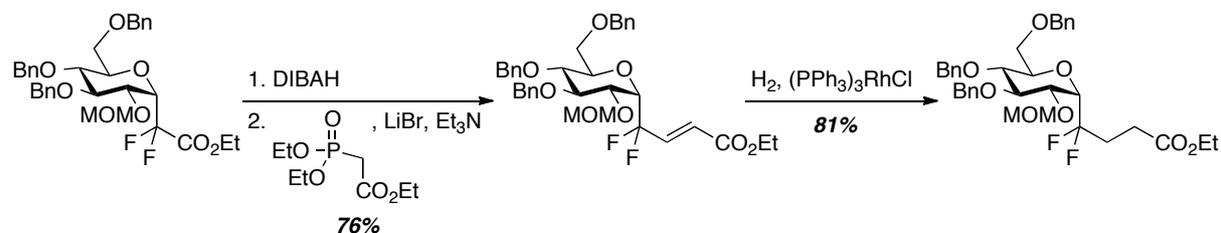


Schéma 31 : Réaction de Horner-Wadsworth-Emmons

⁹⁸ Moreno, B.; Quehen, C.; Rose-Hélène, M.; Leclerc, E.; Quirion, J.-C. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2477.

5. Présentation du projet de synthèse d'analogues fluorés d' α -GalCer

Nous avons pour objectif le développement d'une synthèse originale d'analogues CF₂-glycosidiques d' α -galactosylcéramides. Leurs propriétés immunorégulatrices seront évaluées afin de voir si la substitution de l'oxygène anomérique par un CF₂ a un impact sur le potentiel thérapeutique de ces composés, notamment dans le cadre des maladies autoimmunes. La synthèse des analogues monofluorés est également envisagée. Ces analogues pourraient en effet être un bon compromis entre les CF₂- et CH₂-glycosides dans le cadre de la minimisation des perturbations stériques.

En ce qui concerne les α -galactosylcéramides, la voie de synthèse que nous nous proposons d'explorer est basée sur la dernière méthodologie de synthèse mentionnée plus haut, à savoir l'addition d'un radical difluorométhylé sur un galactal. La forte sélectivité α de cette réaction la désignait comme méthode de choix pour former un synthon α -CF₂-galactoside qui puisse être fonctionnalisé en analogue de GalCer. Les cibles pourraient classiquement être obtenues à partir de l'intermédiaire **A** par un simple couplage avec un acide gras. L'intermédiaire **A** serait obtenu à partir d'un synthon α -CF₂-galactoside **B** correctement fonctionnalisé qui puisse être couplé avec un dérivé électrophile de phytosphingosine **C**. Ce dernier pourrait probablement être obtenu à partir de l'aldéhyde de Garner **F** et **B** par addition radicalaire de **D** sur **E**.

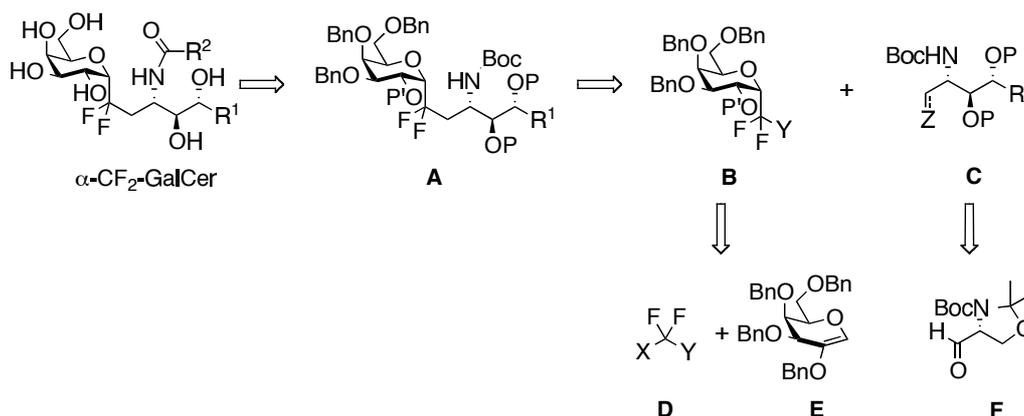


Schéma 32 : Schéma rétrosynthétique

Le chapitre suivant détaille l'exploration de la réaction d'addition radicalaire, la préparation de l' α -CF₂-galactoside **B** et le développement de la méthodologie qui permettra l'assemblage de **B** avec la partie phytosphingosine **C**. La préparation de cette dernière, le couplage avec **B** et la synthèse des premiers analogues seront également exposés.

Chapitre II

Synthèse des premiers analogues difluorés de GalCer

La synthèse d' α -CF₂-galactosylcéramide a donc été réalisée en suivant le schéma rétrosynthétique précédent. L'objectif est de pouvoir valider, dans un premier temps, la méthode d'addition d'un groupement difluoré en position anomérique du sucre avec une configuration α et dans un deuxième temps, la stratégie d'obtention d'analogues de galactosylcéramides difluorés pour mesurer l'activité biologique. L'addition radicalaire de groupements fluorés sur un glycal, la réduction de la fonction carbonyle obtenue et la fonctionnalisation de l' α -galactose seront présentées dans une première partie. La synthèse de la chaîne phytosphingosine ainsi que son couplage avec l' α -CF₂-galactose pour obtenir des analogues du KRN 7000 seront décrits dans une deuxième partie.

1. Synthèse de l' α -CF₂-galactose

1.1. Addition de radicaux électrophiles sur des 2-benzyloxy-D-glycals

L'addition de radicaux perfluoroalkyle ou difluorométhyle sur des insaturations est une méthode très répandue pour la synthèse des molécules organofluorés.⁹⁹ L'addition de radicaux électrophiles sur des glycals a également été étudiée et la régiosélectivité de cette réaction est bien connue, avec une addition s'effectuant exclusivement en C-2 (coefficient orbitalaire le plus élevé de la HOMO).^{100,101} Notre approche reposait sur la simple hypothèse que l'introduction d'un groupement alkoxy en C-2 devrait orienter l'addition d'un radical électrophile en C-1 du fait des seules contraintes stériques et d'un rééquilibrage des coefficients orbitalaires comme l'a aussi montré Miethchen.

⁹⁹ (a) Dolbier, Jr, W. R. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1557-1584. (b) Kirsch, P. in *Modern Fluoroorganic Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2004**, 91-101. (c) Hu, J.; Zhang, W.; Wang, F. *Chem. Commun.* **2009**, 7465-7478.

¹⁰⁰ (a) Miethchen, R.; Hein, M.; Reinke, H. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *5*, 919-923. (b) Wegert, A.; Reinke, H.; Miethchen, R. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1833-1837.

¹⁰¹ (a) Linker, T.; Sommermann, T.; Kahlenberg, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9377-9384. (b) Linker, T.; Schanzenbach, D.; Elamparuthi, E.; Sommermann, T.; Fudickar, W.; Gyóllai, V.; Somsák, L.; Demuth, W.; Schmittel, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16003-16010.

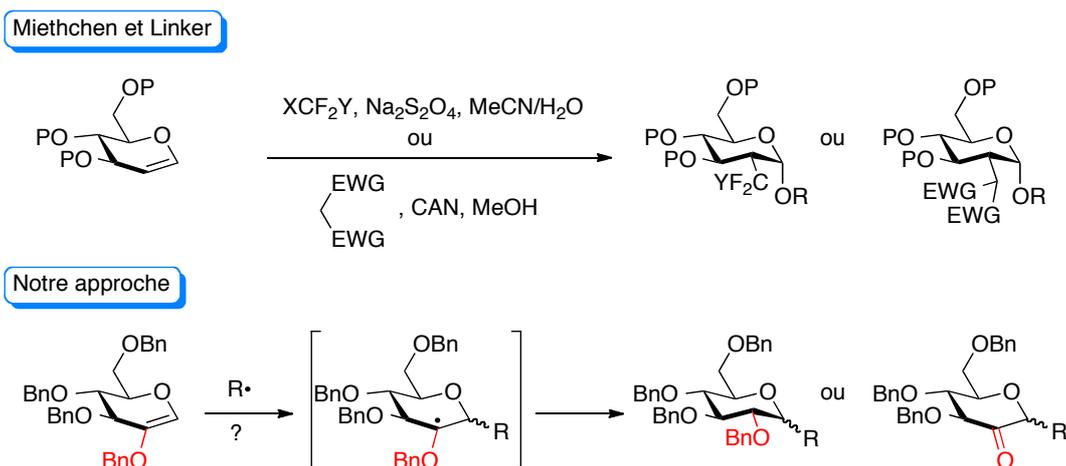
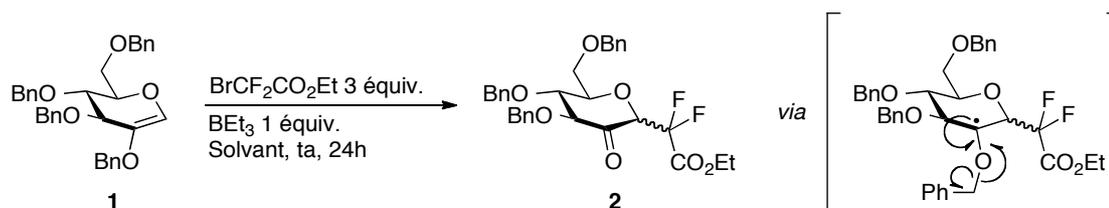


Schéma 33 : Addition de radicaux électrophiles

1.1.1. Mise au point de l'addition radicalaire et étendue de la réaction

Nos premiers essais ont été effectués sur le 2-benzyloxy-D-glucal en utilisant le bromodifluoroacétate d'éthyle en présence de divers initiateurs (dithionite de sodium, AIBN ou BEt_3).¹⁰² Un produit d'addition a été rapidement observé en utilisant le triéthylborane comme initiateur. Une courte étude a montré que les solvants polaires favorisaient cette réaction puisque les rendements augmentent progressivement en passant du dichlorométhane au toluène puis au THF et au DMF.

¹⁰² Pour d'autres additions radicalaires de $\text{BrCF}_2\text{CO}_2\text{Et}$, voir: (a) Morel, D.; Dawans, F. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1445-1447. (b) Sato, K.; Omote, M.; Ando, A.; Kumadaki, I. *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 509-515. (c) Godineau, E.; Schäfer, C.; Landais, Y. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4871-4874. (d) Yang, X.; Yuan, W.; Gu, S.; Yang, X.; Xiao, F.; Shen, Q.; Wu, F. *J. Fluorine Chem.* **2007**, *128*, 540-544. (e) Godineau, E.; Schenk, K.; Landais, Y. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6983-6993.



Entrée	Solvant	Rendement (%)
1	CH ₂ Cl ₂	traces
2	toluène	traces
3	THF	11
4	THF/H ₂ O	21
5	DMF	28

Schéma 34 : Optimisation des conditions d'addition radicalaire du BrCF₂CO₂Et sur le 2-benzyloxy-D-glucal

Un excès de réactifs dans le DMF permet finalement d'obtenir une conversion complète en glycal et un rendement satisfaisant en produit d'addition de 51%. Ce dernier est issu d'une fragmentation du radical intermédiaire qui libère un radical tolyle stabilisé.⁹⁸ La réaction montre une sélectivité α appréciable ($\alpha:\beta = 3:1$) qui devient totale dans le cas du 2-benzyloxy-D-galactal **3** puisque le composé **4** est obtenu avec 58% de rendement sous forme d'un seul diastéréomère. Nous avons donc entre les mains une méthodologie prometteuse pour la synthèse d'analogues CF₂-glycosidiques d' α -galactosides.

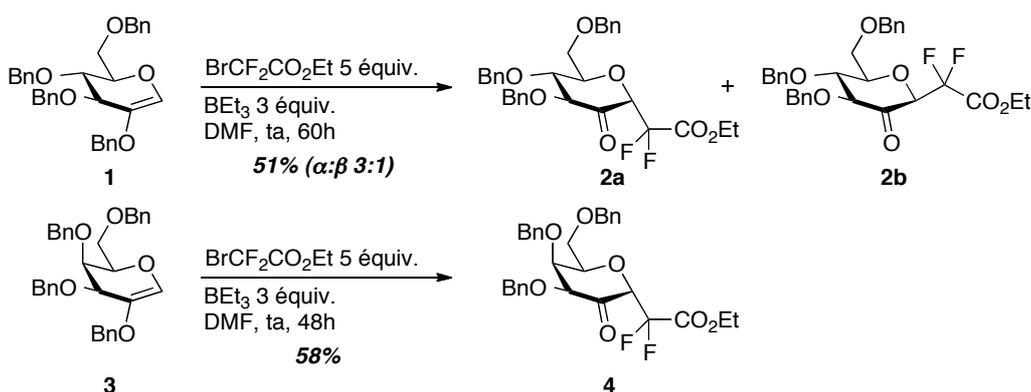
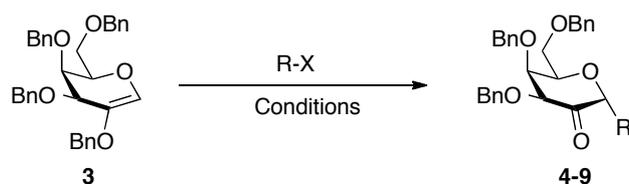


Schéma 35 : Addition de BrCF₂CO₂Et sur le 2-benzyloxy-D-glucal et le 2-benzyloxy-D-galactal

Nous avons alors souhaité examiner l'étendue de cette réaction en testant d'autres donneurs de radicaux. Les radicaux difluorométhyles, fluoroacétyles ou malonyles nous ont

permis d'obtenir les produits désirés avec des rendements convenables (entrées 1-4, 6 et 9). L'utilisation de dibromodifluorométhane, particulièrement intéressante du fait des nombreuses possibilités de fonctionnalisation du produit **7** résultant, aboutit à une réaction rapide et efficace (entrée 6). Le rendement isolé est cependant assez décevant du fait de l'instabilité sur silice de ce composé.



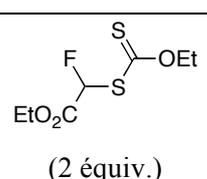
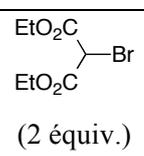
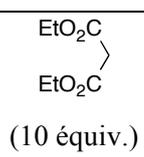
Entrée	R-X	Conditions	Produit	Rdt (%)
1	EtO ₂ CCF ₂ -Br (5 équiv.)	BEt ₃ (2.5 équiv.) DMF, air, ta	4	58
2	 (2 équiv.)	DLP (1 équiv.) DCE/ <i>t</i> -BuOH (1:1), 95°C	5	59
3	 (2 équiv.)	DLP (1 équiv.) DCE/ <i>t</i> -BuOH (1:1), 95°C	6	54
4	 (10 équiv.)	Mn(OAc) ₃ (3 équiv.) MeCN, 85°C	6	52
5	EtO ₂ CCH ₂ -Br ou EtO ₂ CCH ₂ -xanth	BEt ₃ , DMF, ou DLP, DCE/ <i>t</i> -BuOH	/	/
6	BrCF ₂ -Br (10 équiv.)	BEt ₃ (2 équiv.) DMF, air, ta	7	41
7	Br ₂ CF-Br (5 équiv.)	BEt ₃ (1 équiv.) DMF, air, ta	8	16
8	BrCH ₂ -Br (5 équiv.)	BEt ₃ (2.5 équiv.)	/	/
9	PhSO ₂ CF ₂ -I (3 équiv.)	BEt ₃ (3 équiv.) DMF, air, ta	9	38
10	PhSO ₂ CH ₂ -I ou PhSO ₂ CH ₂ -Br	BEt ₃ , DMF, ou DLP, DCE/ <i>t</i> -BuOH	/	/
11	(<i>i</i> -PrO) ₂ P(O)CH ₂ -Br ou (<i>i</i> -PrO) ₂ P(O)CH ₂ -xanth	BEt ₃ , DMF, ou DLP, DCE/ <i>t</i> -BuOH	/	/

Tableau 2 : Essais d'addition de radicaux électrophiles sur le 2-benzyloxy-D-galactal

L'utilisation de dérivés halogénés ou de xanthates avec une initiation au triéthylborane ou au peroxyde de lauroyle est déterminée par la seule efficacité de la réaction et est difficilement rationalisable. Les différentes conditions ont été en effet testées sur chaque substrat et seul le meilleur résultat a été retenu. Une génération du radical par oxydation directe du malonate avec $Mn(OAc)_3$ est également possible (entrée 4). Dans tous les cas, seul le composé α a été détecté et isolé. En revanche, la réaction s'est révélée totalement inefficace avec le bromoacétate d'éthyle, le dibromométhane, le bromométhylphosphonate de di-*iso*-propyle et la bromométhylphénylsulfone quelles que soient les conditions utilisées (entrées 5, 8, 10, 11).

1.1.2. Rappels concernant les radicaux fluoroalkyles et rationalisation des résultats

Afin d'interpréter ces derniers résultats, un point bibliographique concernant la réactivité des radicaux trifluoroalkyles est tout d'abord nécessaire. Il faut cependant noter que l'essentiel des études réalisées ont porté sur le radical trifluorométhyle et les radicaux perfluorés. Peu de données concernant les radicaux partiellement fluorés, tels que nous les utilisons, sont en effet disponibles. Il nous faudra donc extrapoler, avec précautions, certaines données concernant les radicaux perfluoroalkyles.^{103,99(a)}

Les radicaux α -fluoroalkyles se caractérisent par des différences notables, en termes de structures, de stabilité et de réactivité, avec leurs homologues hydrogénés. Ces radicaux ne sont généralement pas plans, avec un degré de pyramidalisation et un caractère σ qui croît avec le nombre d'atomes de fluor (le radical trifluorométhyle est parfaitement tétraédrique). L'effet inductif attracteur des atomes de fluor n'est généralement pas compensé par leur effet mésomère donneur modéré, ce qui aboutit à une déstabilisation globale de ces radicaux. Ces différentes caractéristiques se traduisent par une réactivité considérablement accrue et un certain degré d'électrophilie, *au moins pour les radicaux perfluoroalkyles*. La situation est beaucoup plus nuancée pour les radicaux partiellement fluorés qui se révèlent généralement plus réactifs mais modérément plus électrophiles que leurs homologues hydrogénés. L'électrophilie des radicaux trifluorométhyle ou difluorométhyle a même été probablement

¹⁰³ Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. in *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, **2008**, 1-22, 72-98 et 279-341.

surestimée comme l'ont montré diverses études expérimentales et théoriques.^{104,105} Le radical trifluorométhyle a par exemple été récemment classé comme moins électrophile que le radical *tert*-butoxycarbonylméthyle et considéré comme « nucléophile faible ».

À la lumière de ce dernier point, et bien qu'aucune donnée ne soit disponible pour le radical $\cdot\text{CF}_2\text{Br}$ (entrée 6), celui-ci ne devrait pas être considéré comme plus électrophile que $\cdot\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$. D'une manière générale, l'échec des additions de $\cdot\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, $\cdot\text{CH}_2\text{Br}$, $\cdot\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{O}i\text{-Pr})_2$ et de $\cdot\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ (entrées 5, 8, 10 et 11) n'est probablement pas dû à une électrophilie insuffisante pour cette double liaison riche en électrons, mais plutôt à leur faible réactivité comparée aux radicaux fluoro- et difluorométhyles. L'utilisation de radicaux à la fois plus réactifs et plus électrophiles tels que $\cdot\text{CF}_2\text{CO}_2\text{Et}$ et $\cdot\text{CH}(\text{CO}_2\text{Et})_2$ semble particulièrement adaptée à notre substrat.

L'effet positif d'un solvant polaire pour les réactions initiées par le triéthylborane est conforme au comportement général des radicaux fluorocarbonés, qui, lors d'une addition sur une double liaison riche en électrons, engendrent un état de transition également polarisé.

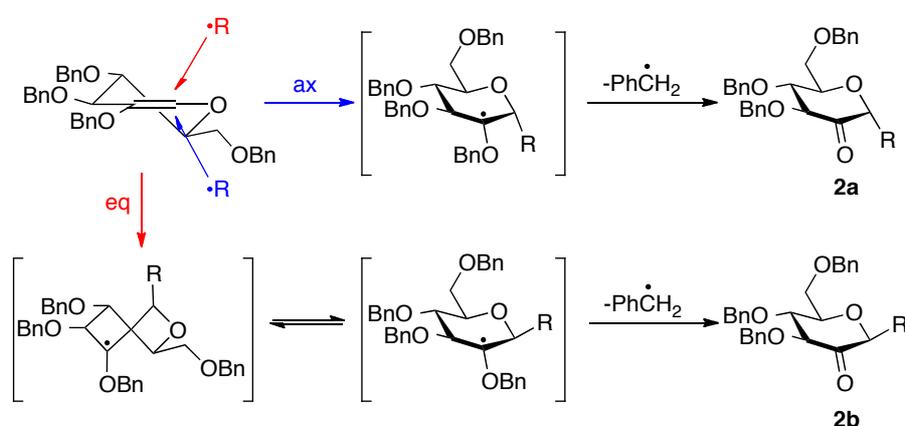


Schéma 36 : Diastéréosélectivité de l'addition radicalaire du 2-benzyloxy-D-glucal

Enfin, la sélectivité α de cette réaction s'explique facilement par le fait qu'une attaque sur la face pro- β donne un premier intermédiaire *twist* haut en énergie et est donc défavorisée.¹⁰⁶ A cette première discrimination s'ajoute, en série galactose, une interaction

¹⁰⁴ Buttle, L. A.; Motherwell, W. B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3995-3998.

¹⁰⁵ (a) Tony, K. A.; Denton, R. W.; Dillhas, A.; Jiménez-Barbero, J.; Mootoo, D. R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1441-1444. (b) De Vleeschouwer, F.; Van Speybroeck, V.; Waroquier, M.; Geerlings, P.; De Proft, F. *J. Org. Chem.* **2008**, *68*, 9109-9120.

¹⁰⁶ (a) LeBel, N. A.; Czaja, R. F.; DeBoer, A. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3112-3126. (b) Beckwith, A. L. J. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 3073-3100.

stérique défavorable entre le groupement benzyloxy en position *pseudo*-axiale et le radical approchant sur la face pro- β , rendant la sélectivité totale dans ce cas.

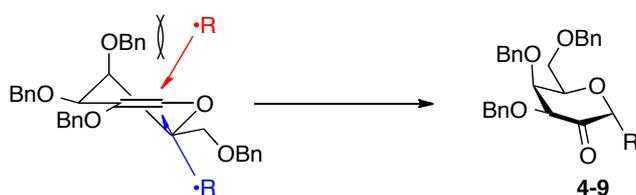


Schéma 37 : Diastéréosélectivité de l'addition radicalaire du 2-benzyloxy-D-galactal

1.1.3. Réduction de la fonction cétone

La réduction des 2-cétohexopyranosides **2** et **4-9** a ensuite été étudiée. Une simple réduction au borohydrure de sodium des dérivés **2a** et **2b** permet d'obtenir les C-glycosides correspondants. Une réduction à basse température est nécessaire pour éviter une réduction simultanée de la fonction difluoroester très activée. L'utilisation d'un excès de borohydrure de sodium à température ambiante fournit en effet le diol **10** avec 68% de rendement. Une réduction sélective de la fonction cétone est par contre possible à -78°C et l' α -C-glucoside **11** et le β -C-mannoside **12** sont obtenus avec des rendements convenables et sous forme d'un seul diastéréomère (RMN ^{19}F).⁹⁸

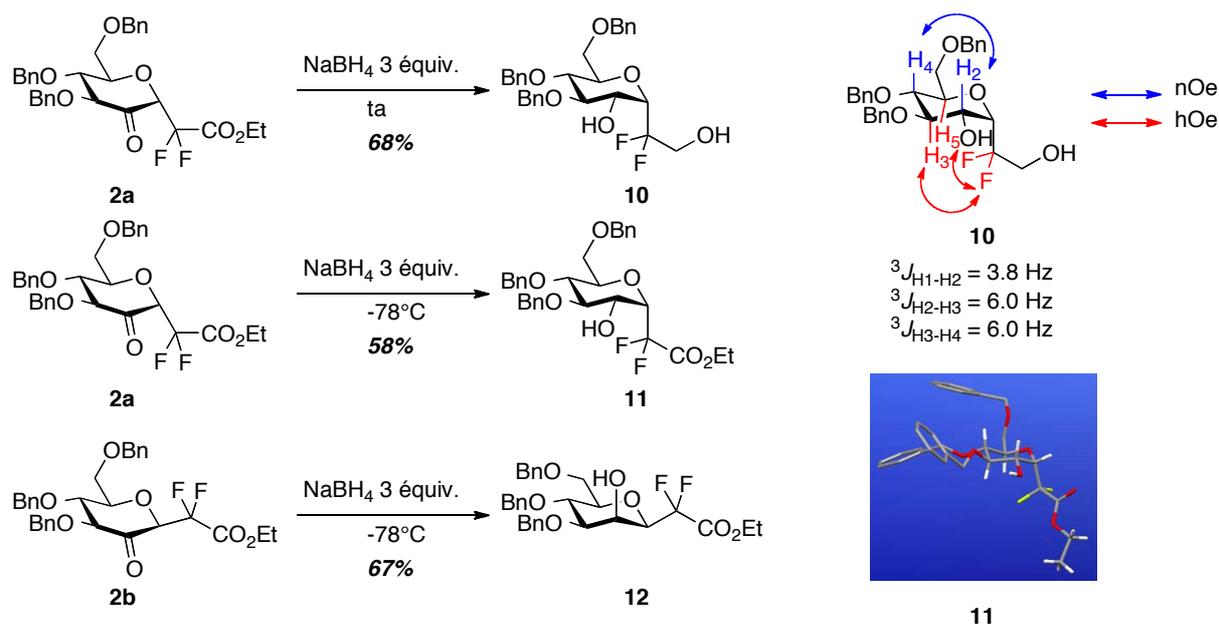


Schéma 38 : Réduction du carbonyle en présence de borohydrure de sodium

La configuration α -glucoside de **10** et **11** a été prouvée grâce à des expériences RMN NOESY et HOESY sur **10**, les constantes de couplages $^1\text{H}/^1\text{H}$ ne permettant pas de conclure. Un cliché de diffraction des rayons X de **11** est venu confirmer l'analyse RMN. La configuration β -mannoside de **12** a par contre été immédiatement déterminée à la seule lecture des constantes de couplage qui sont cette fois en accord parfait avec cette configuration sous une conformation classique $^4\text{C}_1$. Ces stéréosélectivités sont conformes aux données de la littérature concernant la réduction d' α - et de β -2-ceto-D-arabino-hexapyranosides.¹⁰⁷ En effet, la réduction de ce type de composés est gouvernée par la configuration du centre anomérique ou *pseudo*-anomérique, l'hydrure attaquant en *anti* du groupement placé en cette position.

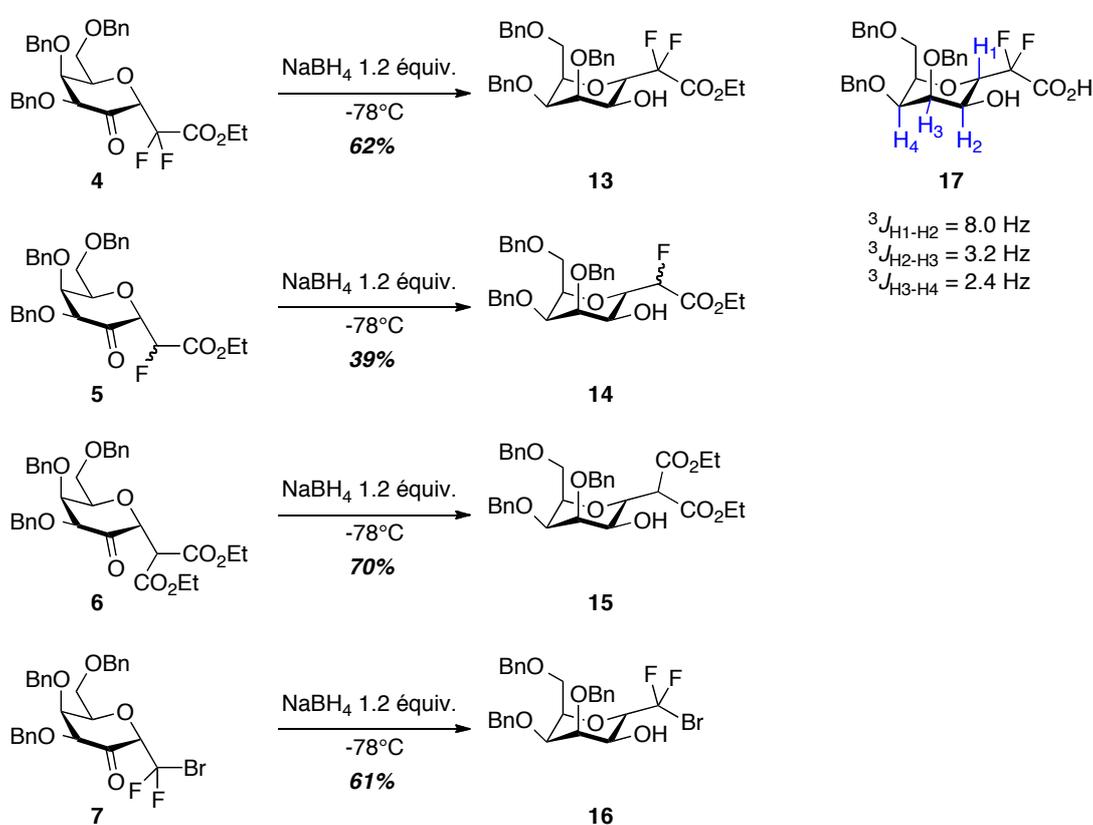


Schéma 39 : Réduction du carbonyle en présence de borohydrure de sodium

L'utilisation de ces conditions sur les dérivés de galactose **4-7** s'est révélée également efficace puisque les composés **13-16** sont obtenus avec des rendements satisfaisants et sous la forme d'un seul diastéréomère dans chaque cas. Malheureusement, la diastéréosélectivité est

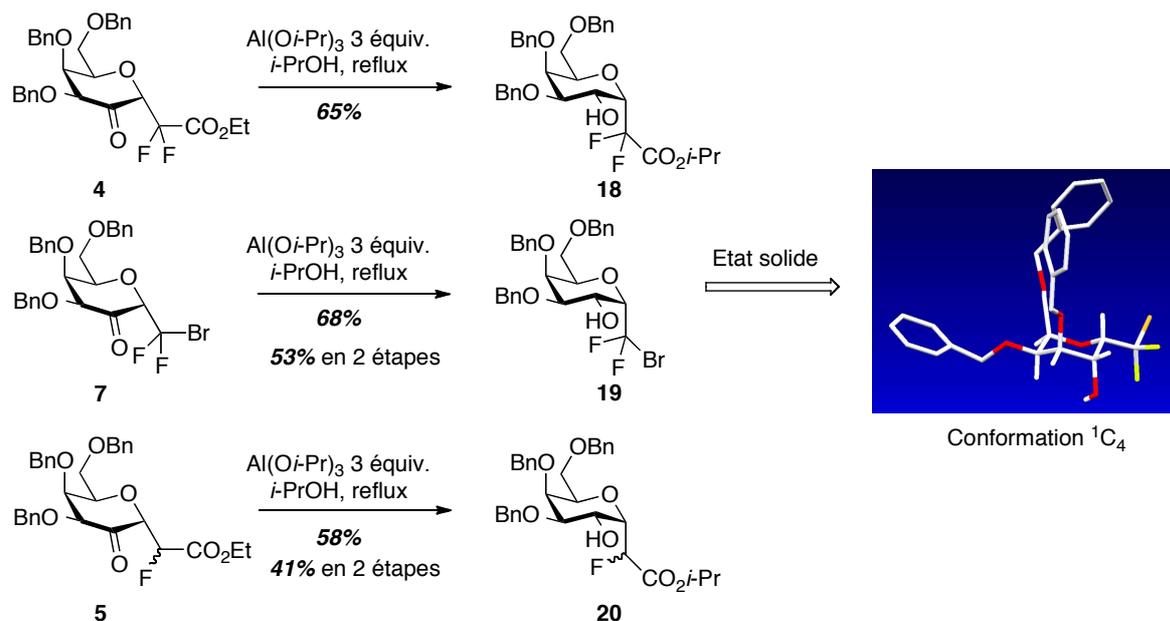
¹⁰⁷ (a) Lichtenthaler, F. W.; Lergenmüller, M.; Peters, S.; Varga, Z. *Tetrahedron : Asymm.* **2003**, *14*, 727-736.
 (b) Lichtenthaler, F. W.; Lergenmüller, M.; Schwidetzky, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3094-3103.

inversée par rapport aux dérivés de glucose et nous n'obtenons pas les α -C-galactosides souhaités mais des analogues d' α -D-talose.⁹⁸ Cette configuration relative a été prouvée non sans difficulté, les expériences RMN menées sur **13-16** ne donnant aucune information significative (corrélation NOESY ou constantes de couplage). En revanche, les constantes de couplage du dérivé **17** ont pu être extraites et étaient caractéristiques d'une disposition axiale-axiale-équatoriale des protons H₁-H₂-H₃, seulement compatible avec la configuration α -D-talose sous une conformation ¹C₄. Bien que décevante, cette inversion de diastéréosélectivité par rapport à la série glucose a déjà été mentionnée dans la littérature pour la réduction d'autres 2-oxogalactosides.¹⁰⁸ D'autres hydrures ont été testés (DIBAH, L-Selectride, Et₃BHLi, ...) mais pour conduire aux mêmes résultats. Nous souhaitions tirer parti de la présence du groupement hydroxyle libre en position 2 pour réaliser des réactions de type S_N2 afin d'obtenir les analogues d' α -D-galactose souhaités. Les réactions de Mitsunobu que nous avons testées ont cependant été inefficaces et des essais de substitution de triflate dérivé de la molécule **13** n'ont conduit qu'à l'obtention du produit d'élimination.

Les réductions avec des hydrures métalliques étant vraisemblablement sous contrôle cinétique, nous avons émis l'hypothèse que cette diastéréosélectivité pourrait être inversée sous contrôle thermodynamique. Un transfert d'hydrure réversible favoriserait en effet le diastéréomère le plus stable que nous pensions être le produit **13** du fait de la forte interaction 1,3-diaxiale entre les substituants en C-3 et C-5. La réduction de Meerwein-Ponndorf-Verley (MPV) est une réduction réversible par transfert d'hydrure bien connue qui pouvait nous permettre de vérifier cette hypothèse.¹⁰⁹ Nous avons très rapidement pu constater que l'utilisation de conditions classiques (*iso*-propoxide d'aluminium au reflux de l'*iso*-propanol) était efficace puisque les CF₂-glycosides **18-20** furent obtenus avec de bons rendements et sous forme d'un seul diastéréomère. Ces conditions sont de plus compatibles avec une réduction directe du brut réactionnel des additions radicalaires, ce qui n'était pas le cas des réductions au borohydrure. Ce processus d'une seule purification sur deux étapes permet d'augmenter sensiblement les rendements globaux, particulièrement dans le cas de **7**. Éviter la purification de ce composé sensible permet en effet d'obtenir un rendement de 53% sur deux étapes au départ du galactal **3** (une chute du rendement à 41% est constatée lorsque la réaction est effectuée sur une échelle de 1g).

¹⁰⁸ Cipolla, L.; La Ferla, B.; Lay, L.; Peri, F.; Nicotra, F. *Tetrahedron : Asymm.* **2000**, *11*, 295-303.

¹⁰⁹ De Graauw, C. F.; Peters, J. A.; Van Bekkum, H.; Huskens, J. *Synthesis* **1994**, 1007-1017.



Sch\u00e9ma 40 : R\u00e9duction du carbonyle selon les conditions de Meerwein-Ponndorf-Verley

Les donn\u00e9es analytiques de **16** et **19** montrent clairement que ces compos\u00e9s sont diast\u00e9r\u00e9om\u00e8res l'un de l'autre et donc que **19** est bien l' α -CF₂-galactose recherch\u00e9. L'ester \u00e9thylique de **4** est converti en ester *iso*-propylique dans les conditions de MPV mais la saponification de **13** et **18** conduit \u00e9galement \u00e0 un couple de diast\u00e9r\u00e9om\u00e8re et permet donc d'attribuer la configuration α -galactose \u00e0 **18**. Un clich\u00e9 de diffraction X effectu\u00e9 sur le compos\u00e9 **19** est venu finalement confirmer la configuration du centre en C-2, bien que ce compos\u00e9 cristallise sous une conformation chaise 1C_4 .

La r\u00e9versibilit\u00e9 de la r\u00e9action a \u00e9t\u00e9 test\u00e9e par diverses exp\u00e9riences. Le compos\u00e9 **13** (suppos\u00e9 \u00eatre le diast\u00e9r\u00e9om\u00e8re cin\u00e9tique) a \u00e9t\u00e9 converti en ester *iso*-propylique **21** qui a \u00e9t\u00e9 plac\u00e9 dans des conditions de r\u00e9duction MPV en utilisant l'ac\u00e9tone ou la 3-pentanone comme co-oxydant. Aucune \u00e9quilibration vers le diast\u00e9r\u00e9om\u00e8re suppos\u00e9 "thermodynamique" **18** n'a \u00e9t\u00e9 observ\u00e9e dans ces conditions. Le potentiel d'oxydation de ces deux c\u00e9tones \u00e9tant peut-\u00eatre trop bas pour promouvoir la r\u00e9action inverse, nous nous sommes plac\u00e9s dans les conditions exactes de notre r\u00e9action. Ces deux c\u00e9tones ont en effet \u00e9t\u00e9 remplac\u00e9es par 1.2 \u00e9quivalent du 2-oxopyranoside de d\u00e9part **4** mais, apr\u00e8s quelques heures au reflux de l'*iso*-propanol, seul un m\u00e9lange des compos\u00e9s **21** et **18** en proportion 1:1.2 a \u00e9t\u00e9 obtenu. Le diast\u00e9r\u00e9om\u00e8re "cin\u00e9tique" **21** n'a donc pas \u00e9t\u00e9 touch\u00e9, aucune \u00e9quilibration n'a lieu et la r\u00e9action ne semble donc pas r\u00e9versible. Une \u00e9tude de Burke et al. a r\u00e9cemment montr\u00e9 que, lors d'une r\u00e9duction MPV diast\u00e9ros\u00e9lective, c'\u00e9tait le diast\u00e9r\u00e9om\u00e8re thermodynamiquement le plus stable qui \u00e9tait

obtenu alors même que l'irréversibilité de la réaction avait été démontrée.¹¹⁰ L'état de transition tardif propre à ce type de réduction avait été mis en avant pour expliquer ce résultat et un raisonnement similaire pourrait donc être effectué dans notre cas.

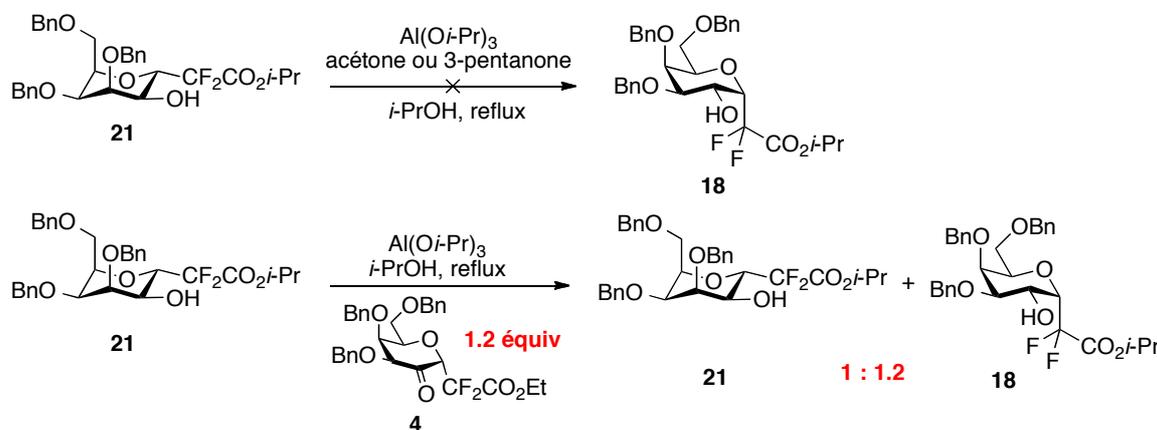


Schéma 41

La stéréosélectivité des différentes réactions de réduction peut alors être rationalisée. La réduction au borohydure des dérivés de glucose **2a** et **2b** procède, en accord avec la littérature, par une attaque de l'hydruure en *anti* du groupement placé en position *pseudo*-anomérique. L'inversion de stéréosélectivité pour les dérivés de galactose **4-7** provient vraisemblablement d'une interaction 1,3-diaxiale entre le groupement benzyloxy en C-4 et l'hydruure approchant qui serait plus déstabilisante que l'interaction gauche existant dans l'approche sur la face opposée. Enfin, si les énergies relatives des deux diastéréomères possibles sont responsables de la sélectivité observée, la forte interaction 1,3-diaxiale qui s'exerce sur les intermédiaires **B** et **B'** favorise probablement la formation de **A** et des composés **18-20**.

¹¹⁰ Dilger, A. K.; Gopalsamuthiram, V.; Burke, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16273-16277.

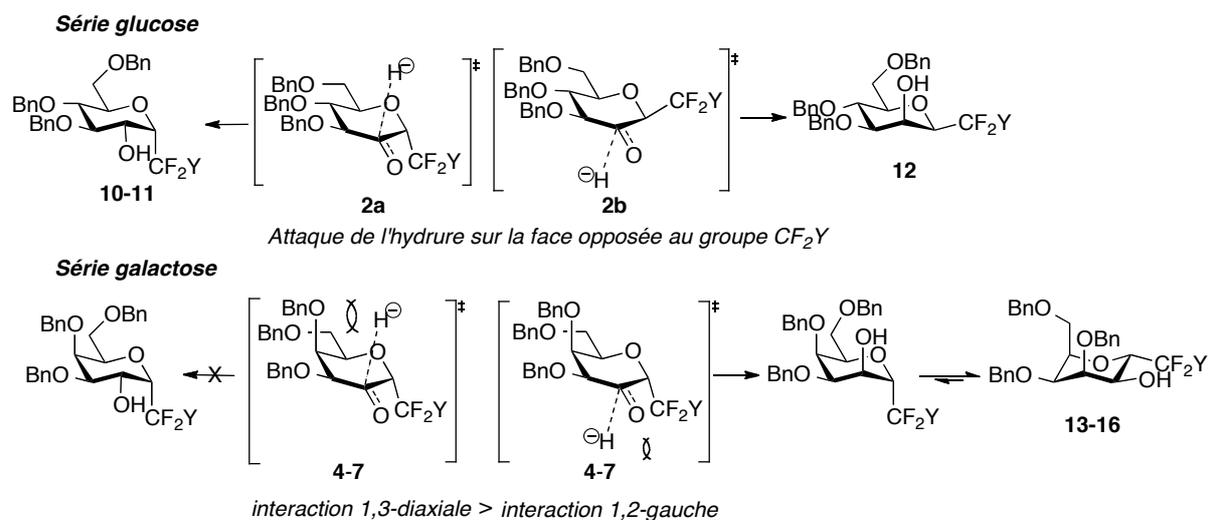
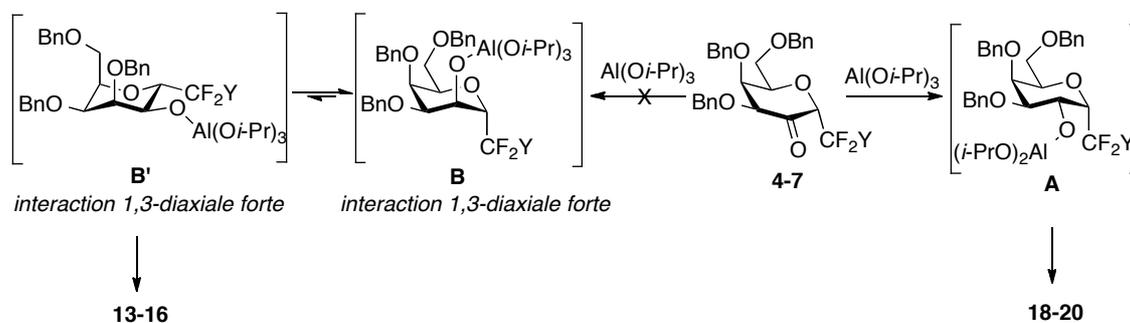
Réductions au borohydure

Réductions MPV


Schéma 42 : Stéréosélectivité des réactions de réductions

1.2. Fonctionnalisation des α -CF₂-galactosides

Le but ultime de cet axe de recherche étant de synthétiser des mimes de glycoconjugués à potentiel thérapeutique, il nous restait à mettre au point des méthodologies permettant d'introduire les chaînes aglycones ciblées (amino-acides, lipides,...). Nous devons plus particulièrement mettre au point des réactions de formation de liaison C–C à partir des différents synthons C-glycosidiques préparés précédemment.

1.2.1. Réactions de Horner-Wadsworth-Emmons

La fonction ester des glycosylacétates se prêtait particulièrement à ce type de transformation. La réduction de la fonction ester en aldéhyde permet en effet d'envisager divers types de formation de liaison C–C. La réaction de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) nous permet de mettre en place des fonctionnalités très utiles pour la synthèse de certains analogues non-hydrolysables de O-glycoconjugués et a donc été étudiée en premier lieu. La réduction au DIBAH des α -glycosylacétates mono- ou difluorés **22**, **25** ou **27** fournit les aldéhydes correspondants sous forme hémiacétalique. Le brut réactionnel est alors directement engagé dans une condensation avec le triéthylphosphonoacétate. Les énoates correspondants sont obtenus avec de bons rendements et l'hydrogénation du composé **23** montre que cette approche est viable pour réaliser des réactions d'élongation de la chaîne latérale de nos synthons C-glycosidiques.⁹⁸

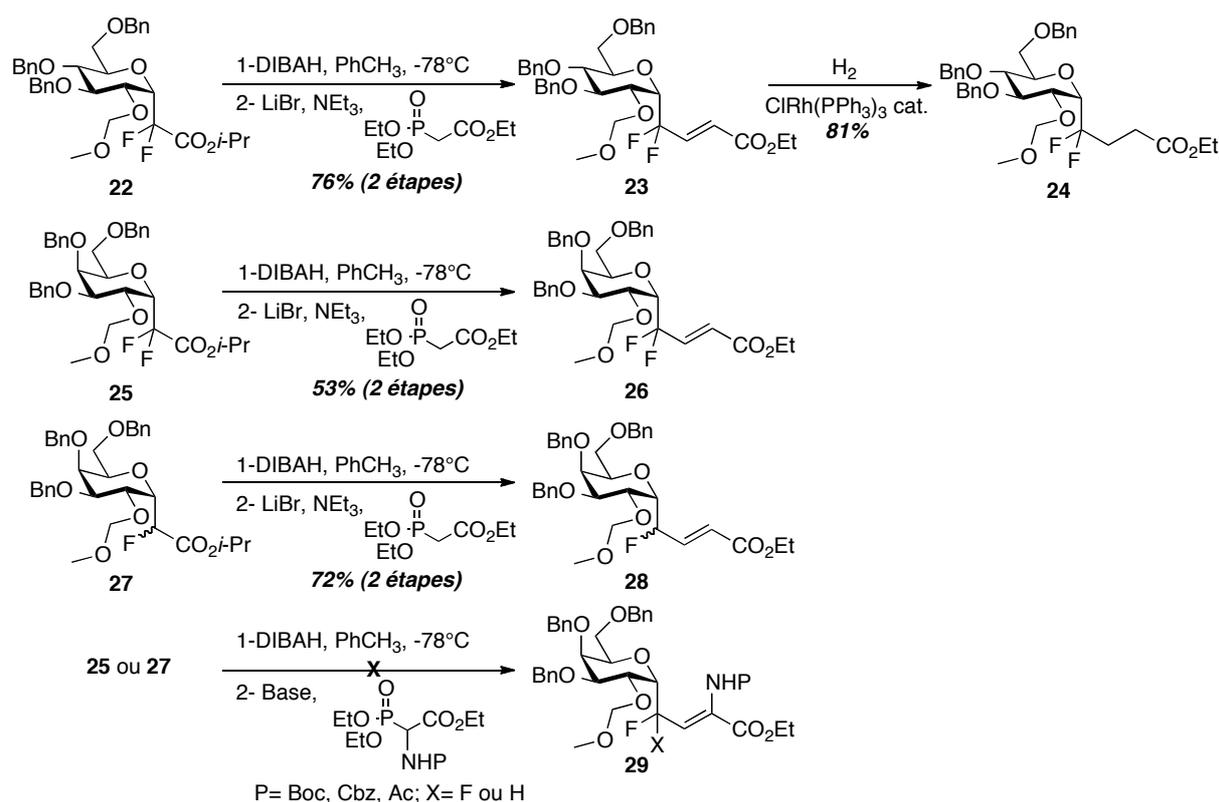


Schéma 43 : Réactions de Horner-Wadsworth-Emmons

La réussite d'une telle séquence en utilisant un α -amino- α -phosphonoacétate nous aurait permis d'accéder à des glycosyldéhydroaminoacides du type **29** qui, après hydrogénation asymétrique, conduiraient à des analogues de glycosylsérine. Malheureusement, tous nos essais de réactions de HWE avec de tels phosphonates sur l'hémiacétal dérivé de **25** se sont soldés par des échecs. Nous avons émis l'hypothèse que ce manque de réactivité était dû à la nature exclusivement hémiacétalique de l'intermédiaire réactionnel. Nous nous sommes alors penchés sur le cas du dérivé monofluoré **27** en espérant que ce substrat favoriserait le déplacement, en milieu basique, de l'équilibre aldéhyde/acétal vers la forme aldéhydique plus réactive mais le succès ne fut pas plus au rendez-vous. Ces résultats restent décevants sachant que de telles réactions ont déjà été décrites sur des difluoroacétates moins fonctionnalisés.¹¹¹

Cette réaction ne pourra cependant pas être utilisée pour la synthèse d'analogues d' α -galactosylcéramides car la construction de la chaîne aglycone devra se faire étape par étape ce qui est contraignant pour synthétiser ce type de molécules.

1.2.2. Réactions d'échange Br/Li et addition nucléophile intramoléculaire

Le groupement CF₂Br du CF₂-galactoside **19**, issu de l'addition radicalaire de CF₂Br₂ sur le galactal **3**, offrait un potentiel de fonctionnalisation intéressant. En effet, la réalisation d'un échange halogène/métal suivi d'une addition sur les électrophiles appropriés permettraient d'introduire en position *pseudo*-anomérique une large variété de chaînes aglycones. Nous étions toutefois circonspects quant à la stabilité thermique du lithien RCF₂Li résultant de l'échange, du fait de son caractère potentiel de carbénoïde. La réalisation d'un échange Br/Li à -78°C sur le composé protégé par un éther de MOM **30** a confirmé ces craintes. En effet, que ce soit en présence ou en absence d'électrophile, seul le produit **31**, issu d'un réarrangement de Fritsch-Buttenberg-Wiechell, est formé lorsque l'ajout de *n*-BuLi est réalisé à cette température. Le potentiel synthétique intéressant de **31** nous a incités à essayer d'améliorer le faible rendement de ce réarrangement thermique typique des carbénoïdes, largement décrit en série sp² mais plus rare en série sp³.¹¹² L'abaissement de la température

¹¹¹ (a) Lamar, J.; Hu, J.; Bueno, A. B.; Yang, H.-C.; Guo, D.; Copp, J. D.; McGee, J.; Gitter, B.; Timm, D.; May, P.; McCarthy, J.; Chen, S.-H. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 239-243. (b) Hu, Z.; Han, W. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 901-902.

¹¹² (a) Braun, M. in *The Chemistry of Organolithium Compounds* (Eds.: Z. Rappoport, I. Marek), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, **2004**, pp 829-900. (b) Capriati, V.; Florio, S. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4152-4162. (c) Jahnke, E.; Tykwinski, R. R. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3235-3249.

d'échange à -95°C semble stabiliser l'organolithien et une simple remontée à -70°C permet d'obtenir le composé **31** avec un rendement qui plafonne malheureusement à 42%. Des essais de transmétallation en zincique, cuivreux ou magnésien furent infructueux. L'espèce lithiée paraissant à peu près stable à -95°C , un essai d'addition sur l'aldéhyde de Garner a été réalisé pour fournir le composé **32** avec un rendement de 45%. Ce résultat s'est cependant révélé faiblement reproductible, la stabilité thermique du lithien à -95°C semblant trop précaire pour exploiter efficacement des réactions d'addition intermoléculaires.

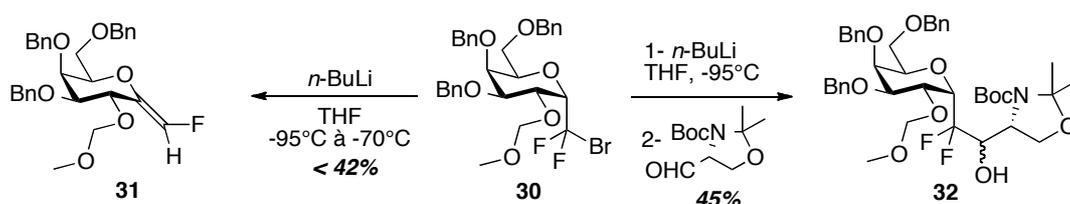


Schéma 44 : Réaction d'échange halogène/métal et addition nucléophile intermoléculaire

Un résultat a cependant retenu notre attention pendant ces investigations: la réalisation d'un échange halogène métal sur le dérivé silylé **33** conduit spontanément à une migration du groupement TBS de O-2 à C-1' pour fournir le composé **34** avec un rendement non optimisé de 44%.

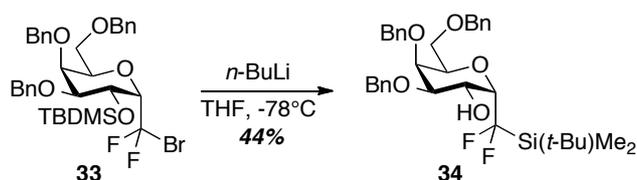


Schéma 45 : Echange halogène/métal sur le dérivé silylé

Un piégeage intramoléculaire du dérivé CF_2Li est alors apparu comme une méthode de choix pour résoudre le problème de stabilité de ce lithien et relancer son exploitation synthétique. Une addition de $n\text{-BuLi}$ à -78°C sur le dérivé acétylé **35** conduit à une addition du lithien sur l'acétate voisin et nous permet d'isoler l'hémiacétal **36** avec un rendement de 75%.¹¹³ Une réduction de ce composé fournit l'alcool **37** avec un rendement de 58% et cette

¹¹³ Pour une réaction similaire de cyclisation d'une espèce difluoromethylithié, voir: (a) Timofte, R. S.; Linclau, B. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3673-3676. (b) Linclau, B.; Boydell, A. J.; Timofte, R. S.; Brown, K. J.; Vinader, V.; Weymouth-Wilson, A. C. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 803-814.

séquence en deux étapes correspond à une addition formelle du lithien dérivé de **19** sur l'acétaldéhyde.

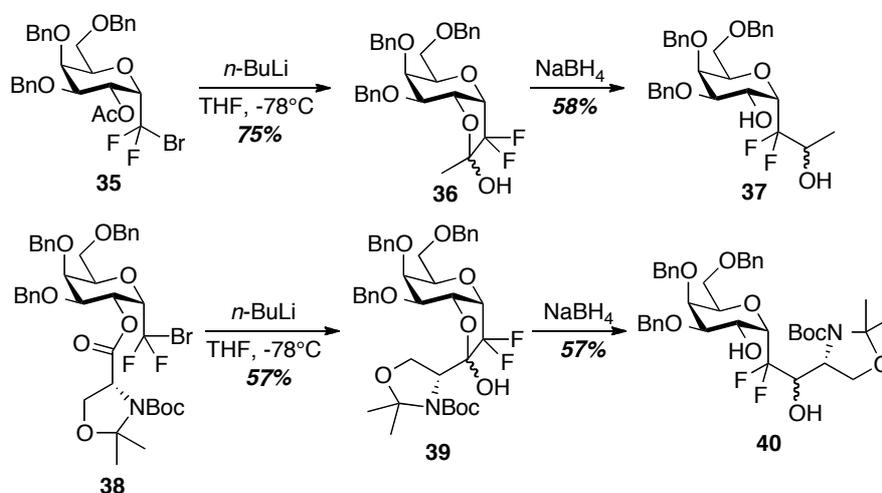


Schéma 46 : Fonctionnalisation de l'α-CF₂-galactoside

Cette migration réductrice d'un ester de l'oxygène en position 2 au carbone *pseudo*-anomérique (C-1') est alors apparue comme une approche efficace et originale aux analogues de O-glycoconjugués si un ester hautement fonctionnalisé était introduit. Afin de vérifier si cette réaction était compatible avec de telles fonctionnalités, l'ester **38** a été préparé à l'aide d'un couplage au DIPC entre **19** et la *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène-D-sérine (85% de rendement). L'échange Br/Li, effectué au *n*-BuLi à -78°C, aboutit à une addition sur l'ester voisin et l'hémiacétal **39** est isolé avec un rendement de 57%. À notre grande satisfaction, une réduction au borohydrure fournit l'α-C-galactoside fonctionnalisé **40** avec un rendement de 57%.

Le dérivé bromodifluorométhylé **19** apparaît donc comme un synthon de choix en vue de la synthèse d'analogues de glycoconjugués du fait de son potentiel de fonctionnalisation. Une réaction d'échange Br/Li suivie d'une addition nucléophile sur un électrophile approprié pourraient en effet permettre de transférer un large éventail de chaînes latérales. Si les additions intermoléculaires restent sans doute exploitables à très basse température, la réaction d'addition intramoléculaire sur un ester en O-2 est sans doute préférable pour introduire des chaînes aglycones hautement fonctionnalisées, notamment α-aminées. En effet, la stabilité chimique et configurationnelle des esters α-aminés étant largement supérieure à celle des aldéhydes correspondants, la préparation des précurseurs de chaînes aglycones en serait facilitée.

La découverte de cette réaction nous a alors permis d'affiner notre schéma rétrosynthétique pour la préparation d'analogues CF₂-glycosidiques de l' α -galactosylcéramides. Nos cibles **I** pourraient être obtenues par déshydroxylation en 2' du composé **II**. En se basant sur les travaux ci-dessus, cet intermédiaire peut être synthétisé à partir de l'hémiacétal **III** par une réduction. Ce précurseur **III** peut provenir de l'ester **IV** par la séquence clé d'échange halogène/métal suivie d'un addition intramoléculaire sur l'ester voisin. Celui-ci peut être issu du couplage entre l'alcool se situant en position 2 sur le sucre fluoré **V** et l'acide carboxylique **VI**. La synthèse du sucre fluoré peut être réalisée à partir du glycal **VII** par une addition radicalaire de dibromodifluorométhane alors que l'acide carboxylique **VI** peut être obtenu à partir de l'aldéhyde de Garner **VIII**.

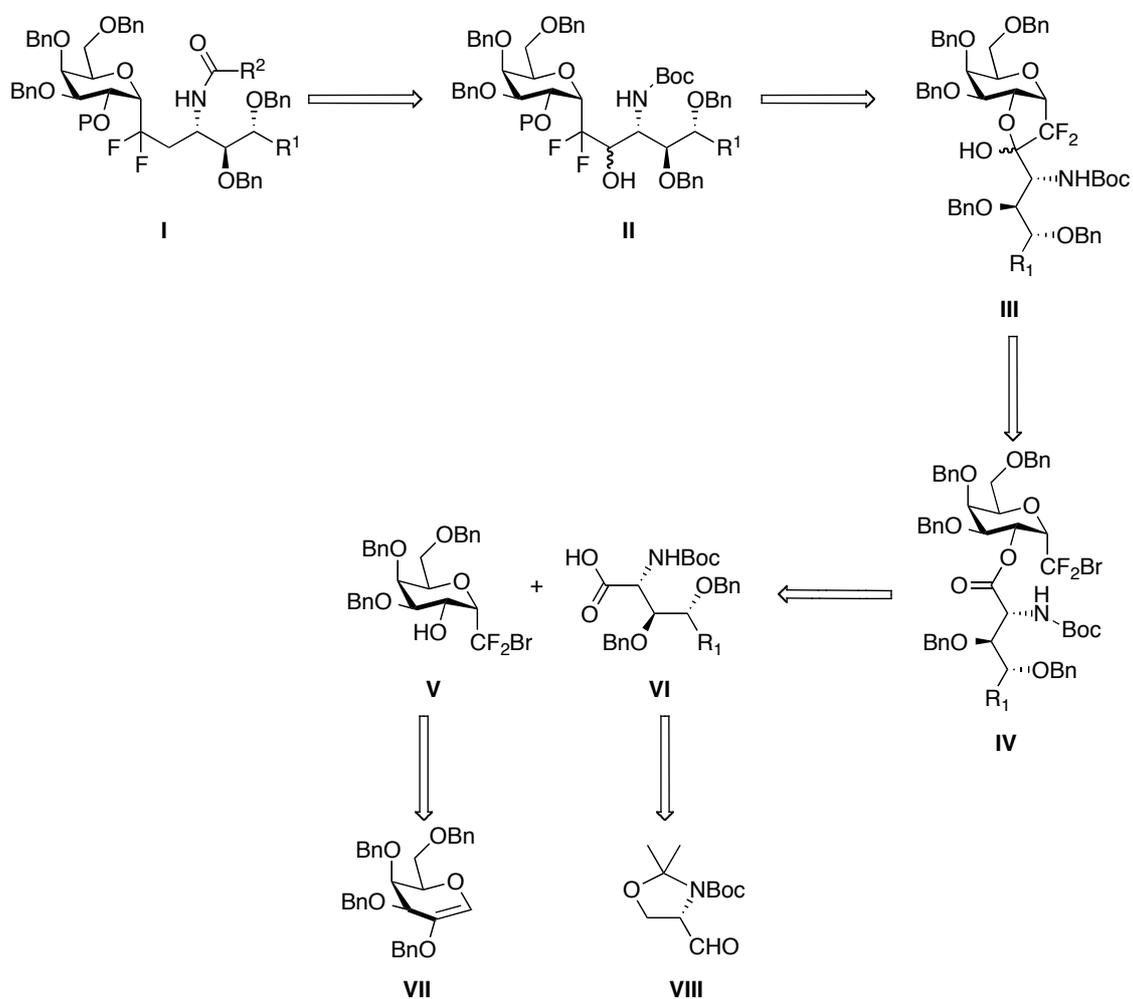


Schéma 47 : Schéma rétrosynthétique

Un aperçu de la bibliographie concernant la synthèse des chaînes phytosphingosines ainsi que la méthode retenue pour préparer les acides **VI** sont exposés dans la partie suivante.

2. Synthèse de la chaîne phytosphingosine

2.1. Bibliographie

Les sphingolipides sont des importantes composantes structurales et fonctionnelles des membranes plasmiques de la quasi-totalité des cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques comme la réponse immunitaire ou la reconnaissance cellulaire. Les plus importants sphingolipides naturels sont les sphingosines et les phytosphingosines qui, lorsqu'ils sont associés à une chaîne grasse et à un galactose, forment la famille des galactosylcéramides.

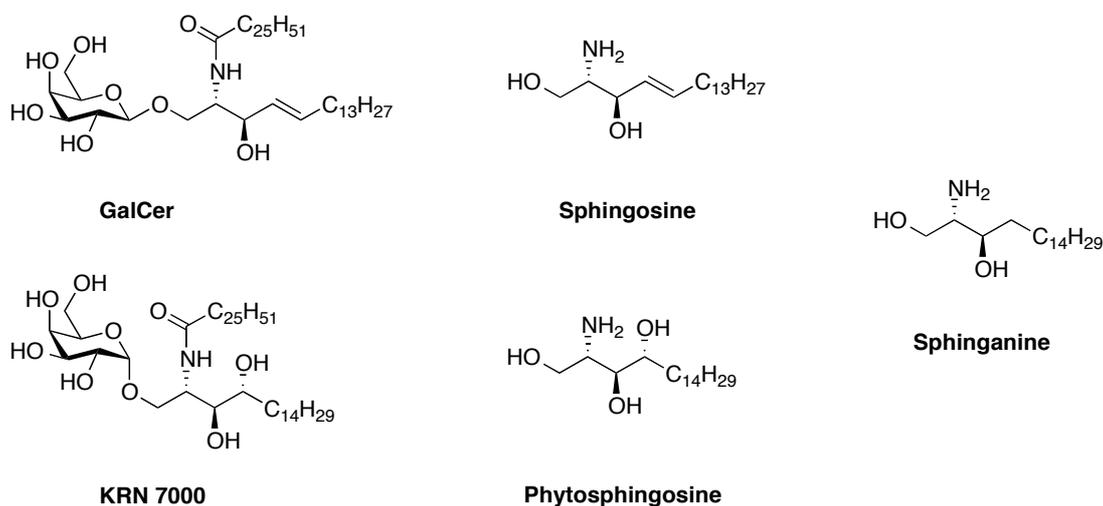


Schéma 48 : Les sphingolipides

Les sphinganine comptent parmi les sphingolipides non naturels les plus intéressants grâce à leur importance médicinale.¹¹⁴ Dans cette partie, nous nous sommes uniquement intéressés à la synthèse de chaînes type phytosphingosine présente sur le KRN 7000 qui est principalement synthétisée à partir de réaction de dihydroxylation.

L'une des premières synthèses de chaînes phytosphingosines a été publiée en 1996 par l'équipe de Yoda et Takabe.¹¹⁵ Le lactame hydroxylé **42** a été obtenu à partir de l'acide D-glutamique hydroxylé et a ensuite été protégé par un groupement silyle puis par un carbamate

¹¹⁴ Kumar, P.; Dubbey, A.; Puranik, V. G. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5074-5086.

¹¹⁵ Yoda, H.; Oguchi, T.; Takabe, K. *Tetrahedron : Asymm.* **1996**, *7*, 2113-2116.

successivement. La formation de la double liaison a ensuite été réalisée par la formation et l'élimination d'un sélénoxide intermédiaire pour donner le lactame insaturé **43**. Après une réaction d'osmylation et une protection du diol sous forme d'acétonide, l'addition d'un organomagnésien, puis la réduction de l'hémiacétal résultant entraînent la formation du composé **45** avec de bons rendements. Une étape de déshydroxylation, réalisée en présence de thiocarbonyldiimidazole et d'hydrure de tributylétain, suivie de la déprotection de l'acétonide et de l'acétylation des alcools ainsi que de la fonction amine aboutit au produit souhaité **48**.

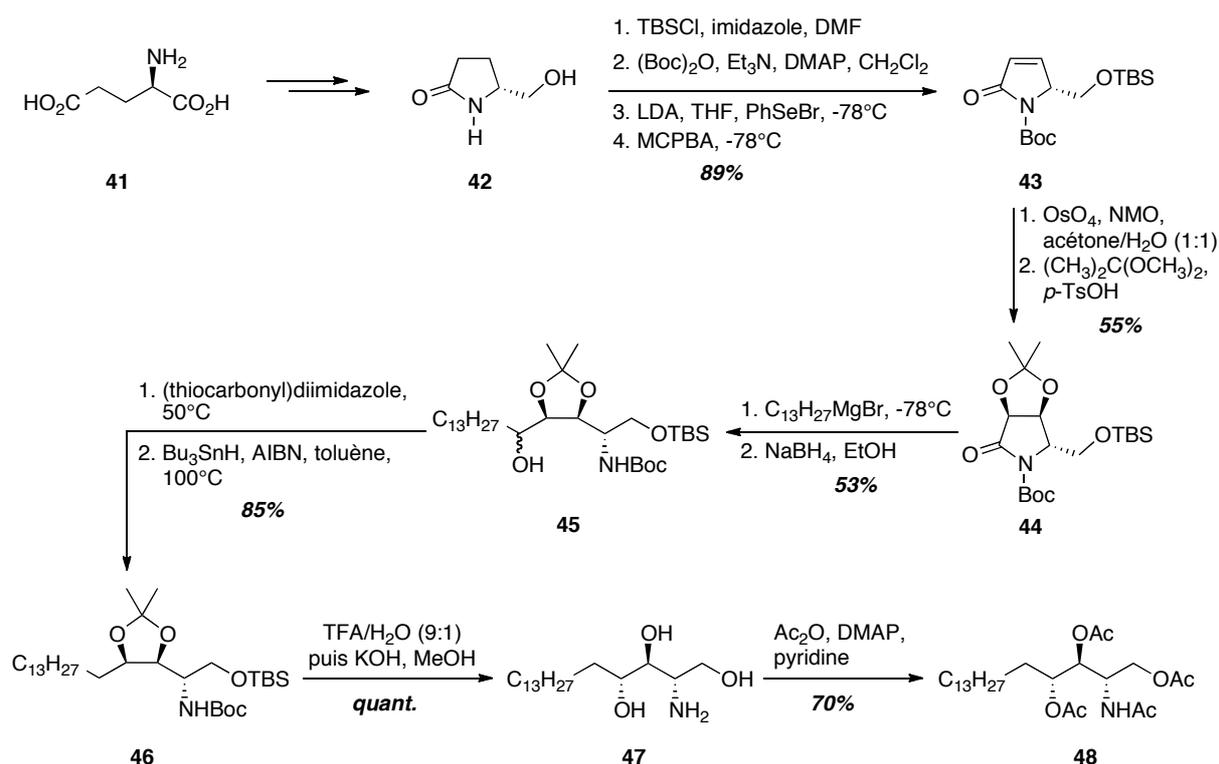


Schéma 49 : Synthèse d'une chaîne phytosphingosine selon Yoda et Takabe

En 1999, Shirota et Berova ont publié une synthèse de ces chaînes phytosphingosines à partir de la L-sérine et *via* l'aldéhyde de Garner.¹¹⁶ Une étape d'oléfination de Wittig entre cet aldéhyde et l'ylure de phosphonium correspondant est ensuite effectuée conduisant majoritairement à l'alcène **51** de configuration *Z* (*Z*:*E* = 9:1), puis une réaction de dihydroxylation de Sharpless sur le produit obtenu forme les isomères **52a** et **52b** dans un rapport diastéréomérique de 1:1. Les composés dihydroxylés ont ensuite été séparés sur gel de silice puis la déprotection de **52a**, réalisée en présence d'acide trifluoroacétique et d'eau, conduit à la chaîne phytosphingosine souhaitée **53** avec un rendement de 92%.

¹¹⁶ Shirota, O.; Nakanishi, K.; Berova, N. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13643-13658.

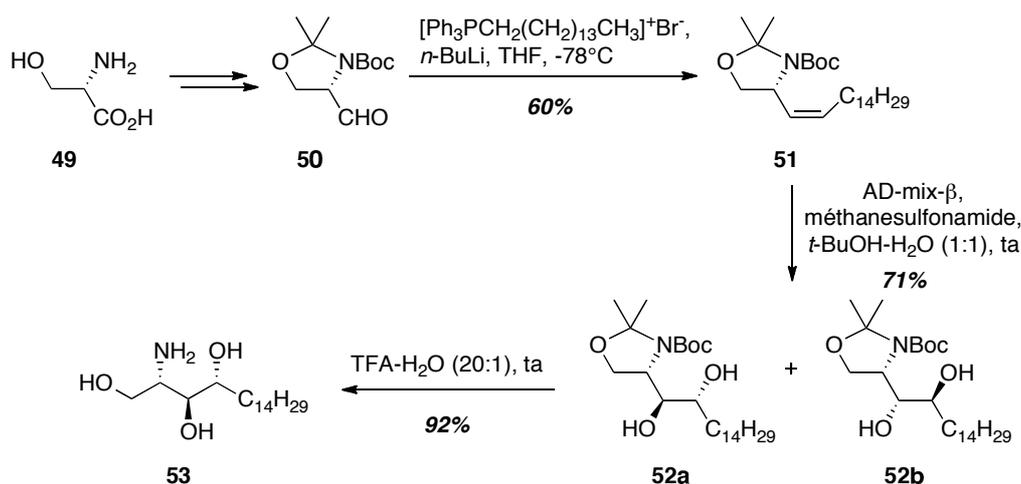


Schéma 50 : Synthèse d'une chaîne phytosphingosine selon Shirota et Berova

En 2000, Bittman et son équipe ont décrit une méthode énantiosélective très efficace pour la préparation de la chaîne *D-ribo*-phytosphingosine par un processus de dihydroxylation asymétrique.¹¹⁷ Après une dihydroxylation de Sharpless sur l'alcène **54** et une protection sélective de l'alcool secondaire, le composé **55** est obtenu avec 96% de rendement sur les trois étapes. L'oxydation de l'alcool en aldéhyde suivie d'une oléfination d'Horner-Wadsworth-Emmons entraînent la formation de l'ester insaturé **56** dans un rapport diastéréomérique de 36:1. Une nouvelle dihydroxylation de Sharpless sur l'ester insaturé **56** donne le composé **57** avec un rendement de 92% et un excès diastéréomérique de 91%. La formation d'un sulfate cyclique suivi de son ouverture sélective en présence d'azoture de sodium conduit sans difficulté au composé **59**. Enfin la suppression des différents groupes protecteurs ainsi que les réductions du groupement azoture et de la fonction ester permettent d'obtenir avec de bons rendements le *D-ribo*-phytosphingosine **53**.

¹¹⁷ He, L.; Byun, H. S.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7618-7626.

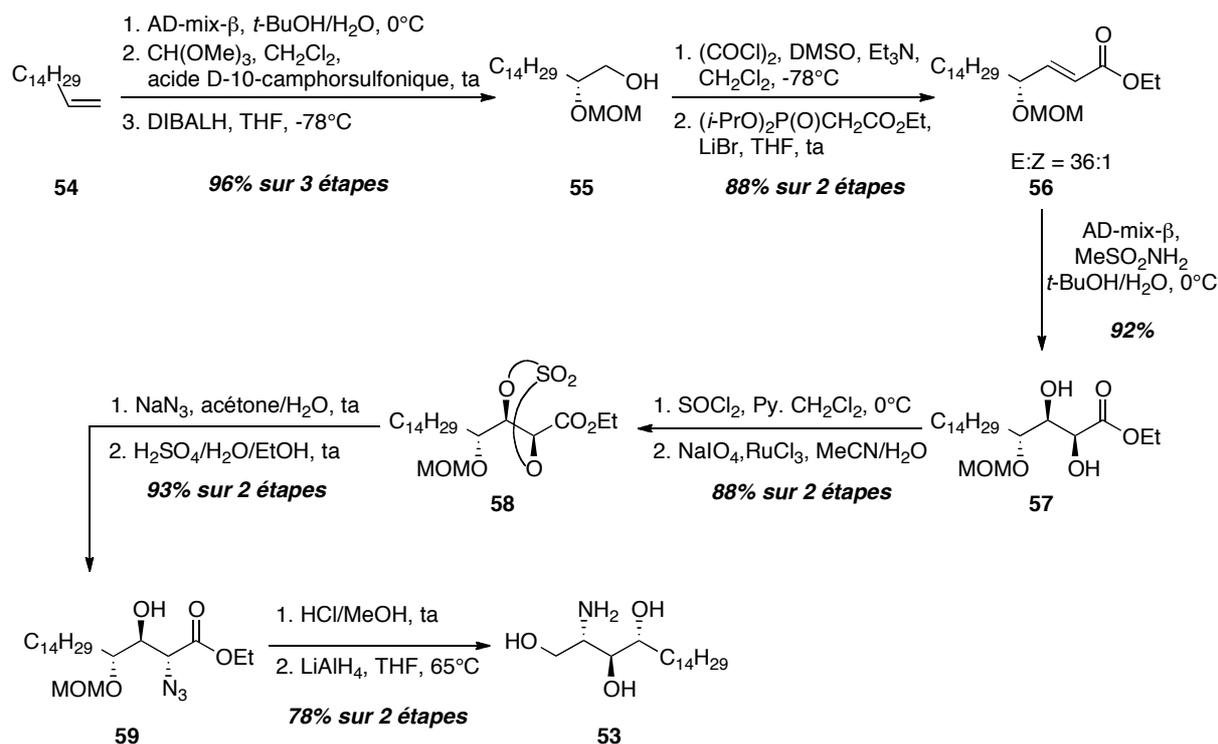


Schéma 51 : Synthèse d'une chaîne phytosphingosine selon Bittman

En 2004, le groupe de Savage a étudié la synthèse d' α -galactosylcéramide en préparant de manière plus courte et plus efficace les chaînes phytosphingosines à partir de l'aldéhyde de Garner.³⁹ Les oléfines **60** ont été préparées selon la stratégie du groupe de Berova c'est-à-dire à partir des ylures de phosphonium correspondants. Une étape d'osmylation en présence d'OsO₄ conduit aux diols **61a-c** et **62a-c** dans un rapport diastéréomérique 2:1. Ce résultat est surprenant puisque, comme vu plus haut, Bérova et son équipe obtiennent un ratio de 1:1 en utilisant les conditions de dihydroxylation asymétrique de Sharpless. Ensuite, la déprotection de l'acétonide, le couplage peptidique avec différentes longueurs de chaînes et l'acétylation des trois fonctions alcools sont effectués. Finalement la déprotection sélective de l'alcool primaire en quatre étapes conduit à six dérivés de chaînes phytosphingosines.

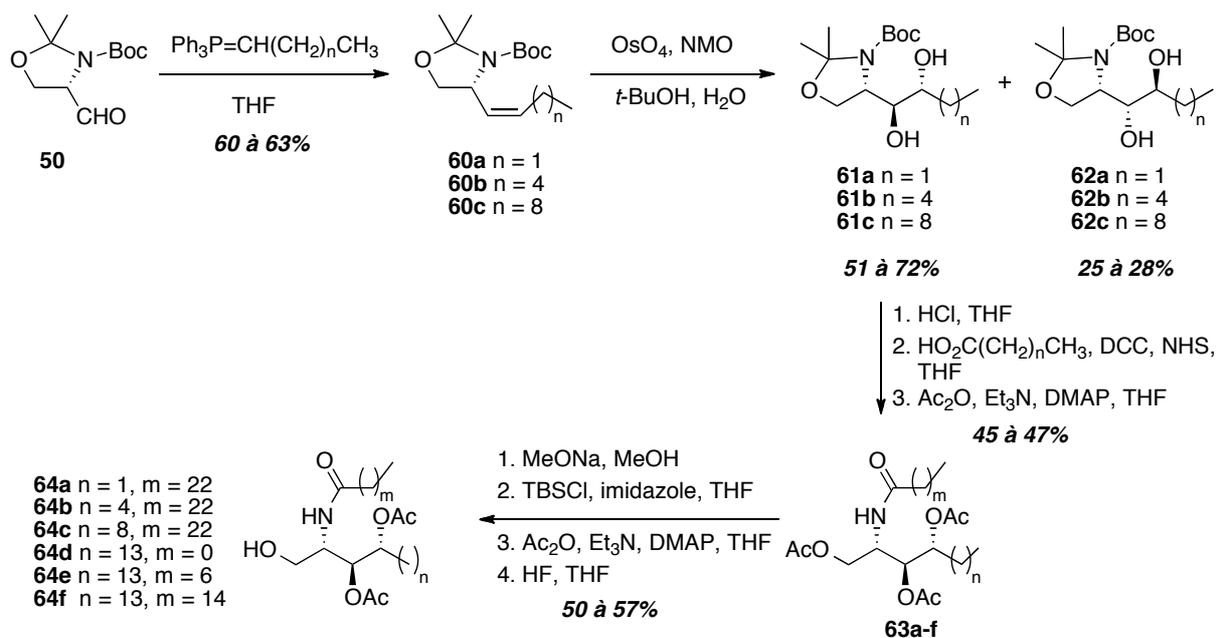


Schéma 52 : Synthèse de chaînes phytosphingosines selon Savage

La synthèse de chaînes phytosphingosines a donc été largement décrite. Nous nous sommes inspirés de ces différentes synthèses et plus particulièrement de la stratégie de Savage pour obtenir nos synthons phytosphingosines.

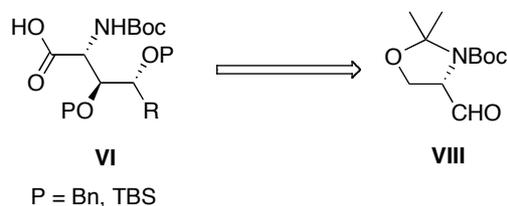


Schéma 53 : Schéma rétrosynthétique de la chaîne phytosphingosine

2.2. Synthèse de la partie céramide

L'acide carboxylique a donc été synthétisé suivant le schéma rétrosynthétique décrit précédemment. Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la préparation de l'aldéhyde de Garner **50** à partir de la L-sérine **49**.¹¹⁸ La première étape de synthèse consiste à réaliser une estérification de l'acide carboxylique. L'amine primaire a ensuite été protégée

¹¹⁸ (a) Garner, P.; Min Park, J. *Org. Synth.* **1998**, 300-307. (b) Dondoni, A.; Perrone, D. *Org. Synth.* **2004**, 320-327.

sous forme de carbamate en présence de $(\text{Boc})_2\text{O}$ pour former l'intermédiaire **66**. Une étape de protection sous forme d'acétonide a été engagée afin d'obtenir le composé **67** avec un rendement global pour ces trois étapes de 80%. L'aldéhyde de Garner **50** a ensuite été obtenu par réduction de l'ester en présence d'hydruure de di-*iso*-butylaluminium à -78°C .

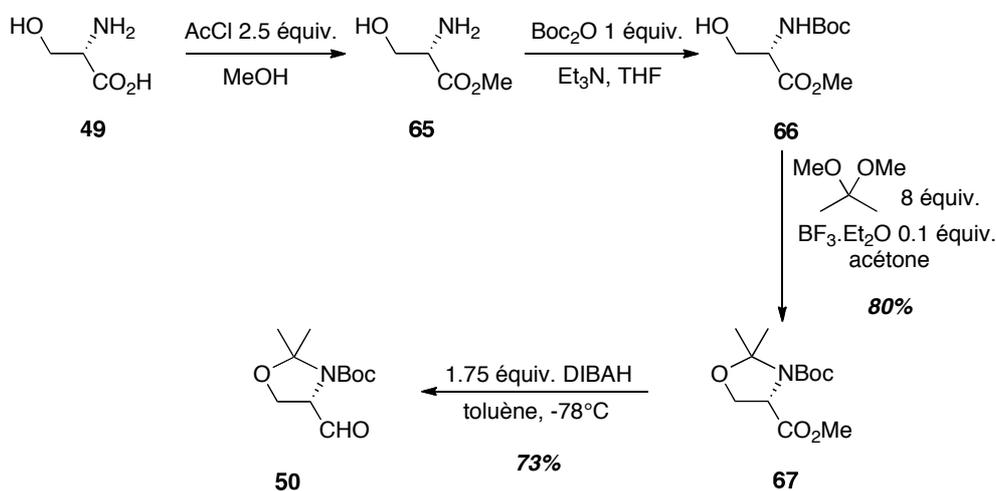


Schéma 54 : Synthèse de l'aldéhyde de Garner¹¹⁸

À partir de l'aldéhyde de Garner obtenu précédemment, une oléfination de Wittig a ensuite été effectuée en présence d'un ylure de phosphonium, préalablement synthétisé à partir du bromoalcane correspondant et de la triphénylphosphine,^{116,119} pour conduire majoritairement à l'alcène *Z* dans un rapport de 97:3. Les rendements de la réaction varient de 66% pour la chaîne la plus longue à environ 90% pour les deux autres chaînes plus courtes. Les travaux effectués sur la chaîne comportant 9 carbones ont été réalisés par Amandine Xolin, stagiaire CFI4 au laboratoire.

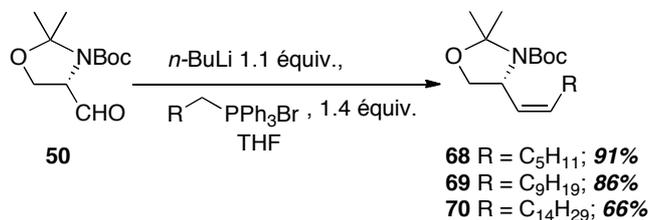


Schéma 55 : Oléfination de Wittig

¹¹⁹ (a) Kodato, S.-I.; Nakagawa, M.; Nakayama, K.; Hino, T. *Tetrahedron* **1989**, *23*, 7247-7262. (b) Al Dulayymi, J. R.; Baird, M. S.; Roberts, E. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11939-11951.

Une réaction d'osmylation a ensuite été effectuée sur les trois alcènes pour nous conduire aux diols correspondants dans un rapport diastéréomérique de 2:1 dans chacun des cas avec de bons rendements.

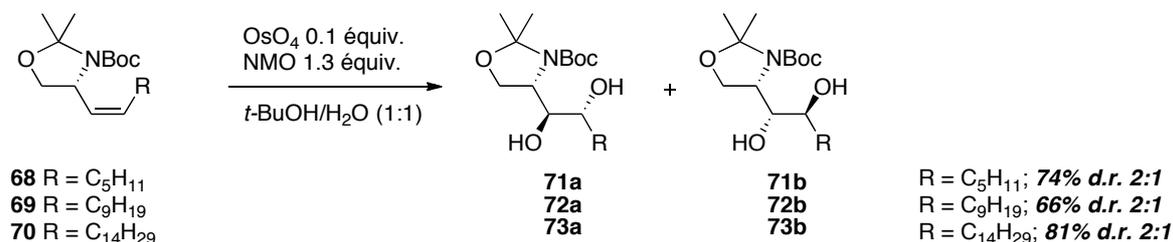


Schéma 56 : Réaction d'osmylation sur les alcènes Z.

Lors de cette étape, nous avons réussi à séparer les diastéréomères formés et ainsi nous avons pu engager les diastéréomères majoritaires **71a**, **72a** et **73a** dans une étape de protection des alcools. Dans un premier temps, différents essais de protection ont été réalisés sur le composé possédant la chaîne la plus courte afin d'optimiser les résultats. Les premiers essais de protection ont tout d'abord débuté par un groupement silyle. En présence de triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle et de triéthylamine dans le dichlorométhane à 0°C, le composé souhaité **74** a été obtenu quantitativement.

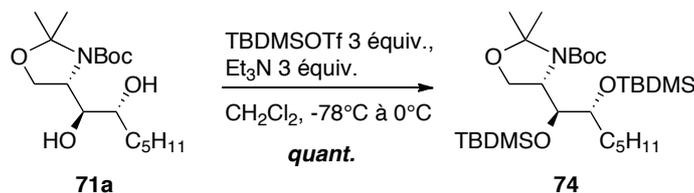


Schéma 57 : Protection des alcools à l'aide de triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle

Une fois silylé, ce produit a été engagé dans des réactions de déprotection de l'acétonide. Nous avons dans un premier temps effectué la réaction dans des conditions classiques, utilisant l'acide *para*-toluènesulfonique en quantité catalytique dans un mélange de méthanol et d'eau dans un rapport de 9:1.³³ Cependant, la conversion du précurseur en produit attendu n'est que de 15% au bout de 48 heures. Une autre stratégie de déprotection a donc été envisagée utilisant cette fois-ci un mélange d'acide trifluoroacétique et d'eau dans un

rapport 75:25.¹²⁰ Dans ces conditions, les résultats ont montré une conversion totale non pas en faveur du produit désiré mais du produit totalement déprotégé **76**.

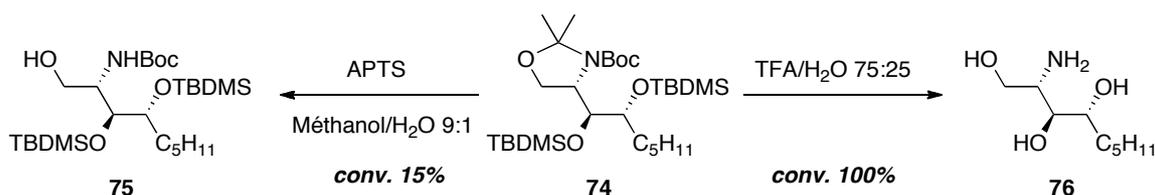


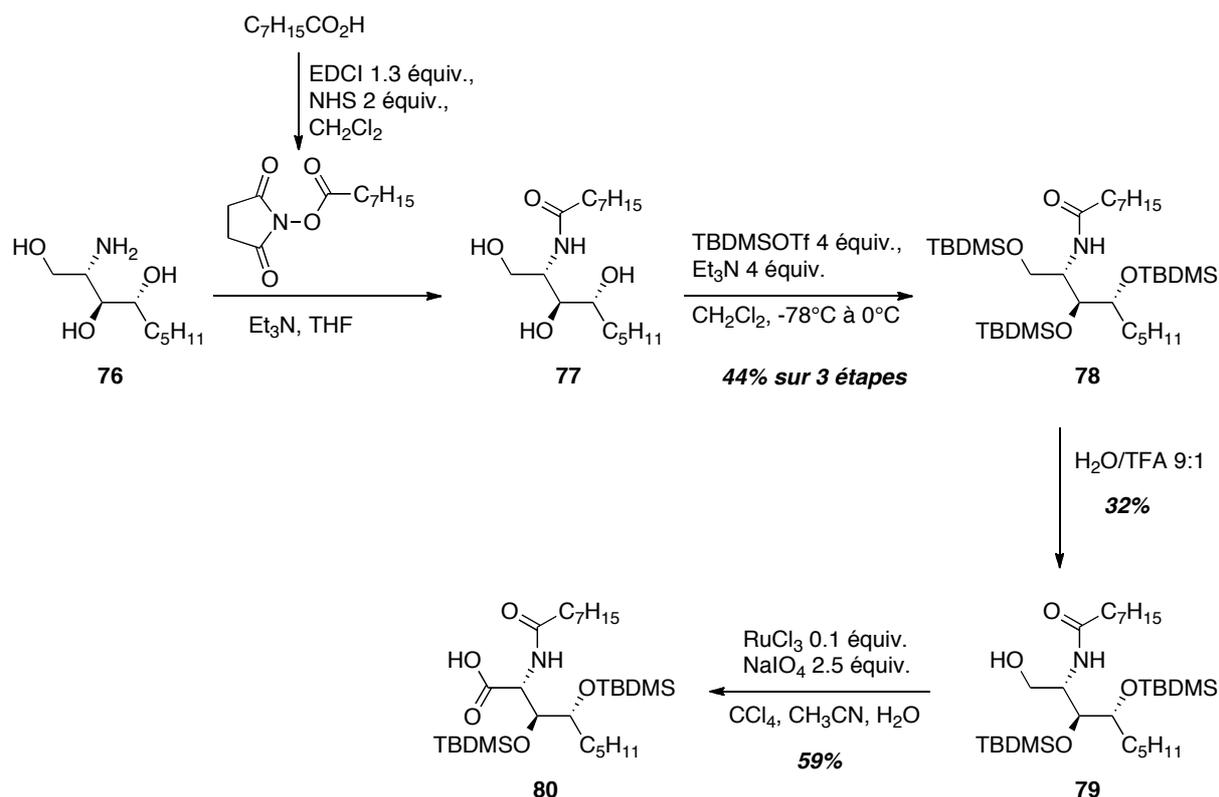
Schéma 58 : Essais de déprotection de l'acétonide

Malgré ces résultats, le produit **76** a tout de même été engagé dans l'étape suivante de couplage peptidique en présence d'acide octanoïque.¹²¹ L'acide octanoïque a été préalablement activé à l'aide de *N*-hydroxysuccinimide, en présence de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide au reflux du dichlorométhane. L'ester activé obtenu a ensuite été engagé dans la réaction de couplage peptidique pour former l'amide correspondant **77**. Sans purification préalable, une réaction de protection des alcools avec du triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle et de la triéthylamine dans le dichlorométhane à 0°C nous conduit au composé **78** avec 44% de rendement global sur les 3 étapes. L'acide carboxylique **80** a ensuite été synthétisé par déprotection sélective de l'alcool primaire avec un mélange d'eau et d'acide trifluoroacétique dans un rapport de 9:1, suivie d'une étape d'oxydation en présence d'une quantité catalytique de chlorure de ruthénium et d'un excès de périodate de sodium.¹²²

¹²⁰ Azuma, H.; Tamagaki, S.; Ogino, K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3538-3541.

¹²¹ Kim, S.; Song, S.; Lee, T.; Jung, S.; Kim, D. *Synthesis* **2004**, *6*, 847-850.

¹²² Joo, J.-A.; Pham, V.-T.; Tian, Y.-S.; Cung, Y.-S.; Oh, C.-Y.; Lee, K.-Y.; Ham, W.-H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1498-1501.


 Schéma 59 : Synthèse de l'acide dérivé d'une chaîne céramide *O*-silylée

Cette voie de synthèse un peu longue aurait pu être raccourcie, notamment en s'affranchissant d'une étape de silylation inutile. Plutôt que de chercher à optimiser à tout prix cette approche, il nous a paru judicieux d'étudier la préparation d'un synthon protégé différemment en position 2 et 3. Le groupement benzyle est apparu comme un groupement protecteur de choix afin de réduire le nombre d'étapes et également par soucis d'homogénéité, ces groupements pouvant être clivés en fin de synthèse avec ceux déjà présents sur le sucre. Le diol **71a** a donc été protégé sous forme d'éthers de benzyle en présence d'un léger excès de bromure de benzyle ainsi que d'hydrure de sodium et d'une quantité catalytique d'iode de tétrabutylammonium pour conduire au composé **81** avec un rendement de 97%. La déprotection du groupement acétonide et du groupement Boc, ainsi que le couplage peptidique avec l'acide octanoïque ont été réalisés comme précédemment pour obtenir le composé **83** avec 65% de rendement sur ces deux étapes. Une réaction d'oxydation catalysée par du chlorure de ruthénium a ensuite été engagée sur ce produit. Si l'oxydation de l'alcool primaire en acide carboxylique a bien été observée, une réaction parasite d'oxydation des fonctions benzyliques s'est également produite pour donner le dibenzoate **84** avec 28% de rendement. Afin d'éviter cet écueil, le dichromate de pyridinium (PDC) dans le DMF a

également été testé.¹²³ Dans ces conditions, nous avons obtenu le produit souhaité **85** avec un rendement de 49%. Cependant, cette étape s'est révélée peu reproductible malgré quelques modifications apportées, notamment la recristallisation du PDC dans un mélange d'eau et d'acétone. De plus, la formation de l'aldéhyde en tant que sous-produit parfois majoritaire a également été observée.

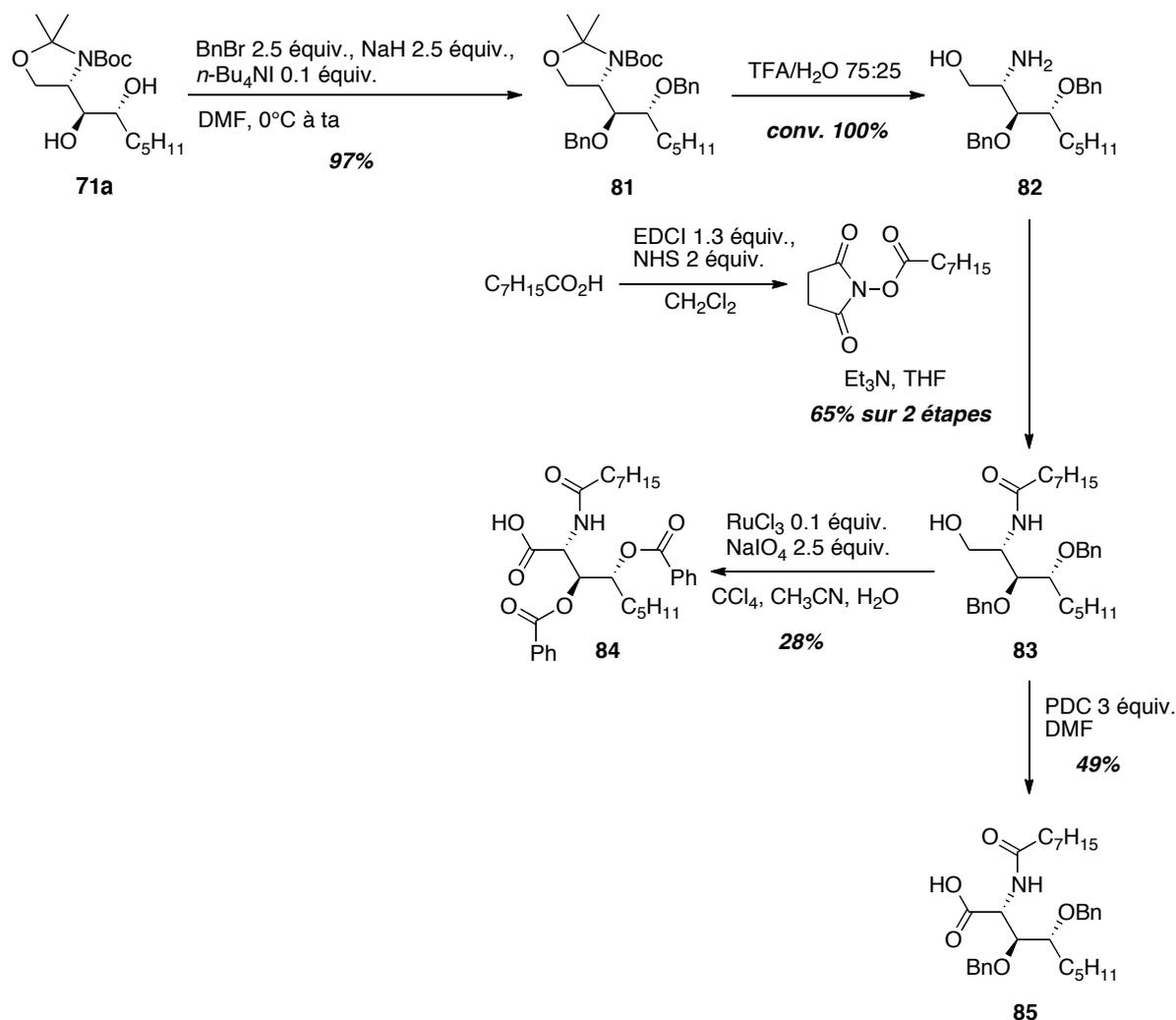


Schéma 60 : Synthèse d'un acide dérivé d'une chaîne céramide benzylée

Parallèlement à ces travaux de synthèse directe de synthons céramides, il nous a également paru judicieux de réaliser le couplage peptidique avec l'acide gras plus tardivement dans la synthèse, après greffage d'un synthon phytosphingosine sur le sucre et juste avant la déprotection finale. La synthèse d'acides carboxyliques dérivés de phytosphingosines N-

¹²³ (a) Vedejs, E.; Dent, W. H.; Gapinski, D. M.; McClure, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5437-5446. (b) Tamborini, L.; Conti, P.; Colleoni, S.; Gobbi, M.; De Micheli, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6083-6089.

protégées a donc été réalisée. Le composé **86** a notamment été synthétisé par clivage de l'acétonide en présence d'acide acétique et d'eau avec un rendement de 99% puis soumis à plusieurs conditions d'oxydation afin d'obtenir l'acide carboxylique **87**.

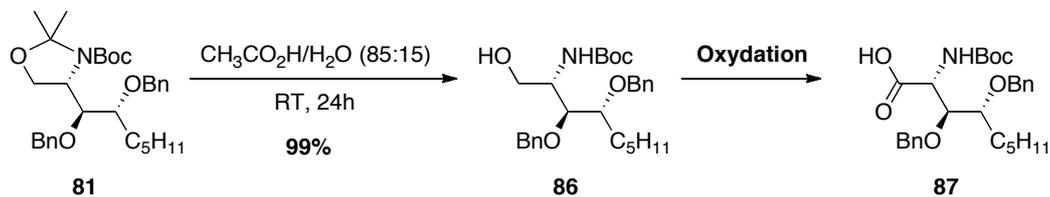


Schéma 61 : Synthèse d'un acide dérivé d'une chaîne phytosphingosine benzylée

L'utilisation de PDC nous a fourni des résultats similaires au synthon précédent. En effet, une formation majoritaire de l'aldéhyde ainsi qu'une faible reproductibilité des résultats ont de nouveau sanctionné cette méthode. Nous avons également essayé d'utiliser du tétraméthyl pipéridine-1-oxyl (TEMPO) en présence de bromure de potassium, mais cette méthode s'est révélée inefficace car aucune conversion de produit de départ n'a été observée.¹²⁴ Les méthodes d'oxydation directe en acide carboxylique n'apportant pas de résultats pleinement satisfaisants, un processus en deux étapes a été testé. La formation de l'aldéhyde à l'aide du réactif de Dess-Martin dans le dichlorométhane suivie d'une oxydation de Pinnick fournit l'acide avec un rendement global faible de 34%.¹²⁵ Cette faible efficacité semblant provenir de la première oxydation, nous avons remplacé le périodinate par de l'acide iodoxobenzoïque (IBX) et le produit désiré **87** a cette fois pu être obtenu avec 81% de rendement.

¹²⁴ Ito, M.; Yamanaka, M.; Kutsumura, N.; Nishiyama, S. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5623-5634.

¹²⁵ (a) Booker, J. E. M.; Boto, A.; Churchill, G. H.; Green, C. P.; Ling, M.; Meek, G.; Prabhakaran, J.; Sinclair, D.; Blake, A. J.; Pattenden, G. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4193-4205. (b) Anderson, J. C.; O'Loughlin, J. M. A.; Tornos, J. A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2741-2749. (c) Bal, B. S.; Childers, W. E.; Pinnick, H. W. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091-2096.

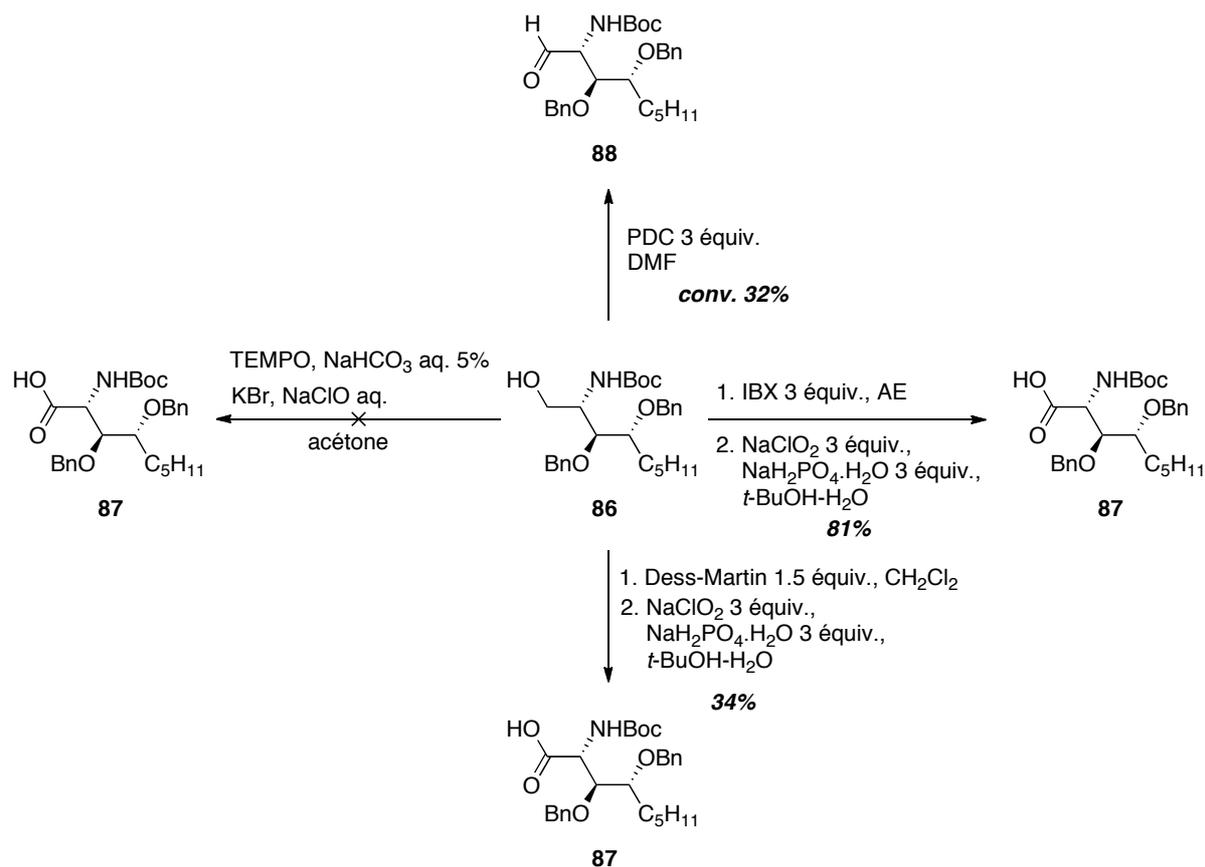


Schéma 62 : Essais d'oxydation de l'alcool primaire en acide carboxylique

Les acides carboxyliques, possédant deux différentes longueurs de chaîne, ont également été obtenus avec la même stratégie de synthèse en quatre étapes: protection des alcools sous forme d'éthers de benzyle, clivage de l'acétonide et enfin une double oxydation.

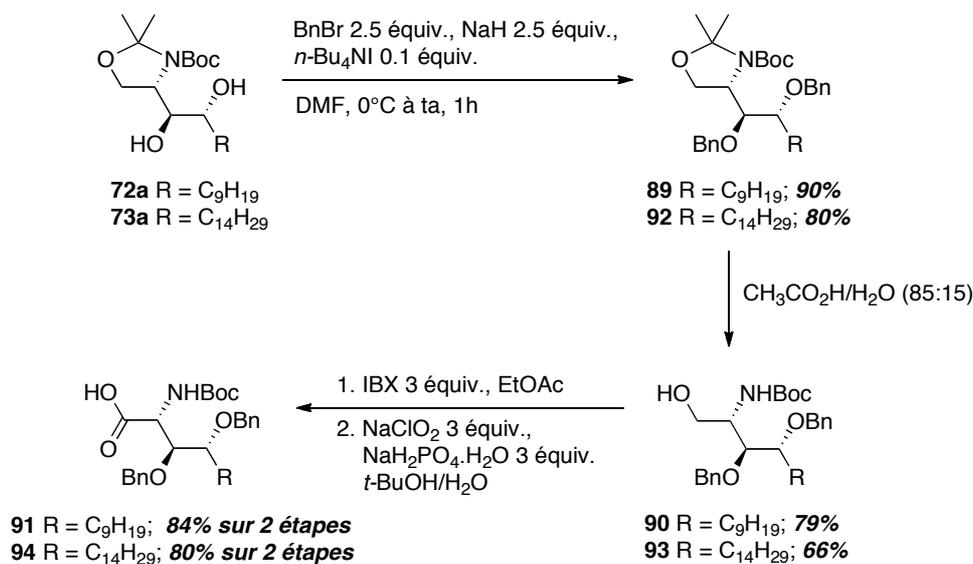


Schéma 63 : Synthèse des deux autres acides dérivés d'une chaîne phytosphingosine benzylée

Un dernier type de synthon a été préparé. En effet, la présence d'un proton acide sur l'azote du carbamate pouvait se révéler problématique pour la première étape du transfert de la chaîne latérale sur le sucre, qui procède par échange Br/Li et cyclisation (voir rétrosynthèse). L'amine NHBoc du composé **86** a donc été protégée par un groupement benzyle. Une étape de protection de l'alcool primaire par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyl, la benzylation du carbamate, la déprotection de l'alcool primaire puis une oxydation en présence de PDC nous ont conduit au composé souhaité **98** avec de bons rendements.

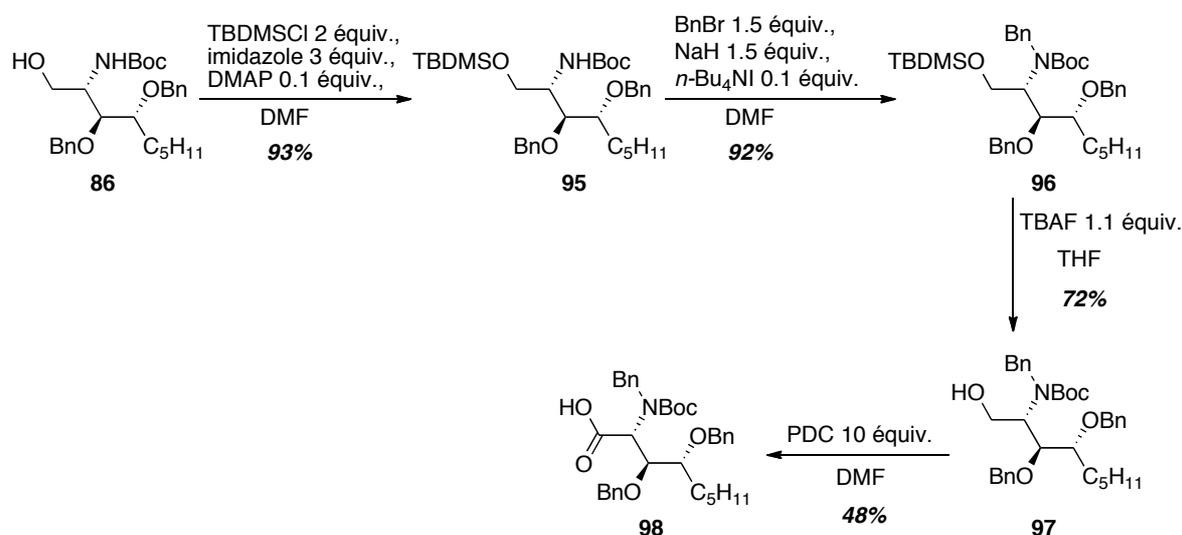


Schéma 64 : Synthèse d'un acide dérivé de phytosphingosine totalement protégée

Nous avons donc synthétisé une série de cinq acides carboxyliques différents sur lesquels le couplage avec le sucre difluoré en position anomérique va pouvoir être étudié.

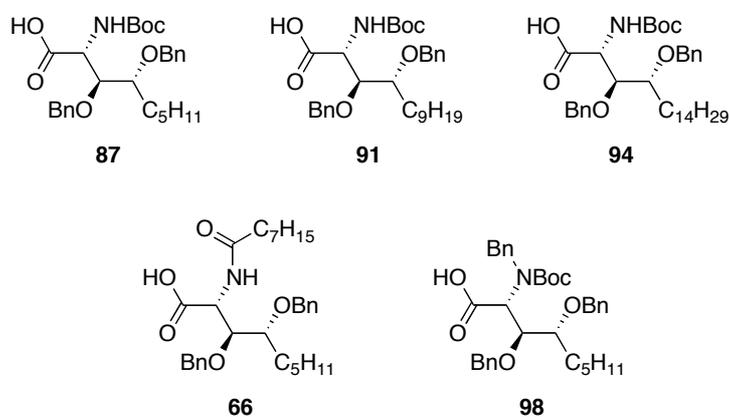


Figure 32 : Acides carboxyliques

3. Synthèse d'analogues difluorés de GalCer

3.1. Couplage entre l'acide carboxylique et le galactose et échange halogène/métal

La méthodologie étant mise en place, le synthon CF₂-galactoside étant prêt et les différents acides dérivés de phytosphingosines ou de céramides ayant été préparés, les premiers essais d'assemblage de ces deux parties ont été effectués.

Des essais de couplage entre le groupement hydroxyle situé en position 2 du sucre fluoré **19** et les acides carboxyliques dérivés de phytosphingosine ont été réalisés. Contre toute attente, seul l'acide carboxylique **87**, monoprotégé sur l'azote, a été couplé efficacement sur l'alcool du sucre pour former l'ester **99** avec un rendement de 69%. La même réaction avec l'acide N-benzylé **98** s'est en effet soldée par un échec.

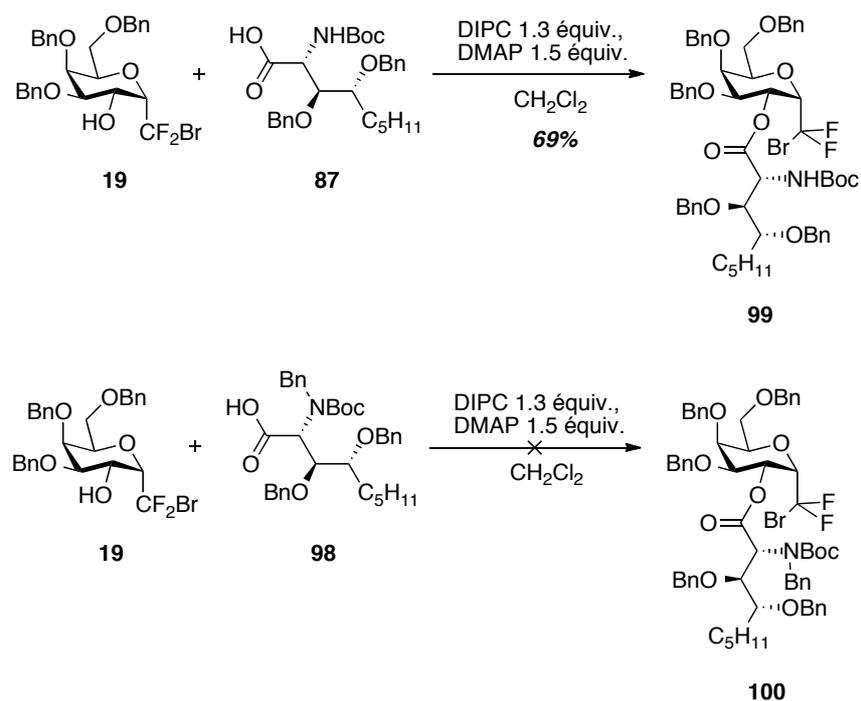


Schéma 65 : Couplage entre l'alcool en position 2 du sucre et l'acide carboxylique

La séquence lithiation/cyclisation a ensuite été tentée sur le composé **99**. L'utilisation de *n*-BuLi pour réaliser l'échange halogène/métal a conduit à des résultats peu reproductibles. En effet, le composé désiré n'a pu être obtenu qu'une seule fois avec un rendement de 50%

lors de l'addition de 2.2 équivalents de *n*-BuLi et ce malgré de nombreux essais. Une étude d'optimisation a donc été nécessaire pour déterminer l'organolithien le plus adapté et les conditions appropriées à cette séquence réactionnelle. L'utilisation de *t*-BuLi n'a conduit qu'à la dégradation du sucre. En effet, seuls les produits de réarrangement de Fritsch-Buttenberg-Wiechell ainsi que celui issu de la saponification de l'ester ont pu être observés dans ces conditions. En nous inspirant des travaux de Linclau, il nous a paru judicieux de tester cette réaction avec du MeLi, lithien souvent utilisé pour réaliser des échanges Br/Li sur des carbones fluorés.¹¹³ Un rendement de 70%, plus élevé que celui obtenu avec le *n*-BuLi et cette fois reproductible, a été obtenu en présence de 2.2 équivalents de MeLi. Toutefois, les deux diastéréomères n'ont pas pu être séparés.

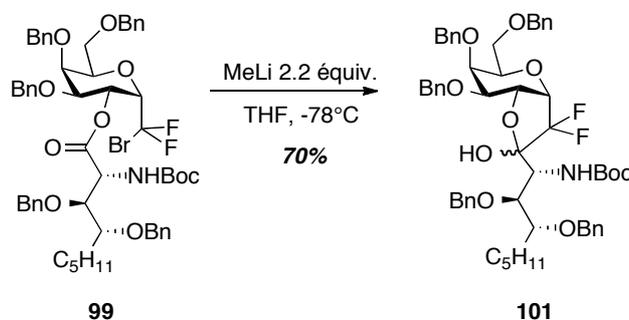


Schéma 66 : Echange halogène/métal et cyclisation intramoléculaire

Il faut noter que l'utilisation de 1.1 équivalent de *n*-BuLi ou de MeLi s'est toujours révélée inefficace. En effet, le produit désiré est obtenu avec une conversion de 15% seulement, la moitié du produit de départ a été consommée et un produit d'hydrolyse a pu être caractérisé.

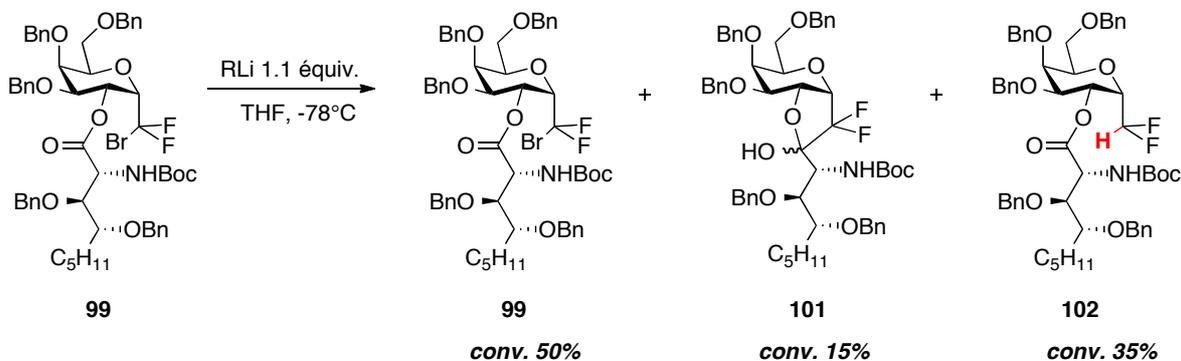


Schéma 67 : Réaction d'échange halogène/métal avec 1.1 équivalent de lithien

Le résultat obtenu avec 1.1 équivalent de lithien semble montrer que les vitesses de l'échange Br/Li et de la déprotonation du carbamate sont comparables. Il est en effet probable que le produit de départ récupéré en fin de réaction provienne d'une déprotonation du carbamate, reprotonné lors du traitement. Le produit **102** pourrait être issu d'une reprotonation interne du lithien « CF₂Li » par le carbamate, qui serait plus rapide que la réaction de cyclisation aboutissant à **101**. Ces différentes hypothèses permettraient d'expliquer le succès de la réaction avec 2.2 équivalents : l'excès de lithien permettrait en effet de réaliser l'échange Br/Li et la déprotonation du carbamate simultanément. Le dianion résultant pourrait alors cycliser en évitant toute réaction parasite.

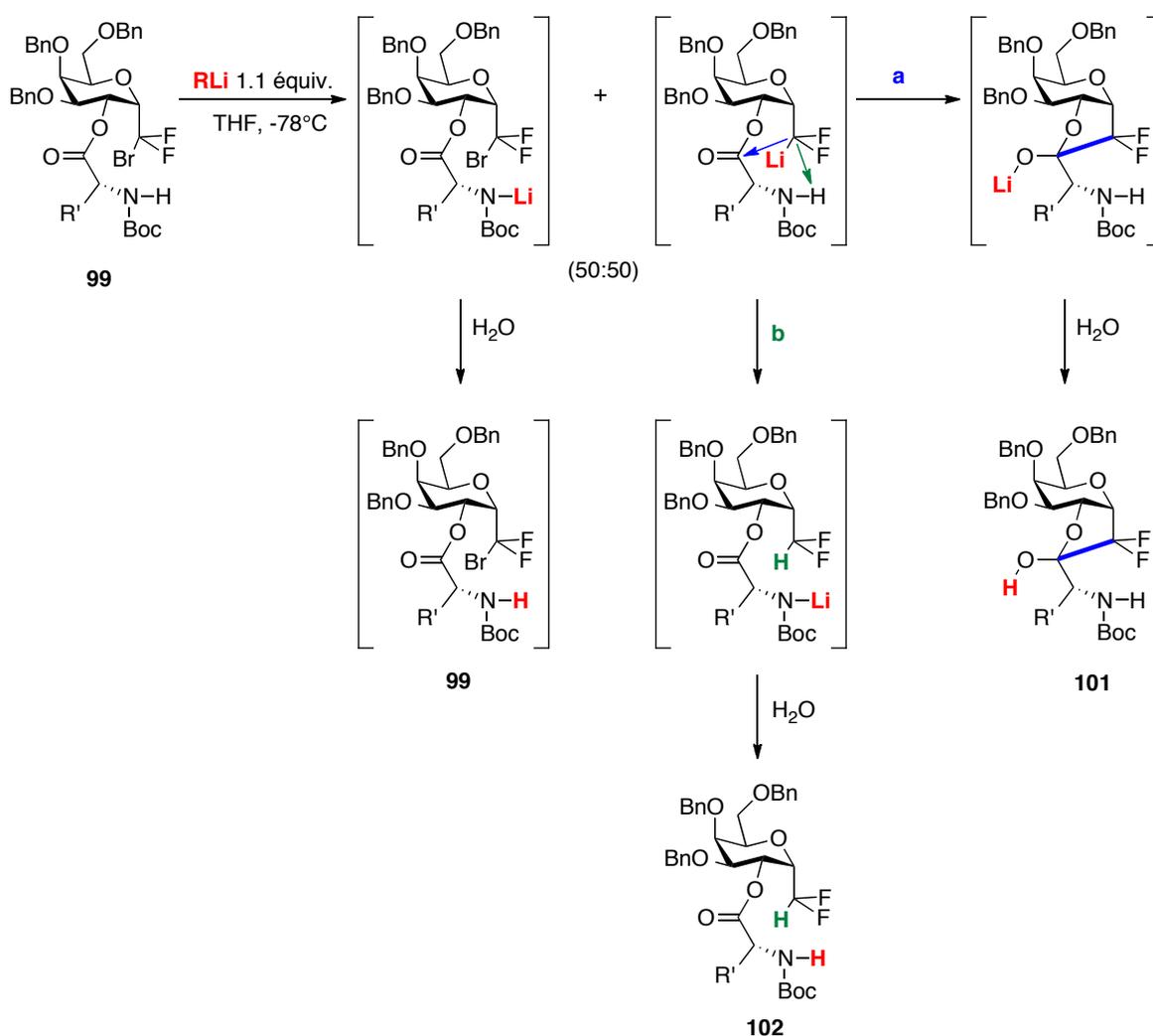


Schéma 68

Devant le succès de cette réaction avec la chaîne phytosphingosine, nous avons décidé de ne pas coupler l'acide carboxylique comportant la chaîne céramide avec le sucre. En effet, l'introduction des acides gras en fin de synthèse permet de travailler avec un intermédiaire commun le plus longtemps possible et de diversifier les structures en fin de synthèse. Si cette approche plus convergente venait à échouer, nous pourrions de toute façon revenir à la réalisation de cette réaction avec une chaîne céramide complète.

3.2. Réduction de l'hémi-acétal

Une réduction diastéréosélective de l'hémi-acétal intermédiaire nous a ensuite conduits à l' α -CF₂-galactoside **103** avec un rendement de 74% sous forme d'un seul diastéréomère.

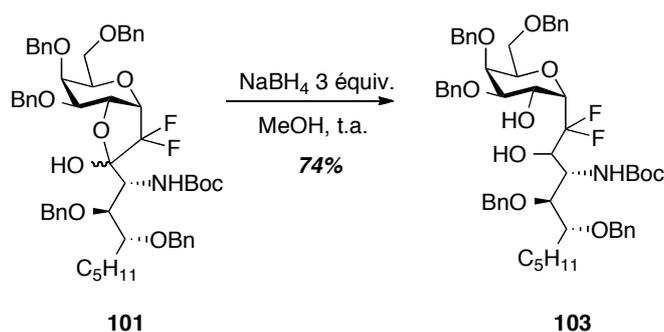


Schéma 69 : Réduction de l'hémi-acétal

La configuration relative du carbone portant l'alcool en α du groupement CF₂ n'a malheureusement pas pu être déterminée. Des expériences RMN sont actuellement en cours au sein de l'équipe d'analyse de l'UMR CNRS 6014 COBRA dirigée par le Professeur Hassan Oulyadi. L'interprétation de ces spectres étant assez complexe du fait de la présence des cinq groupements benzyles, nous leur avons fourni, en plus du composé **103**, son homologue débenzylé **104**.

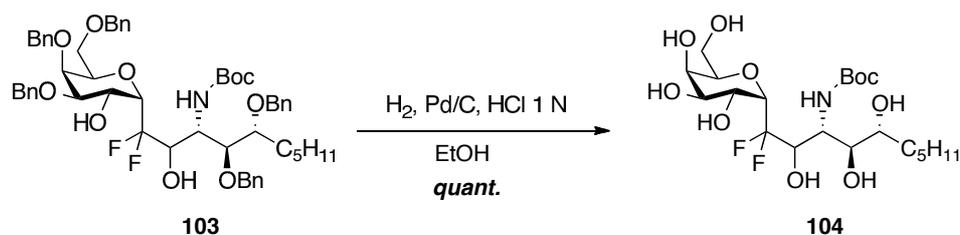


Schéma 70 : Réaction d'hydrogénation

De plus, les molécules **105** et **106** ont par la suite été synthétisées afin de faciliter cette détermination par formation d'un composé cyclique. À ce jour, ces quatre molécules sont toujours en cours d'étude.

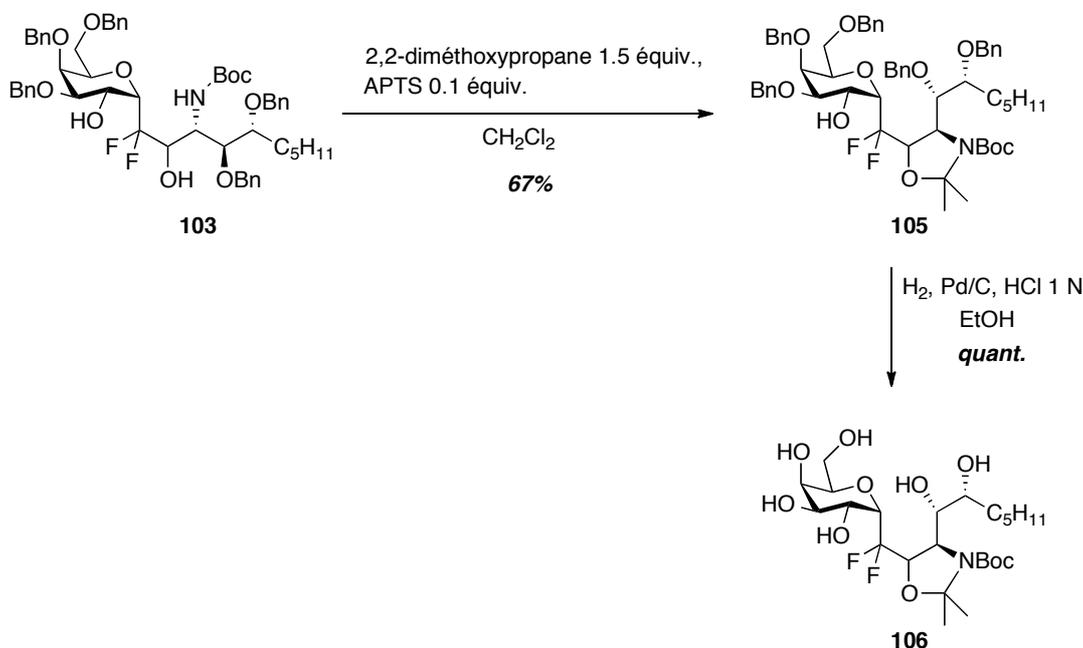


Schéma 71 : Protection sélective de l'alcool en α du groupe CF_2

Ayant en main le composé **103**, il faudrait maintenant développer une méthodologie nous permettant de réduire le groupement OH en position 2' afin d'obtenir des analogues exacts de GalCer. Il nous a cependant paru judicieux de pousser la synthèse jusqu'au bout en gardant ce groupement OH supplémentaire et ce, pour deux raisons. La première est de tester les étapes restantes afin de s'assurer qu'aucun écueil ne compromette la fin de la synthèse. La seconde est que la préparation et l'évaluation immunologique d'une petite famille d'analogues possédant un OH supplémentaire en 2' reste intéressante et pourrait révéler des activités inattendues.

3.3. Synthèse d'analogues d' α -galactosylcéramides

Nous avons donc poursuivi la synthèse de ces premiers analogues d' α -galactosylcéramides en déprotégeant l'amine **103** en présence d'un mélange TFA/eau puis en réalisant un couplage peptidique avec l'acide octanoïque pour donner la molécule **107** avec un rendement de 46% sur ces deux étapes.

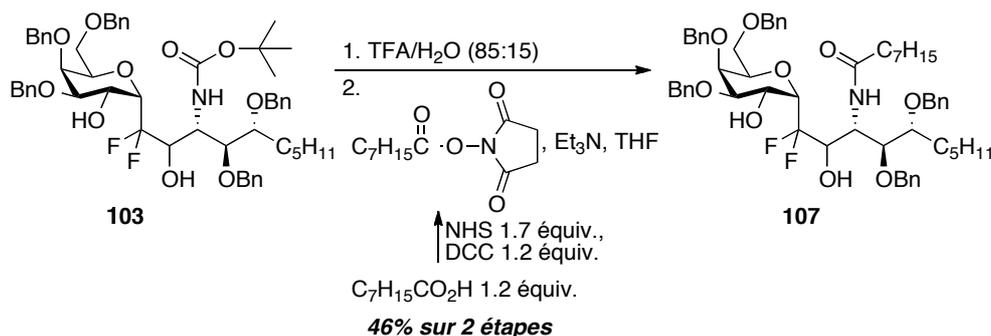


Schéma 72 : Couplage peptidique avec l'acide octanoïque

Plusieurs acides carboxyliques comportant des chaînes plus longues ont été couplés à cette amine afin de pouvoir évaluer biologiquement les réponses immunitaires données par le changement de longueur de chaînes grasses. Dans un premier temps, l'acide palmitique a pu être couplé de la même manière que l'acide octanoïque c'est-à-dire en présence de *N*-hydroxysuccinimide et de dicyclohexylcarbodiimide afin de former un ester activé qui a été par la suite couplé avec l'amine primaire de la partie céramide pour donner le composé **108** avec un rendement de 45% sur les deux étapes.

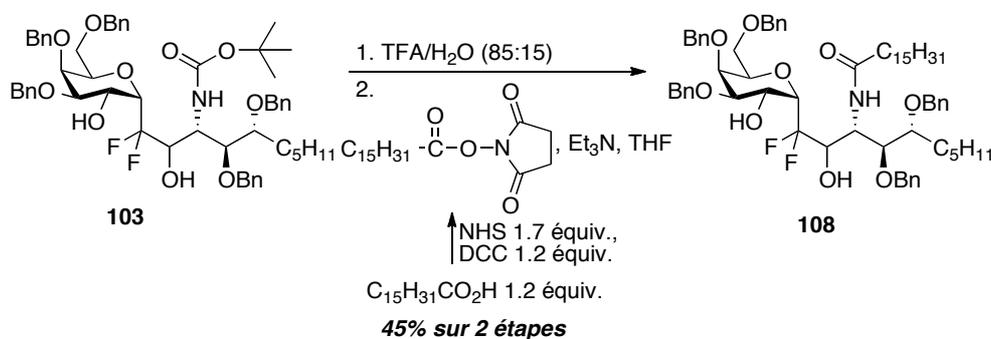


Schéma 73 : Couplage peptidique avec l'acide palmitique

Malheureusement, ces conditions se sont révélées inefficaces avec l'acide cérotique. Les travaux de l'équipe d'Howell ont cependant montré que la préparation de l'ester activé à l'aide de *para*-nitrophénol conduisait à l'amide en présence de diméthylaminopyridine dans le THF.²⁶ Ces conditions nous ont donc conduits à l'amide **109** avec un rendement de 40% sur les deux étapes.

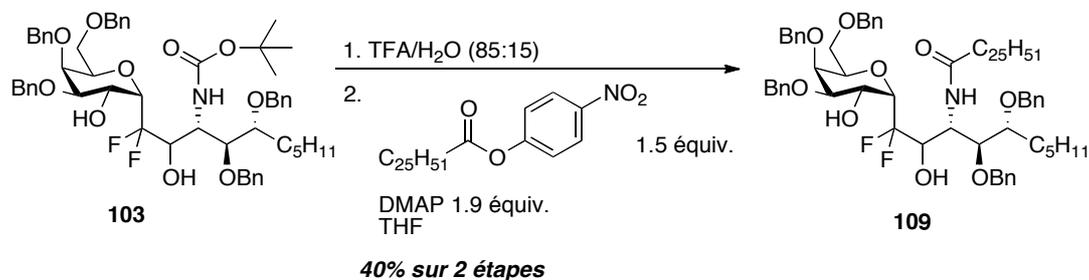


Schéma 74 : Couplage peptidique avec l'acide cérotique

La dernière étape consiste en la déprotection des alcools par une réaction d'hydrogénation pour nous conduire quantitativement à des analogues d' α -CF₂-galactosylcéramide. Pour cela, des conditions d'hydrogénation classiques ont été utilisées en additionnant tout de même quelques gouttes d'acide chlorhydrique 1 N afin d'accélérer la réaction. Cette méthode s'est avérée très efficace pour les composés **107** et **108**.

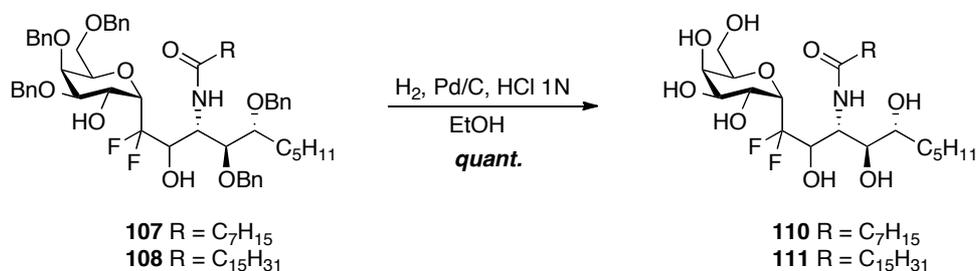


Schéma 75 : Réaction d'hydrogénation sur des analogues difluorés d' α -galactosylcéramide

Cependant, des produits de dégradations ont été constatés lors de la réaction d'hydrogénation sur le composé **109**. D'autres conditions ont donc été explorées et ainsi l'utilisation de Pd(OH)₂ dans un mélange chloroforme/éthanol s'est révélée efficace.

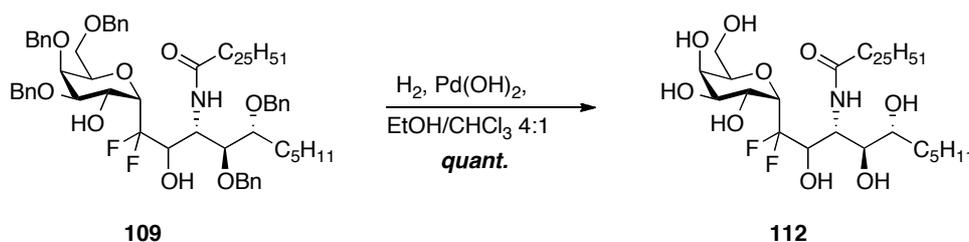


Schéma 76 : Réaction d'hydrogénation sur un analogue difluoré d' α -galactosylcéramide

En suivant le même schéma rétrosynthétique, l'analogue difluoré (avec un OH supplémentaire en 2') du KRN 7000 a été préparé. Le couplage entre l'alcool en position 2 du sucre difluoré **19** et l'acide carboxylique **94**, la réaction d'échange halogène/métal suivie de la cyclisation intramoléculaire puis la réduction de l'hémi-acétal nous conduisent au composé **115** avec de bons rendements. Une étape de couplage peptidique entre l'amine préalablement déprotégée et l'ester activé à l'aide de *para*-nitrophénol suivi d'une réaction d'hydrogénation nous amènent au composé **117**.

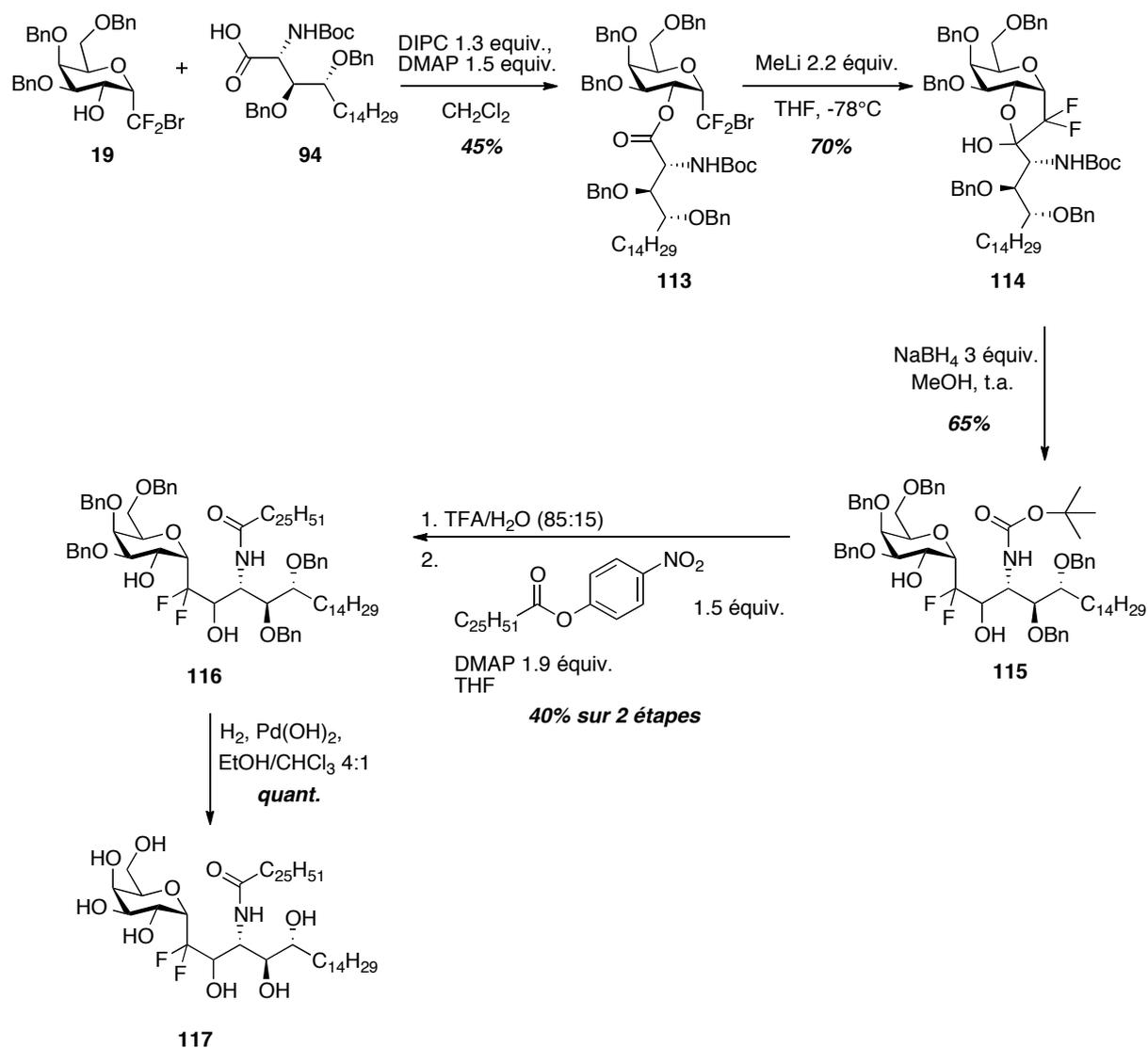


Schéma 77 : Synthèse de l'analogue difluoré non exact du KRN 7000

Les composés **110**, **111**, **112** et **117** obtenus sont des analogues modifiés de l' α -galactosylcéramide comportant un alcool supplémentaire en α du groupement CF_2 . Il nous a paru judicieux de tester dans un premier temps ces analogues afin de déterminer l'influence de ce OH supplémentaire sur l'activité des composés.

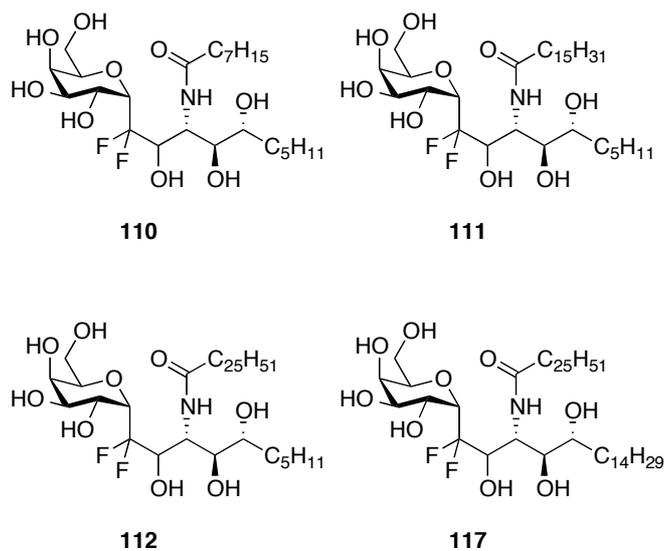


Figure 33 : Analogues d' α -CF₂-galactosylcéramides

Chapitre III

Aspects biologiques et évaluations des premiers analogues

Remarque : Ci-joint à la fin de ce chapitre, une liste de définitions de certains termes rencontrés dans ce chapitre. Ils seront soulignés dans le texte.

1. Interactions cellules NKT/ α -GalCer/CPA

Le système immunitaire, dont le rôle est de protéger notre organisme contre les agressions extérieures (virus, parasites, bactéries, ...) est classiquement divisé en immunités innée et adaptative. L'immunité innée exerce une fonction effectrice immédiate au début d'une infection primaire vis-à-vis de divers agents pathogènes, toutefois, elle n'augmente pas suite à des expositions répétées. Une grande variété de types cellulaires contribue à l'immunité innée, dont les cellules « natural killer » (NK), les granulocytes et les phagocytes. En revanche, l'immunité adaptative repose sur une reconnaissance de l'antigène (Ag) par des cellules porteuses de récepteurs, les lymphocytes. L'immunité adaptative est relativement longue à se développer après l'exposition initiale à un Ag. Cependant, en raison de la mise en place d'une réponse mémoire, la réponse secondaire est plus efficace et plus rapide que la réponse initiale.

1.1. Les lymphocytes

Les lymphocytes sont de petites cellules rondes d'environ 7 micromètres possédant un noyau et appartenant à la famille des leucocytes (globules blancs). Ils sont produits dans les organes lymphoïdes primaires (le thymus ou la moelle osseuse) et on les retrouve dans le sang ainsi que dans les tissus lymphoïdes secondaires, comme la rate et les ganglions lymphatiques. Il existe deux principales familles de lymphocytes: les lymphocytes B, générés dans la moelle osseuse, et les lymphocytes T, générés dans le thymus. Ces deux types de lymphocytes ne se différencient pas sur des critères morphologiques mais par la nature de leurs récepteurs de surface qui déterminent leurs fonctions. Les lymphocytes B jouent un rôle crucial dans l'immunité humorale, par opposition à l'immunité cellulaire induite par les lymphocytes T. En effet, le système immunitaire humoral agit contre les bactéries et les virus alors que le système immunitaire cellulaire participe plutôt à l'élimination des cellules infectées par des virus, des bactéries et des cellules cancéreuses.

Les lymphocytes B ont pour fonction principale de produire des anticorps (Ac) et participent à la réponse immunitaire spécifique, c'est-à-dire qu'après avoir reconnu un Ag grâce à leur récepteur membranaire (BCR pour « B cell receptor »), un lymphocyte B donné ne peut réagir que contre cet Ag spécifique. La reconnaissance de l'Ag conduit les lymphocytes B spécifiques à se multiplier et certains descendants de ces lymphocytes B deviennent des cellules mémoires « sensibilisées » à cet Ag. D'autres descendants des lymphocytes B activés se transforment en cellules sécrétrices d'Ac (les plasmocytes), ces derniers sont ensuite libérés dans le plasma. Ces Ac peuvent se lier au même Ag que celui qui a déclenché cette série d'évènements, et l'Ag est ainsi neutralisé. Enfin, l'Ag « recouvert » d'Ac va directement entrer en contact avec des phagocytes qui sont des cellules pouvant ingérer ou détruire des particules de taille variable comme des microbes ou encore des cellules altérées.

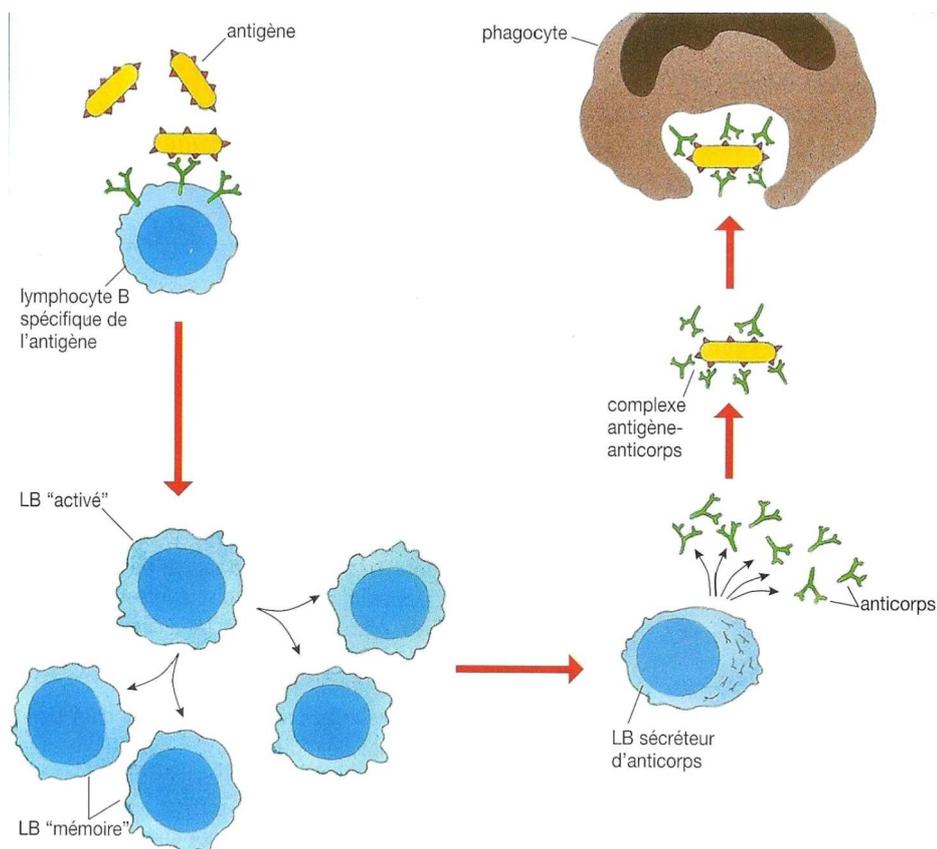


Schéma 78 : Mécanisme d'action des lymphocytes B

Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T ne sont pas capables de reconnaître de façon directe l'Ag *via* leur récepteur membranaire (TCR pour « T cell receptor»). En effet, pour qu'il y ait reconnaissance et activation du lymphocyte T, l'Ag doit être présenté au TCR sous forme de petits fragments peptidiques associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentes à la surface de cellules dites cellules présentatrices de l'Ag (CPA). Les lymphocytes T, qui possèdent tous un marqueur spécifique appelé CD3 (CD pour « cluster de différenciation »), peuvent se différencier en plusieurs sous-populations. Les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) possèdent des marqueurs CD8 et détruisent les cellules infectées. Ils peuvent éliminer des cellules cibles qui expriment des Ag spécifiques qu'ils reconnaissent en libérant une substance chimique, la perforine, à l'intérieur de la membrane plasmique et par conséquent détruire ces cellules.

Les lymphocytes T auxiliaires (Th pour T « helper ») sont des intermédiaires de la réponse immunitaire qui prolifèrent après contact avec l'Ag présenté par une CPA. Une fois activés, ils participeront par exemple à l'activation des lymphocytes B. Ces lymphocytes T auxiliaires expriment à leur surface des marqueurs CD4.

Les lymphocytes NKT (pour « natural killer T cell ») possèdent à leur surface à la fois des marqueurs de cellules T comme le marqueur CD3, mais aussi des marqueurs spécifiques de cellules NK. Ils sont donc un lien entre le système immunitaire inné qui constitue la première ligne de défense contre les pathogènes et le système immunitaire adaptatif qui met en place une réponse mémoire. Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, les NKT reconnaissent un glycolipide présenté par une molécule non-polymorphique « CMH-like » appelée CD1d. Une fois activés, les lymphocytes NKT sont capables de lyser les cibles et de sécréter des quantités importantes de facteurs solubles, les cytokines.

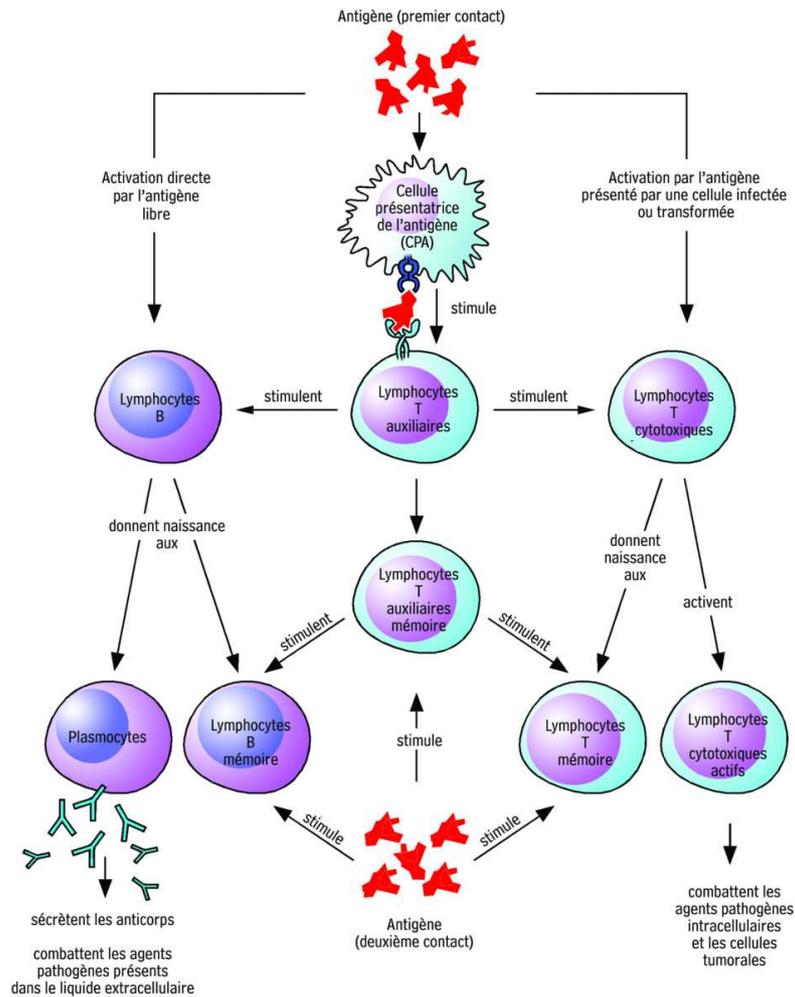


Schéma 79 : Mécanisme d'action des lymphocytes T

1.2. Complexation avec la molécule CD1d

1.2.1. La glycoprotéine CD1d

Les molécules CD1 appartiennent à une famille de protéines exprimées sur les CPA et sont responsables de la liaison et de la présentation d'Ag aux cellules T. Contrairement aux molécules du CMH, les molécules CD1 sont spécialisées dans la présentation d'antigènes lipidiques. Il existe cinq glycoprotéines de ce type chez l'homme, classées en deux catégories: le groupe I (CD1a, CD1b, CD1c et CD1e) et le groupe II (CD1d), qui est le seul exprimé

également chez la souris.¹²⁶ La molécule CD1d est exprimée à la surface des CPA, et présente ses ligands de nature glycolipidique, tels que l' α -GalCer, aux lymphocytes NKT. La molécule CD1d présente une structure quasi-identique à celle des molécules du CMH de classe I (CMH-I). Elle est en effet formée par l'association non covalente de la β 2-microglobuline et d'une chaîne peptidique qui comprend dans sa partie *N*-terminale trois domaines (α 1, α 2 et α 3) d'environ 90 acides aminés chacun.

La première structure cristalline de molécules CD1d (modèle murin) a permis de donner les premières informations structurales.¹²⁷ En effet, la cavité de la molécule CD1d est plus profonde et plus étroite par rapport à celle des molécules CMH. De plus, celle-ci est divisée en deux poches (A' et F') comportant des chaînes latérales d'acides aminés majoritairement hydrophobes, adaptées pour accueillir des chaînes longues alkyles. Les CD1d murines et humaines possèdent 183 acides aminés communs sur les 280 au total et les deux poches A' et F' des deux CD1d sont identiques en terme de volume et d'hydrophobie.¹²⁸

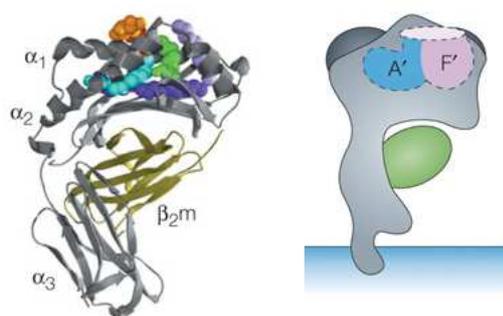


Figure 34 : Structure de la glycoprotéine CD1d

1.2.2. Le complexe ligand/CD1d

La structure cristalline du CD1d murin complexé à un analogue du KRN 7000 ainsi que celle du CD1d humain complexé à l' α -GalCer ont apporté quelques informations sur les interactions entre ces deux partenaires.^{18a} Ces deux études montrent que la chaîne grasse de l'amide s'insère dans la cavité A' alors que la chaîne phytosphingosine s'insère dans la poche F'. De plus, de fortes interactions de Van der Waals entre les chaînes alkyles de l' α -GalCer et

¹²⁶ Calabi, F.; Jarvis, J. M.; Martin, L.; Milstein, C. *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 285-292.

¹²⁷ Zeng, Z. H.; Castano, A. R.; Segelke, B. W.; Stura, E. A.; Peterson, P. A.; Wilson, I. A. *Science* **1997**, *277*, 339-345.

¹²⁸ Wu, D.; Fujio, M.; Wong, C. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1073-1083.

les acides aminés comme la Tyr73 au niveau de la cavité A' ou la Phe75 et la Trp131 au niveau de la cavité F' entraînent une stabilisation du glycolipide.

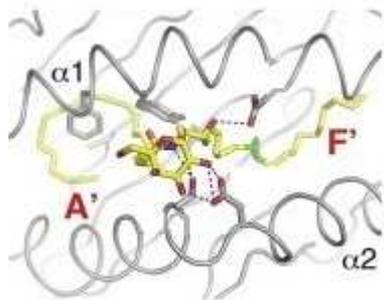


Figure 35 : Structure cristalline du complexe CD1d humain/GalCer

Des interactions hydrogènes ont également été observées et semblent être primordiales pour stabiliser le complexe CD1d/ligand. Les groupements hydroxyles en position 2 et 3 du galactose forment une liaison hydrogène avec l'Asp151 situé sur l'hélice $\alpha 2$ (Asp153 (CD1d souris)). Le proton de l'amide forme une deuxième liaison H avec la Thr154 (Thr156) située également sur la même hélice. Enfin, les deux fonctions alcools positionnées sur la chaîne phytosphingosine (3'-OH et 4'-OH) forment des liaisons hydrogènes avec l'Asp80 situé sur l'hélice $\alpha 1$. Toutes ces interactions donnent une orientation spécifique au ligand et stabilisent le complexe qui peut ensuite interagir avec le TCR des cellules NKT.

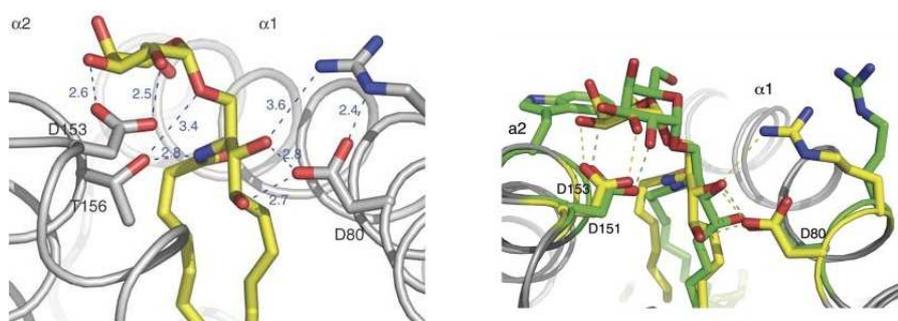


Figure 36 : Liaisons hydrogènes entre le ligand et le CD1d murin (gauche) ou le CD1d humain (droite)

1.3. Interactions du complexe CD1d/GalCer avec le TCR

Les α -galactosylcéramides sont des glycolipides extraits d'éponge marine qui ont montré, chez l'animal comme chez l'homme, des propriétés immunostimulantes et immunorégulatrices remarquables. Ces propriétés sont dues à leur interaction avec des

cellules NKT dont ils provoquent l'expansion et l'activation.¹²⁹ Les GalCer se lient aux CPA via le domaine CD1d de ces dernières et le complexe ainsi formé est reconnu par les cellules NKT grâce à une interaction de l'unité galactose du GalCer avec le TCR. En 2007, Rossjohn et son équipe ont publié la structure cristalline du complexe trimoléculaire ainsi que les principales interactions observées.^{14b}

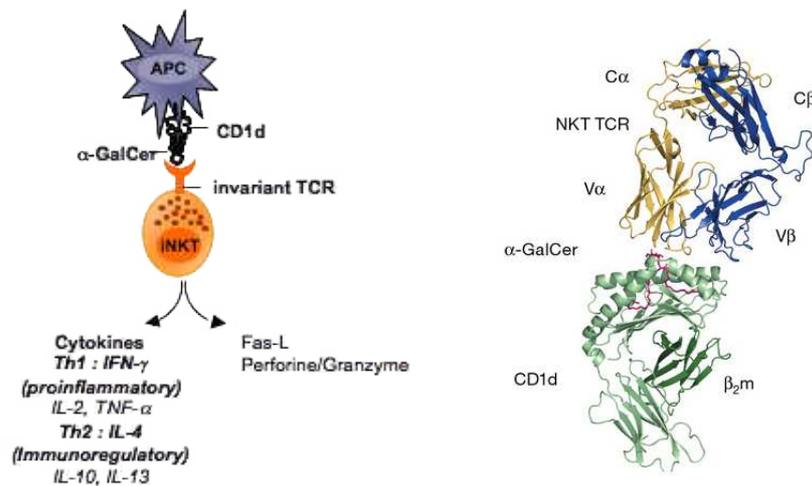


Figure 37 : Complexe CD1d humain/ α -GalCer avec le récepteur TCR

D'après les résultats obtenus, l'acide aminé Ser30 α situé sur la boucle CDR1 α du TCR forme une liaison hydrogène avec l'alcool en position 3 du galactose alors que le groupement hydroxyle en position 4 du sucre interagit par liaisons H avec la Phe29 α située elle aussi sur la boucle CDR1 α .

¹²⁹ (a) Burdin, N.; Brossay, L.; Kronenberg, M. *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 2014-2025. (b) Carnaud, C.; Lee, D.; Donnars, O.; Park, S. H.; Beavis, A.; Koezuka, Y.; Bendelac, A. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 4647-4680. (c) Singh, N.; Hong, S.; Scherer, D. C.; Serizawa, I.; Burdin, N.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; Van Kaer, L. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 2373-2377.

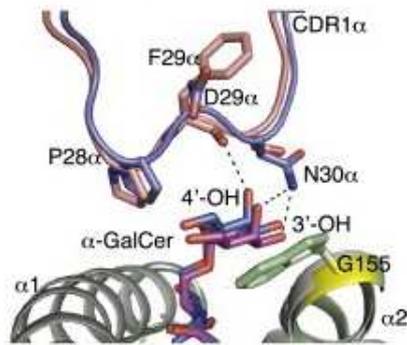


Figure 38 : Interactions par liaisons hydrogènes de la Ser30 α et de la Phe29 α

De plus, des interactions par liaisons hydrogènes entre l'alcool en position 2 du galactose et celui situé en 3 de la chaîne phytosphingosine existent avec l'Arg95 α et le Gly96 α placés sur la boucle CDR3 α du TCR.

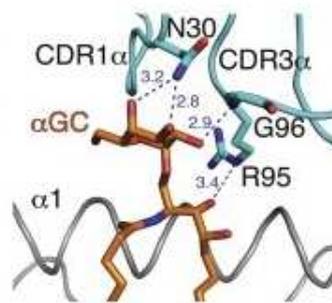


Figure 39 : Interactions par liaisons hydrogènes de la Arg95 α et de la Gly96 α

Par ailleurs, il a été montré qu'il existe des interactions entre le TCR et la glycoprotéine CD1d. En effet, six acides aminés (cinq provenant de l'hélice α 1 et un de l'hélice α 2 du CD1d) possèdent des liaisons hydrogènes avec le récepteur TCR ce qui rend d'autant plus stable le complexe trimoléculaire formé.

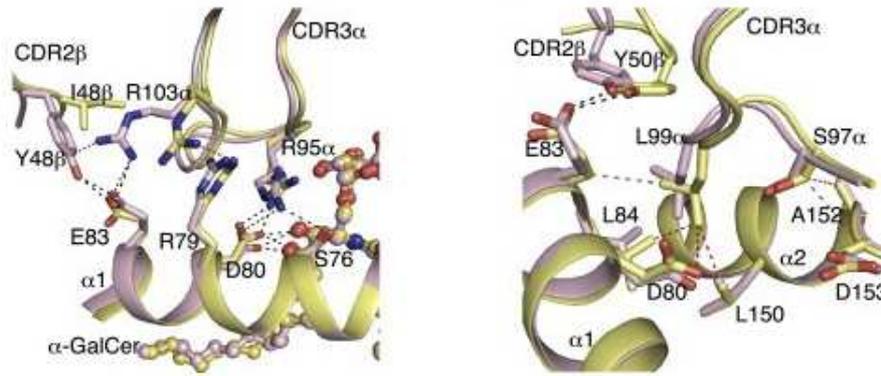


Figure 40 : Interactions par liaisons hydrogènes entre la CD1d et le TCR

La reconnaissance du complexe CD1d/glycolipide par le TCR et la formation du complexe ternaire CPA/GalCer/NKT entraînent alors l'activation de la cellule NKT qui produit rapidement de très grandes quantités de cytokines amorçant ainsi diverses réponses immunitaires.

1.4. Les cytokines

Les cytokines sont des substances solubles synthétisées par les cellules du système immunitaire (les lymphocytes T notamment) agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Ce sont des glycoprotéines qui peuvent être membranaires ou sécrétées suite à une stimulation. Tout comme les hormones ou les neuromédiateurs, ce sont des molécules essentielles à la communication de nos cellules. La rencontre entre une cellule de l'immunité et un Ag, par le biais d'un récepteur spécifique ou bien d'une autre cytokine, déclenche leur sécrétion. La liaison entre une cytokine et son récepteur à la surface extérieure de la membrane cytoplasmique induit une suite d'évènements biochimiques intracellulaires comportant l'activation séquentielle d'enzymes, principalement des protéines kinases. L'aboutissement de cet enchaînement séquentiel est la régulation du fonctionnement de certains gènes: la régulation positive comme l'activation de la transcription ou encore la régulation négative comme le ralentissement voir l'arrêt de cette transcription. Les cytokines sont donc des messagers chimiques qui permettent aux cellules de communiquer entre elles.

Les cytokines peuvent être classées sous différentes catégories selon l'activité biologique qu'elles exercent. Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6 et l'IL-8, l'Interféron- γ (IFN- γ), le Tumor Necrosis factor- β (TNF- β) sont des facteurs régulateurs de l'inflammation, de la fièvre, du sommeil, de l'hématopoïèse (formation de cellules du sang) ou de la destruction osseuse. Elles sont produites par les cellules T de type Th1, responsables d'une immunité à médiation cellulaire telle qu'une activation des lymphocytes cytotoxiques Tc. Les cytokines immunorégulatrices (IL-2, -4, -5, -7, -10 et -12) contrôlent essentiellement la formation des cellules du système immunitaire et leur activation en cellules tueuses ou productrices d'Ac et sont produites par les cellules T de type Th2, responsables d'une immunité à médiation humorale telle qu'une activation des lymphocytes B. Et enfin, les cytokines effectrices (IFN, TNF...) assurent la défense de l'organisme vis-à-vis des agents infectieux et des cancers. La régulation des sous-populations Th1 et Th2 est directement contrôlée par les cytokines qu'elles produisent: en effet, la production d'IFN- γ par les cellules Th1, inhibe le développement des cellules Th2 et inversement, la sécrétion d'IL-4 par les cellules Th2 inhibe celui des cellules Th1.

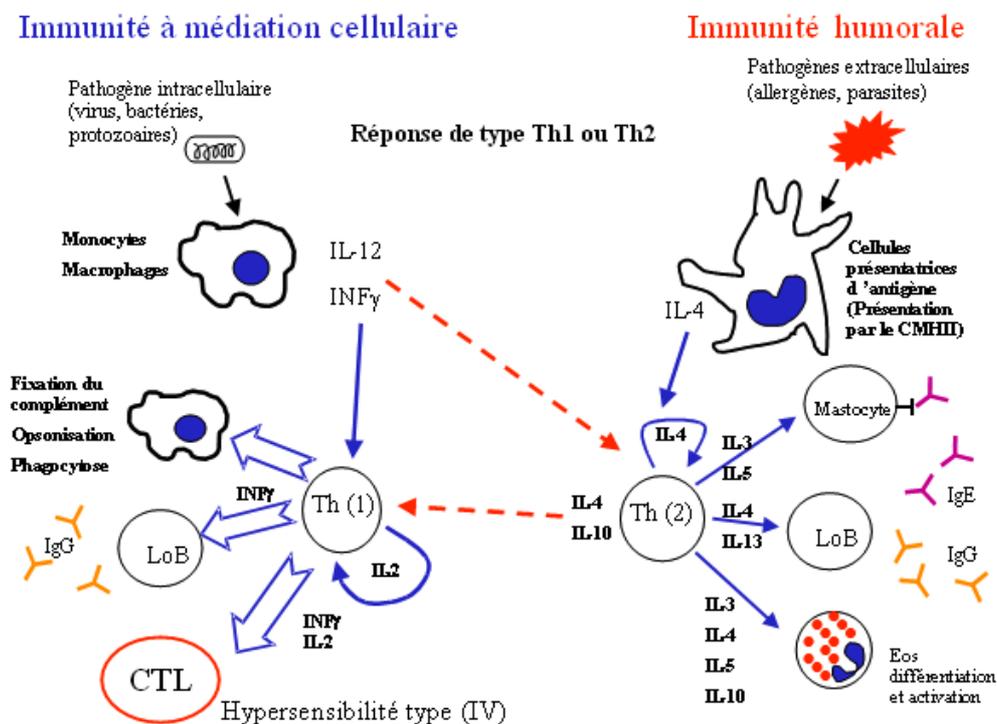


Figure 41 : Réponse du type Th1 ou Th2

La reconnaissance du complexe α -GalCer/CD1d par le récepteur des cellules NKT implique donc une rapide sécrétion à la fois d'IFN- γ (cytokine de type Th1) et d'IL-4 (cytokine de type Th2) par les lymphocytes NKT et d'IL-12 par la CPA.^{130,131} Les différentes relations structure/activité ont pu mettre en évidence l'importance de la longueur des chaînes lipidiques ainsi que la présence ou l'absence de groupements hydroxyles sur le type de cytokines sécrétées. Par exemple, l'analogue OCH qui possède une chaîne phytosphingosine de 5 carbones au lieu des 14 de l' α -GalCer induit préférentiellement une réponse de type Th2¹⁶ alors que l'analogue α -C-GalCer induit une réponse de type Th1 100 à 1000 fois supérieure par rapport à son analogue oxygéné.^{54a} En effet, l' α -C-GalCer, non hydrolysable *in vivo*, forme un complexe plus stable avec le CD1d et peut donc interagir plus longtemps avec le récepteur.⁵⁵

Les propriétés immunorégulatrices de nos analogues difluorés d' α -galactosylcéramides ont été évaluées lors de tests permettant de mesurer la prolifération cellulaire ainsi que la production de cytokines induite par ses analogues. Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Immunologie et Chimie Thérapeutiques à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) de Strasbourg, avec l'aide du Dr Fanny Monneaux.

2. Tests immunologiques sur nos analogues

2.1. Introduction

La fonction principale du système immunitaire est d'établir une réponse immune protectrice contre les Ag dérivés de pathogènes tout en maintenant une tolérance vis-à-vis des Ag du soi. La tolérance au soi se définit donc comme un état de non-réponse immunitaire vis-à-vis des constituants de l'organisme et une rupture de cette tolérance, peut conduire au développement de maladies autoimmunes. Le maintien de la tolérance est assuré en périphérie, notamment par l'existence de cellules régulatrices, comme par exemple les cellules NKT. En effet, de par leurs caractéristiques fonctionnelles, les cellules NKT sont

¹³⁰ (a) Brossay, L.; Chioda, M.; Burdin, N.; Koezuka, Y.; Casorati, G.; Dellabona, P.; Kronenberg, M. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 1521-1528. (b) Spada, F. M.; Koezuka, Y.; Porcelli, S. A. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 1529-1534.

¹³¹ Kitamura, H.; Iwakabe, K.; Yahata, T.; Nishimura, S.-I.; Ohta, A.; Ohmi, Y.; Sato, M.; Takeda, K.; Okumura, K.; Van Kaer, L.; Kawano, T.; Taniguchi, M.; Nishimura, T. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1121-1127.

impliquées dans de nombreuses réponses immunes, incluant les réponses anti-tumorales et anti-infectieuses, mais aussi le maintien de la tolérance au soi et la prévention de l'autoimmunité. Étant capables de sécréter à la fois des cytokines pro- et anti-inflammatoires, les cellules NKT constituent une cible privilégiée pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment en se focalisant sur une reconstitution de leur nombre ou par la modulation de leur activité. Depuis plusieurs années, l'équipe d'immunologie s'intéresse aux cellules T régulatrices au cours d'une maladie autoimmune systémique, le lupus érythémateux disséminé (LED) dans des modèles murins mais aussi chez des patients. Une analyse numérique a permis de mettre en évidence une diminution en nombre de cellules NKT, dans un modèle murin de lupus, mais aussi chez des patients atteints de LED ou d'une autre maladie autoimmune apparentée, la polyarthrite rhumatoïde.¹³² Des études chez les souris ont pu montrer qu'il était possible de restaurer ce défaut numérique en activant *in vivo* les cellules NKT après administration d'un analogue de l' α -GalCer, validant ainsi le potentiel thérapeutique de tels analogues.

Nous nous sommes donc proposés de sélectionner des analogues pouvant se révéler efficaces dans le traitement du lupus. La première étape consiste à vérifier l'activité des analogues, et pour cela, la reconnaissance des analogues par les cellules NKT s'effectue par des analyses *ex vivo*.

En effet, l'activité des analogues est mesurée par leur capacité à induire la prolifération des cellules NKT ainsi que leur sécrétion de cytokines, et la spécificité de cette réponse est évaluée en présence d'un Ac anti-CD1d bloquant. Ces Ac anti-CD1d bloquant rendent alors impossible la présentation du ligand par la molécule CD1d au TCR du lymphocyte NKT.

Quatre analogues difluorés d' α -galactosylcéramides comportant un groupement hydroxyle supplémentaire en α du CF₂ ont été testés afin de connaître l'influence de cet alcool supplémentaire sur l'activité des composés.

¹³² Parietti, V.; Chiffot, H., Sibilia, J.; Muller, S.; Monneaux, F. *Clin. Immunol.* **2010**, *134*, 331-339.

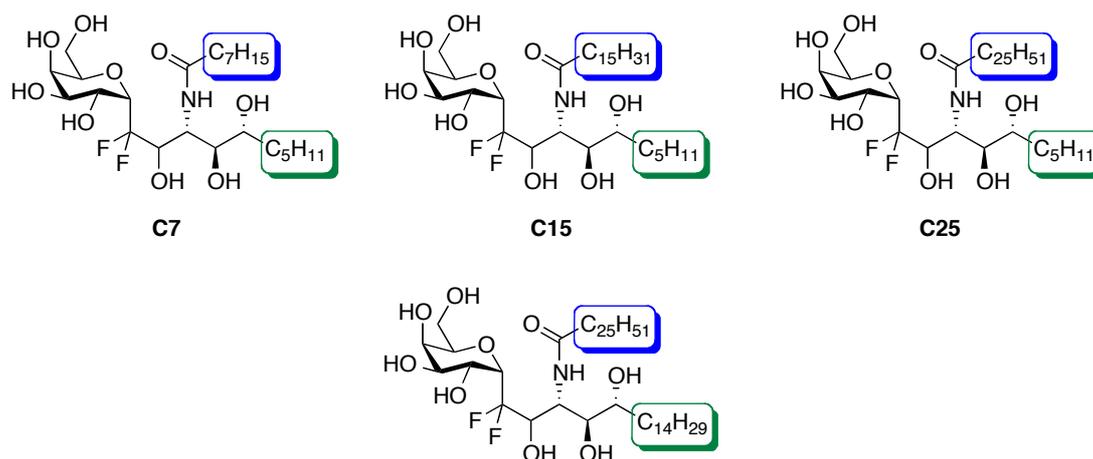


Figure 42 : Les analogues difluorés d' α -galactosylcéramides

2.2. Tests immunologiques

2.2.1. Protocole expérimental

- Les ligands sont préalablement dissous dans le DMSO afin d'obtenir des échantillons à une concentration de 5 mg/L, puis dans un milieu adapté aux cultures cellulaires.
- Les splénocytes, récoltés à partir de rates de souris saines BALB/c, sont cultivés en présence des ligands à différentes concentrations (10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/mL}$).
- Les contrôles internes sont définis comme suit :
 - Absence de ligand (contrôle négatif, définition du bruit de fond)
 - Présence de l' α -GalCer commercial (présente une réponse cellulaire spécifique des cellules NKT déjà connue, contrôle positif)
 - Cultures réalisées en absence et en présence d'Ac anti-CD1d bloquant (permet d'étudier la spécificité de la réponse induite)

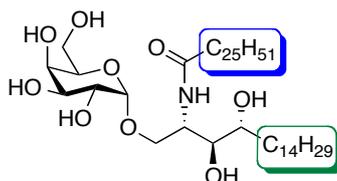
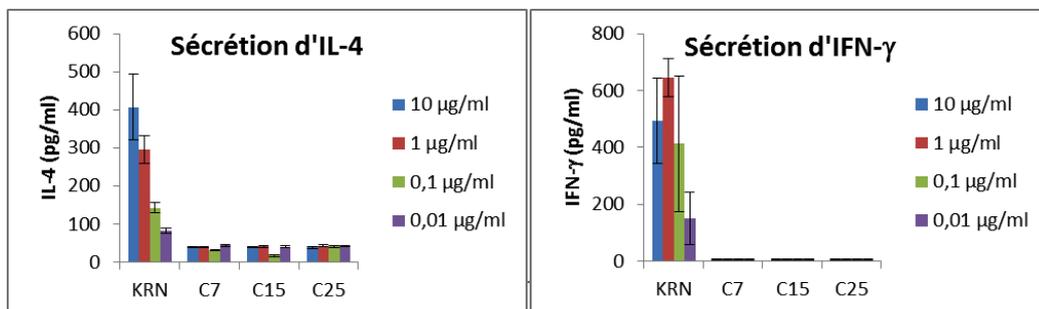
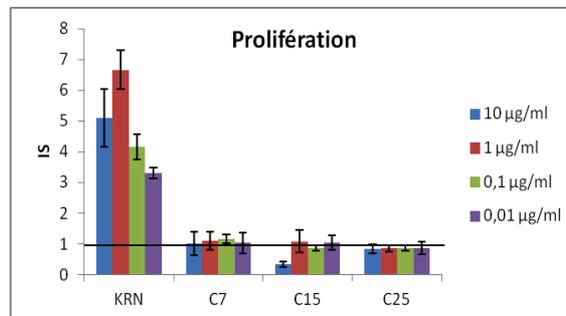


Figure 43 : KRN 7000

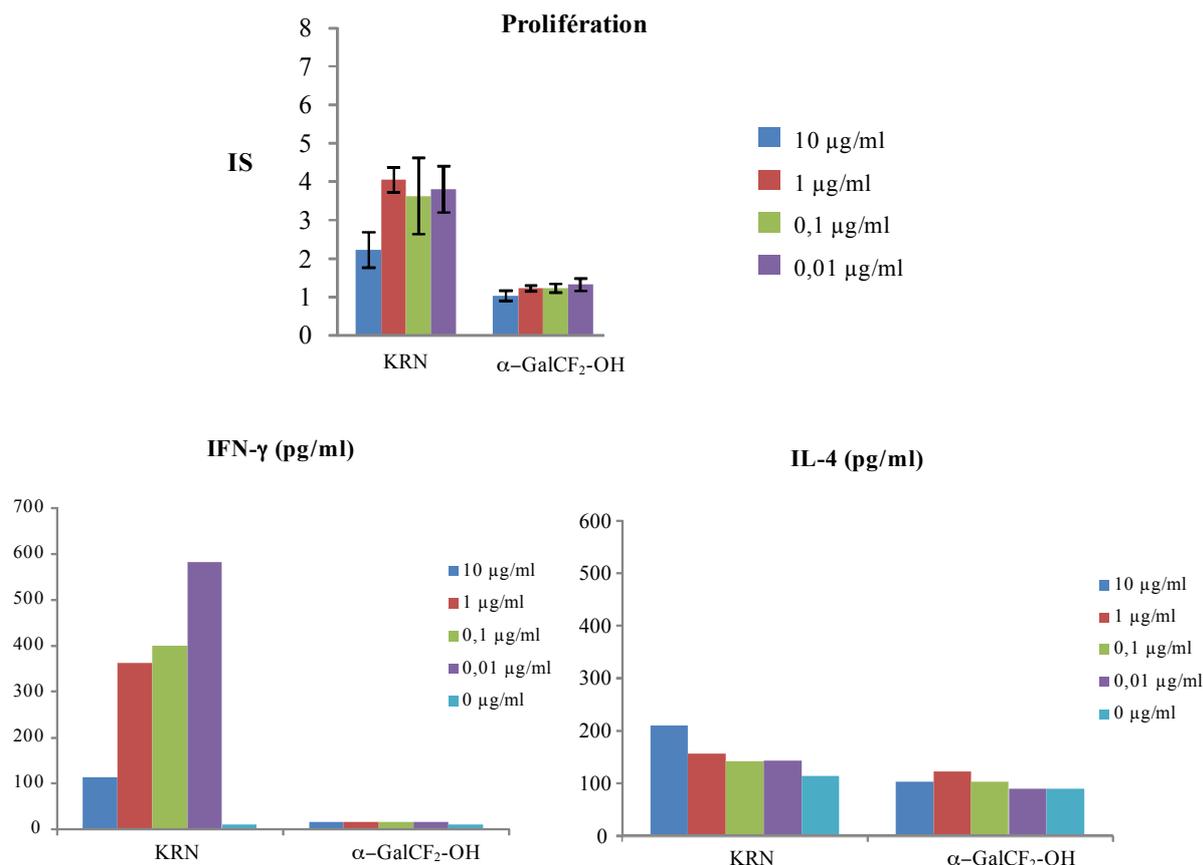
La prolifération cellulaire est mesurée après trois jours de culture dans un incubateur à 37°C, 80% d'humidité et 5% de CO₂ par incorporation de thymidine tritiée permettant la mesure de la radioactivité incorporée par les cellules pendant l'activation. Les résultats sont exprimés en indice de stimulation (IS), correspondant aux coups par minutes (cpm) mesurés en présence de ligand par cpm mesurés en absence de ligand. En parallèle, les quantités de cytokines sécrétées (IFN- γ et IL-4) sont déterminées par un test ELISA de type sandwich dans les surnageants récoltés après 30h de culture dans l'incubateur.

2.2.2. Résultats

Dans un premier temps, nous avons testé une famille de trois composés que nous avons synthétisés à savoir ceux possédant une courte chaîne phytosphingosine. Les résultats obtenus montrent que contrairement au KRN7000 commercial qui induit à la fois la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-4, et ce de façon CD1d restreinte (inhibition de la réponse en présence d'Ac anti-CD1d bloquant, résultats non montrés), aucun de nos analogues ne semblent capables d'activer les cellules NKT issues de rate de souris BALB/c.



Bien que ces résultats soient assez décevants, il nous a paru judicieux de tester le quatrième analogue synthétisé correspondant au KRN 7000 du point de vue des longueurs de chaînes. Bien qu'au cours de cette expérience, le KRN 7000 commercial ait présenté une activité moindre (avec notamment une faible sécrétion d'IL-4), nos résultats montrent que dans cette expérience (dans laquelle le KRN7000 reste positif), notre analogue n'induit quant à lui aucune prolifération ni sécrétion de cytokines par les cellules NKT.



Au vu de ces résultats, nous nous sommes demandés si la non activité observée était due au remplacement de l'atome d'oxygène par un groupement CF₂ ou au groupement hydroxyle supplémentaire en position 2' de la chaîne phytosphingosine. Afin de répondre à cette interrogation, nous avons donc dû poursuivre comme prévu initialement notre travail concernant la synthèse d'analogues exacts difluorés de GalCer.

Définitions

Anticorps : Un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B : les plasmocytes.

Antigène : macromolécule naturelle ou synthétique, étrangère à l'organisme considéré, mais reconnue par des anticorps ou des cellules du système immunitaire et capable d'engendrer une réponse immunitaire.

Clusters de différenciation (CD) : antigènes exprimés par les populations cellulaires du système immunitaire et déterminent le type cellulaire et éventuellement leur fonction. Ce sont des marqueurs des surfaces cellulaires, tels que les reconnaissent des jeux spécifiques d'anticorps utilisés pour identifier le type de cellule, l'étape de différenciation et l'activité d'une cellule.

Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) : système de reconnaissance du soi présent chez la plupart des vertébrés. Le CMH I permet aux cellules présentatrices d'antigène d'être identifiées comme faisant partie du corps et le CMH II permet à certains globules blancs de présenter des parties de corps intrus pour déclencher une réponse immunitaire. Dans de rares cas, les peptides du CMH peuvent devenir, à leur tour, responsables de maladies autoimmunes indépendamment de l'immunité cellulaire.

ELISA : La méthode immuno-enzymatique ELISA est un examen de laboratoire. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène.

Ex vivo : cellules primaires fraîches sorties de l'animal (dans notre cas, il s'agit de cellules de la rate).

Granulocytes : Les granulocytes sont des globules blancs qualifiés de « non spécifiques » dans la mesure où ils ne sont pas dirigés contre un seul antigène. Il existe trois catégories de granulocytes : les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles.

Lupus érythémateux disséminé (LED) : Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie systémique autoimmune chronique, de la famille des connectivités, c'est-à-dire touchant plusieurs organes du tissu conjonctif, qui se manifeste différemment selon les individus.

Pathogène : du grec « naissance de la douleur » signifie : qui entraîne une maladie. La capacité d'une maladie à provoquer des troubles chez un hôte dépend de son pouvoir invasif (capacité à se répandre dans les tissus et à y établir un/des foyers infectieux), et de son pouvoir toxicogène (capacité à produire des toxines). Il existe aussi de nombreux virus pathogènes.

Phagocyte : signifie « mangeur de cellules ». Les phagocytes ou « *cellules phagocytaires* », sont en effet des cellules pouvant ingérer et détruire des particules de taille variable (de l'échelle nanométrique à micrométrique), qui sont par exemple des microbes, des cellules altérées, des tissus sanguins ou des particules étrangères à l'organisme. Les phagocytes jouent un rôle essentiel contre les infections, essentiellement bactériennes, mais ils participent aussi à l'élimination des micro- et nano-particules étrangères qui pénètrent l'organisme. Les phagocytes regroupent les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles et participent aux processus inflammatoires.

Plasmocytes : globules blancs du sang. Ces cellules sont productrices d'anticorps, et elles sont le stade final de différenciation des lymphocytes B. À la différence d'autres lymphocytes B, qui présentent leurs anticorps au niveau de leur surface membranaire, les plasmocytes sont capables de produire des anticorps solubles. De plus, ces cellules se caractérisent par une incapacité de prolifération (contrairement aux autres stades d'activation des lymphocytes). Ces plasmocytes sont produits dans la rate de mammifères et migrent dans la moelle osseuse

où ils peuvent survivre plusieurs mois, permettant ainsi une défense à long terme de l'organisme.

Polyarthrite rhumatoïde : C'est une maladie dégénérative inflammatoire chronique caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique et évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes.

Chapitre IV

Vers la synthèse d'analogues exacts difluorés de GalCer

En parallèle à ces tests de premiers analogues, nous devons voir qu'il arrive de poursuivre notre objectif de synthèse de mimes exacts de galactosylcéramides. À ce premier objectif s'ajoutait alors la volonté d'interpréter les résultats immunologiques obtenus avec les premières molécules synthétisées possédant un groupement hydroxyle supplémentaire en position 2' de la chaîne phytosphingosine. En effet, ces piètres résultats peuvent aussi bien provenir du remplacement de l'oxygène anomérique par un groupement CF₂ que par la présence de ce OH supplémentaire.

1. Stratégie envisagée

D'une manière générale, l'objectif est donc de transformer ce OH en 2' par un groupement réductible (halogène, sulfure, xanthate...). Le problème principal à résoudre est donc la différenciation des deux groupements OH présents sur la molécule, soit par un jeu de protection sélective, soit par une réaction directe du groupement visé. Dans un premier temps, nous pensions que le OH en 2 sur le sucre serait plus réactif que celui en 2' (dont la nucléophilie devrait être amoindrie par la proximité du CF₂) et nous avons alors envisagé sa protection sélective. Nos cibles **I** pourraient alors être obtenues par réduction en 2' du composé **II**, lui-même obtenu à partir de l'alcool monoprotégé **III**. Toutefois, en cas d'absence de sélectivité lors de la monoprotection de **IV**, nous pourrions tirer parti de la présence du groupement NHBoc pour effectuer une protection cyclique en 2'/3' et préparer des composés type **V**. Le précurseur **III** pourrait alors être obtenu *via* **V** par un jeu de protection/déprotection ou bien **II** pourrait être obtenu directement par ouverture de **V**.

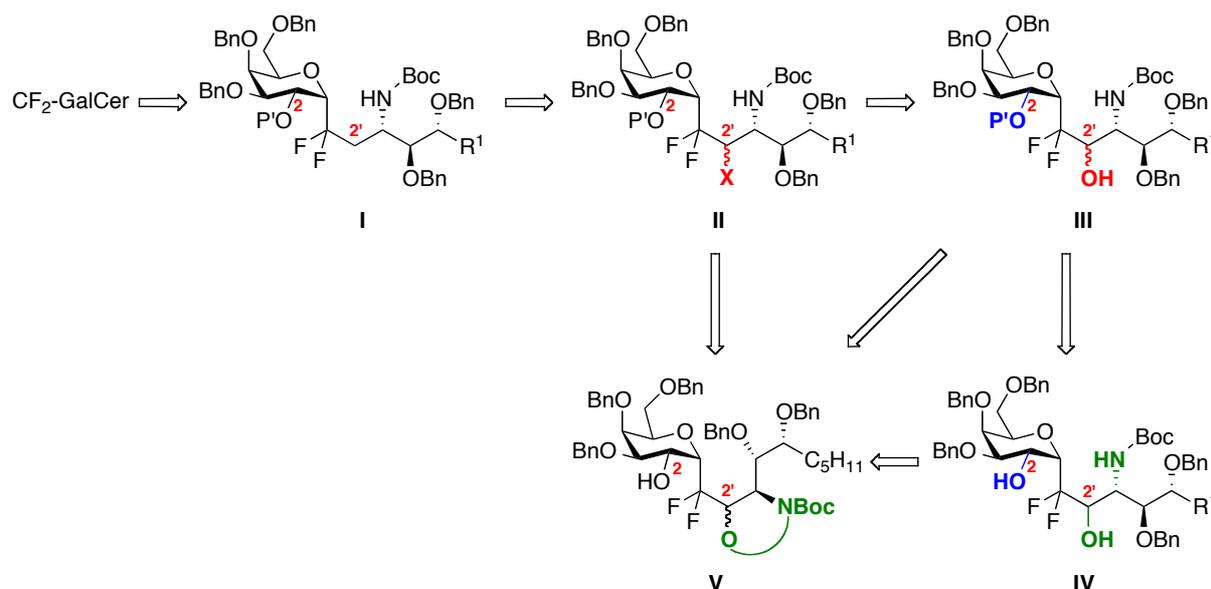


Schéma 80 : Stratégie de synthèse d'analogues exacts d' α -CF₂-galactosylcéramides

2. Protection sélective en position 2

Le premier objectif était de déterminer si l'on pouvait compter sur une différence de réactivité entre les deux groupements OH du composé **103**. Nous avons tenté d'introduire un équivalent d'anhydride acétique sur le composé **103** en présence d'une quantité catalytique de DMAP et d'un excès de triéthylamine afin de se rendre compte de la sélectivité de la réaction. Nous avons pu constater la formation de trois produits mono- et di-protégés ce qui signifie un manque total de sélectivité et par conséquent une réactivité équivalente au niveau des deux alcools primaires.

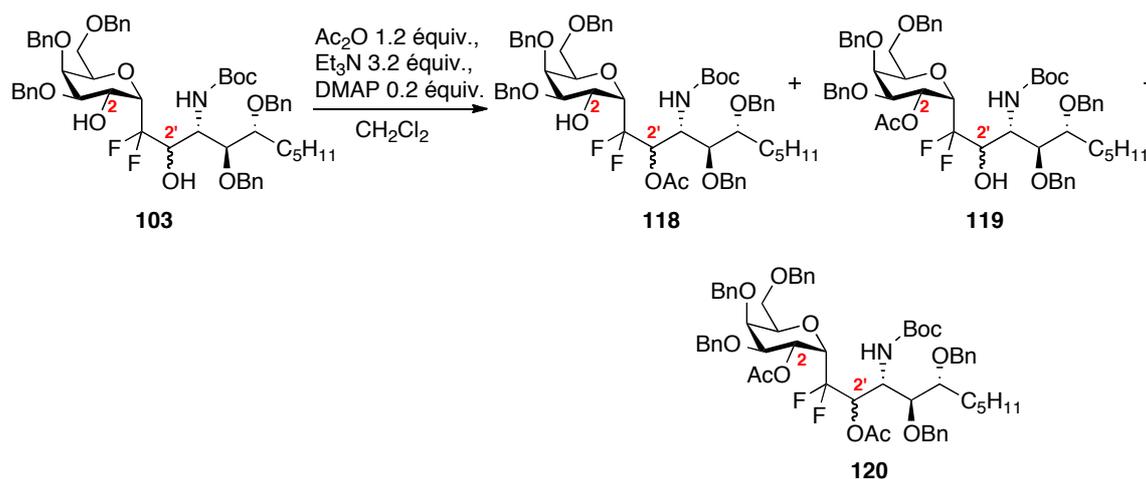


Schéma 81 : Essais d'acétylation du composé 103

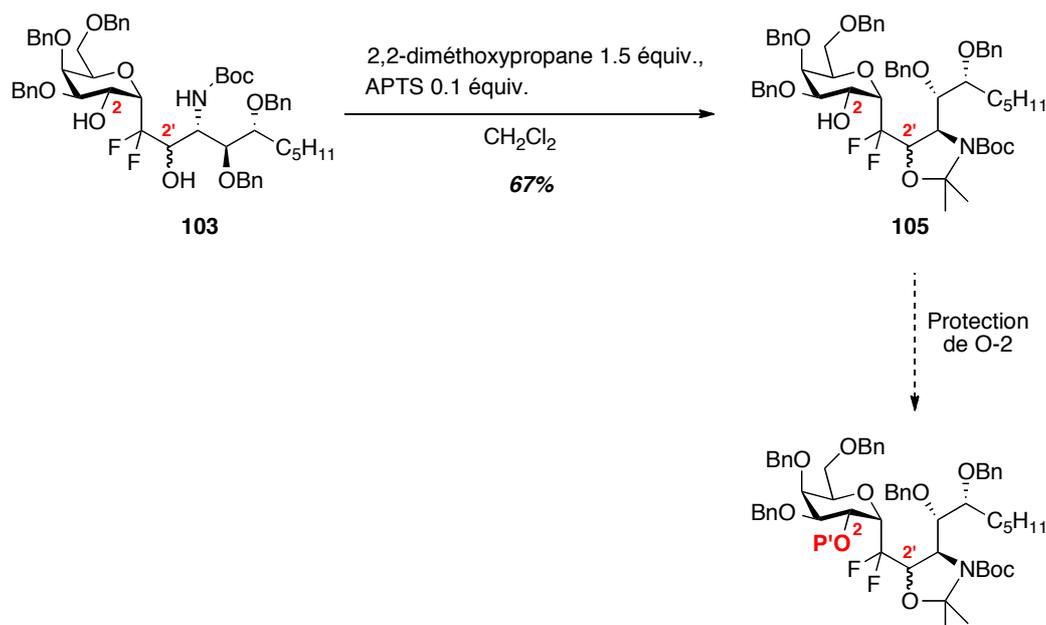
Nous avons alors décidé d'effectuer cette protection en position 2 en deux temps, par l'intermédiaire d'une protection cyclique entre les positions 2' et 3'.

3. Formation d'un composé cyclique en 2'/3'

Dans un premier temps, il nous a paru judicieux de protéger sélectivement l'alcool en 2' en s'aidant du NHBoc voisin. En effet, la formation d'un acétonide ou tout autre motif cyclique pourrait sélectivement protéger le O-2' tout en laissant libre le groupement hydroxyle en position 2 du sucre.

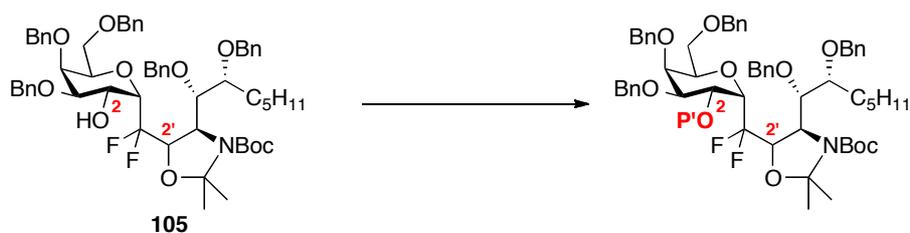
3.1. Via une protection acétonide

La stratégie de synthèse envisagée *via* une protection acétonide en O-2' nous paraissait la plus simple, le composé **104** ayant été préparé au chapitre 2 dans le but de déterminer la configuration du centre stéréogénique. Une simple protection de l'alcool libre en position 2 du sucre nous semblait alors assez triviale.


 Schéma 82 : : Protection *via* un acétone en O-2'

Dans un premier temps, nous avons appliqué des conditions classiques de benzylation, utilisant en plus du bromure de benzyle soit l'iodure de tétrabutylammonium ou l'iodure de sodium. En effet, le groupement benzyle est apparu comme un groupement protecteur de choix par soucis d'homogénéité, ce groupement pouvant être clivé en fin de synthèse avec ceux déjà présents sur le sucre. Cependant aucune conversion de produit de départ n'a été observée. Nous avons tenté de réaliser la même réaction en utilisant du triflate de benzyle préalablement synthétisé, mais le résultat obtenu est le même. D'autres conditions de protection de cet alcool ont alors été appliquées au composé **105**. L'utilisation d'un excès de chlorure de benzoyle ou d'anhydride benzoïque n'ont malheureusement pas permis d'obtenir le produit souhaité. Nous avons également envisagé d'introduire un groupement acétate. Le premier essai a été effectué en présence d'un léger excès d'anhydride acétique dans le dichlorométhane à température ambiante et le second avec 33 équivalents d'anhydride acétique et 150 équivalents de pyridine à 150°C pendant six jours. Cependant, aucune conversion du produit de départ n'a été observée malgré les conditions drastiques utilisées. À partir de ces résultats, nous avons donc choisi d'utiliser des groupements protecteurs silylés comme le *tert*-butyldiméthylsilyle. En présence de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle, aucune réaction n'a été observée, cependant, l'utilisation de triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle a conduit à des résultats peu reproductibles. En effet, le composé souhaité n'a pu être obtenu qu'une seule fois en très faible quantité. L'emploi de TESOTf ou de TIPSOTf a abouti à une

dégradation partielle du produit de départ et le triflate de méthyle, que ce soit à température ambiante ou bien à 50°C toute une nuit, n'a apporté aucun résultat supplémentaire.



Entrée	Conditions	Résultats
1	BnBr 4.5 équiv., NaH 3 équiv., <i>n</i> -Bu ₄ NI 1 équiv., DMF	Aucune conversion
2	BnBr 2.5 équiv., NaH 2.5 équiv., NaI 1.2 équiv., DMF	Aucune conversion
3	BnOTf 3 équiv., <i>i</i> -Pr ₂ NEt 3 équiv., CH ₂ Cl ₂ , -78°C	Aucune conversion
4	BzCl 2 équiv., DMAP 1.8 équiv., CH ₂ Cl ₂	Aucune conversion
5	Bz ₂ O 2.5 équiv., Et ₃ N 2.5 équiv., DMAP 0.5 équiv., CH ₂ Cl ₂	Aucune conversion
6	Ac ₂ O 2.5 équiv., Et ₃ N 2.5 équiv., DMAP 0.5 équiv., CH ₂ Cl ₂	Aucune conversion
7	Ac ₂ O 33 équiv., pyridine 115 équiv., 0°C à 150°C, 6 jours	Aucune conversion
8	TBDMSCl 2 équiv., imidazole 0.5 équiv., Et ₃ N 2 équiv., CH ₂ Cl ₂	Aucune conversion
9	TBDMSOTf 2 équiv., <i>i</i> -Pr ₂ NEt 2 équiv., CH ₂ Cl ₂ , -78°C	Traces du produit désiré
10	TESOTf 3 équiv., <i>i</i> -Pr ₂ NEt 3 équiv., CH ₂ Cl ₂ , -78°C	Produit de départ + dégradation
11	TIPSOTf 3 équiv., <i>i</i> -Pr ₂ NEt 3 équiv., CH ₂ Cl ₂ , -78°C	Produit de départ + dégradation
12	MeOTf 1.5 équiv., di- <i>tert</i> -butylpyridine 1.5 équiv., CH ₂ Cl ₂	Aucune conversion
13	MeOTf 1.5 équiv., di- <i>tert</i> -butylpyridine 3 équiv., CH ₂ Cl ₂ , 50°C, 1 nuit	Produit de départ + dégradation

Tableau 3 : Essais de protection de O-2

La protection de l'alcool en position 2 du sucre, *via* une protection sous forme d'acétonide en O-2', n'a donc pas permis d'obtenir les produits attendus. Cet échec était bien sûr inattendu et la seule explication envisageable serait que cette position 2 soit masquée par l'acétonide, groupement encombrant. Nous avons donc décidé de changer la protection de O-2' par un groupement sulfamidate, dans une approche qui diffère d'une simple protection sélective.

3.2. *Via* une protection sulfamidate

Nous avons donc tenté de protéger cet alcool situé sur la chaîne phytosphingosine en formant dans un premier temps le sulfamidite qui par la suite pourrait être oxydé en sulfamidate. Cette approche ne constitue plus une simple protection sélective en 2' puisqu'il s'agit cette fois d'activer cette position et offrir la possibilité d'introduire des groupements réductibles à l'aide de nucléophiles halogénés ou soufrés.

En présence de chlorure de thionyle, le sulfamidite a pu être observé avec une conversion totale.¹³³ Cependant, celui-ci n'a pu être isolé du fait de sa faible stabilité sur colonne de silice. Le produit **121** obtenu, il ne reste plus qu'à oxyder le soufre afin d'obtenir le sulfamidate désiré.

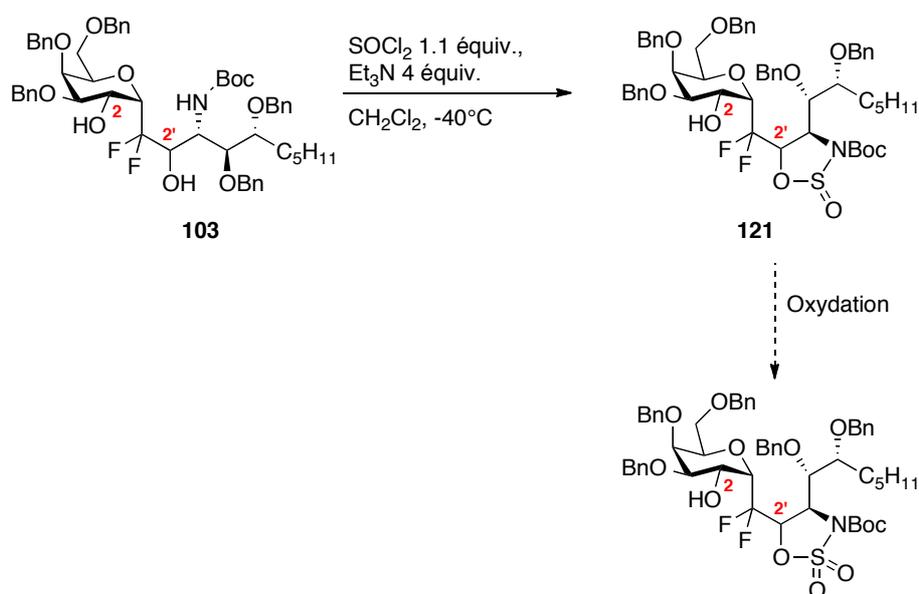
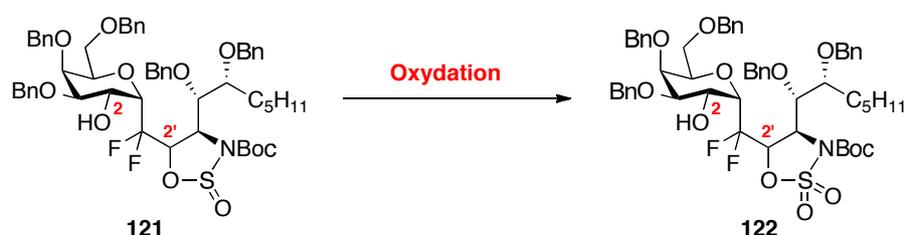


Schéma 83 : Protection *via* un sulfamidate en O-2'

¹³³ Guo, R.; Lu, S.; Chen, X.; Tsang, C.-W.; Jia, W.; Sui-Seng, C.; Amoroso, D.; Abdur-Rashid, K. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 937-940.

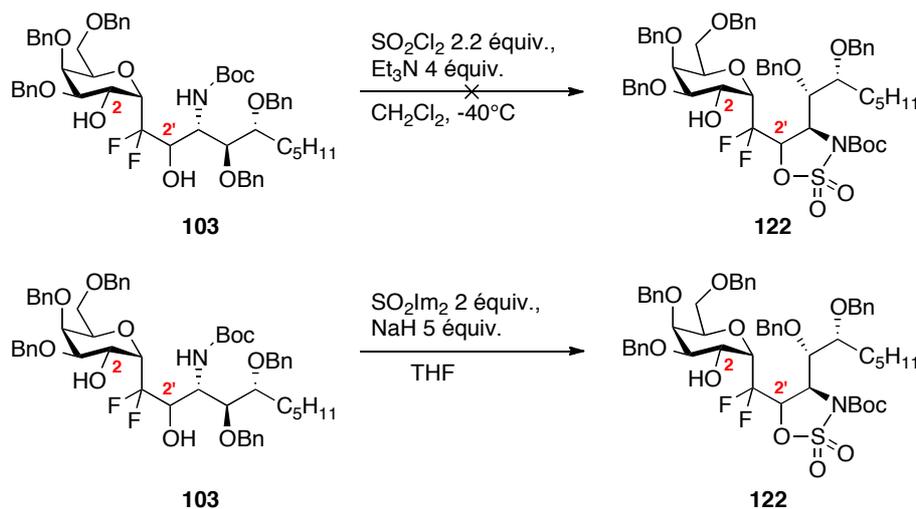
Dans un premier temps, nous avons utilisé de l'acide *m*éta-chloroperbenzoïque. Cependant, au bout de huit heures, aucune conversion du produit de départ n'a été observée. Nous avons ensuite appliqué les conditions d'oxydation décrites par le groupe de Guo, en présence de chlorure de ruthénium et de périodate de sodium. Seul le produit de départ a été observé lors de ces essais malgré les changements de température et de stoechiométrie.



Entrée	Conditions	Résultats
1	<i>m</i> -CPBA 1.25 équiv., 8 h, CH ₂ Cl ₂	Aucune conversion
2	RuCl ₃ 2 équiv., NaIO ₄ 2 équiv., MeCN/H ₂ O, 0°C	Aucune conversion
3	RuCl ₃ 1.1 équiv., NaIO ₄ 1.1 équiv., MeCN/H ₂ O, t.a.	Aucune conversion
4	RuCl ₃ 0.2 équiv., NaIO ₄ 3.8 équiv., MeCN/H ₂ O, t.a.	Aucune conversion

Tableau 4 : Essais d'oxydation du composé 121

L'étape d'oxydation ne nous ayant pas permis d'obtenir le produit attendu, nous avons donc décidé d'introduire directement le sulfamidate en présence de chlorure de sulfuryle ou bien de sulfonyldiimidazole.

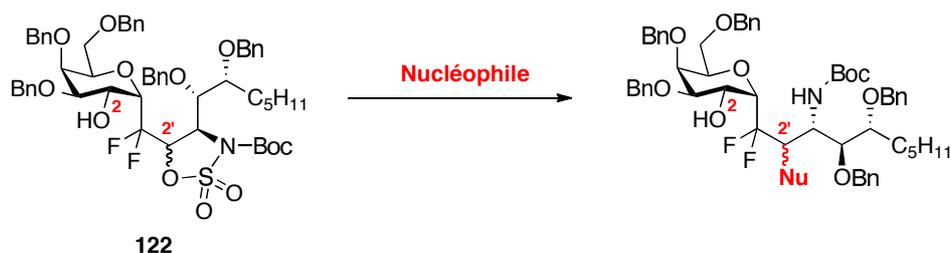
Schéma 84 : Essais de protection *via* un sulfamidate en O-2'

Nous avons débuté avec le chlorure de sulfuryle comme réactif, et ce en excès car il peut réagir avec les deux groupements hydroxyles.¹³⁴ À la fin de la réaction, seul le produit non cyclisé a pu être détecté par spectrométrie de masse. Par ailleurs, l'utilisation d'un excès de sulfonyldiimidazole en présence d'hydrure de sodium dans le THF nous a conduits au produit désiré **122** avec une conversion totale.¹³⁵ Cependant, ce produit n'a pu être isolé du fait de sa faible stabilité sur silice et le brut réactionnel, très propre, a été directement engagé dans les essais d'ouverture par divers nucléophiles.¹³⁶

¹³⁴ Liu, S.; Xie, J.-H.; Li, W.; Kong, W.-L.; Wang, L.-X.; Zhou, Q.-L. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4994-4997.

¹³⁵ (a) Aguilera, B.; Fernández-Mayoralas, A.; Jaramillo, C. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5863-5876. (b) Chen, H.-M.; Withers, S. G. *Carbohydrate Research* **2007**, *342*, 2212-2222.

¹³⁶ Cobb, S. L.; Vederas, J. C. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1031-1038.



Entrée	Conditions	Résultats
1	PhSH 1.8 équiv., CS ₂ CO ₃ 1.5 équiv., DMF	Produit de départ majoritaire
2	PhSH 4 équiv., CS ₂ CO ₃ 3.5 équiv., DMF	Dégradation du produit de départ
3	KSAc 5 équiv., DMF	Dégradation du produit de départ
4	Ethylxanthate de potassium 1.5 équiv., DMF	Produit de départ majoritaire
5	LiBr 2 équiv., DMF	Produit de départ majoritaire
6	Et ₃ SiH 1.5 équiv., BF ₃ ·Et ₂ O 1 équiv., CH ₂ Cl ₂ , -78°C	Dégradation du produit de départ

Tableau 5 : Essais d'addition nucléophile sur le composé 118

Nous avons donc effectué, dans un premier temps, un essai de substitution nucléophile en présence de 1.8 équivalents de thiophénol et de 1.5 équivalents de carbonate de césium dans le DMF. Dans ce cas, le produit de départ est majoritaire et l'allongement de la durée de la réaction ainsi que l'augmentation du nombre d'équivalent des réactifs utilisés conduisent à la dégradation du produit de départ. Un excès de thioacétate de potassium ne nous permet que d'obtenir des produits de dégradation. D'autres conditions de substitution nucléophile ont alors été appliquées au composé **122**. L'utilisation d'éthylxanthate de potassium et de bromure de lithium ont donné majoritairement le produit de départ. La substitution en présence de triéthylsilane et de BF₃·Et₂O n'a également pas permis d'obtenir le produit souhaité mais a seulement entraîné la dégradation du produit de départ.

Nous n'avons donc pour le moment pas réussi à substituer la position 2', *via* une activation sous forme de sulfamidate. Cette approche étant cependant une des plus attractives, nous devons réaliser de nouveaux essais en faisant varier les nucléophiles, les solvants ou la température.

4. Conclusions

Quelques voies d'accès aux analogues exacts d' α -galactosylcéramides faisant intervenir une protection sélective de O-2' ont donc été exploitées mais aucune n'a abouti. En effet, malgré une première protection sélective de O-2' *via* un groupement acétonide, de nombreux essais de protection de l'alcool sur le sucre (O-2) n'ont malheureusement pas donné les résultats escomptés, le groupement acétonide devant être trop encombrant pour protéger l'alcool libre. Les essais de substitutions nucléophiles sur le sulfamidate préalablement formé, qui auraient abouti à des intermédiaires intéressants, se sont également soldés par un échec. Cette approche est cependant la plus prometteuse et d'autres essais de substitution sont à tester.

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion

Une synthèse originale d' α -C-galactosylcéramides difluorés a donc été mise au point et a conduit à ce jour à des premiers analogues. Ces CF₂-glycosides pourraient résoudre les inconvénients que posent généralement l'utilisation de principes actifs glycosidiques, à savoir leur faible stabilité métabolique et donc leur médiocre biodisponibilité. Étant donné l'activité très prometteuse des α -galactosylcéramides pour le traitement des tumeurs, des maladies infectieuses et, domaine qui nous intéresse plus particulièrement, des maladies autoimmunes, l'obtention d'analogues à l'activité accrue par une meilleure stabilité *in vivo* serait donc très intéressante. Dans le cas précis de nos glycomimétiques, le groupement difluorométhylène serait peut-être plus à même de mimer efficacement l'atome d'oxygène que le groupement CH₂ des analogues C-glycosidiques déjà préparés, du fait des propriétés électroniques et stériques du fluor.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à développer une méthodologie de synthèse des CF₂-glycosides afin d'obtenir le synthon α -CF₂-galactose requis pour la préparation d' α -GalCer et permettant l'incorporation d'une chaîne céramide. À cette fin, une étape d'addition radicalaire du dibromodifluorométhane sur le 2-benzyloxygalactal suivie d'une réduction diastéréosélective, dans les conditions de Meerwein-Ponndorf-Verley, du carbonyle résultant permettaient ainsi d'obtenir le diastéréomère désiré. Il nous restait ensuite à mettre au point des méthodologies permettant d'introduire des chaînes aglycones sur cet intermédiaire. Un couplage entre le groupement hydroxyle situé en position 2 du sucre fluoré et les acides dérivés de phytosphingosines a été effectué puis la réalisation d'un échange halogène/métal suivi d'une addition intramoléculaire sur l'ester voisin et enfin la réduction de l'hémi-acétal formé nous ont permis d'obtenir l'intermédiaire de synthèse souhaité. Un couplage peptidique de différentes longueurs de chaînes grasses (C₇H₁₅, C₁₅H₃₁ et C₂₅H₅₁) nous a donné accès à des analogues modifiés de l' α -CF₂-galactosylcéramide comportant un alcool supplémentaire en position 2' de la chaîne phytosphingosine. Ces analogues ont dans un premier temps été testés par le Dr. Fanny Monneaux (IBMC de Strasbourg) afin de déterminer l'influence du groupement OH supplémentaire sur l'activité des composés. Malheureusement, les tests de prolifération et de sécrétion d'IFN- γ et d'IL-4 ont montré des résultats très faibles comparés au KRN 7000. Au vu de ces résultats, nous nous sommes

demandés si l'activité quasi-nulle observée était due au remplacement de l'atome d'oxygène par un groupement CF₂ ou au groupement hydroxyle supplémentaire en position 2' de la chaîne phytosphingosine. Afin de répondre à cette interrogation et de mener à bien le projet initial, nous avons poursuivi notre travail concernant la synthèse d'analogues exacts difluorés de GalCer.

Une protection sélective de l'alcool en position 2' par un acétonide à l'aide du groupement NHBoc voisin nous a permis d'obtenir un intermédiaire clé pour la déshydroxylation de ce centre. Malheureusement, l'étape de protection de l'alcool situé en position 2 du sucre fluoré n'a pas abouti malgré de nombreux essais. Au vu de ces résultats, nous avons une nouvelle fois profité de la présence de ce groupement NHBoc pour faire réagir sélectivement le OH en 2', mais cette fois pour l'activer directement en vue de l'introduction d'un nucléophile. En effet, l'installation d'un sulfamidate entre les positions 2' et 3' nous a aussi permis d'obtenir un second intermédiaire clé que nous souhaitions ouvrir avec des nucléophiles « réductibles » (halogénures, sulfures, xanthates...). Cependant, les divers essais d'addition nucléophile n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré mais a seulement entraîné la dégradation du produit de départ.

Nous avons ainsi pu mettre au point une synthèse originale d'analogues d' α -C-galactosylcéramides difluorés. La déshydroxylation en 2' de la chaîne phytosphingosine doit cependant être achevée dans le but d'obtenir des analogues exacts de GalCer.

2. Perspectives

Notre objectif est de réussir à terminer la synthèse d'analogues exacts du KRN 7000. Pour cela, il ne reste plus qu'à cliver le groupement hydroxyle en position 2' issu du produit de réduction de l'hémi-acétal. Quelques conditions expérimentales ont déjà été testées sans succès. Cependant, l'addition de nouveaux nucléophiles comme le thiophénolate ou d'autres dérivés de xanthate sur le sulfamidate **122** pourrait être envisagée.

Si ces essais ne donnent pas les résultats escomptés, une autre possibilité serait de former un carbamate ou un thiocarbamate cyclique afin de bloquer la position 2' de façon analogue à l'acétonide mais avec un encombrement stérique moindre. Ces derniers pourraient être formés en présence de phosgène ou de thiophosgène en fonction du carbamate désiré. La

stratégie envisagée avec l'acétonide serait ensuite étudiée sur ces composés, à savoir la protection de l'alcool en position 2 du sucre fluoré, puis la déprotection du carbamate et enfin la déshydroxylation en 2'.

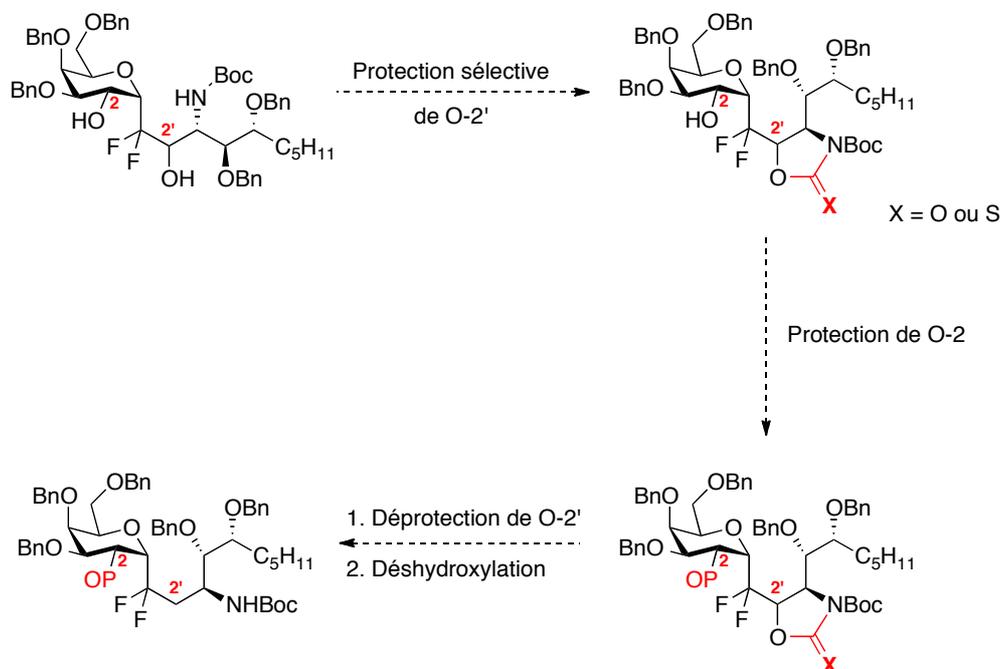


Schéma 85 : Une autre stratégie de synthèse possible d'analogues d' α -galactosylcéramides

Une autre stratégie de synthèse pourrait être de protéger les deux groupements hydroxyles existants sous forme d'acétate pour ensuite en déprotéger un sélectivement par rapport à l'autre. En effet, l'équipe de Nakazato¹³⁷ a décrit un protocole de saponification régiosélective par la lithine à 0°C en faveur de l'ester en α d'un atome de fluor. Dans notre cas, l'acétate situé en 2' pourrait être déprotégé avant celui en position 2 du sucre. Une dernière étape de déshydroxylation pourrait ensuite être envisagée afin d'obtenir des analogues difluorés d' α -CF₂-galactosylcéramides.

¹³⁷ Yasuhara, A.; Nakamura, M.; Sakagami, K.; Shimazaki, T.; Yoshikawa, R.; Chaki, S.; Ohta, H.; Nakazato, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 4193-4207.

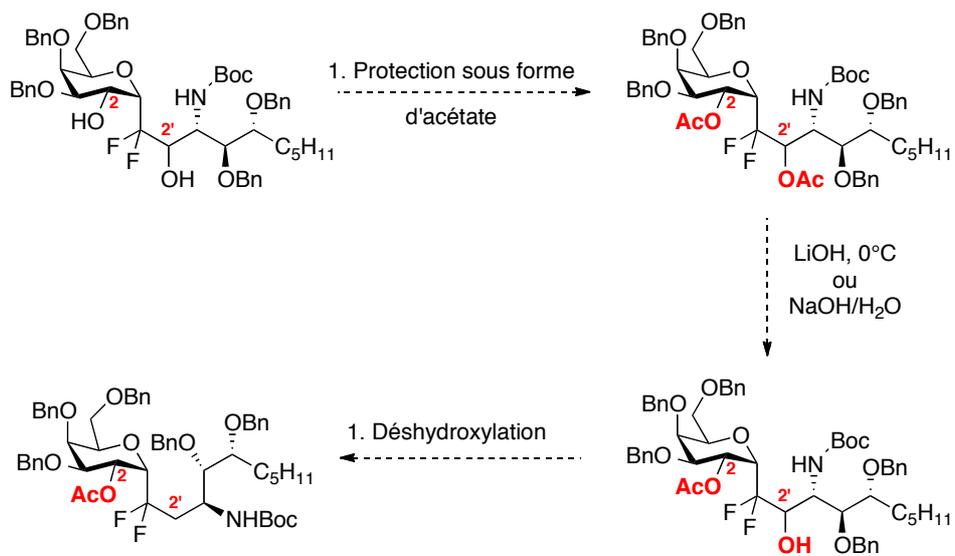


Schéma 86 : Autre stratégie de déshydroxylation en O-2'

Références bibliographiques

1. (a) *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2nd ed.; Lindshorst, T. K., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002. (b) *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wong, C.-H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003.
2. (a) Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. Synthetic Carbohydrate Vaccines. In *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wong, C.-H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003; Vol. 1, pp 381. (b) Danishefsky, S. J.; Allen, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836-863. (c) dziadek, S.; Hobel, A.; Schmitt, E.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630-7635. (d) Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5985-5988.
3. Wennekes, T.; van den Berg, R. J. H. N.; Boot, R. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8848-8849.
4. (a) Natori, T.; Morita, M.; Akimoto, K.; Koezuka, Y. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2771-2784. (b) Morita, M.; Motoki, K.; Akimoto, K.; Natori, T.; Sakai, T.; Sawa, E.; Yamaji, K.; Koezuka, Y.; Kobayashi, E.; Fukushima, H. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2176-2187. (c) Giaccone, G.; Punt, C. J. A.; Ando, Y.; Ruijter, R.; Nishi, N.; Peters, M.; von Blomberg, B. M. E.; Scheper, R. J.; van der Vliet, H. J. J.; van der Eertwegh, A. J. M.; Roelvink, M.; Beijnen, J.; Zwierzina, H.; Pinedo, H. M. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3702-3709.
5. (a) Grubor-Bauk, B.; Simmons, A.; Mayrhofer, G.; Speck, P. G. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 1430-1434. (b) Nieuwenhuis, E. E.; Matsumoto, T.; Exley, M.; Scheipman, R. A.; Glickman, J.; Bailey, D. T.; Corazza, N.; Colgan, S. P.; Onderdonk, A. B.; Blumberg, R. S. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 588-593. (c) Hong, S.; Wilson, M. T.; Serizawa, I.; Wu, L.; Singh, N.; Naidenko, O. V.; Miura, T.; Haba, T.; Scherer, D. C.; Wei, J.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; Van Kaer, L. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1052-1056.
6. Kronenberg, M. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 877-900.
7. (a) Mathé, C.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 276-281. (b) Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 105-111.
8. Shen, W.; Kim, J.-S.; Kisch, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 792-796.
9. Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2076-2078.
10. Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; Broder, S. *Science* **1990**, *249*, 1533-1544.
11. Sears, P.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300-2324.
12. Natori, T.; Koezuka, Y.; Higa, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5591-5592.
13. Akimoto, K.; Natori, T.; Morita, M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5593-5595.
14. (a) Godfrey, D. I.; Kronenberg, M. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1379-1388. (b) Borg, N. A.; Wun, K. S.; Kjer-Nielsen, L.; Wilce, M. C.; Pellicci, D. G.; Koh, R.; Besra, G. S.; Bharadwaj, J. M.; Godfrey, D. I.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. *Nature* **2007**, *448*, 44-49.
15. (a) Seino, K.; Motohashi, S.; Fujisawa, T.; Nakayama, T.; Tanigushi, M. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 807-812. (b) Linsen, L.; Somers, V.; Stinissen, P. *Hum. Immunol.* **2005**, *66*, 1193-1202.
16. Miyamoto, K.; Miyake, S.; Yamamutura, T. *Nature* **2001**, *413*, 531-534.

17. Murata, K.; Toba, T.; Nakanishi, K.; Takahashi, B.; Yamamura, T.; Miyake, S.; Annoura, H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2398-2401.
18. (a) Koch, M.; Stronge, V. S.; Shepherd, D.; Gadola, S. D.; Mathew, B.; Ritter, G.; Fersht, A. R.; Besra, G. S.; Schmidt, R. R.; Jones, E. Y.; Cerundolo, V. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 819-826. (b) Zajonc, D. M.; Cantu III, C.; Matner, J.; Zhou, D.; Savage, P. B.; Bendelac, Y. A.; Wilson, Y. A.; Teyton, L. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 810-818.
19. Zeng, Z. H.; Castano, A. R.; Segelke, B. W.; Stura, E. A.; Peterson, P. A.; Wilson, I. A. *Science* **1997**, *277*, 339-345.
20. Kobayashi, E.; Motoki, K.; Yamagushi, Y.; Uchida, T.; Fukushima, H.; Koezuka, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 615-619.
21. Costantino, V.; Fattorusso, E.; Imperatore, C.; Mangoni, A. *Tetrahedron*, **2002**, 369-375.
22. Barbieri, L.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Aru, E.; Parapini, S.; Tamarelli, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 468-473.
23. Barbieri, L.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Basilico, N.; Mondani, M.; Taramelli, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3279-3285.
24. Xing, G.-W.; Wu, D.; Poles, M. A.; Horowitz, A.; Tsuli, M.; Ho, D. D.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2907-2916.
25. Zhu, X. H.; Hara, A.; Taketomi, T. *J. Biochem. (Tokyo)* **1991**, *110*, 241-245.
26. Raju, R.; Castillo, B. F.; Richardson, S. K.; Thakur, M.; Severins, R.; Kronenberg, M.; Howell, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 4122-4125.
27. Zhou, X.-T.; Forestier, C.; Goff, R. D.; Li, C.; Teyton, L.; Bendelac, A.; Savage, P. B. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1267-1270.
28. Xia, C.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Woodward, R. L.; Wang, J.; Wang, P. G. *Tetrahedron* **2009**, 6390-6395.
29. Trappeniers, M.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Hillaert, U.; Linclau, B.; Elewaut, D.; Van Calenbergh, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16468-16469.
30. Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Inoue, S.; Shiozaki, M.; Watarai, H.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6827-6830.
31. Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Hirokawa, T.; Inoue, S.; Watarai, H.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3343-3347.
32. Tashiro, T.; Nakagawa, R.; Hirokawa, T.; Inoue, S.; Watarai, H.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6360-6373.
33. Ndonge, R. M.; Izmirian, D. P.; Dunn, M. F.; Yu, K. O. A.; Porcelli, S. A.; Khurana, A.; Kronenberg, M.; Richardson, S. K.; Howell, A. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10260-10270.
34. Sidobre, S.; Hammond, K. J. L.; Bénazet-Sidobre, L.; Maltsev, S. D.; Richardson, S. K.; Ndonge, R. M.; Howell, A. R.; Sakai, T.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A.; Kronenberg, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, *101*, 12254-12259.
35. Park, J. -J.; Lee, J. H.; Ghosh, S. C.; Bricard, G.; Venkataswamy, M. M.; Porcelli, S. A.; Chung, S. -K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3906-3909.
36. Trappeniers, M.; Goormans, S.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Linclau, B.; Al-Shamkhani, A.; Elliot, T.; Ottensmeier, C.; Werner, J. M.; Elewaut, D.; Van Calenbergh, S. *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 1061-1070.

37. Leung, L.; Tomassi, C.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Elewaut, D.; Elliott, T.; Al-Shamkhani, A.; Ottensmeier, C.; Van Calenbergh, S.; Werner, J.; Williams, T.; Linclau, B. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4433-4436.
38. Trappeniers, M.; Chofor, R.; Aspeslagh, S.; Li, Y.; Linclau, B.; Zajonc, D. M.; Elewaut, D.; Van Calenbergh, S. *Org. Lett.* **2010**, *13*, 2928-2931.
39. Goff R. D.; Gao, Y.; Mattner, J.; Yin, N.; Cantu, (III) C.; Teyton, L.; Bendelac, A.; Savage, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13602-13603.
40. Oki, S.; Chiba, A.; Yamamura, T.; Miyake, S. *J. Clin. Invest.* **2004**, *11*, 1631-1640.
41. Yu, K. O. A.; Im, J. S.; Molano, A.; Dutronc, Y.; Illarionov, P. A.; Forestier, C.; Fujiwara, N.; Arias, I.; Miyake, S.; Yamamura, T.; Chang, Y. -T.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 3383-3388.
42. Velmourougane, G.; Raju, R.; Bricard, G.; Im, J. S.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A.; Howell, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3386-3388.
43. Toba, T.; Murata, K.; Nakanishi, K.; Takahashi, B.; Takemoto, N.; Akabane, M.; Nakatsuka, T.; Imajo, S.; Yamamura, T.; Miyake, S.; Annoura, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2781-2784.
44. Fujio, M.; Wu, D.; Garcia-Navarro, R.; Ho, D. D.; Tsuji, M.; Wong, C. -H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9022-9023.
45. Chang, Y. -J.; Huang, J. -R.; Tsai, Y. -C.; Hung, J. -T.; Wu, D.; Fujio, M.; Wong, C. H.; Yu, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 10299-10304.
46. Park, J. -J.; Lee, J. H.; Seo, K. -C.; Bricard, G.; Venkataswamy, M. M.; Porcelli, S. A.; Chung, S. -K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 814-818.
47. Lee, T.; Cho, M.; Ko, S. -Y.; Youn, H. -J.; Baek, D. J.; Cho, W. -J.; Kang, C. -H.; Kim, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 585-589.
48. Fuhshuku, K. -I.; Hongo, N.; Tashiro, T.; Masuda, Y.; Nakagawa, R.; Seino, K. -I.; Tanigushi, M.; Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 950-964.
49. Leung, L.; Tomassi, C.; Van Beneden, K.; Decruy, T.; Trappeniers, M.; Elewaut, D.; Gao, Y.; Elliott, T.; Al-Shamkhani, A.; Ottensmeier, C.; Werner, J. M.; Williams A.; Van Calenbergh, S.; Linclau, B. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 329-334.
50. (a) Bordwell, F. G. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 456-463. (b) Taft, R. W.; Bordwell, F. G. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 463-469.
51. Shiozaki, M.; Tashiro, T.; Koshino, H.; Nakagawa, R.; Inoue, S.; Shigeura, T.; Watarai, H.; Taniguchi, M.; Mori, K. *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 1663-1684.
52. Tomiyama, H.; Yanagisawa, T.; Nimura, M.; Noda, A.; Tomiyama, T. JP 2001/354666, 2002; Chem. Abst. 2002, 136, 37901x; US Patent Appl. 2002/0032158 A1, 14 Mars, **2002**.
53. Yang, G.; Schmiege, J.; Tsuji, M.; Franck, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3818-3822.
54. (a) Franck, R. W.; Tsuji, M. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 692-701. (b) Chen, G.; Chien, M.; Tsuji, M.; Franck, R. W. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1017-1022.
55. Schmiege, J.; Yang, G.; Franck, R. W.; Tsuji, M. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1631-1641.
56. Chen, G.; Schmiege, J.; Tsuji, M.; Franck, R. W. *Org. Lett.* **2004**, *22*, 4077-4080.
57. Toba, T.; Murata, K.; Yamamura, T.; Miyake, S.; Annoura, H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5043-5047.
58. Wipf, P.; Pierce, J. G. *Org. Lett.* **2006**, *15*, 3375-3378.

59. Liu, Z.; Byun, H. -S.; Bittman, R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2974-2977.
60. Dere, R. T.; Zhu, X. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4641-4644.
61. Blauvelt, M. L.; Khalili, M.; Jaung, W.; Paulsen, J.; Anderson, A. C.; Wilson, S. B.; Howell, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6374-6376.
62. Moissan, H. R. *Acad. Sciences* **1886**, *102*, 1543.
63. Shimizu M.; Hiyama T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 214-231.
64. Ojima, I.; McCarthy, J.T. *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*, ACS Symposium Series 639, **1996**, 2.
65. (a) O'hagan, D. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308-319. (b) Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. in *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, John Wiley & sons, Inc., Hoboken, **2008**, pp 72 et pp 279.
66. Numéro complet du *ChemBioChem* **2004**, *5*, 557.
67. L'étude de la réaction de nitration du toluène, du fluorobenzène et du chlorobenzène a en effet montré que la formation de l'intermédiaire de Whealand est 5 fois plus rapide dans le cas du fluorobenzène que du chlorobenzène mais 163 fois moins rapide que dans le cas du toluène. Un groupement méthyle reste donc bien plus activant qu'un fluor : Rosenthal, J.; Schuster, D.I. *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 679-690.
68. Purser, S.; Moore, P.R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 320-330.
69. Smyth, M. S.; Burke, T. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 551-554.
70. (a) Withers, S. G.; Street, I. P.; Bird, P.; Dolphin, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7530-7531. (b) Withers, S. G.; Street, I. P. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7929-7932.
71. (a) Schlosser, M.; Michel, M. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 99-108. (b) Mikami, K.; Itoh, Y.; Yamanaka, M. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1-16.
72. (a) Wolf, C.; Konig, W. A.; Roussel, C. *Liebigs Ann.* **1995**, 781. (b) Leroux, F. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 644-649.
73. (a) Alavi, A.; Reivich, M. *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32*, 2-5. (b) Warburg, O. *Science* **1956**, *123*, 309. (c) Warburg, O. *The metabolism of tumors*. London : Arnold Constable, **1930**. (d) Beuthien-Baumann, B.; Harnacher, K.; Oberdorfer, F.; Steinbach, J. *Carbohydrate Res.* **2000**, *327*, 107-118.
74. Filler, R.; Riputana, S. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 777-791.
75. Wells, P.R. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1968**, *6*, 111.
76. (a) Blackburn, G.M. *Chem. Ind. (London)*, **1981**, 184. (b) Blackburn, G.M.; Kent, D.E.; Kolkman, F. J. *Chem. Soc. Perkin.*, **1984**, *1*, 1119-1125.
77. (a) Deleuze, A.; Menozzi, C.; Sollogoub, M.; Sinaÿ, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6680-6683. (b) Sardinha, J.; Guieu, S.; Deleuze, A.; Fernández-Alonso, M. C.; Rauter, A. P.; Sinaÿ, P.; Marrot, J.; Jiménez-Barbero, J.; Sollogoub, M. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1689-1703. (c) Sardinha, J.; Rauter, A. P.; Sollogoub, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5548-5550.
78. (a) Barth, F.; O-Yang, C. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5873-5876. (b) Arnone, A.; Bravo, P.; Cavicchio, G.; Frigerio, M.; Viani, F. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8523-8540.
79. (a) Jiang, S.; Singh, G.; Batsanov, A.S. *Tetrahedron: Asymm.* **2000**, *11*, 3873-3877. (b) Audouard, C.; Fawcett, J.; Griffith, G. A.; Kérourédan, E.; Miah, A.; Percy, J. M.; Yang, H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4269-4272. (c) Anderl, T.; Audouard, C; Miah, A.; Percy, J. M.; Rinaudo, G.; Singh, K. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 5200-5206.

80. (a) Fourrière, G.; Lalot, J.; Van Hijfte, N.; Quirion, J. C.; Leclerc, E. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7048-7050. (b) Fourrière, G.; Van Hijfte, N.; Lalot, J.; Dutech, G.; Fragnet, B.; Coadou, G.; Quirion, J. C.; Leclerc, E. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3963-3972.
81. Jimenez-Barbero, J.; Demange, R.; Schenk, K.; Vogel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5132-5138.
82. Pérez-Castells, J.; Hernández-Gay, J. J.; Dento, R. W.; Tony, K. A.; Mootoo, D. R.; Jiménez-Barbero, J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1087-1092.
83. Motherwell, W. B.; Tozer, M.; Ross, B. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1437-1439.
84. Herpin, T.F.; Motherwell, W. B.; Tozer, M. T. *Tetrahedron : Asymmetry* **1994**, *5*, 2269-2282.
85. Herpin, T. F.; Motherwell, W. B.; Weibel, J. M. *Chem. Commun* **1997**, 923-924.
86. (a) Brigaud, T.; Lefebvre, O.; Plantier-Royon, R.; Portella, C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6115-6116. (b) Berber, H.; Brigaud, T.; Lefebvre, O.; Plantier-Royon, R.; Portella, C. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 903-909.
87. Wegert, A.; Miethchen, R.; Hein, M.; Reinke, H. *Synthesis* **2005**, 1850-1858.
88. Picard, J.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Augé, J. *Synthesis* **2006**, 979-982.
89. Kolympadi, M.; Fontanella, M.; Venturi, C.; André, S.; Gabius, H.-J.; Jiménez-Barbero, J.; Vogel, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2861-2873.
90. (a) Tony, K. A.; Denton, R. W.; Dilhas, A.; Jiménez-Barbero, J.; Mootoo, D. R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1441-1444. (b) Denton, R. W.; Tony, K. A.; Hernández-Gay, J. J.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Mootoo, D. R. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1624-1635.
91. Hirai, G.; Watanabe, T.; Yamaguchi, K.; Miyagi, T.; Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15420-15421.
92. Marcotte, S.; D'Hooge, F.; Ramadas, S.; Feasson, C.; Pannecoucke, X.; Quirion, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5879-5882.
93. Cuenca, A.-B.; D'Hooge, F.; Gouge, V.; Castelot-Deliencourt, G.; Oulyadi, H.; Leclerc, E.; Jubault, P.; Pannecoucke, X.; Quirion, J.-C. *Synlett* **2005**, 2627-2630.
94. (a) Adinolfi, M.; Barone, G.; De Lorenzo, F.; Iadonisi, A. *Synlett* **1999**, 336-338. (b) Boiron, A.; Zillig, P.; Faber, D.; Giese, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5877-5882.
95. Poulain, F.; Serre, A.-L.; Lalot, J.; Leclerc, E.; Quirion, J.-C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2435-2438.
96. Karche, N.; Pierry, C.; Poulain, F.; Oulyadi, H.; Leclerc, E.; Pannecoucke, X.; Quirion, J.-C. *Synlett* **2007**, 123-126.
97. Poulain, F.; Leclerc, E.; Quirion, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1803-805.
98. Moreno, B.; Quehen, C.; Rose-Hélène, M.; Leclerc, E.; Quirion, J.-C. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2477-2480.
99. (a) Dolbier, Jr, W. R. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1557-1584. (b) Kirsch, P. in *Modern Fluoroorganic Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2004**, 91-101. (c) Hu, J.; Zhang, W.; Wang, F. *Chem. Commun.* **2009**, 7465-7478.
100. (a) Miethchen, R.; Hein, M.; Reinke, H. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *5*, 919-923. (b) Wegert, A.; Reinke, H.; Miethchen, R. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1833-1837.
101. (a) Linker, T.; Sommermann, T.; Kahlenberg, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9377-9384. (b) Linker, T.; Schanzenbach, D.; Elamparuthi, E.; Sommermann, T.; Fudickar, W.; Gyóllai, V.; Somsák, L.; Demuth, W.; Schmittel, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16003-16010.
102. Pour d'autres additions radicalaires de BrCF₂CO₂Et, voir: (a) Morel, D.; Dawans, F. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1445-1447. (b) Sato, K.; Omote, M.; Ando, A.; Kumadaki, I. *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 509-515. (c)

- Godineau, E.; Schäfer, C.; Landais, Y. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4871-4874. (d) Yang, X.; Yuan, W.; Gu, S.; Yang, X.; Xiao, F.; Shen, Q.; Wu, F. *J. Fluorine Chem.* **2007**, *128*, 540-544. (e) Godineau, E.; Schenk, K.; Landais, Y. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6983-6993.
103. Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. in *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, **2008**, 1-22, 72-98 et 279-341.
104. Buttle, L. A.; Motherwell, W. B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3995-3998.
105. (a) Tony, K. A.; Denton, R. W.; Dllhas, A.; Jiménez-Barnero, J.; Mootoo, D. R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1441-1444. (b) De Vleeschouwer, F.; Van Speybroeck, V.; Waroquier, M.; Geerlings, P.; De Proft, F. *J. Org. Chem.* **2008**, *68*, 9109-9120.
106. (a) LeBel, N. A.; Czaja, R. F.; DeBoer, A. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3112-3126. (b) Beckwith, A. L. *J. Tetrahedron* **1981**, *37*, 3073-3100.
107. (a) Lichtenthaler, F. W.; Lergemüller, M.; Peters, S.; Varga, Z. *Tetrahedron : Asymm.* **2003**, *14*, 727-736. (b) Lichtenthaler, F. W.; Lergemüller, M.; Schwidetzky, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3094-3103.
108. Cipolla, L.; La Ferla, B.; Lay, L.; Peri, F.; Nicotra, F. *Tetrahedron : Asymm.* **2000**, *11*, 295-303.
109. De Graauw, C. F.; Peters, J. A.; Van Bekkum, H.; Huskens, J. *Synthesis* **1994**, 1007-1017.
110. Dilger, A. K.; Gopalsamuthiram, V.; Burke, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16273-16277.
111. (a) Lamar, J.; Hu, J.; Bueno, A. B.; Yang, H.-C.; Guo, D.; Copp, J. D.; McGee, J.; Gitter, B.; Timm, D.; May, P.; McCarthy, J.; Chen, S.-H. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 239-243. (b) Hu, Z.; Han, W. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 901-902.
112. (a) Braun, M. in *The Chemistry of Organolithium Compounds* (Eds.: Z. Rappoport, I. Marek), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, **2004**, pp 829-900. (b) Capriati, V.; Florio, S. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4152-4162. (c) Jahnke, E.; Tykwinski, R. R. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 3235-3249.
113. Pour une réaction similaire de cyclisation d'une espèce difluoromethylithié, voir: (a) Timofte, R. S.; Linclau, B. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3673-3676. (b) Linclau, B.; Boydell, A. J.; Timofte, R. S.; Brown, K. J.; Vinader, V.; Weymouth-Wilson, A. C. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 803-814.
114. Kumar, P.; Dubbey, A.; Puranik, V. G. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5074-5086.
115. Yoda, H.; Oguchi, T.; Takabe, K. *Tetrahedron : Asymm.* **1996**, *7*, 2113-2116.
116. Shirota, O.; Nakanishi, K.; Berova, N. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13643-13658.
117. He, L.; Byun, H. S.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7618-7626.
118. (a) Garner, P.; Min Park, J. *Org. Synth.* **1998**, 300-307. (b) Dondoni, A.; Perrone, D. *Org. Synth.* **2004**, 320-327.
119. (a) Kodato, S.-I.; Nakagawa, M.; Nakayama, K.; Hino, T. *Tetrahedron* **1989**, *23*, 7247-7262. (b) Al Dulayymi, J. R.; Baird, M. S.; Roberts, E. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11939-11951.
120. Azuma, H.; Tamagaki, S.; Ogino, K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3538-3541.
121. Kim, S.; Song, S.; Lee, T.; Jung, S.; Kim, D. *Synthesis* **2004**, *6*, 847-850.
122. Joo, J.-A.; Pham, V.-T.; Tian, Y.-S.; Cung, Y.-S.; Oh, C.-Y.; Lee, K.-Y.; Ham, W.-H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1498-1501.
123. (a) Vedejs, E.; Dent, W. H.; Gapinski, D. M.; McClure, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *18*, 5437-5446. (b) Tamborini, L.; Conti, P.; Colleoni, S.; Gobbi, M.; De Micheli, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6083-6089.
124. Ito, M.; Yamanaka, M.; Kutsumura, N.; Nishiyama, S. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5623-5634.

125. (a) Booker, J. E. M.; Boto, A.; Churchill, G. H.; Green, C. P.; Ling, M.; Meek, G.; Prabhakaran, J.; Sinclair, D.; Blake, A. J.; Pattenden, G. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4193-4205. (b) Anderson, J. C.; O'Loughlin, J. M. A.; Tornos, J. A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2741-2749. (c) Bal, B. S.; Childers, W. E.; Pinnick, H. W. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091-2096.
126. Calabi, F.; Jarvis, J. M.; Martin, L.; Milstein, C. *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 285-292.
127. Zeng, Z. H.; Castano, A. R.; Segelke, B. W.; Stura, E. A.; Peterson, P. A.; Wilson, I. A. *Science* **1997**, *277*, 339-345.
128. Wu, D.; Fujio, M.; Wong, C. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1073-1083.
129. (a) Burdin, N.; Brossay, L.; Kronenberg, M. *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 2014-2025. (b) Carnaud, C.; Lee, D.; Donnars, O.; Park, S. H.; Beavis, A.; Koezuka, Y.; Bendelac, A. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 4647-4680. (c) Singh, N.; Hong, S.; Scherer, D. C.; Serizawa, I.; Burdin, N.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; Van Kaer, L. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 2373-2377.
130. (a) Brossay, L.; Chioda, M.; Burdin, N.; Koezuka, Y.; Casorati, G.; Dellabona, P.; Kronenberg, M. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 1521-1528. (b) Spada, F. M.; Koezuka, Y.; Porcelli, S. A. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 1529-1534.
131. Kitamura, H.; Iwakabe, K.; Yahata, T.; Nishimura, S.-I.; Ohta, A.; Ohmi, Y.; Sato, M.; Takeda, K.; Okumura, K.; Van Kaer, L.; Kawano, T.; Tanigushi, M.; Nishimura, T. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1121-1127.
132. Parietti, V.; Chiffot, H.; Sibilis, J.; Muller, S.; Monneaux, F. *Clin. Immunol.* **2010**, *134*, 331-339.
133. Guo, R.; Lu, S.; Chen, X.; Tsang, C.-W.; Jia, W.; Sui-Seng, C.; Amoroso, D.; Abdur-Rashid, K. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 937-940.
134. Liu, S.; Xie, J.-H.; Li, W.; Kong, W.-L.; Wang, L.-X.; Zhou, Q.-L. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4994-4997.
135. (a) Aguilera, B.; Fernández-Mayoralas, A.; Jaramillo, C. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5863-5876. (b) Chen, H.-M.; Withers, S. G. *Carbohydrate Research* **2007**, *342*, 2212-2222.
136. Cobb, S. L.; Vederas, J. C. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1031-1038.
137. Yasuhara, A.; Nakamura, M.; Sakagami, K.; Shimazaki, T.; Yoshikawa, R.; Chaki, S.; Ohta, H.; Nakazato, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 4193-4207.

Experimental section

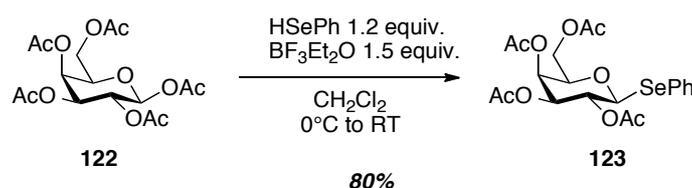
1. General methods

All reactions were carried out under an argon atmosphere with dry solvents under anhydrous conditions, unless otherwise noted. Dry THF, DMF and CH₂Cl₂ were obtained by drying over Na/benzophenone, barium oxide (DMF) and CaH₂ (CH₂Cl₂) respectively, followed by distillation. All reagents were purchased from commercial sources and used without further purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) carried out on 0.25 mm silica gel plates using UV light as a visualizing agent and an ethanolic solution of phosphomolybdic acid or a sulfuric solution of ceric ammonium molybdate, and heat as developing agents. Chromatographic purifications were carried out using silica gel columns (60, particle size 0.040-0.063 mm or 0.070-0.200 mm) or automated equipment with prepacked silica cartridges. ¹H NMR, ¹³C NMR and ¹⁹F NMR spectra were recorded on a 300 MHz instrument and calibrated using residual undeuterated solvent as an internal reference. The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, app = apparent. Mass spectrometry (MS) experiments were performed using electrospray ionization (ESI). IR spectra were recorded on a FT-IR Spectrometer. Optical rotations were measured at 20°C and with λ = 589 nm; concentrations are expressed in g. mL⁻¹. Elemental analysis were performed on a CE Instruments EA 110 CHMS-O instrument.

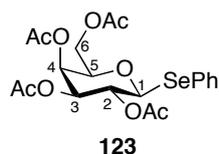
2. Synthesis of α -CF₂-galactose

2.1. Preparation of the 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-glycals

Phenyl-2,3,4,5-tetra-O-acetyl-1-seleno- β -D-galactopyranoside



To a solution of galactose pentaacetate **122** (16.1 g, 41.3 mmol, 1 equiv.) in CH₂Cl₂ (100 mL) was added at 0°C selenophenol (5.25 mL, 49.9 mmol, 1.2 equiv.) followed by boron trifluoride diethyl ether (7.85 mL, 62.0 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched with triethylamine (30 mL) and the organic layer was washed with water and dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by recrystallization in ethanol (16.1 g, 80%).



R_f = 0.38 (30% EtOAc in cyclohexane).

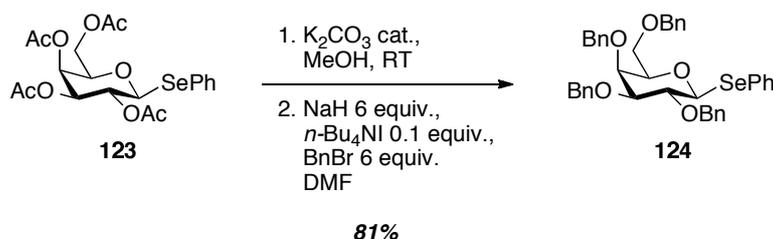
¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.26 (m, 5H, Ph), 5.41 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H₄), 5.27 (t, 1H, J = 10.1 Hz, H₂), 5.02 (dd, 1H, J = 9.9 Hz, J = 3.4 Hz, H₃), 4.91 (d, 1H, J = 10.2 Hz, H₁), 4.20-4.06 (m, 2H, H₆), 3.88 (t, 1H, J = 7.0 Hz, H₅), 2.09, 2.08, 2.04, 1.97 (s, 12H, OAc).

¹³C NMR (75.5MHz, CDCl₃): δ 170.3, 170.2, 169.6 (OAc), 135.0, 129.3, 127.8 (Ph), 82.1 (C₃), 75.6 (C₁), 72.8 (C₅), 68.1 (C₂), 67.4 (C₄), 61.8 (C₆), 21.1, 20.8 (OAc).

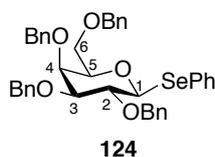
MS (ESI⁺): $m/z = 489.1$ ($[M+H]^+$).

Anal. Calcd for C₂₀H₂₄O₉Se: C, 49.29; H, 4.96. Found: C, 49.69; H, 4.78.

Phenyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-seleno-β-D-galactopyranoside



To a solution of phenyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-seleno-β-D-galactopyranoside **123** (16.1 g, 33.0 mmol, 1 equiv.) in MeOH (160 mL) was added potassium carbonate (41 mg, 0.3 mmol, 0.1 equiv.). The mixture was stirred during two hours at room temperature and then concentrated under reduced pressure. The crude compound was used in the next step without further purification. To a solution of crude in DMF (450 mL) was added *n*-Bu₄NI (1.3 g, 3.5 mmol, 0.1 equiv.) and sodium hydride (4.7 g, 196 mmol, 4.5 equiv.). After the mixture was stirred during 15 minutes at 0°C, benzyl bromide (25 mL, 235 mmol, 4.5 equiv.) was added dropwise at 0°C. The resulting mixture was stirring for one day at room temperature. Then saturated aqueous NH₄Cl was added, and the mixture was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude residue was recrystallized in pentane with a minimum of Et₂O.



R_f = 0.33 (30% EtOAc in cyclohexane).

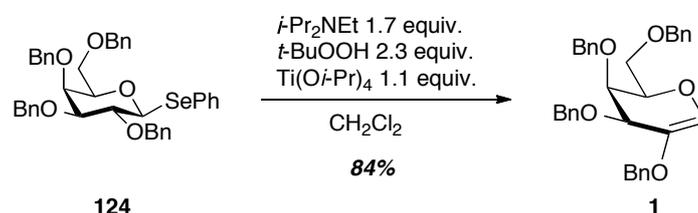
¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.60-7.08 (m, 25H, Ph), 4.91 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.79 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz, H₁), 4.70-4.67(m, 4H, CH₂Ph), 4.54 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz, CH₂Ph), 4.42-4.40 (m, 2H, CH₂Ph), 3.96-3.95 (m, 1H, H₄), 3.89 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H₂), 3.62-3.60 (m, 2H, H₅₋₆), 3.57-3.53 (m, 2H, H₃₋₆).

^{13}C NMR (75.5MHz, CDCl_3): δ 138.8, 138.3, 138.2, 137.9, 133.0, 129.2, 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.7, 127.5, 127.4 (Ph), 84.2 (C_3), 83.7 (C_1), 78.3 (C_5), 77.9 (C_2), 75.6, 74.5 (CH_2Ph), 73.7 (C_4), 73.6, 72.7 (CH_2Ph), 68.7 (C_6).

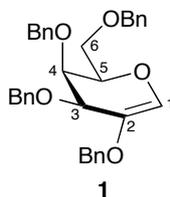
MS (ESI^+): $m/z = 703,1$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{Se}$: C, 70.68; H, 5.93. Found: C, 70.86; H, 5.89.

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-galactal



To a stirred solution of phenyl-2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1-seleno- β -D-galactopyranoside **124** (5.0 g, 7.35 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (50 mL) under argon atmosphere at 0°C were added *N,N*-diisopropylethylamine (2.05 mL, 12.3 mmol, 1.7 equiv.), *tert*-butylhydroperoxide (3.05 mL, 16.7 mmol, 5.0 M in hexanes, 2.3 equiv.) and titanium tetraisopropoxide (2.41 mL, 7.98 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for three hours. After checking by TLC the completion of the reaction, the solution was concentrated in vacuo and purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 98:2 as eluent) to afford **1** as a colourless oil which crystallized upon cooling (3.22 g, 84%).



$R_f = 0.38$ (20% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_D^{20} = +47.4$ ($c = 0.38$, CHCl_3).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.10 (20H, m, Ph), 6.10 (1H, s, H₁), 4.76 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.70 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, CH₂Ph), 4.69 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.64 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, CH₂Ph), 4.54 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, CH₂Ph), 4.53 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.46 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.37 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.17 (1H, d, *J* = 4.3 Hz, H₃), 4.15-4.10 (1H, m, H₅), 3.90-3.78 (2H, m, H_{4,6}), 3.62 (1H, dd, *J* = 10.9 Hz, *J* = 3.3 Hz, H₆).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 139.2, 138.6, 138.4, 137.6, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (Ph and C₂), 127.2 (C₁), 75.6 (C₅), 73.9, 73.8 (CH₂Ph), 73.5 (C₄), 73.0 (CH₂Ph), 72.0 (C₃), 71.7 (CH₂Ph), 68.0 (C₆).

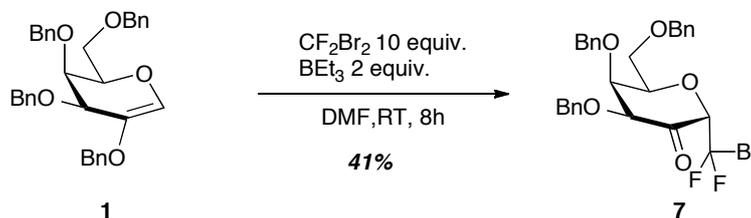
IR (neat): ν_{max} 3064, 3032 (CH Ar), 2926, 2872 (CH Aliph), 1759 (C=O) cm⁻¹.

MS (ESI⁺): *m/z* = 523.7 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₃₄H₃₄O₅: C, 78.14; H, 6.56. Found : C, 78.11; H, 6.72.

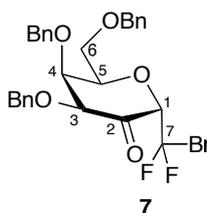
2.2. Addition of dibromodifluoromethane to 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-galactal

(2*S*,5*S*,6*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-2-(bromodifluoromethyl)dihydro-2*H*-pyran-3(4*H*)-one



To a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-galactal **1** (0.26 g, 0.5 mmol, 1 equiv.) in aerated DMF (4 mL) was added dibromodifluoromethane (0.23 mL, 2.5 mmol, 5 equiv.) and triethylborane (0.5 mL, 0.5 mmol, 1.0 M solution in hexanes, 1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for three hours and the conversion was checked by TLC. Addition

of dibromodifluoromethane (5 equiv.) and triethylborane (1 equiv.) and stirring for three more hours was usually required for reaching completion. Saturated aqueous NH_4Cl (50 mL) was then added and the mixture extracted with Et_2O . The organic layer was washed with water, dried over MgSO_4 and evaporated. Purification by column chromatography (cyclohexane/ EtOAc 97:3) afforded compound **7** as a colorless oil (0.115 g, 41%).



R_f = 0.50 (20% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +311.5$ ($c = 0.48$, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.40-7.20 (15H, m, Ph), 5.00 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H_1), 4.91 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H_3), 4.59 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H_5), 4.55 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, CH_2Ph), 4.53-4.52 (5H, m, CH_2Ph), 4.30 (1H, app. d, $J_{\text{app}} = 2.4$ Hz, H_4), 3.68-3.59 (2H, m, H_6).

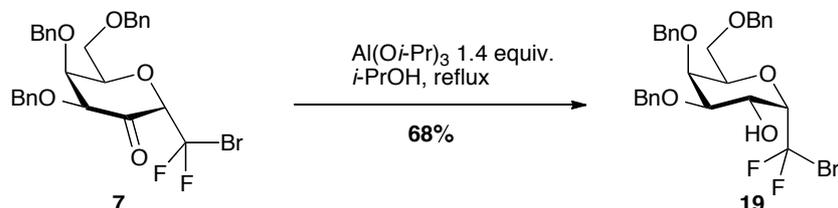
^{19}F NMR (282.5 MHz, CDCl_3): δ -52.4 (1F, dd, $J = 168.8$ Hz, $J = 8.0$ Hz), -54.4 (1F, dd, $J = 168.8$ Hz, $J = 14.0$ Hz).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 199.4 (C_2), 137.8, 137.7, 137.1, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9 (Ph), 119.4 (t, $J = 313.1$ Hz, C_7), 83.5 (t, $J = 23.6$ Hz, C_1), 77.5, 77.0 (CH_2Ph), 75.0 (C_5), 74.0 (C_4), 73.6 (C_3), 68.0 (C_6).

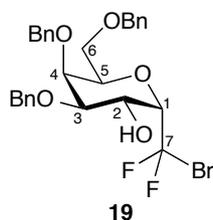
IR (neat): ν_{max} 3090, 3064, 3031 (CH Ar), 2925, 2858 (CH Aliph), 1760 (C=O) cm^{-1} .

MS (ESI⁺): $m/z = 562.6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{BrF}_2\text{O}_5$: C, 59.24; H, 4.60. Found : C, 59.27; H, 4.58.

2.3. Reduction of the carbonyl to obtain CF₂-galactose**Bromo-difluoro-(3,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)methane**

To a solution of bromo 2,2-difluoro-2-(3,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-*lyxo*-hexopyranosid-2-ulosyl)methane **7** (0.31 g, 0.56 mmol, 1 equiv.) in *iso*-propanol (7 mL) was added Al(*Oi*-Pr)₃ (0.29 g, 1.4 mmol, 1.4 equiv.). The resulting suspension was heated to reflux during four hours. The conversion was checked by TLC and the mixture was neutralized with 1 M HCl (25 mL) and extracted with EtOAc. The collected organics were washed with water sat. NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. Chromatography on a flash purification system (5 to 40% EtOAc in cyclohexane) afforded compound **19** as a white crystalline solid (0.212 g, 68%).



R_f = 0.17 (20% EtOAc in cyclohexane).

m.p.: 89°C.

[α]_D²⁰ = +37.4 (*c* = 0.76, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.34-7.25 (15H, m, Ph), 4.68 (1H, d, *J* = 11.9 Hz, H₁), 4.61 (1H, d, *J* = 11.9 Hz, CH₂Ph), 4.60 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.55 (2H, app s, CH₂Ph), 4.54 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.35 (1H, ddd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 6.0 Hz, *J* = 2.8 Hz, CH₂Ph), 4.24 (1H, ddd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.3 Hz, H₂), 4.21-4.17 (1H, m, H₃), 4.13 (1H, dd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 2.9 Hz, H₅), 4.00 (1H, dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 8.5 Hz, H₆), 3.83 (1H, dd, *J* = 4.9 Hz, *J* = 2.9 Hz, H₄), 3.74 (1H, dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 2.8 Hz, H₆).

^{19}F NMR (282.5 MHz, CD_3OD): δ -53.0 (1F, dd, $J = 164.0$ Hz, $J = 14.2$ Hz), -55.3 (1F, d, $J = 164.0$ Hz).

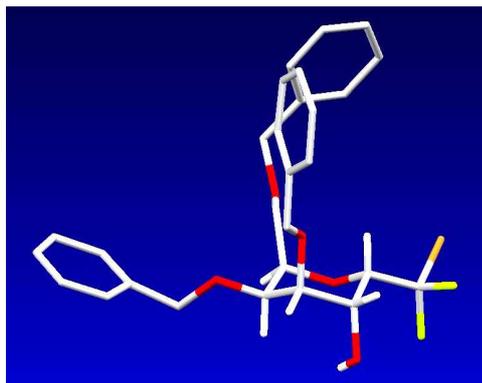
^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD): δ 139.6, 139.5, 139.4, 129.4, 129.3, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6 (Ph), 123.3 (dd, $J = 312.6$ Hz, $J = 308.8$ Hz, C_7), 78.2 (C_3), 77.0 (C_5), 75.3 (dd, $J = 25.0$ Hz, $J = 20.2$ Hz, C_4), 74.3, 74.0, 73.9 (CH_2Ph), 73.0 (C_1), 68.2 (C_6), 66.7 (C_2).

MS (ESI^+): $m/z = 582.0, 580.0$ ($[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$).

IR (neat): ν_{max} 3410 (OH), 3031 (C-H Ar), 2877 (C-H Aliph) cm^{-1} .

Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{BrF}_2\text{O}_5$: C, 59.69; H, 5.19. Found : C, 59.94; H, 5.15.

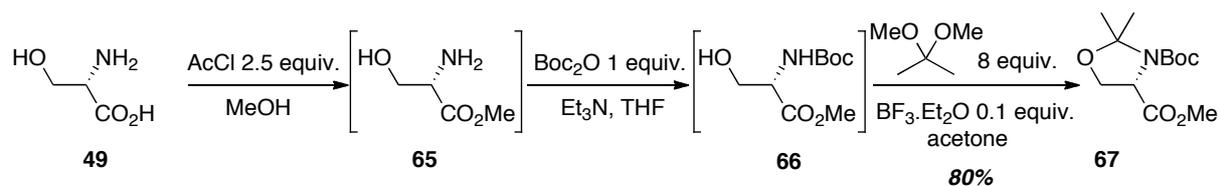
RX diffraction:



3. Synthesis of phytosphingosine chain

3.1. Synthesis of Garner's aldehyde

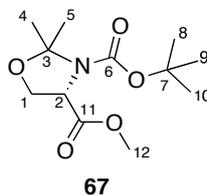
3-tert-butyl 4-methyl 2,2-dimethyloxazolidine-3,4-dicarboxylate



To a solution of methanol (125 mL) at 0°C was added slowly acetyl chloride (19 mL, 0.25 mol, 2.5 equiv.). The solution was stirred for a further 5 min, then solid 99% (L)-serine **49** (10 g, 0.1 mol, 1 equiv.) was added in one portion and the solution was heated to reflux. The reflux was continued for two hours, then the solution was allowed to cool to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure to give a crude methyl serinate hydrochloride **65** as a white crystalline solid that was used without further purification. The crude was dissolved in THF (220 mL) and the triethylamine (27 mL, 0.4 mol, 4 equiv.) was added. The resulting white suspension was cooled with an ice-water bath and the solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (21 g, 0.1 mol, 1 equiv.) in THF (100 mL) was added dropwise over a period of one hour. After 10 min, the ice bath was removed and the suspension was stirred overnight at room temperature, then warmed at 50°C for a further three hours. The solvent was removed under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with saturated aqueous Na₂CO₃, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give a N-Boc-L-serine methyl ester **66** as a colorless oil that was used without further purification.

To a solution of the crude ester in acetone (330 mL) was added 2,2-dimethoxypropane (100 mL, 0.8 mol, 8 equiv.) and boron trifluoride etherate (0.7 mL, 5.5 mmol, 0.1 equiv.). The resulting orange solution was stirred at room temperature for three hours when TLC analysis indicates the reaction to be complete. The reaction mixture was treated with triethylamine (3 mL) and the solvent was removed under reduced pressure. The aqueous layer was extracted with Et₂O and the combined organic layers were washed with saturated aqueous Na₂CO₃,

dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give an oxazolidine methyl ester **67** as a pale yellow oil. This material is vacuum distilled to give the compound (19.3 g, 80%) as a colorless liquid, bp 101-102°C.



Rf = 0.72 (40% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -46.7$ (c 1.30, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4.26 (m, 1H, H_2), 3.81 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 3.2$ Hz, H_1), 3.75 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_1), 3.35 (s, 3H, H_{12}), 1.60 (s, 6H, H_{4-5}), 1.41 (s, 9H, H_{8-9-10}).

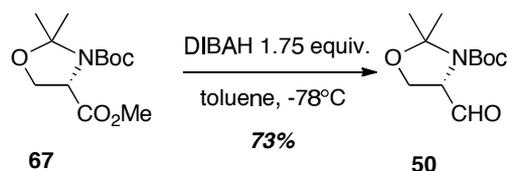
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 171.5 (C_{11}), 152.5 (C_6), 93.4 (C_3), 79.5 (C_7), 69.2 (C_2), 64.3 (C_1), 51.9 (C_{12}), 28.5 (C_{8-9-10}), 24.5 (C_{4-5}).

IR (neat): ν_{max} 1760 (C=O), 1704 (C=O) cm^{-1} .

MS (ESI+): $m/z = 260.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

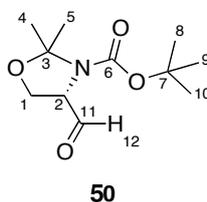
Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: C, 55.58; H, 8.16; N, 5.40. Found: C, 55.60; H, 8.09; N, 5.44.

(S)-tert-butyl 4-formyl-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



To a solution of oxazolidine ester **67** in dry toluene (110 mL) at -78°C was added a solution of diisobutylaluminium hydride (96 mL, 115 mmol, 1.2 M in toluene, 1.75 equiv.). The rate

of addition was adjusted so as to keep the internal temperature below -65°C and took approximately one hour to complete. The reaction mixture was stirred for an additional two hours at -78°C under an atmosphere of nitrogen when TLC analysis showed the reaction to be complete. The reaction was quenched by slowly adding methanol (60 mL) again keeping the internal temperature below -65°C . The resulting white emulsion was slowly poured into 1 L of ice cold 1 N HCl with swirling over 15 min and the aqueous mixture was then extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to give the good product as a colorless oil. This material was vacuum distilled to give (11.5 g, 76%) of oxazolidine aldehyde **50** as a colorless liquid, bp $83\text{--}88^{\circ}\text{C}$.



$R_f = 0.81$ (40% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_D^{20} = -91.7$ (c 1.34, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 9.54 (s, 1H, H_{12}), 4.31 (m, 1H, H_2), 4.20 (s, 1H, H_1), 4.11 (s, 1H, H_1), 1.60 (s, 6H, H_{4-5}), 1.41 (s, 9H, H_{8-9-10}).

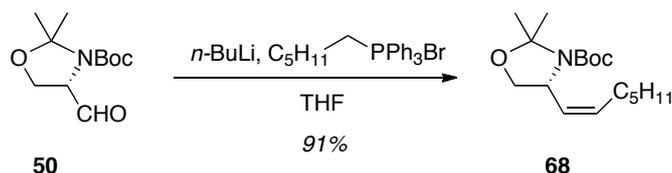
$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 200.1 (C_{11}), 152.4 (C_6), 93.6 (C_3), 79.5 (C_7), 78.2 (C_2), 64.3 (C_1), 28.5 (C_{8-9-10}), 24.5 (C_{4-5}).

IR (neat): ν_{max} 1735 ($\text{C}=\text{O}$), 1705 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

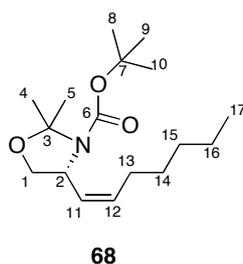
MS (ESI+): $m/z = 230.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: C, 57.62; H, 8.35; N, 6.11. Found: C, 57.65; H, 8.39; N, 6.08.

3.2. Wittig reaction

(R,Z)-tert-butyl 4-(hept-1-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate

n-BuLi (6.3 mL, 9.6 mmol, 1.54 M in hexanes, 1.1 equiv.) was added dropwise to a suspension of hexyltriphenylphosphonium bromide (5.0 g, 11.8 mmol, 1.4 equiv. ; prepared from 1-bromohexane and triphenylphosphine refluxed in toluene for five days, 90%) in anhydrous THF (27 mL) at -78°C . The resulting yellow suspension was allowed to warm to room temperature and was stirred for one additional hour. The reddish solution was cooled to -78°C , and a solution of Garner's aldehyde **50** (2.0 g, 8.8 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (5.5 mL) was added over a thirty-minute period. The suspension was allowed to warm up to room temperature and was stirred for another two hours. Saturated aqueous NH_4Cl (10 mL) was added followed by extraction with Et_2O . The organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/ EtOAc 90:10 to 70:30) to afford the desired product **68** (2.4 g, 91%) as a white oil.



$R_f = 0.85$ (10% EtOAc in cyclohexane).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5.42-5.36 (m, 2H, H_{11-12}), 4.68-4.59 (m, 1H, H_2), 4.05 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 6.1$ Hz, 1H, H_1), 3.63 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 3.2$ Hz, 1H, H_1), 2.11-2.03 (m, 2H, H_{13}), 1.59-1.51 (m, 6H, H_{4-5}), 1.44 (s, 9H, H_{8-9-10}), 1.33-1.24 (m, 6H, $\text{H}_{14-15-16}$), 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H_{17}).

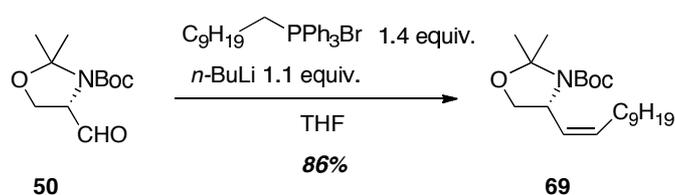
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 151.6 (C_6), 129.8 (C_{11} or C_{12}), 126.3 (C_{11} or C_{12}), 93.6 (C_3), 79.5 (C_7), 64.7 (C_1), 57.4 (C_2), 31.9 (C_{13}), 29.4, 29.3 (C_{14-15}), 28.4 (C_{4-5}), 27.7 (C_{8-9-10}), 22.3 (C_{16}), 14.0 (C_{17}).

IR (neat): ν_{max} 2923 (C-H), 2858 (CH_2), 1702 (C=O), 1459 (C=C), 1366 (CH_3), 1093 (C-O), 1054 (C-O) cm^{-1} .

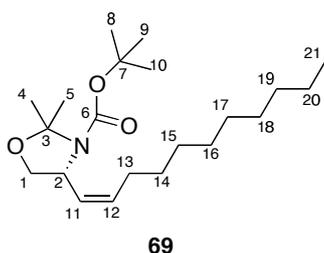
MS (ESI+): $m/z = 299.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NO}_3$: C, 68.65; H, 10.51; N, 4.71. Found: C, 68.69; H, 10.56; N, 4.68.

(R,Z)-tert-butyl 2,2-dimethyl-4-(undec-1-en-1-yl)oxazolidine-3-carboxylate



The same procedure was applied to **50** (4.0 g, 17.6 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) afforded the desired product **69** (5.3 g, 86%) as a white oil.



$R_f = 0.66$ (10% EtOAc in cyclohexane).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.52-5.48 (m, 2H, H_{11-12}), 4.60-4.55 (m, 1H, H_2), 3.98 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H, H_1), 3.72 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 3.0$ Hz, 1H, H_1), 2.20-2.14 (m, 2H, H_{13}), 1.61-1.55 (m, 6H, H_{4-5}), 1.42 (s, 9H, H_{8-9-10}), 1.33-1.20 (m, 14H, H_{14} to H_{20}), 0.89 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, H_{21}).

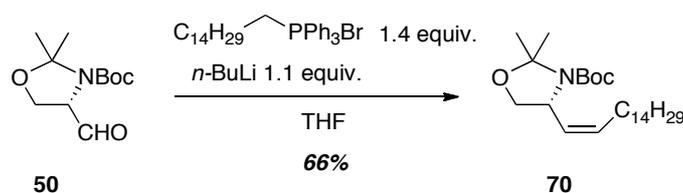
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 151.8 (C_6), 135.8 (C_{11} or C_{12}), 127.2 (C_{11} or C_{12}), 93.4 (C_3), 79.5 (C_7), 64.3 (C_1), 57.7 (C_2), 32.2 (C_{13}), 29.9, 29.7, 29.6, 29.4, 29.2 (C_{14} to C_{18}), 26.4 (C_{4-5}), 27.3 (C_{8-9-10}), 22.7, 22.5 (C_{19-20}), 14.2 (C_{21}).

IR (neat): ν_{max} 2921 (C-H), 2861 (CH_2), 1699 (C=O), 1461 (C=C), 1368 (CH_3), 1093 (C-O), 1053 (C-O) cm^{-1} .

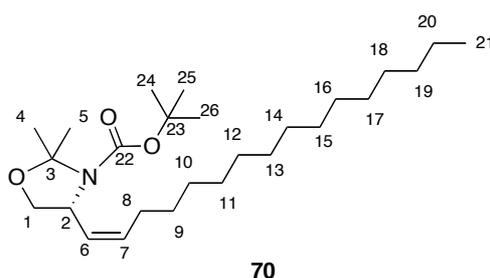
MS (ESI+): $m/z = 354.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_3$: C, 71.34; H, 11.12; N, 3.96. Found: C, 71.39; H, 11.06; N, 4.02.

(R,Z)-tert-butyl 4-(hexadec-1-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



The same procedure was applied to **50** (0.2 g, 1.0 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) afforded the desired product **70** (284 mg, 66%) as a white oil.



$R_f = 0.68$ (10% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +25.9$ (c 1.28, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.71-5.62 (m, 2H, H_{6-7}), 4.82-4.61 (m, 1H, H_2), 4.03 (dd, $J = 12.9$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H, H_1), 3.73 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_1), 2.13-2.06 (m, 2H,

H₈), 1.61-1.60 (m, 3H, H₄ or H₅), 1.54-1.53 (m, 3H, H₄ or H₅), 1.46 (s, 9H, H₂₄₋₂₅₋₂₆), 1.34-1.27 (m, 24H, H₉ to H₂₀), 0.89 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H₂₁).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 151.8 (C₂₂), 130.4 (C₆ or C₇), 128.5 (C₆ or C₇), 93.8 (C₃), 79.3 (C₂₃), 68.7 (C₁), 54.4 (C₂), 31.9 (C₈), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0 (C₉ C₁₈), 28.4 (C₄₋₅₋₂₄₋₂₅₋₂₆), 27.4 (C₁₉), 22.6 (C₂₀), 14.0 (C₂₁).

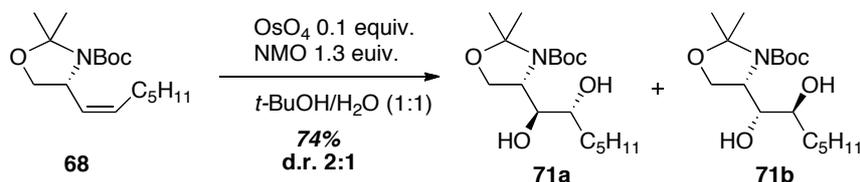
IR (neat): ν_{\max} 2922 (C-H), 2856 (CH₂), 1699 (C=O), 1459 (C=C), 1364 (CH₃), 1094, 1055 (C-O) cm⁻¹.

MS (ESI⁺): $m/z = 446.3$ ([M+Na]⁺).

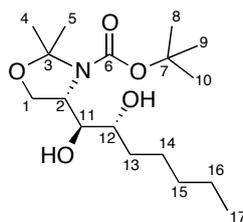
Anal. Calcd for C₂₆H₄₉NO₃: C, 73.71; H, 11.66; N, 3.31. Found: C, 73.69; H, 11.69; N, 3.26.

3.3. Osmylation reaction

(S)-tert-butyl 4-((1S,2R)-1,2-dihydroxyheptyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



Aqueous OsO₄ (4% v/v, 5.1 mL, 0.8 mmol, 0.1 equiv.) was added to a solution of NMO (1.1 g, 9.6 mmol, 1.3 equiv.) in *t*-BuOH and water (17 mL, 1:1). The colorless solution was cooled to 0°C and an emulsion of Z-alkene **68** (2.4 g, 8.0 mmol, 1 equiv.) in the same solvent (11 mL) was added dropwise. The resulting brown suspension was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight. The solution was quenched with solid Na₂SO₃ and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 99:1 to 70:30) to afford the two diastereomers **71a** and **71b** (1.9 g, 74%) as colorless oil. ($R_{f_{\text{minor}}} = 0.33$, 0.6 g, 25% ; $R_{f_{\text{major}}} = 0.28$, 1.3 g, 49%)


71a

R_f = 0.28 (30% EtOAc in cyclohexane).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.19-4.16 (m, 2H, H₁), 4.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₂), 3.61-3.58 (m, 2H, H₁₁₋₁₂), 3.32-3.27 (m, 2H, 2 x OH), 1.66 (s, 6H, H₄₋₅), 1.51-1.49 (m, 9H, H₈₋₉₋₁₀), 1.28-1.23 (m, 8H, H₁₃₋₁₄₋₁₅₋₁₆), 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, H₁₇).

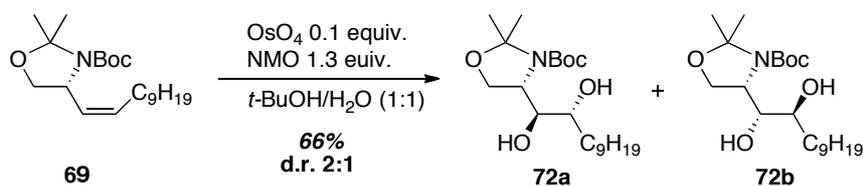
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 151.7 (C₆), 93.9 (C₃), 79.4 (C₇), 74.8 (C₁₁), 74.0 (C₁₂), 64.2 (C₁), 59.4 (C₂), 31.9 (C₁₃), 29.7, 29.5 (C₁₄₋₁₅), 28.3 (C₄₋₅), 28.1 (C₈₋₉₋₁₀), 22.8 (C₁₆), 14.1 (C₂₁).

IR (neat): ν_{max} 2918 (C-H), 2850 (CH₂), 1687 (C=O), 1470 (CH₂), 1398 (O-H), 1382 (CH₃), 1110 (C-O), 1066 (C-O), 719 (CH₂) cm⁻¹.

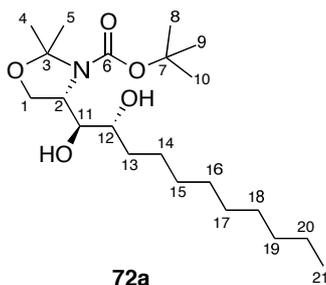
MS (ESI+): *m/z* = 332.3 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₁₇H₃₃NO₅: C, 61.60; H, 10.04; N, 4.23. Found: C, 61.63; H, 10.05; N, 4.17.

(S)-tert-butyl 4-((1S,2R)-1,2-dihydroxyundecyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



The same procedure was applied to **69** (837 mg, 2.4 mmol, 1 equiv.) Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 99:1 to 70:30) afforded the two diastereomers **72a** and **72b** (1.9 g, 66%) as colorless oil. (R_f_{minor} = 0.35, 215 mg, 22% ; R_f_{major} = 0.29, 394 mg, 44%)



R_f = 0.29 (30% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -29.1 (c 1.65, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.17-4.14 (m, 2H, H₁), 3.90 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₂), 3.65-3.59 (m, 2H, H₁₁₋₁₂), 3.45-3.42 (m, 2H, 2*OH), 1.62 (s, 6H, H₄₋₅), 1.49-1.45 (m, 9H, H₈₋₉₋₁₀), 1.28-1.21 (m, 16H, H₁₃ to H₂₀), 0.87 (t, *J* = 8.1 Hz, 3H, H₂₁).

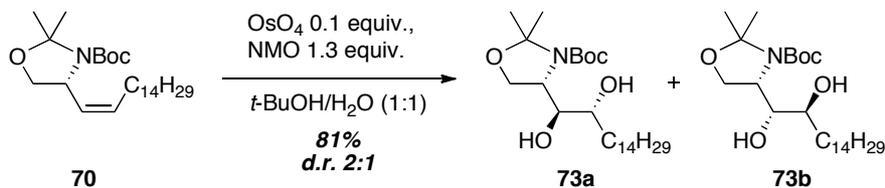
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 152.9 (C₆), 93.5 (C₃), 79.6 (C₇), 75.3 (C₁₁), 74.5 (C₁₂), 64.3 (C₁), 59.6 (C₂), 32.8 (C₁₃), 29.7, 29.5, 29.4 (C₁₄₋₁₅₋₁₆), 28.3 (C₈₋₉₋₁₀), 28.1, 27.9 (C₁₇₋₁₈₋₁₉), 25.4 (C₄₋₅), 22.4 (C₂₀), 14.2 (C₂₁).

IR (neat): ν_{max} 2920 (C-H), 2851 (CH₂), 1688 (C=O), 1470 (CH₂), 1399 (O-H), 1381 (CH₃), 1108, 1066 (C-O), 720 (CH₂) cm⁻¹.

MS (ESI+): *m/z* = 410.3 ([M+Na]⁺).

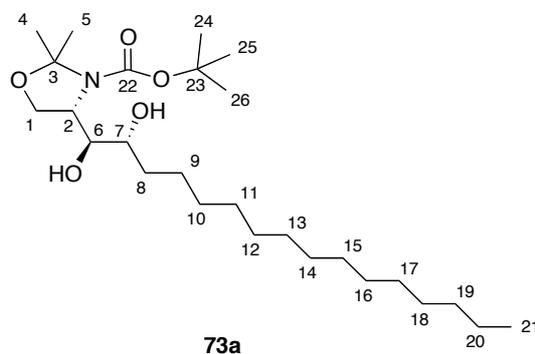
Anal. Calcd for C₂₁H₄₁NO₅: C, 65.08; H, 10.66; N, 3.61. Found: C, 65.03; H, 10.65; N, 3.67.

(S)-tert-butyl-4-((1S,2R)-1,2-dihydroxyhexadecyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



The same procedure was applied to **70** (251 mg, 0.59 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 99:1 to 70:30) afforded the two diastereomers **73a** and

73b (220 mg, 81%) as colorless oil. ($R_{f_{\text{minor}}} = 0.53$, 73.2 mg, 27% ; $R_{f_{\text{major}}} = 0.47$, 146.4 mg, 54%).



$R_f = 0.47$ (30% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_D^{20} = -3.1$ (c 1.14, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 4.18-4.13 (m, 2H, H_1), 4.01 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_2), 3.79-3.73 (m, 2H, H_{6-7}), 3.48-3.22 (m, 2H, 2*OH), 1.62 (s, 6H, H_{4-5}), 1.53-1.51 (m, 9H, $\text{H}_{24-25-26}$), 1.27-1.21 (m, 26H, H_8 to H_{20}), 0.92 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H_{21}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 153.8 (C_{22}), 93.9 (C_3), 81.2 (C_{23}), 74.7 (C_6), 73.9 (C_7), 65.1 (C_1), 59.2 (C_2), 31.9 (C_8), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3 (C_9 to C_{19}), 28.3 ($\text{C}_{4-5-24-25-26}$), 22.6 (C_{20}), 14.0 (C_{21}).

IR (neat): ν_{max} 2918(C-H), 2849 (CH_2), 1684 (C=O), 1470 (CH_2), 1400 (O-H), 1381 (CH_3), 1108, 1067 (C-O), 719 (CH_2) cm^{-1} .

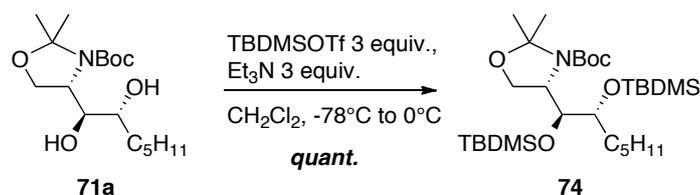
MS (ESI+): $m/z = 480.4$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 937.3 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{51}\text{NO}_5$: C, 68.23; H, 11.23; N, 3.06. Found: C, 68.20; H, 11.25; N, 3.12.

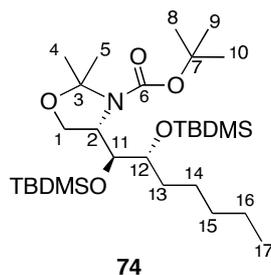
3.4. Synthesis of the carboxylic acid

3.4.1. Synthesis of silyl derivatives

(S)-tert-butyl-2,2-dimethyl-4-((5S,6R)-2,2,3,3,8,8,9,9-octamethyl-6-pentyl-4,7-dioxa-3,8-disiladecan-5-yl)oxazolidine-3-carboxylate



To a solution of compound **71a** (208 mg, 0.63 mmol, 1 equiv.) in CH₂Cl₂ (3 mL) were added at -78°C triethylamine (420 μL, 2.0 mmol, 3 equiv.) and TBDMSTf (0.5 mL, 2.0 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred at 0°C for two hours, then a saturated solution of NaHCO₃ was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were then washed with water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95:05) as eluent to afford a compound **74** (350 mg, 100%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.95 (20% EtOAc in cyclohexane).

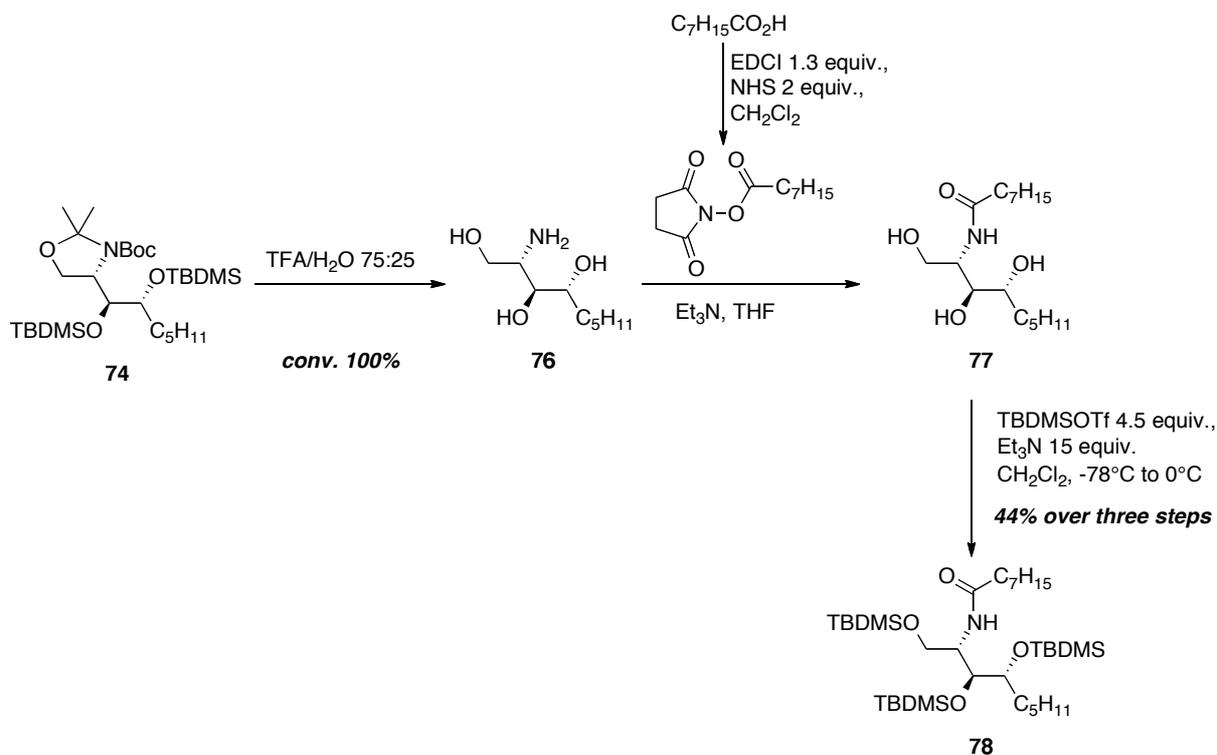
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.20-4.12 (m, 2H, H₁₋₂), 3.92-3.90 (m, 2H, H₁₋₁₁), 3.69-3.65 (m, 1H, H₁₂), 1.56-1.29 (m, 26H, H₄₋₅₋₈₋₉₋₁₀₋₁₃₋₁₄₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 0.91-0.86 (m, 18H, 2 x SiC(CH₃)₃), 0.09-0.01 (m, 12H, 2 x Si(CH₃)₂).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 152.5 (C_6), 93.4 (C_3), 80.2 (C_7), 79.5 (C_{11}), 78.8 (C_{12}), 72.6 (C_2), 64.2 (C_1), 32.2 (C_{13}), 28.6 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27.1, 26.4, 26.2, 25.9 ($\text{C}_{4-5-8-9-10}$ and $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 22.8 (C_{14}), 18.4, 18.3 (C_{15-16}), 14.2 (C_{17}), -2.8, -3.5, -4.6 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MS (ESI+): $m/z = 560.4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

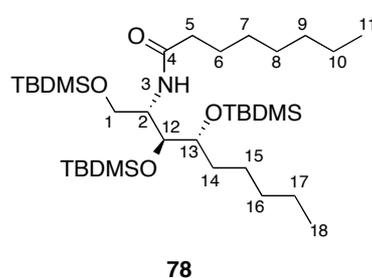
Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{61}\text{NO}_5\text{Si}_2$: C, 62.20; H, 10.98; N, 2.50. Found: C, 62.14; H, 11.02; N, 2.57.

***N*-((6*S*,7*S*,8*R*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-2,2,3,3,10,10,11,11-octamethyl-8-pentyl-4,9-dioxa-3,10-disiladodecan-6-yl)octanamide**



A solution of compound **74** (930 mg, 1.82 mmol, 1 equiv.) in a mixture of TFA (4.20 mL) and H_2O (1.40 mL) was stirred at room temperature for two hours. The mixture was then slowly quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 . The reaction mixture was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were washed with a water to pH = 7, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduce pressure. To a solution of this crude product **76** in dry THF (32 mL) and triethylamine (1 mL) were added a solution of activated octanoic acid (365 mg, 2.53 mmol, 1.3 equiv.) obtained by refluxing for 3 hours

NHS (359 mg, 3.12 mmol, 2 equiv.) and EDCI (528 mg, 2.75 mmol, 1.3 equiv.) in CH₂Cl₂ (30 mL). The resulting mixture of 76 and activated octanoic acid was refluxing overnight, then cooled down and concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude residue 77 in CH₂Cl₂ (30 mL) were added at -78°C triethylamine (3.5 mL, 25.2 mmol, 15 equiv.) and TBDMSOTf (2.1 mL, 9.1 mmol, 4.5 equiv.). The mixture was stirred at 0°C for two hours, then a saturated solution of NaHCO₃ was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were then washed with water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95:5) as eluent to afford a compound 78 (523 mg, 44%) as a pale yellow oil.



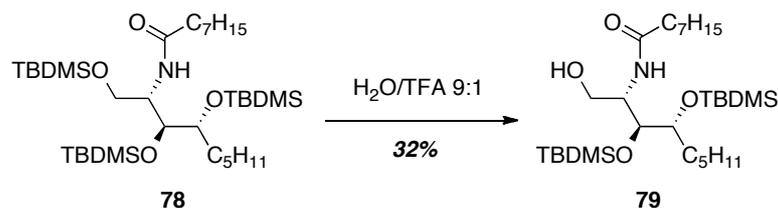
R_f = 0.99 (20% EtOAc in cyclohexane).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₃), 4.07-4.00 (m, 1H, H₁), 3.92-3.86 (m, 2H, H₁₋₁₂), 3.78-3.73 (m, 1H, H₂), 3.63-3.60 (m, 1H, H₁₃), 1.55-1.52 (m, 4H, H₅₋₁₄), 1.50-1.27 (m, 16H, H₆₋₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 0.92-0.86 (m, 33H, H₁₁₋₁₈ and 2 x SiC(CH₃)₃), 0.12-0.05 (m, 18H, 3 x Si(CH₃)₂).

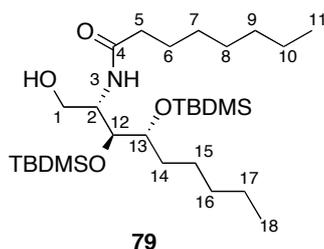
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 174.2 (C₄), 80.5 (C₁₂), 76.2 (C₁₃), 64.8 (C₁), 59.9 (C₂), 36.7 (C₅), 35.3 (C₁₄), 29.3 (SiC(CH₃)₃), 27.1, 26.8, 26.4, 26.3, 26.2, 26.0, 25.9 (SiC(CH₃)₃), 24.3, 23.9, 23.6, 23.3, 23.0, 22.8, 22.5, 22.0 (C₆₋₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 14.2 (C₁₁₋₁₈), -2.8, -3.0, -3.5, -3.9, -4.6 (Si(CH₃)₂).

MS (ESI⁺): *m/z* = 660.4 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₃₅H₇₇NO₄Si₃: C, 63.67; H, 11.75; N, 2.12. Found: C, 63.71; H, 11.72; N, 2.20.

N-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-hydroxynonan-2-yl)octanamide

To a solution of compound **78** (288 mg, 0.44 mmol, 1 equiv.) in THF (8 mL) was added a mixture of TFA (0.1 mL) and H₂O (0.9 mL) at -10°C. The mixture was stirred at the same temperature for three hours and then slowly quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The reaction mixture was extracted with Et₂O, and the combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (80:20) as eluent to afford **79** (77 mg, 32%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.33 (30% EtOAc in cyclohexane).

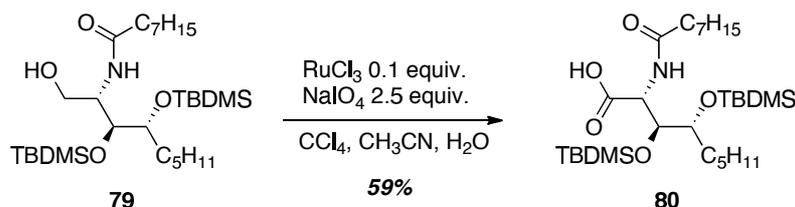
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.25 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₃), 4.20 (dd, *J* = 11.2 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₁), 4.05-4.02 (m, 1H, H₁₂), 3.89 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H₂), 3.77-3.72 (m, 1H, H₁₃), 3.63-3.57 (m, 1H, H₁), 3.19-3.17 (m, 1H, OH), 2.19-2.17 (m, 2H, H₅), 1.65-1.51 (m, 4H, H₆₋₁₄), 1.33-1.27 (m, 14H, H₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 0.91-0.85 (m, 24H, H₁₁₋₁₈ and SiC(CH₃)₃), 0.10-0.07 (m, 12H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 172.8 (C₄), 77.5 (C₂), 76.2 (C₁₃), 63.7 (C₁), 51.3 (C₁₂), 37.0 (C₅), 34.4 (C₁₄), 32.1, 31.8 (SiC(CH₃)₃), 29.4, 29.1 (SiC(CH₃)₃), 26.1, 25.8, 25.7, 25.6, 22.7, 22.6, 22.5 (C₆₋₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 14.2 (C₁₁₋₁₈), -3.6, -4.0, -4.4, -4.8 (Si(CH₃)₂).

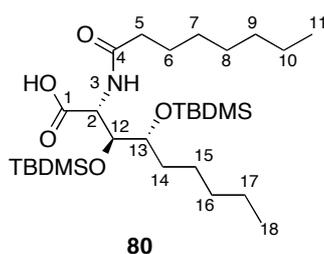
MS (ESI+): $m/z = 546.4$ ($[M+H]^+$).

Anal. Calcd for $C_{29}H_{63}NO_4Si_2$: C, 63.79; H, 11.63; N, 2.57. Found: C, 63.78; H, 11.76; N, 2.48.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-octanamidononanoic acid



To a solution of alcohol **79** (78 mg, 0.14 mmol, 1 equiv.) in carbon tetrachloride (1 mL), acetonitrile (1 mL) and water (1 mL) was added sodium periodate (124 mg, 0.58 mmol, 4 equiv.) and the mixture was stirred. After 5 minutes, $RuCl_3$ (2.9 mg, 0.014 mmol, 0.1 equiv.) was added and the stirring was continued at room temperature for two hours. The mixture was filtered and the residue was washed with ethyl acetate and brine, dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 then $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 + 0.1% of acetic acid) to afford the desired product **80** (45 mg, 59%) as a pale yellow oil.



$R_f = 0.05$ (50% EtOAc in cyclohexane).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.72 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H_3), 4.72 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H_2), 4.03 (s, 1H, H_{12}), 3.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_{13}), 2.25-2.20 (m, 2H, H_5), 2.08-2.05 (m, 1H, OH), 1.62-1.60 (m, 2H, H_{14}), 1.31-1.24 (m, 16H, $H_{6-7-8-9-10-15-16-17}$), 0.93-0.84 (m, 24H, H_{11-18} and 2 x $Si(CH_3)_3$), 0.19 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$), 0.04 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$).

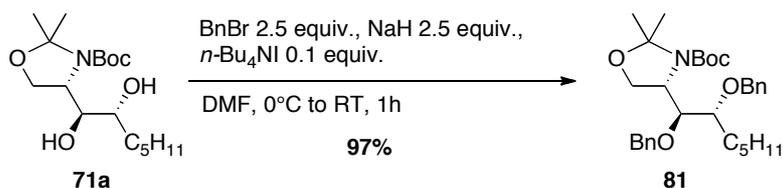
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 173.0 (C_4), 169.7 (C_1), 77.5 (C_{12}), 79.9 (C_{13}), 55.3 (C_2), 36.7 (C_5), 34.5 (C_{14}), 31.8, 31.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 29.4, 29.1 (C_{6-15}), 26.0, 25.9, 25.8, 25.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 22.8, 22.7, 22.6, 22.5 ($\text{C}_{7-8-9-16}$), 18.3, 18.1 (C_{10-17}), 14.2 (C_{11-18}), -4.0, -4.2, -4.6, -4.8 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

MS (ESI+): $m/z = 560.4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

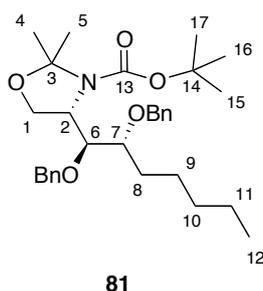
Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{61}\text{NO}_5\text{Si}_2$: C, 62.20; H, 10.98; N, 2.50. Found: C, 62.08; H, 11.06; N, 2.42.

3.4.2. Synthesis of benzyl derivatives

(S)-tert-butyl-4-((1S,2R)-1,2-bis(benzyloxy)heptyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



To a solution of **71a** (3.5 g, 10.3 mmol, 1 equiv.) in DMF (80 mL) was added *n*- Bu_4NI (0.3 g, 1.0 mmol, 0.1 equiv.) and sodium hydride (0.6 g, 25.7 mmol, 2.5 equiv.). After 15 minutes of stirring at 0°C , benzyl bromide (3.0 mL, 25.2 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwise. The resulting mixture was stirring for one hour at room temperature, then saturated aqueous NH_4Cl was added, and the mixture was extracted three times with Et_2O . The combined organic layers were washed with water, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/ EtOAc 90:10 to 70:30) to afford the desired product **81** (5.1g, 97%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.78 (30% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -18.6 (*c* 1.15, CHCl₃).

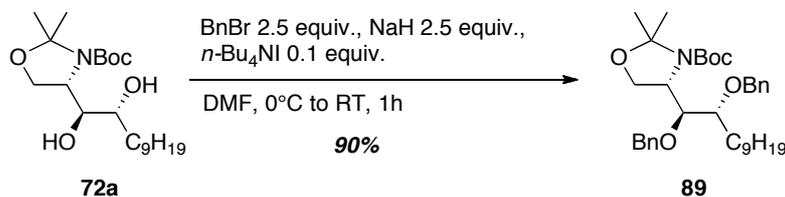
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.27 (m, 10H, Ph), 4.73-4.48 (m, 4H, CH₂Ph), 4.26-4.25 (m, 1H, H₁), 4.14-4.13 (m, 1H, H₆), 4.08-4.07 (m, 1H, H₂), 3.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₁), 3.51-3.50 (m, 1H, H₇), 1.59-1.43 (m, 17H, H₈₋₉₋₁₀₋₁₁₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 1.30-1.24 (m, 6H, H₄₋₅), 0.88-0.84 (m, 3H, H₁₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 152.5 (C₁₃), 138.6, 138.4, 128.3, 128.2, 127.9, 127.8, 127.5 (Ph), 93.4 (C₃), 80.0 (C₇), 79.5 (C₁₄), 78.8 (C₆), 73.7, 72.6 (CH₂Ph), 64.3 (C₁), 57.7 (C₂), 31.8, 30.8, 30.2, 29.7 (C₈₋₉₋₁₀₋₁₁), 28.5 (C₁₅₋₁₆₋₁₇), 25.4 (C₄₋₅), 14.1 (C₁₂).

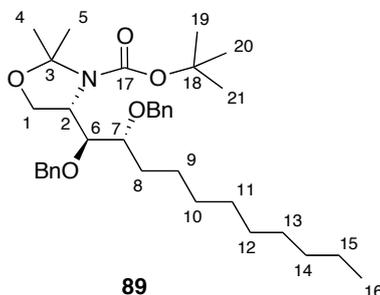
IR (neat): ν_{\max} 1698 (C=O), 1499 (C=C), 1362 (CH₃), 1172 (C-O), 1100 (C-O), 697 (C-C) cm⁻¹.

MS (ESI+): *m/z* = 534.3 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₃₁H₄₅NO₅: C, 72.76; H, 8.86; N, 2.76. Found: C, 72.64; H, 9.02; N, 2.97.

(S)-tert-butyl-4-((1S,2R)-1,2-bis(benzyloxy)undecyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate

The same procedure was applied to **72a** (2.1 g, 5.5 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) afford the desired product **89** (2.8 g, 90%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.59 (20% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15.3$ (*c* 1.01, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.28 (m, 10H, Ph), 4.75-4.48 (m, 4H, CH₂Ph), 4.27-4.25 (m, 1H, H₁), 4.15-4.10 (m, 1H, H₆), 4.08-4.05 (m, 1H, H₂), 3.97 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁), 3.52-3.51 (m, 1H, H₇), 1.62-1.45 (m, 19H, H₈₋₉₋₁₀₋₁₁₋₁₂₋₁₉₋₂₀₋₂₁), 1.32-1.26 (m, 12H, H₄₋₅₋₁₃₋₁₄₋₁₅), 0.90 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H₁₆).

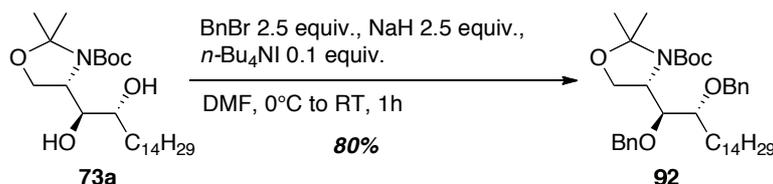
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 152.7 (C₁₇), 138.7, 138.5, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.6, 127.0 (Ph), 93.4 (C₃), 80.0 (C₇), 79.6 (C₁₈), 78.9 (C₆), 73.7, 72.5 (CH₂Ph), 64.4 (C₁), 57.8 (C₂), 33.6 (C₈), 32.0 (C₉), 29.6, 29.4 (C₁₀₋₁₁₋₁₂), 28.5 (C₁₉₋₂₀₋₂₁), 25.5 (C₄₋₅), 22.8 (C₁₃₋₁₄₋₁₅), 14.2 (C₁₆).

IR (neat): ν_{max} 2919 (C-H), 1698 (C=O), 1455 (C=C), 1362 (CH₃), 1097, 1066 (C-O), 697 (C-C) cm⁻¹.

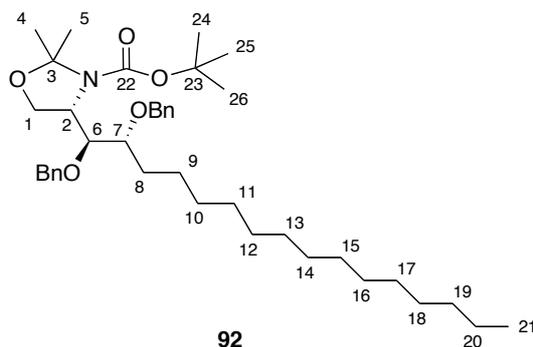
MS (ESI+): $m/z = 590.3$ ($[M+Na]^+$).

Anal. Calcd for $C_{35}H_{53}NO_5$: C, 74.04; H, 9.41; N, 2.47. Found: C, 74.03; H, 9.30; N, 2.54.

(S)-tert-butyl-4-((1S,2R)-1,2-bis(benzyloxy)hexadecyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



The same procedure was applied to **73a** (1.4 g, 3.1 mmol). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) afforded the desired product **92** (1.6 g, 80%) as a white oil.



$R_f = 0.73$ (20% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_D^{20} = -13.4$ (c 1.32, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.54-7.47 (m, 10H, Ph), 4.75-4.40 (m, 4H, CH_2Ph), 4.22-4.18 (m, 1H, H_1), 4.16-4.06 (m, 1H, H_6), 4.04-3.99 (m, 1H, H_2), 3.85 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_1), 3.41-3.40 (m, 1H, H_7), 1.60-1.39 (m, 26H, $\text{H}_{8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20}$), 1.24-1.16 (m, 15H, $\text{H}_{4-5-24-25-26}$), 0.79 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H_{21}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ 152.8 (C_{22}), 138.7, 138.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5 (Ph), 93.4 (C_3), 80.0 (C_7), 79.7 (C_{23}), 78.9 (C_6), 73.7, 72.1

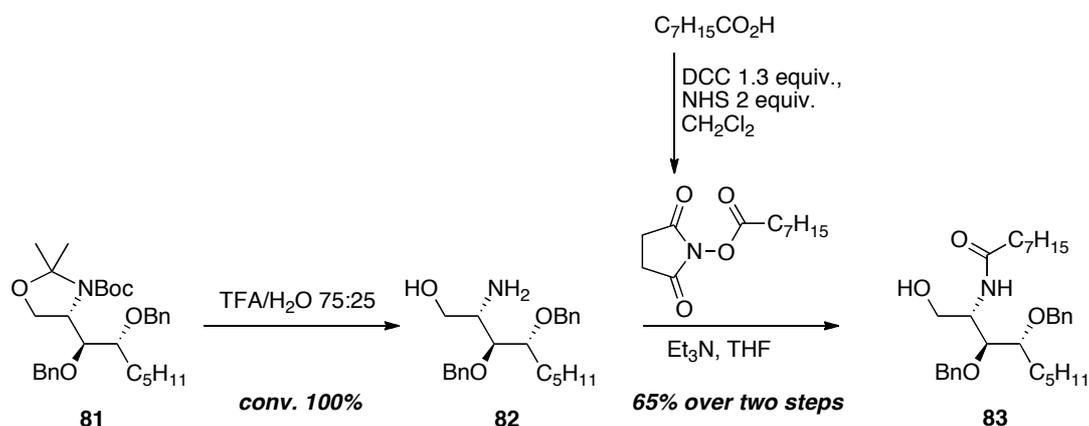
(CH₂Ph), 64.3 (C₁), 57.8 (C₂), 32.0 (C₈), 31.2 (C₉), 29.8, 29.7, 29.6, 29.4 (C₁₀ to C₁₃), 28.5 (C₂₄₋₂₅₋₂₆), 26.0 (C₄₋₅), 22.8 (C₁₄ to C₂₀), 14.2 (C₂₁).

IR (neat): ν_{\max} 2923 (C-H), 2853 (CH₂), 1698 (C=O), 1454 (C=C), 1364 (CH₃), 1094, 1064 (C-O), 732 (C-H), 696 (C-C) cm⁻¹.

MS (ESI+): $m/z = 660.5$ ([M+Na]⁺).

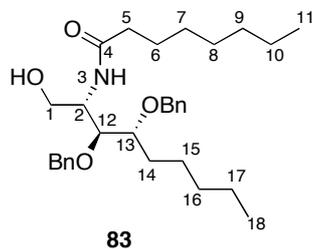
Anal. Calcd for C₃₁H₄₅NO₅: C, 75.31; H, 9.95; N, 2.20. Found: C, 75.34; H, 9.90; N, 2.28.

N-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-1-hydroxynonan-2-yl)octanamide



A solution of compound **81** (207 mg, 0.40 mmol, 1 equiv.) in a mixture of TFA (1.0 mL) and H₂O (0.3 mL) was stirred at room temperature for two hours. The mixture was then slowly quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The reaction mixture was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were washed with a water to pH=7, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. To a solution of this crude product **82** in dry THF (2.1 mL) and triethylamine (0.6 mL) were added a solution of activated octanoic acid (82 μ L, 0.52 mmol, 1.3 equiv.) obtained by refluxing for 3 hours NHS (695 mg, 0.80 mmol, 2 equiv.), DCC (107 mg, 0.52 mmol, 1.3 equiv.) in THF (2 mL). The resulting mixture of **82** and octanoic acid was refluxing overnight. The crude mixture was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were washed with a water and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. The crude residue

was then purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (80:20) as eluent to afford a compound **83** (131 mg, 65% over two steps) as a pale yellow oil.



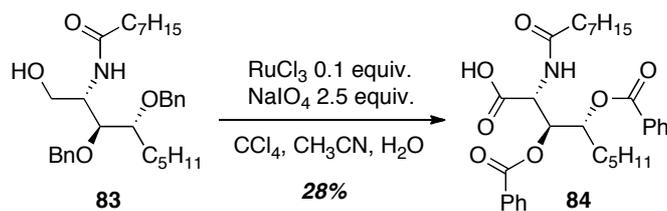
R_f = 0.19 (30% EtOAc in cyclohexane).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₃), 4.74-4.59 (m, 3H, CH₂Ph), 4.47-4.43 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.16-4.12 (m, 1H, H₂), 4.02-3.97 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 2.9 Hz, 1H, H₁), 3.71-3.66 (m, 2H, H₁₂₋₁₃), 3.64-3.59 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 3.8 Hz, 1H, H₁), 3.18-3.09 (m, 1H, OH), 2.03-1.94 (m, 2H, H₅), 1.72-1.42 (m, 6H, H₆₋₁₄₋₁₅), 1.33-1.20 (m, 12H, H₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₆₋₁₇), 0.90-0.85 (m, 6H, H₁₁₋₁₈).

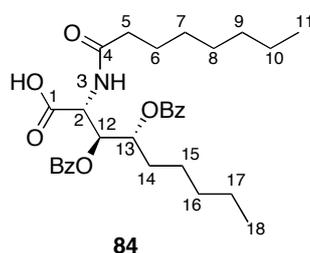
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 173.0 (C₄), 138.2, 137.9, 128.8, 128.5, 128.0, 127.9 (Ph), 82.0 (C₁₂ or C₁₃), 79.2 (C₁₂ or C₁₃), 73.1, 72.9 (CH₂Ph), 62.9 (C₁), 50.7 (C₂), 36.8 (C₅), 31.9, 31.8, 30.8, 29.3, 29.1, 25.8, 25.7, 22.7 (C₆₋₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₄₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 14.1 (C₁₁₋₁₈).

MS (ESI⁺): *m/z* = 598.4 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₃₁H₄₇NO₄: C, 74.81; H, 9.52; N, 2.81. Found: C, 74.88; H, 9.56; N, 2.92.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzoyloxy)-2-octanamidononanoic acid

To a solution of alcohol **83** (112 mg, 0.22 mmol, 1 equiv.) in carbon tetrachloride (4.5 mL), acetonitrile (4.5 mL) and water (6.9 mL) was added sodium periodate (189 mg, 0.88 mmol, 4 equiv.) and the mixture was stirred. After 5 minutes, RuCl₃ (19.5 mg, 0.03 mmol, 0.1 equiv.) was added and the stirring was continued at room temperature for two hours. The mixture was filtered and the residue was washed with ethyl acetate and brine, dried over MgSO₄ and evaporated. The resulting residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 then CH₂Cl₂/MeOH 98:2 + 0.1% of acetic acid) to afford the desired product **84** (34 mg, 28%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.02 (50% EtOAc in cyclohexane).

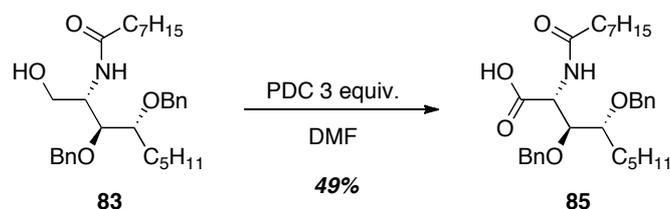
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.04-7.99 (m, 4H, Ph), 7.56-7.37 (m, 6H, Ph), 6.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H₃), 5.77 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H, H₂), 5.55-5.48 (m, 1H, H₁₂), 5.25 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H, H₁₃), 3.31-3.25 (m, 1H, OH), 2.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₅), 1.67-1.05 (m, 18H, H₆₋₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₄₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 0.89-0.79 (m, 6H, H₁₁₋₁₈).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 173.5 (C₁), 172.8 (C₄), 166.6, 165.5 (OC(O)Ph), 133.6, 113.5, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 128.6, 128.5 (Ph), 74.3 (C₂), 71.6 (C₁₂), 52.3 (C₁₃), 49.5 (C₅), 36.8, 33.6, 31.9, 31.6, 31.1, 29.2, 25.8, 25.6, 24.9, 22.8 (C₆₋₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₄₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 14.2, 14.0 (C₁₁₋₁₈).

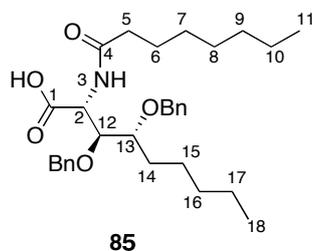
MS (ESI+): $m/z = 540.3$ ($[M+H]^+$).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{41}NO_7$: C, 68.99; H, 7.66; N, 2.60. Found: C, 69.08; H, 7.56; N, 2.52.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-2-octanamidononanoic acid



To a solution of alcohol **83** (192 mg, 0.39 mmol, 1 equiv.) in DMF (2 mL) was added pyridinium dichromate (440 mg, 1.17 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred at room temperature one night and then water was added. The mixture was extracted with EtOAc and the organic layers was washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduce pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 then $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 + 0.1% of acetic acid) as eluent to afford the desired product **85** (97 mg, 49%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.07 (30% EtOAc in cyclohexane).

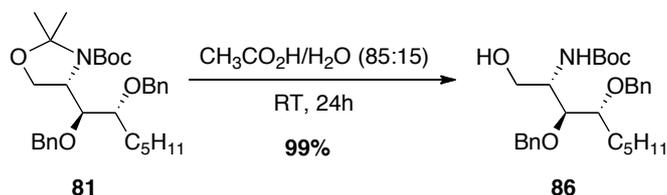
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.15 (m, 1H, OH), 7.36-7.26 (m, 10H, Ph), 6.27 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₃), 5.00 (dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1H, H₂), 4.66-4.48 (m, 4H, CH_2Ph), 3.92 (dd, $J = 5.1$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H₁₂), 3.64 (dd, $J = 10.1$ Hz, $J = 5.3$ Hz, 1H, H₁₃), 2.05-1.92 (m, 2H, H₅), 1.72-1.23 (m, 18H, H₆₋₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₄₋₁₅₋₁₆₋₁₇), 0.89-0.84 (m, 6H, H₁₁₋₁₈).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 173.5 (C_1), 172.5 (C_4), 137.6, 136.8, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9 (Ph), 80.5 (C_{12}), 78.5 (C_{13}), 72.3, 72.0 (CH_2Ph), 49.5 (C_2), 36.5 (C_5), 33.7, 32.0, 31.8, 29.9, 29.1, 25.7, 24.9, 24.6, 22.7 ($\text{C}_{6-7-8-9-10-14-15-16-17}$), 14.2 (C_{11-18}).

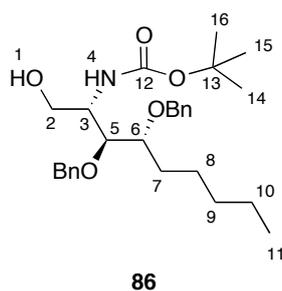
MS (ESI+): $m/z = 512.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{NO}_5$: C, 72.76; H, 8.86; N, 2.74. Found: C, 72.73; H, 8.87; N, 2.75.

tert-butyl ((2S,3S,4R)-3,4-bis(benzyloxy)-1-hydroxynonan-2-yl)carbamate



A solution of compound **81** (664 mg, 1.30 mmol, 1 equiv.) in a mixture of acetic acid (11 mL) and H_2O (2 mL) was stirred at room temperature overnight. The mixture was then concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 100:0 to 70:30) to afford the desired product **86** (606 mg, 99%) as a pale yellow oil.



$R_f = 0.48$ (30% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_D^{20} = -14.4$ (c 1.37, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.27-7.20 (m, 10H, Ph), 6.06 (m, 1H, H_1), 5.21 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 4.70-4.46 (m, 4H, CH_2Ph), 3.85-3.81 (m, 1H, H_2), 3.76-3.74 (m, 1H, H_3), 3.68-

Experimental Section

3.66 (m, 1H, H₅), 3.65-3.63 (m, 1H, H₆), 3.59-3.56 (m, 1H, H₂), 1.62-1.20 (m, 17H, H₇₋₈₋₉₋₁₀₋₁₄₋₁₅₋₁₆), 0.83-0.78 (m, 3H, H₁₁).

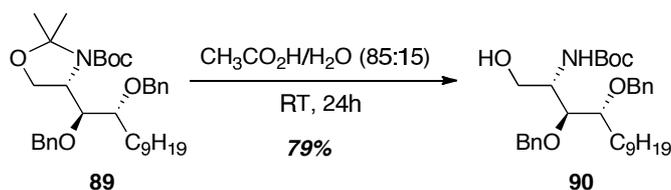
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.6 (C₁₂), 138.1, 137.9, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.7 (Ph), 81.1 (C₅), 79.4 (C₁₃), 79.1 (C₆), 72.8 (CH₂Ph), 62.6 (C₂), 51.9 (C₃), 31.8 (C₇), 30.0 (C₈), 28.3 (C₁₄₋₁₅₋₁₆), 25.6 (C₉), 22.6 (C₁₀), 14.0 (C₁₁).

IR (neat): ν_{max}. 3424, 2925 (OH), 1695 (C=O), 1497 (C=C), 1365 (CH₃), 1170 (C-O), 1063 (C-O), 697 (C-C) cm⁻¹.

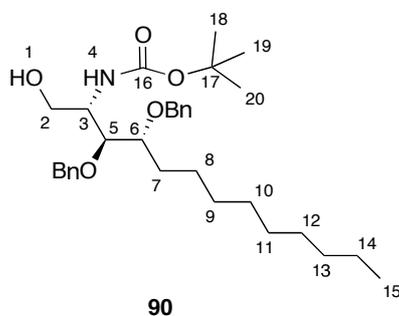
MS (ESI+): m/z = 494.2 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₂₈H₄₁NO₅: C, 71.31; H, 8.76; N, 2.97. Found: C, 71.33; H, 8.67; N, 2.99.

tert-butyl ((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-1-hydroxytridecan-2-yl)carbamate



The same procedure was applied to **89** (826 mg, 1.45 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 100:0 to 70:30) afforded the desired product **90** (606 mg, 79%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.24 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -13.3 (c 1.76, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27-7.20 (m, 10H, Ph), 5.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₄), 4.97-4.54 (m, 4H, CH₂Ph), 3.93-3.83 (m, 1H, H₂), 3.76-3.74 (m, 1H, H₃), 3.70-3.67 (m, 1H, H₅), 3.65-3.63 (m, 2H, H₆ and H₂), 2.79-2.77 (m, 1H, H₁), 1.61-1.57 (m, 2H, H₇), 1.40-1.35 (m, 9H, H₁₈₋₁₉₋₂₀), 1.20-1.17 (m, 14H, H₈ to H₁₄), 0.73-0.67 (m, 3H, H₁₅).

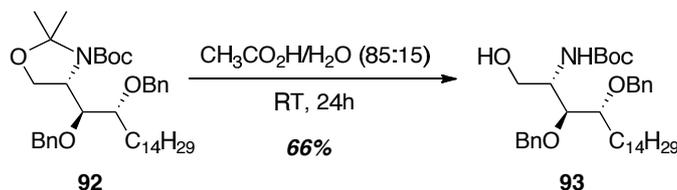
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.5 (C₁₆), 138.2, 137.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.5, 126.9 (Ph), 81.7 (C₅), 79.4 (C₁₇), 79.0 (C₆), 72.7, 72.5 (CH₂Ph), 62.8 (C₂), 51.8 (C₃), 31.9 (C₇), 30.5 (C₈), 28.4 (C₁₈₋₁₉₋₂₀), 26.9 (C₉), 26.0 (C₁₀₋₁₁), 22.7 (C₁₂₋₁₃₋₁₄), 14.2 (C₁₅).

IR (neat): ν_{max}. 3435 (OH), 2919 (C-H), 1689 (C=O), 1494 (C=C), 1368 (CH₃), 1167, 1061 (C-O), 695 (C-C) cm⁻¹.

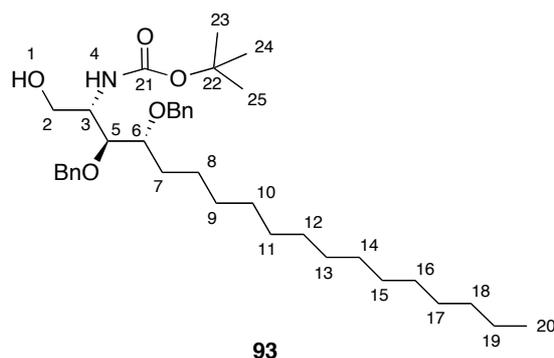
MS (ESI+): *m/z* = 550.3 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₃₂H₄₉NO₅: C, 72.83; H, 9.36; N, 2.65. Found: C, 72.81; H, 9.42; N, 2.61.

tert-butyl ((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-1-hydroxyoctadecan-2-yl)carbamate



The same procedure was applied to **92** (104 mg, 0.16 mmol, 1 equiv). Purification by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 100:0 to 70:30) afforded the desired product **93** (64 mg, 66%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.19 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -16.3 (c 1.80, CHCl₃).

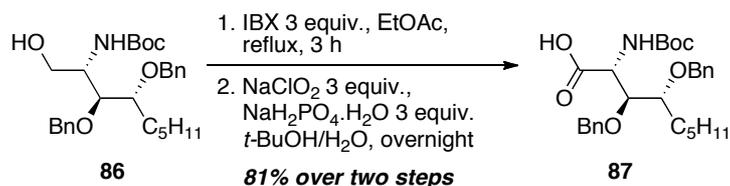
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.25-7.20 (m, 10H, Ph), 5.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 4.74-4.45 (m, 4H, CH₂Ph), 3.86-3.82 (m, 1H, H₂), 3.74-3.72 (m, 1H, H₃), 3.65-3.63 (m, 1H, H₅), 3.65-3.58 (m, 2H, H₆ and H₂), 2.79-2.77 (m, 1H, H₁), 1.66-1.52 (m, 2H, H₇), 1.40-1.35 (m, 9H, H₂₃₋₂₄₋₂₅), 1.25-1.17 (m, 24H, H₈ to H₉), 0.80 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H₂₀).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.5 (C₂₁), 138.2, 137.9, 128.6, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8 (Ph), 81.8 (C₅), 79.4 (C₂₂), 79.0 (C₆), 73.3, 72.8 (CH₂Ph), 62.9 (C₂), 51.9 (C₃), 32.0 (C₇), 30.5 (C₈), 29.7 (C₂₃₋₂₄₋₂₅), 29.4 (C₉ to C₁₇), 26.0 (C₁₈), 22.7 (C₁₉), 14.2 (C₂₀).

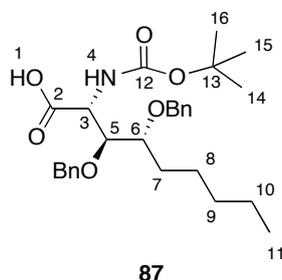
IR (neat): ν_{max}. 2922 (C-H), 2851 (CH₂), 1699 (C=O), 1496 (C=C), 1454, 1365 (CH₃), 1167 (C-N), 1055 (C-O), 696 (C-C) cm⁻¹.

MS (ESI+): *m/z* = 620.3 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₃₇H₅₉NO₅: C, 74.33; H, 9.95; N, 2.34. Found: C, 74.29; H, 9.87; N, 2.39.

(2R,3S,4R)-3,4-bis(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)nonanoic acid

Compound **86** (1.0 g, 2.2 mmol, 1 equiv.) was dissolved in EtOAc (17 mL). IBX (1.9 g, 6.8 mmol, 3 equiv.) was added and the mixture was refluxed for three hours (TLC cyclohexane/EtOAc 70:30). The reaction was filtered through a sintered glass funnel to remove the excess IBX and its byproducts and washed with EtOAc. The solvent was removed under reduced pressure to give the aldehyde as a colorless oil. The crude compound was used in the next step without further purification. The crude aldehyde was dissolved in a mixture of *t*-BuOH (15 mL) and 2-methylbut-2-ene (33 mL) and was cooled to 0°C. With vigorous stirring, a soln of NaClO₂ (587 mg, 6.5 mmol, 3 equiv.) and NaH₂PO₄·H₂O (899 mg, 6.5 mmol, 3 equiv.) in H₂O (10 mL) was slowly added dropwise by syringe over 30 min. The mixture became yellow and was allowed to stir at room temperature overnight. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and was extracted with hexanes. The aqueous layer was mixed with Et₂O and cooled to 0°C. With stirring, 1 M HCl was added dropwise to adjust the pH to 2-3. The organic phase was separated and the residue was washed with Et₂O. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 then CH₂Cl₂/MeOH 98:2 + 0.1% of acetic acid) to afford the desired product **87** (857 mg, 81%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.07 (30% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -21.8 (*c* 1.1, CHCl₃).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 10.14 (m, 1H, H_1), 7.28-7.19 (m, 10H, Ph), 5.25 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H_4), 4.62-4.43 (m, 5H, CH_2Ph and H_3), 3.83-3.81 (m, 1H, H_5), 3.56-3.54 (m, 1H, H_6), 1.45-1.16 (m, 17H, $\text{H}_{7-8-9-10-14-15-16}$), 0.79-0.70 (m, 3H, H_{11}).

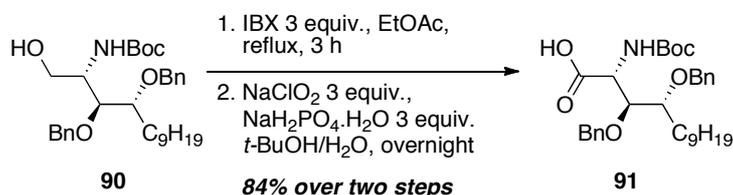
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 175.1 (C_2), 155.8 (C_{12}), 138.2, 137.7, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.7 (Ph), 81.6 (C_5), 80.0 (C_{13}), 79.3 (C_6), 72.9 (CH_2Ph), 72.3 (CH_2Ph), 53.4 (C_3), 32.1 (C_7), 29.8 (C_8), 28.4 ($\text{C}_{14-15-16}$), 23.8 (C_9), 21.0 (C_{10}), 14.2 (C_{11}).

IR (neat): ν_{max} 2930 (OH), 1716 (C=O), 1497 (C=C), 1367 (CH_3), 1247 (C-O), 1165 (CN) cm^{-1} .

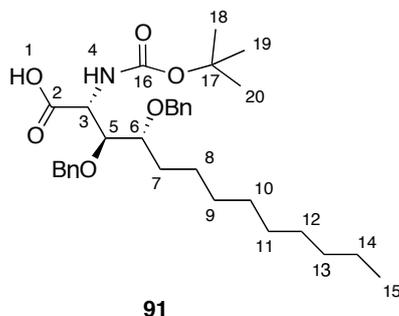
MS (ESI+): $m/z = 486.0$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 508.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 993.0 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{NO}_6$: C, 69.25; H, 8.09; N, 2.88. Found: C, 69.33; H, 8.07; N, 2.95.

(2R,3S,4R)-3,4-bis(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)tridecanoic acid



The same procedure was applied to **90** (420 mg, 0.8 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 + 0.1% of acetic acid) afforded the desired product **91** (362 mg, 84%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.1 (30% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -8.6 (*c* 1.18, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.23 (m, 1H, H₁), 7.31-7.24 (m, 10H, Ph), 5.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₄), 4.77-4.41 (m, 5H, CH₂Ph and H₃), 3.84-3.83 (m, 1H, H₅), 3.53-3.52 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H₆), 1.62-1.55 (m, 2H, H₇), 1.37-1.34 (m, 9H, H₁₈₋₁₉₋₂₀), 1.17-1.15 (m, 14H, H₈ to H₁₄), 0.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, H₁₅).

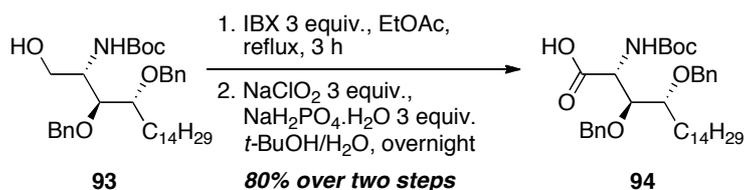
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 173.7 (C₂), 155.6 (C₁₆), 137.4, 136.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2 (Ph), 80.4 (C₅), 79.8 (C₁₇), 77.9 (C₆), 72.3, 71.8 (CH₂Ph), 53.8 (C₃), 31.9 (C₇), 29.8 (C₈), 29.6 (C₉), 29.4 (C₁₀), 28.3 (C₁₈₋₁₉₋₂₀), 24.5 (C₁₁), 22.7 (C₁₂₋₁₃₋₁₄), 14.2 (C₁₅).

IR (neat): ν_{max} 2914 (OH), 1701 (C=O), 1644 (N-H), 1506 (C=C), 1454 (CH₃), 1395 (OH), 1161 (CN), 1078 (C-O), 698 (C-H) cm⁻¹.

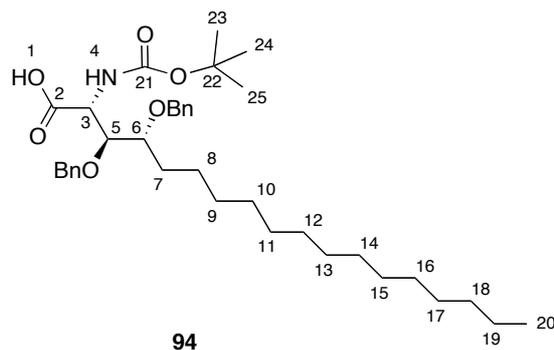
MS (ESI⁺): *m/z* = 564.3 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₃₂H₄₇NO₆: C, 70.95; H, 8.74; N, 2.59. Found: C, 70.89; H, 8.81; N, 2.56.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)octadecanoic acid



The same procedure was applied to **93** (713 mg, 1.2 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 then CH₂Cl₂/MeOH 98:2 + 0.1% of acetic acid) afforded the desired product **94** (581 mg, 80%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.16 (30% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -18.0 (*c* 1.30, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 11.11 (m, 1H, H₁), 7.22-7.13 (m, 10H, Ph), 5.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 4.87 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₃), 4.86-4.60 (m, 4H, CH₂Ph), 3.85 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H₅), 3.48 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H₆), 1.60-1.55 (m, 2H, H₇), 1.38-1.34 (m, 9H, H₂₃₋₂₄₋₂₅), 1.22-1.14 (m, 24H, H₈ to H₁₉), 0.81 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H, H₂₀).

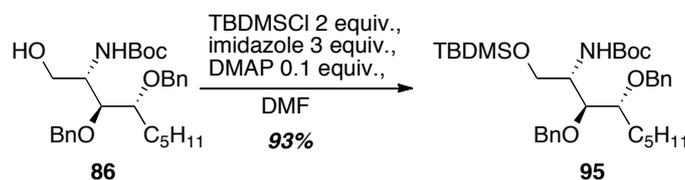
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 174.6 (C₂), 155.7 (C₂₁), 137.5, 137.0, 128.6, 128.4, 128.1, 128.0 (Ph), 80.2 (C₂₂), 79.8 (C₅), 77.5 (C₆), 72.3, 71.5 (CH₂Ph), 53.6 (C₃), 32.0 (C₇), 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 (C₈ to C₁₈), 28.3 (C₂₃₋₂₄₋₂₅), 22.8 (C₁₉), 14.2 (C₂₀).

IR (neat): ν_{max} 2922 (OH), 2856 (CH₂), 1710 (C=O), 1496 (C=C), 1367 (CH₃), 1163 (C-N), 732 (C-H), 696 (C-C) cm⁻¹.

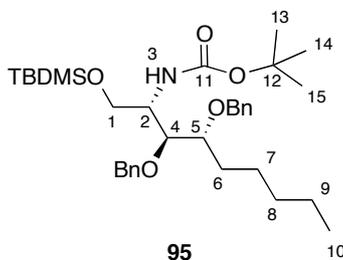
MS (ESI+): *m/z* = 634.3 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₃₇H₅₇NO₆: C, 72.63; H, 9.39; N, 2.29. Found: C, 72.53; H, 9.38; N, 2.37.

3.4.3. Synthesis of a fully protected derivative

tert-butyl-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)nonan-2-yl)carbamate

To a solution of compound **86** (393 mg, 0.83 mmol, 1 equiv.) in DMF (5 mL) were added dimethylaminopyridine (11 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.), imidazole (184 mg, 2.71 mmol, 3 equiv.) and TBDMSCl (0.5 mL, 1.7 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred for one night, then water was added and the mixture was extracted with Et₂O. The combined organic layers were then washed with water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95:05) as eluent to afford a compound **95** (453 mg, 93%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.53 (30% EtOAc in cyclohexane).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.25 (m, 10H, Ph), 4.87 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H₃), 4.77-4.49 (m, 4H, CH₂Ph), 3.90 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H₁), 3.72-3.55 (m, 3H, H₁₋₂₋₅), 1.67-1.64 (m, 2H, H₆), 1.43-1.42 (s, 9H, H₁₃₋₁₄₋₁₅), 1.29-1.20 (m, 6H, H₇₋₈₋₉), 0.91-0.86 (m, 12H, SiC(CH₃)₃ and H₁₀), 0.04-0.03 (m, 6H, Si(CH₃)₂).

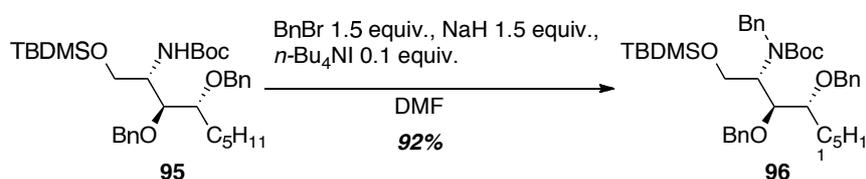
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.3 (C₁₁), 138.9, 138.7, 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 127.5 (Ph), 80.5 (C₅), 79.1 (C₁₂), 78.3 (C₄), 73.7, 72.1 (CH₂Ph), 62.2 (C₁), 52.5 (C₂), 31.2

(SiC(CH₃)₃), 29.5 (C₆), 28.5 (SiC(CH₃)₃), 25.9 (C₁₃₋₁₄₋₁₅), 22.8, 18.3, 14.2 (C₇₋₈₋₉), 14.2 (C₁₀), -5.3, -5.2 (Si(CH₃)₂).

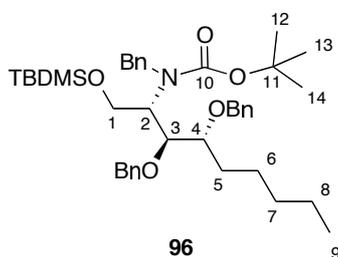
MS (ESI⁺): m/z = 586.4 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₃₄H₅₅NO₅Si: C, 69.70; H, 9.46; N, 2.39. Found: C, 69.73; H, 9.47; N, 2.49.

tert-butylbenzyl((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)nonan-2-yl)carbamate



To a solution of **95** (453 mg, 0.77 mmol, 1 equiv.) in DMF (6 mL) was added *n*-Bu₄NI (32 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv.) and sodium hydride (28.8 mg, 1.2 mmol, 1.5 equiv.). After the mixture was stirred during 15 minutes at 0°C, benzyl bromide (150 μL, 1.2 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise at 0°C. The resulting mixture was stirring for one hour at room temperature. Then saturated aqueous solution of NH₄Cl was added, and the mixture was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) to afford the desired product **96** (483 mg, 92%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.65 (30% EtOAc in cyclohexane).

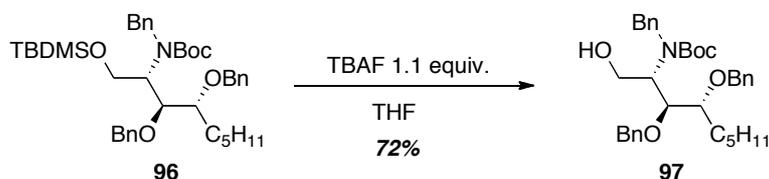
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.34-7.21 (m, 15H, Ph), 4.88-4.52 (m, 6H, CH₂Ph), 4.27-4.23 (m, 1H, H₁), 4.00-3.98 (m, 2H, H₁₋₂), 3.77-3.55 (m, 1H, H₃), 3.38-3.35 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H₄), 1.67-1.64 (m, 2H, H₅), 1.46-1.25 (m, 17H, H₆₋₇₋₈₋₁₂₋₁₃₋₁₄), 0.92-0.85 (m, 12H, SiC(CH₃)₃ and H₉), -0.01--0.03 (m, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.6 (C₁₀), 139.8, 139.1, 138.6, 128.5, 128.3, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 126.9 (Ph), 81.0 (C₄), 79.8 (C₃), 79.0 (C₁₁), 77.9, 73.8, 73.5 (CH₂Ph), 62.1 (C₁), 52.8 (C₂), 32.3 (SiC(CH₃)₃), 29.3 (C₅), 28.4 (SiC(CH₃)₃), 26.0 (C₁₂₋₁₃₋₁₄), 22.9, 18.2 (C₆₋₇₋₈), 14.2 (C₉), -5.5, -5.5 (Si(CH₃)₂).

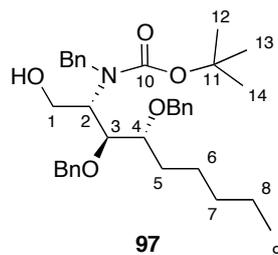
MS (ESI+): *m/z* = 676.4 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₄₁H₆₁NO₅Si: C, 72.84; H, 9.10; N, 2.07. Found: C, 72.76; H, 9.17; N, 2.09.

tert-butyl benzyl((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-1-hydroxynonan-2-yl)carbamate



To a solution of compound **96** (483 mg, 0.71 mmol, 1 equiv.) in dry THF (5 mL) was added at 0°C a solution of TBAF (1M in THF, 0.8 mL, 0.8 mmol, 1.1 equiv.) and the mixture was stirred during one hour. Water was then added and the product was extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 then 80:20) to afford the desired product **97** (291 mg, 72%) as a colorless oil.



R_f = 0.48 (30% EtOAc in cyclohexane).

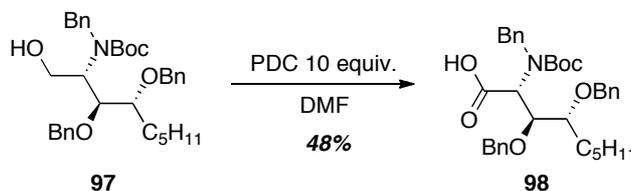
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.35-7.19 (m, 15H, Ph), 4.84-4.59 (m, 6H, CH₂Ph), 4.19-4.13 (m, 1H, H₂), 3.90-3.83 (m, 2H, H_{1,3}), 3.77-3.55 (m, 2H, H_{1,4}), 1.70-1.67 (m, 2H, H₅), 1.46-1.42 (m, 9H, H₁₂₋₁₃₋₁₄), 1.31-1.25 (m, 6H, H₆₋₇₋₈), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H₉).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.3 (C₁₀), 139.5, 139.0, 138.7, 128.5, 128.4, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 126.9, 126.7 (Ph), 81.2 (C₃), 80.2 (C₄), 79.2 (C₁₁), 77.8, 73.9, 73.5 (CH₂Ph), 60.5 (C₂), 54.9 (C₁), 29.1 (C₅), 28.3 (C₁₂₋₁₃₋₁₄), 22.9, 21.4, 18.2 (C₆₋₇₋₈), 14.1 (C₉).

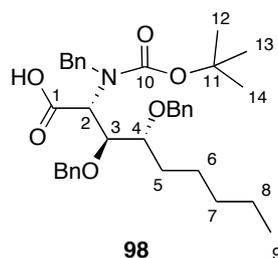
MS (ESI+): *m/z* = 562.3 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₃₅H₄₇NO₅: C, 74.83; H, 8.43; N, 2.49. Found: C, 74.90; H, 8.47; N, 2.41.

(2*R*,3*S*,4*R*)-2-(benzyl(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3,4-bis(benzyloxy)nonanoic acid



To a solution of alcohol **97** (291 mg, 0.52 mmol, 1 equiv.) in DMF (3 mL) was added pyridinium dichromate (1.95 g, 5.20 mmol, 10 equiv.). The mixture was stirred at room temperature one night and then water was added. The mixture was extracted with EtOAc and organic layers were washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 100:0 to 0:100 then CH₂Cl₂/MeOH 98:2 + 0.1% of acetic acid) as eluent to afford the desired product **98** (144 mg, 48%) as a pale yellow oil.



R_f = 0.05 (30% EtOAc in cyclohexane).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.17 (m, 1H, OH), 7.39-7.25 (m, 15H, Ph), 6.00 (m, 1H, H₂), 4.75-4.27 (m, 6H, CH₂Ph), 3.75-3.69 (m, 1H, H₃), 3.57-3.48 (m, 1H, H₄), 1.50-1.43 (m, 9H, H₁₂₋₁₃₋₁₄), 1.32-1.22 (m, 8H, H₅₋₆₋₇₋₈), 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H₉).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 177.0 (C₁), 157.9 (C₁₀), 137.9, 137.6, 135.5, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 127.8 (Ph), 93.9 (C₃), 78.3 (C₄), 77.4 (C₁₁), 76.0, 72.8, 72.7 (CH₂Ph), 63.0 (C₂), 45.9 (NCH₂Ph), 31.9 (C₅), 28.3 (C₁₂₋₁₃₋₁₄), 22.7, 22.6 (C₆₋₇₋₈), 14.1 (C₉).

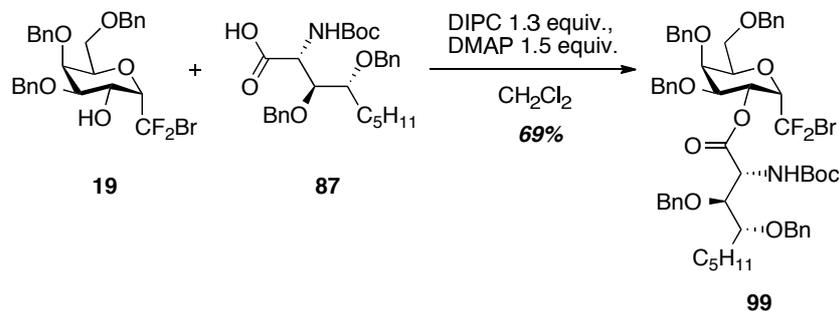
MS (ESI⁺): *m/z* = 576.3 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₃₅H₄₅NO₆: C, 73.02; H, 7.88; N, 2.43. Found: C, 72.91; H, 7.87; N, 2.33.

4. Synthesis of α-CF₂-galactosylceramides analogues

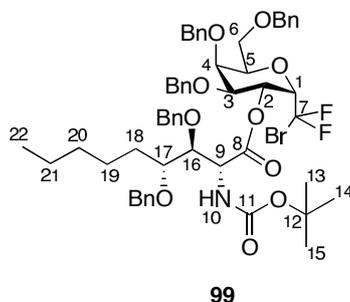
4.1. Coupling between the carboxylic acid and the galactose

4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-2-(bromodifluoromethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl-3,4-bis(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)nonanoate



Compound **87** (1.0 g, 2 mmol, 1.05 equiv.) was dissolved in CH₂Cl₂ (30 mL). 4-dimethylaminopyridine (348 mg, 2.8 mmol, 1.5 equiv.) was added to the reaction mixture cooled at 0°C and *N*-*N'*-diisopropylcarbodiimide (380 μL, 2.4 mmol, 1.3 equiv.) was added dropwise. After 20 minutes of stirring, sugar **19** (1.1 g, 1.9 mmol, 1 equiv.) was added

dropwise at 0°C. The resulting mixture was stirring overnight at room temperature. The mixture was then concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) to afford the desired product **27** (1.4 g, 69%) as a yellow oil.



R_f = 0.64 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = -11.0 (*c* 1.9, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.35-7.25 (m, 25H, Ph), 5.23 (s, 1H, H₁), 5.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H₁₀), 4.72 (dd, *J* = 13.8 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₉), 4.65-4.61 (m, 1H, H₄), 4.59-4.41 (m, 10H, CH₂Ph), 4.34-4.27 (m, 1H, H₅), 4.00-3.97 (m, 2H, H₂ and H₆), 3.94-3.92 (m, 1H, H₃), 3.86 (dd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 3.0 Hz, 1H, H₁₆), 3.76 (dd, *J* = 11.0 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H₆), 3.50-3.47 (m, 1H, H₁₇), 1.62-1.59 (m, 2H, H₁₈), 1.46-1.39 (m, 9H, H₁₃₋₁₄₋₁₅), 1.27-1.17 (m, 6H, H₁₉₋₂₀₋₂₁), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H₂₂).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -51.8 (d, *J* = 165.0 Hz, 1F), -53.8 (d, *J* = 163.0 Hz, 1F).

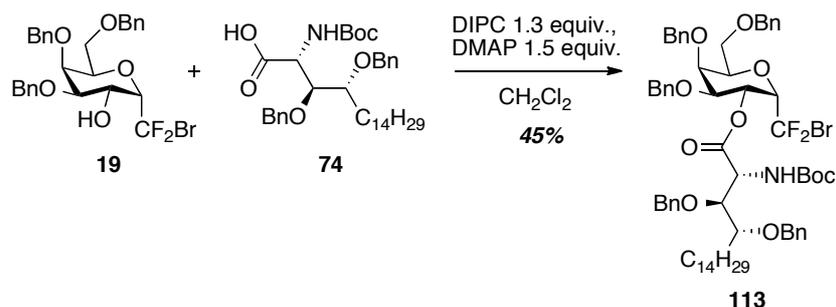
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.8 (C₈), 155.7 (C₁₁), 138.4, 138.3, 137.9, 137.8, 137.6, 137.5, 128.8, 128.6, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (Ph), 121.1 (t, *J* = 312.1 Hz, C₇), 79.9 (C₁₆), 79.8 (C₁₂), 75.8 (C₁₇), 73.3 (C₅), 73.2 (C₃), 72.3 (C₄), 73.1, 73.0, 72.8, 72.5, 72.1 (CH₂Ph), 69.2 (C₁), 65.5 (C₆), 60.5 (C₂), 53.9 (C₉), 32.3 (C₁₈), 29.4 (C₁₉), 28.5 (C₁₃₋₁₄₋₁₅), 23.8 (C₂₀), 22.8 (C₂₁), 14.3 (C₂₂).

IR (neat): ν_{max} 2930 (OH), 1715 (C=O), 1455 (C=C), 1366 (CH₃), 1243 (C-O), 1164 (CN), 1111 (C-O), 698 (CH₂) cm⁻¹.

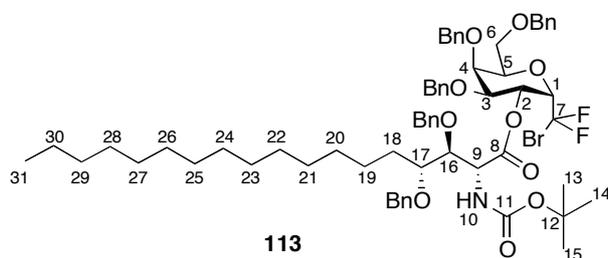
MS (ESI+): *m/z* = 1054.33 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₅₆H₆₆BrF₂NO₁₀: C, 65.24; H, 6.45; N, 1.36. Found: C, 64.99; H, 6.32; N, 1.31.

(2R,3S,4R)-(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-2-(bromodifluoromethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl-3,4-bis(benzyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)octadecanoate



The same procedure was applied to **74** (908 mg, 1.5 mmol, 1.05 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) afforded the desired product **113** (735 g, 45%) as a yellow oil.



R_f = 0.62 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = +10.8 (*c* 1.19, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.44-7.40 (m, 25H, Ph), 5.42 (s, 1H, H₁), 5.34 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H₁₀), 4.86 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H₉), 4.76 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, H₄), 4.65-4.46 (m, 10H, CH₂Ph), 4.40-4.32 (m, 1H, H₅), 4.10-4.06 (m, 2H, H₂ and H₆), 4.03-3.92 (m, 2H, H₃ and H₁₆), 3.83 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H₆), 3.55-3.49 (m, 1H, H₁₇), 1.78-1.62 (m, 2H, H₁₈), 1.51-1.46 (m, 9H, H₁₃₋₁₄₋₁₅), 1.37-1.23 (m, 24H, H₁₉ to H₃₀), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H₃₁).

^{19}F NMR (282.5 MHz, CDCl_3): δ -51.8 (d, J = 166 Hz, 1F), -53.8 (d, J = 166 Hz, 1F).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 169.9 (C_8), 155.7 (C_{11}), 138.4, 138.3, 138.2, 137.9, 137.8, 137.6, 137.5, 137.3, 128.8, 128.6, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (Ph), 121.1 (t, J = 312.2 Hz, C_7), 79.8 (C_3 or C_{16}), 79.5 (C_{12}), 75.8 (C_{17}), 73.3 (C_5), 73.1, 72.9, 72.8, 72.5 (CH_2Ph), 72.2 (C_4), 71.3 (C_3 or C_{16}), 69.2 (C_1), 65.6 (C_6), 60.4 (C_2), 53.9 (C_9), 32.1 (C_{18}), 30.1, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 (C_{19} to C_{28}), 28.5 ($\text{C}_{13-14-15}$), 24.1 (C_{29}), 22.7 (C_{30}), 14.4 (C_{31}).

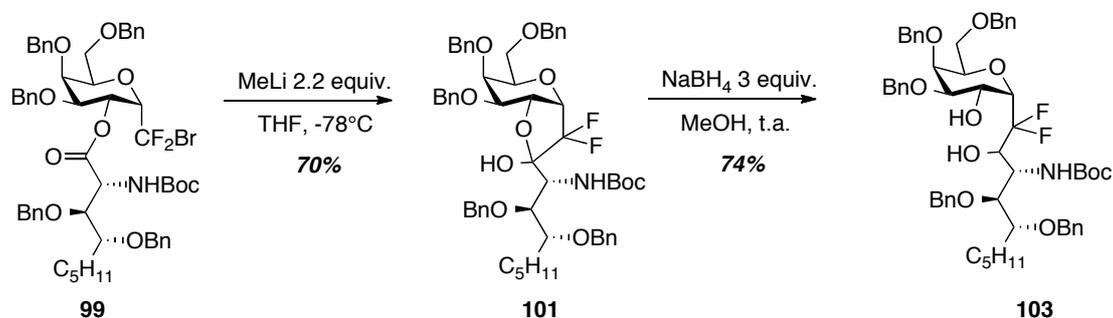
IR (neat): ν_{max} 2925 (C-H), 2856 (CH_2), 1713 (C=O), 1490 (N-H), 1448 (C=C), 1369 (CH_3), 1162 (CN), 1098 (C-O), 1030 (C-F), 701 (CH_2), 667 (C-Br) cm^{-1} .

MS (ESI+): m/z = 1178.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{84}\text{BrF}_2\text{NO}_{10}$: C, 67.46; H, 7.32; N, 1.21. Found: C, 67.49; H, 7.31; N, 1.31.

4.2. Intramolecular cyclisation and reduction of the hemiacetal

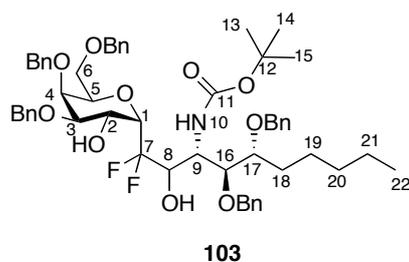
tert-butyl((3*S*,4*S*,5*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-1-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-6-(benzyloxy)methyl)-3-hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1,1-difluoro-2-hydroxydecan-3-yl)carbamate



To a solution of compound **99** (2.8 g, 2.7 mmol, 1 equiv.) in THF (55 mL) was added MeLi (4 mL, 6.1 mmol, 1.5 M in hexanes, 2.2 equiv.) dropwise at -78°C . The reaction mixture was allowed to stir at -78°C for two hours. Then a small amount of HCl 1 N was added, and the

mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with aqueous NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:05 then 80:20) to afford the desired product **101** (1.8 g, 70%) as a white oil.

To a solution of **101** (462 mg, 0.49 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (23 mL) at room temperature was added NaBH₄ (60.4 mg, 1.60 mmol, 3 equiv.). The reaction mixture was stirred for one hour and then slowly quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl. The reaction mixture was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaCl, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:05 to 70:30) to afford the desired product **103** (342 mg, 74%) as a white oil.



R_f = 0.32 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = +8.9 (*c* 1.36, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27-7.14 (m, 25H, Ph), 5.87 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H₁₀), 4.85 (m, 1H, H₁), 4.63-4.34 (m, 12H, CH₂Ph and H₂₋₈), 4.17-4.10 (m, 3H, H₅₋₆₋₉), 3.90 (s, 1H, H₃), 3.83 (s, 1H, H₄), 3.77-3.69 (m, 2H, H₁₆ and H₆), 3.44 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H₁₇), 1.63-1.60 (m, 2H, H₁₈), 1.32 (s, 9H, H₁₃₋₁₄₋₁₅), 1.20-1.08 (m, 6H, H₁₉₋₂₀₋₂₁), 0.79 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, H₂₂).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -105.8 (dd, *J* = 268.9 Hz, *J* = 16.9 Hz, 1F), -118.6 (dd, *J* = 269.2 Hz, *J* = 24.0 Hz, 1F).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.1 (C₁₁), 138.6, 138.4, 138.2, 137.7, 136.3, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4 (Ph), 122.0 (t, *J* = 255.5 Hz, C₇), 79.8 (C₁₂), 78.9 (C₁₆), 77.3 (C₁₇), 76.2 (C₂ or C₈), 75.6 (C₄), 73.5

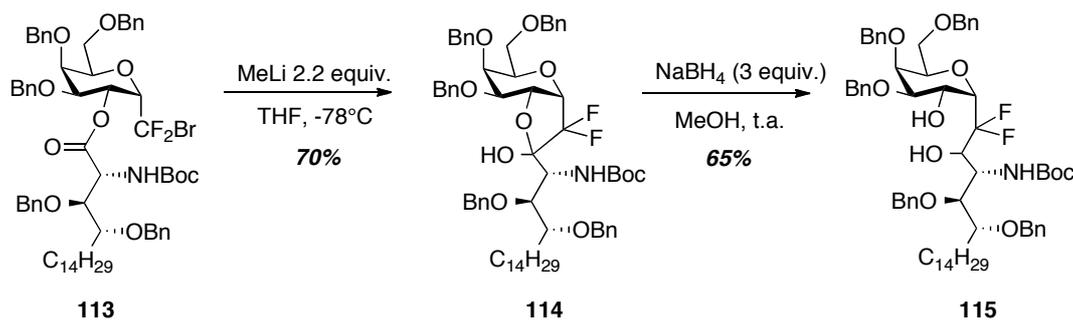
(C₁), 73.2, 73.0, 72.2, 71.6, 71.2 (CH₂Ph and C₅₋₉), 66.4 (C₃), 65.1 (C₆), 51.9 (C₂ or C₈), 32.1 (C₁₈), 28.3 (C₁₃₋₁₄₋₁₅), 23.2 (C₁₉), 22.7 (C₂₀), 21.2 (C₂₁), 14.3 (C₂₂).

IR (neat): ν_{\max} 2928 (OH), 1717 (C=O), 1454 (C=C), 1367 (CH₃), 1162 (CN), 1073 (C-O), 695 (CH₂) cm⁻¹.

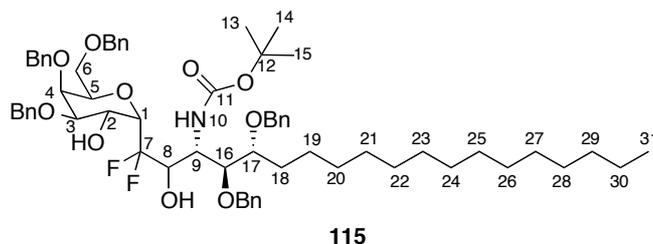
MS (ESI+): $m/z = 977.3$ ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₅₆H₆₉F₂NO₁₀: C, 70.49; H, 7.29; N, 1.47. Found: C, 70.41; H, 7.33; N, 1.44.

tert-butyl-((3*S*,4*S*,5*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-1-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-3-hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1,1-difluoro-2-hydroxy nonadecan-3-yl)carbamate



The same procedure was applied to **113** (735 mg, 0.64 mmol, 1 equiv.) Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:05 to 70:30) afforded the desired product **115** (247 mg, 65%) as a white oil.



R_f = 0.31 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = +5.9 (*c* 1.45, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.35-7.12 (m, 25H, Ph), 6.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₁₀), 4.88 (m, 1H, H₁), 4.77-4.29 (m, 12H, CH₂Ph and H₂₋₈), 4.26-4.03 (m, 3H, H₅₋₆₋₉), 3.94 (s, 1H, H₃), 3.84 (s, 1H, H₄), 3.80-3.65 (m, 2H, H₁₆ and H₆), 3.45 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H₁₇), 1.72-1.52 (m, 2H, H₁₈), 1.33 (s, 9H, H₁₃₋₁₄₋₁₅), 1.30-1.05 (m, 24H, H₁₉ to H₃₀), 0.79 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, H₃₁).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -105.9 (dd, *J* = 268.9 Hz, *J* = 16.5 Hz, 1F), -118.4 (dd, *J* = 268.9 Hz, *J* = 21.2 Hz, 1F).

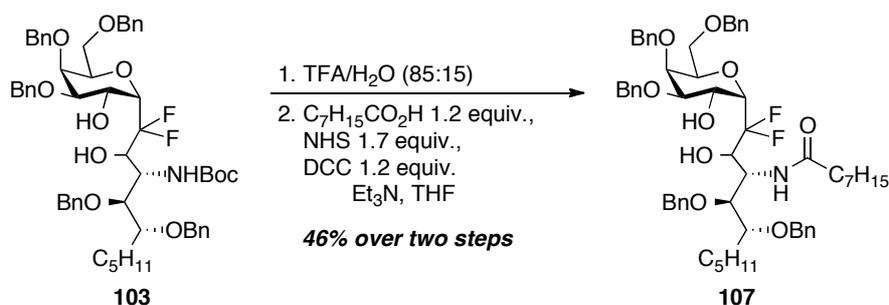
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.2 (C₁₁), 138.8, 138.6, 138.4, 138.3, 138.1, 138.0, 137.8, 137.3, 136.4, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4 (Ph), 122.2 (t, *J* = 251.5 Hz, C₇), 79.5 (C₁₂), 78.3 (C₁₆), 77.1 (C₁₇), 76.2 (C₂ or C₈), 75.6 (C₄), 73.3, 73.2, 73.0, 72.3, 71.7, 71.6, 71.2, 70.7, 70.3 (CH₂Ph and C₅₋₉), 69.9 (C₁), 66.4 (C₃), 65.2 (C₆), 52.0 (C₂ or C₈), 32.0 (C₁₈), 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5 (C₁₉ to C₂₈), 28.4 (C₁₃₋₁₄₋₁₅), 23.7 (C₂₉), 22.8 (C₃₀), 14.3 (C₃₁).

IR (neat): ν_{max} 2924 (OH), 1718 (C=O), 1454 (C=C), 1364 (CH₃), 1163 (CN), 1074 (C-O), 696 (CH₂) cm⁻¹.

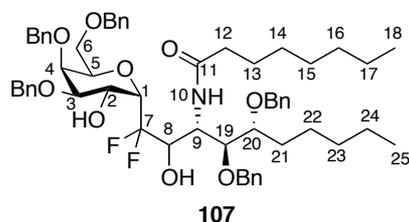
MS (ESI+): *m/z* = 1080.1 ([M+H]⁺), 1102.5 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₆₅H₈₇F₂NO₁₀: C, 72.26; H, 8.12; N, 1.30. Found: C, 72.21; H, 8.13; N, 1.34.

4.3. Peptidic coupling

N-((3*S*,4*S*,5*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-1-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-3-hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1,1-difluoro-2-hydroxydecan-3-yl)octanamide

A solution of compound **103** (27 mg, 0.03 mmol, 1 equiv.) in a mixture of TFA (0.85 mL) and H₂O (0.15 mL) was stirred at room temperature for two hours. The mixture was then slowly quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The reaction mixture was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were washed with water to pH=7, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. To a solution of this crude product in dry THF (0.3 mL) and triethylamine (0.04 mL) were added a solution of octanoic acid (5.1 μ L, 0.03 mmol, 1.1 equiv.), NHS (5.5 mg, 0.05 mmol, 1.7 equiv.), DCC (6.2 mg, 0.04 mmol, 1.2 equiv.) in THF (0.5 mL) preably refluxing during three hours, and the mixture was stirred at reflux during one night. The crude mixture was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:05 to 70:30) to afford the desired product **107** (13.3 mg, 46% over two steps) as a white oil.



R_f = 0.37 (20% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_D^{20} = +6.4$ (*c* 0.44, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.52-7.16 (m, 25H, Ph), 6.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁₀), 5.43 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₁), 4.97 (s, 1H, OH), 4.68-4.34 (m, 12H, CH₂Ph and H₂₋₈), 4.25-4.10 (m, 3H, H₅₋₆₋₉), 4.01 (s, 1H, H₃), 3.93 (s, 1H, H₄), 3.86-3.78 (m, 2H, H₆₋₁₉), 3.43 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, H₂₀), 2.75 (m, 1H, OH), 1.64-1.57 (m, 2H, H₁₂), 1.42-1.37 (m, 2H, H₂₁), 1.35-1.15 (m, 16H, H₁₃₋₁₄₋₁₅₋₁₆₋₁₇₋₂₂₋₂₃₋₂₄), 0.83-0.78 (m, 6H, H₁₈₋₂₅).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -105.0 (dd, *J* = 268.8 Hz, *J* = 17.6 Hz, 1F), -118.7 (dd, *J* = 268.8 Hz, *J* = 24.4 Hz, 1F).

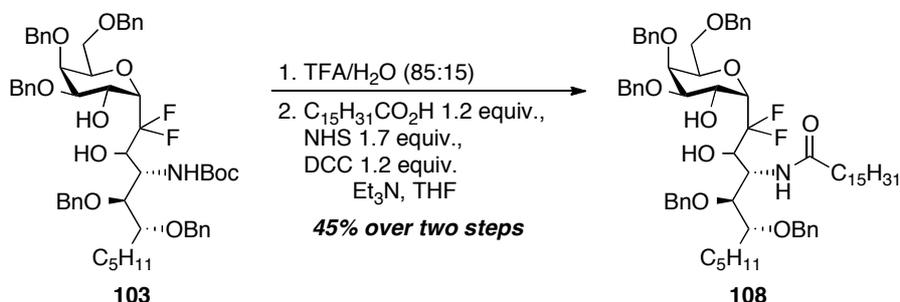
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 173.9 (C₁₁), 138.5, 138.4, 138.3, 137.7, 136.4, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4 (Ph), 122.2 (t, *J* = 252.7 Hz, C₇), 78.0 (C₁₉), 77.3 (C₂₀), 76.2 (C₂ or C₈), 75.5 (C₄), 73.3 (C₁), 73.1, 73.0, 72.4, 71.6, 70.7, 70.6 (CH₂Ph and C₅₋₉), 66.4 (C₃), 65.2 (C₆), 51.6 (C₂ or C₈), 36.4, 32.1, 31.8, 29.8, 29.0, 28.3, 25.6, 23.5 (C₁₂₋₁₃₋₁₄₋₁₅₋₁₆₋₂₁₋₂₂₋₂₃), 22.7 (C₁₇₋₂₄), 14.2 (C₁₈₋₂₅).

IR (neat): ν_{max} 3373, 2930 (OH), 1740 (C=O), 1455 (C=C), 1097 (C-O), 698 (CH₂) cm⁻¹.

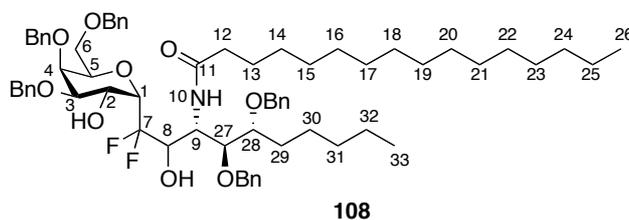
MS (ESI+): *m/z* = 980.3 ([M+H]⁺).

Anal. Calcd for C₅₉H₇₅F₂NO₉: C, 72.29; H, 7.71; N, 1.43. Found: C, 72.36; H, 7.73; N, 1.44.

***N*-((3*S*,4*S*,5*R*)-4,5-bis(benzoyloxy)-1-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-bis(benzoyloxy)-6-((benzyl oxy)methyl)-3-hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1,1-difluoro-2-hydroxydecan-3-yl)dodecanamide**



A solution of compound **103** (81 mg, 0.09 mmol, 1 equiv.) in a mixture of TFA (0.55 mL) and H₂O (0.1 mL) was stirred at room temperature for two hours. The mixture was then slowly quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The reaction mixture was extracted with EtOAc, and combined organic layers were washed with water until pH=7, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. To a solution of this crude product in dry THF (3 mL) and triethylamine (0.13 mL) were added a solution of palmitic acid (29 mg, 0.11 mmol, 1.2 equiv.), NHS (18 mg, 0.16 mmol, 2.3 equiv.), DCC (22 mg, 0.11 mmol, 1.2 equiv.) in THF (3 mL) preably refluxing during three hours, and the mixture was stirred at reflux during one night. The crude mixture was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:05 to 70:30) to afford the desired product **108** (42.1 mg, 45% over two steps) as a white oil.



R_f = 0.37 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = +3.0 (*c* 1.01, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.33-7.15 (m, 25H, Ph), 6.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₁₀), 5.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H₁), 4.99 (s, 1H, OH), 4.69-4.31 (m, 13H, CH₂Ph and H₂₋₈ and OH), 4.18-

4.06 (m, 3H, H₅₋₆₋₉), 3.93 (s, 1H, H₃), 3.86 (s, 1H, H₄), 3.78-3.72 (m, 2H, H₆₋₂₇), 3.42 (dd, $J = 10.8$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 1H, H₂₈), 1.64-1.61 (m, 2H, H₁₂), 1.42-1.37 (m, 2H, H₂₉), 1.23-1.19 (m, 32H, H₁₃ to H₂₅ and H₃₀₋₃₁₋₃₂), 0.86-0.73 (m, 6H, H₂₆₋₃₃).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -105.0 (dd, $J = 268.9$ Hz, $J = 13.5$ Hz, 1F), -118.7 (dd, $J = 268.9$ Hz, $J = 24.0$ Hz, 1F).

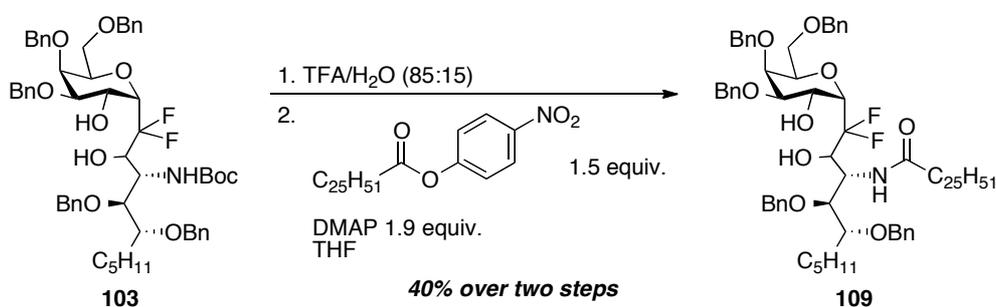
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 173.8 (C₁₁), 138.6, 138.4, 138.2, 137.6, 136.4, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3 (Ph), 121.9 (t, $J = 251.9$ Hz, C₇), 78.1 (C₂₇), 77.2 (C₂₈), 76.1 (C₂ or C₈), 75.5 (C₄), 73.2 (C₁), 73.1, 72.9, 72.4, 71.5, 70.7, 70.5 (CH₂Ph and C₅₋₉), 66.3 (C₃), 65.2 (C₆), 51.7 (C₂ or C₈), 36.5, 36.4, 33.2, 32.0, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.3, 25.5, 23.5, 22.7 (C₁₂ to C₂₄ and C₂₉₋₃₀₋₃₁), 22.6 (C₂₅₋₃₂), 14.3 (C₂₆₋₃₃).

IR (neat): ν_{\max} 2923 (OH), 1454 (C=C), 1093 (C-O), 695 (CH₂) cm⁻¹.

MS (ESI⁺): $m/z = 1092.4$ ([M+H]⁺), 1115.7 ([M+Na]⁺).

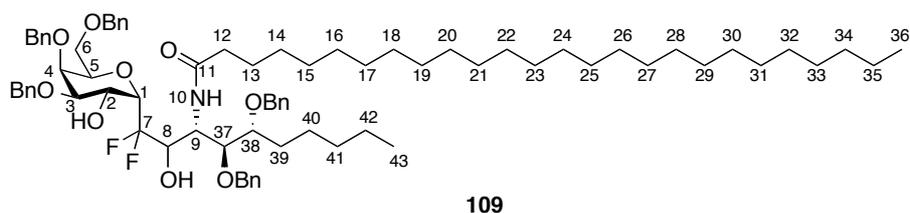
Anal. Calcd for C₆₇H₉₁F₂NO₉: C, 73.66; H, 8.40; N, 1.28. Found: C, 73.63; H, 8.43; N, 1.24.

N-((3S,4S,5R)-4,5-bis(benzyloxy)-1-((2S,3R,4R,5S,6R)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-3-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1,1-difluoro-2-hydroxydecan-3-yl)hexacosanamide



A solution of compound **103** (108 mg, 0.11 mmol, 1 equiv.) in a mixture of TFA (0.85 mL) and H₂O (0.15 mL) was stirred at room temperature for two hours. The mixture was then slowly quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The reaction mixture was

extracted with EtOAc, and combined organic layers were washed with water to pH=7, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. To a solution of this crude product in dry THF (4 mL) was added the activated lipidic chain (83 mg, 0.16 mmol, 1.5 equiv. ; prepared from hexacosanoic acid, p-nitrophenol, DCC and DMAP in CH₂Cl₂ for 16h, 70%), DMAP (24 mg, 0.20 mmol, 1.9 equiv.) and the mixture was stirred at room temperature during one night. The crude mixture was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:05 to 70:30) to afford the desired product **109** (54 mg, 40% over two steps) as a white oil.



R_f = 0.30 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = +4.3 (*c* 1.98, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.21 (m, 25H, Ph), 6.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₁₀), 5.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₁), 5.00 (s, 1H, OH), 4.64-4.37 (m, 13H, CH₂Ph and H₂₋₈ and OH), 4.16-4.09 (m, 3H, H₅₋₆₋₉), 3.93 (s, 1H, H₃), 3.86 (s, 1H, H₄), 3.75-3.70 (m, 2H, H₆₋₃₇), 3.41 (m, 1H, H₃₈), 1.68-1.60 (m, 2H, H₁₂), 1.41-1.36 (m, 2H, H₃₉), 1.23-1.17 (m, 52H, H₁₃ to H₃₅ and H₄₀₋₄₁₋₄₂), 0.81 (s, 6H, H₃₆₋₄₃).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -104.9 (d, *J* = 307.9 Hz, 1F), -118.7 (d, *J* = 269.0 Hz, 1F).

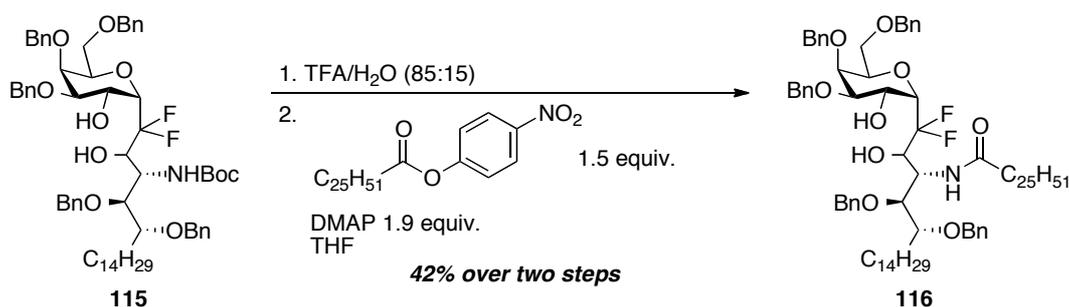
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 173.8 (C₁₁), 138.6, 138.4, 138.2, 137.6, 136.4, 129.0, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2, 127.1 (Ph), 122.1 (t, *J* = 254.3 Hz, C₇), 78.0 (C₃₇), 77.3 (C₃₈), 76.1 (C₂ or C₈), 75.5 (C₄), 73.2 (C₁), 73.1, 72.9, 72.3, 71.5, 70.9, 70.5 (CH₂Ph and C₅₋₉), 66.3 (C₃), 65.2 (C₆), 51.6 (C₂ or C₈), 36.4, 32.0, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.3, 25.5, 23.5, 22.7, 22.6 (C₁₂ to C₃₄ and C₄₀₋₄₁), 22.5 (C₃₅₋₄₂), 14.1 (C₃₆₋₄₃).

IR (neat): ν_{max} 2922, 2852 (OH), 1454 (C=C), 1095 (C-O), 695 (CH₂) cm⁻¹.

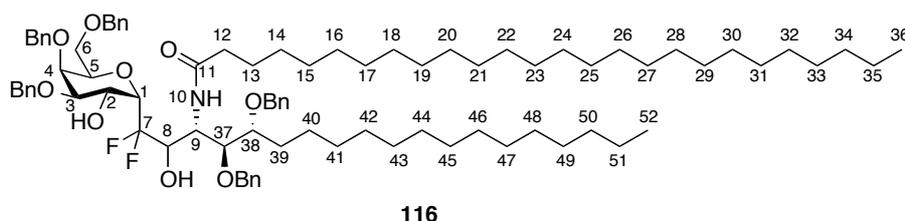
MS (ESI+): $m/z = 1232.7$ ($[M+H]^+$).

Anal. Calcd for $C_{77}H_{111}F_2NO_9$: C, 75.02; H, 9.08; N, 1.14. Found: C, 75.00; H, 9.04; N, 1.18.

***N*-((3*S*,4*S*,5*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-1-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-3-hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1,1-difluoro-2-hydroxynonadecan-3-yl)hexacosanamide**



The same procedure was applied to **115** (61.4 mg, 0.057 mmol, 1 equiv.). Purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:05 to 70:30) afforded the desired product **116** (32 mg, 42 % over two steps) as a white oil.



$R_f = 0.43$ (20% EtOAc in cyclohexane).

$[\alpha]_D^{20} = +4.2$ (c 1.89, $CHCl_3$).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.50-7.16 (m, 25H, Ph), 6.40 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H₁₀), 5.43 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₁), 5.09 (s, 1H, OH), 4.74-4.42 (m, 13H, CH₂Ph and H₂₋₈ and OH), 4.27-4.10 (m, 3H, H_{5-6,9}), 3.96 (s, 1H, H₃), 3.86 (s, 1H, H₄), 3.72-3.67 (m, 2H, H₆₋₃₇), 3.42 (m, 1H, H₃₈), 1.82-1.60 (m, 4H, H₁₂₋₃₉), 1.48-1.36 (m, 2H, H₁₃), 1.29-1.00 (m, 68H, H₁₄ to H₃₅ and H₄₀₋₄₁ to H₅₁), 0.85 (s, 6H, H₃₆₋₅₂).

^{19}F NMR (282.5 MHz, CDCl_3): δ -104.9 (dd, $J = 326.4$ Hz, $J = 16.8$ Hz, 1F), -118.7 (dd, $J = 268.9$ Hz, $J = 22.8$ Hz, 1F).

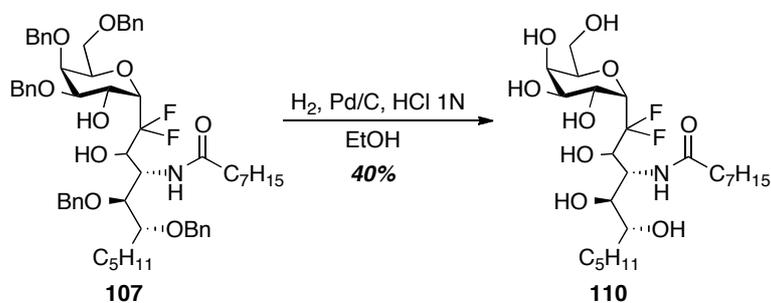
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 173.8 (C_{11}), 138.6, 138.4, 138.2, 137.6, 136.4, 128.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2 (Ph), 122.3 (t, $J = 251.6$ Hz, C_7), 78.1 (C_{37}), 77.2 (C_{38}), 76.1 (C_2 or C_8), 75.5 (C_4), 73.2, 73.1, 72.9, 72.4, 71.5, 70.9, 70.7 (CH_2Ph and C_{5-9}), 67.8 (C_1), 66.3 (C_3), 65.2 (C_6), 51.7 (C_2 or C_8), 36.4, 32.0, 30.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.4, 25.5, 23.9 (C_{12} to C_{34} and C_{39} to C_{50}), 22.7 (C_{35-51}), 14.1 (C_{36-52}).

IR (neat): ν_{max} 2924, 2851 (OH), 1454 (C=C), 1098 (C-O), 692 (CH_2) cm^{-1} .

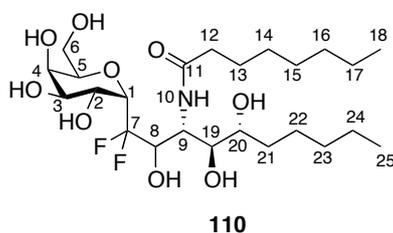
MS (ESI+): $m/z = 1345.1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Anal. Calcd for $\text{C}_{86}\text{H}_{129}\text{F}_2\text{NO}_9$: C, 76.01; H, 9.57; N, 1.03. Found: C, 76.03; H, 9.48; N, 0.98.

4.4. Hydrogenation

***N*-((3*R*,4*S*,5*R*)-1,1-difluoro-2,4,5-trihydroxy-1-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)decan-3-yl)octanamide**

To a solution of **107** (22 mg, 0.022 mmol, 1 equiv.) in absolute ethanol (5 mL) and HCl 1 N (0.1 mL), was added a catalytic amount of Pd/C (10%). The reaction flask was flushed with hydrogen, and the reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere overnight. After complete reaction, the reaction mixture was filtered through a pad of celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure to afford **110** (4.7 mg, 40%) as a white solid.



$[\alpha]_D^{20} = +5.3$ (*c* 1.90, MeOH).

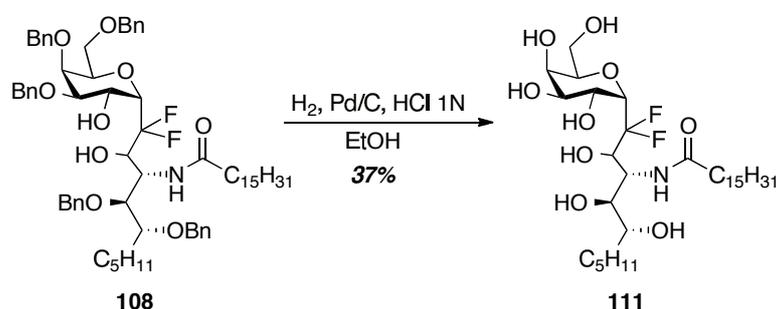
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 5.27-4.62 (m, 8H, OH and H₁₀), 4.43-4.21 (m, 3H, H₁₋₅₋₉), 4.15-3.91 (m, 4H, H₂₋₄₋₆₋₈), 3.88-3.80 (m, 1H, H₃), 3.79-3.63 (m, 2H, H₆₋₁₉), 3.60-3.57 (m, 1H, H₂₀), 2.60 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₁₂), 2.17 (m, 2H, H₂₁), 1.70-1.57 (m, 4H, H₁₃₋₂₂), 1.44-1.18 (m, 12H, H₁₄₋₁₅₋₁₆₋₁₇₋₂₃₋₂₄), 0.89 (m, 6H, H₁₈₋₂₅).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, MeOD): δ -109.2 (d, *J* = 264.7 Hz, 1F), -115.4 (d, *J* = 265.6 Hz, 1F).

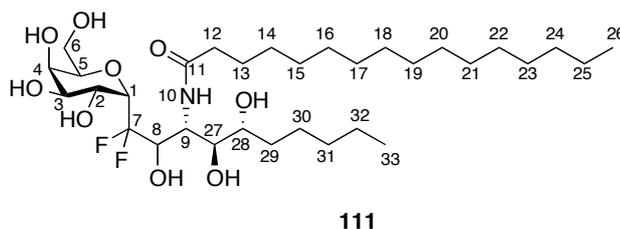
^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 170.5 (C_{11}), 119.2 (C_7), 78.7 (C_2 or C_4 or C_8), 76.5 (C_{19}), 72.9 (C_{20}), 71.9 (C_3), 71.1 (C_1), 69.6 (C_5), 68.3 (C_2 or C_4 or C_8), 67.9 (C_2 or C_4 or C_8), 60.7 (C_6), 53.9 (C_9), 37.2 (C_{21}), 33.3 (C_{14}), 31.6 (C_{13}), 30.7 (C_{12}), 30.5, 30.2, 29.8 ($\text{C}_{15-16-23}$), 27.3, 26.9 (C_{17-24}), 25.7 (C_{22}), 14.4 (C_{18-25}).

HRMS: (ESI-) m/z = 528.3 ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

***N*-((3*R*,4*S*,5*R*)-1,1-difluoro-2,4,5-trihydroxy-1-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)decan-3-yl)palmitamide**



The same procedure was applied to **108** (31 mg, 0.028 mmol, 1 equiv). After complete reaction, the reaction mixture was filtered through a pad of celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure to afford **111** (6.7 mg, 37%) as a white solid.



$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7.1$ (c 1.12, MeOH).

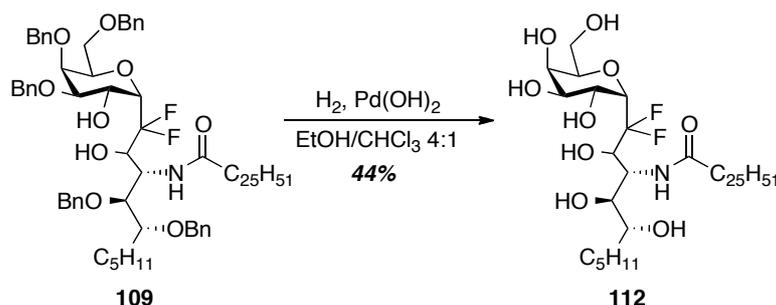
^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 5.20-4.80 (m, 8H, OH and H_{10}), 4.48-4.29 (m, 3H, $\text{H}_{1-5,9}$), 4.10-3.96 (m, 4H, $\text{H}_{2-4-6-8}$), 3.90-3.87 (m, 1H, H_3), 3.81-3.71 (m, 2H, H_{6-27}), 3.61-3.57 (m, 1H, H_{28}), 2.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_{12}), 2.15 (m, 2H, H_{29}), 1.67-1.50 (m, 4H, H_{13-30}), 1.40-1.19 (m, 28H, H_{14} to H_{25} and H_{31-32}), 0.89 (m, 6H, H_{26-33}).

^{19}F NMR (282.5 MHz, MeOD): δ -109.2 (dd, $J = 264.2$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1F), -115.4 (d, $J = 264.1$ Hz, 1F).

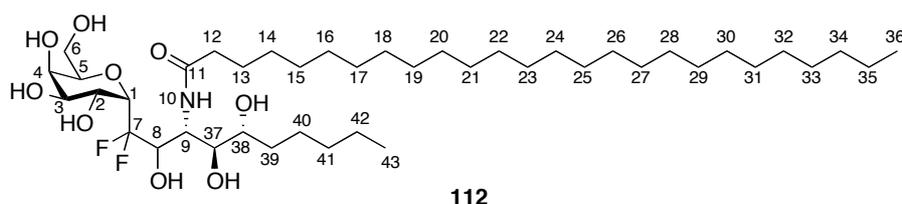
^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 170.7 (C₁₁), 118.7 (C₇), 78.7 (C₂ or C₄ or C₈), 76.4 (C₂₇), 72.9 (C₂₈), 72.0 (C₃), 71.0 (C₁), 69.6 (C₅), 68.3 (C₂ or C₄ or C₈), 67.9 (C₂ or C₄ or C₈), 60.6 (C₆), 53.8 (C₉), 37.2, 34.8, 33.3, 33.2, 33.1 (C₁₂₋₁₃₋₂₉₋₃₀), 31.6 (C₁₄), 30.8 (C₁₅), 30.6, 30.5, 30.4, 30.3, 30.2, 30.0, 29.8 (C₁₆ to C₂₂), 26.9, 26.8, 26.6, 26.0 (C₂₃₋₂₄₋₃₁), 23.8, 23.7 (C₂₅₋₃₂), 14.5 (C₂₆₋₃₃).

HRMS: (ESI-) $m/z = 640.7$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

***N*-((3*R*,4*S*,5*R*)-1,1-difluoro-2,4,5-trihydroxy-1-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)decan-3-yl)hexacosanamide**



To a solution of **109** (48 mg, 0.039 mmol, 1 equiv.) in a mixture of absolute ethanol (4 mL) and CHCl_3 (1 mL), was added a catalytic amount of $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (20%). The reaction flask was flushed with hydrogen, and the reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere one hour. After complete reaction, the reaction mixture was filtered through a pad of celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure to afford **112** (13.4 mg, 44%) as a white solid.



$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +5.4$ (c 1.22, MeOH).

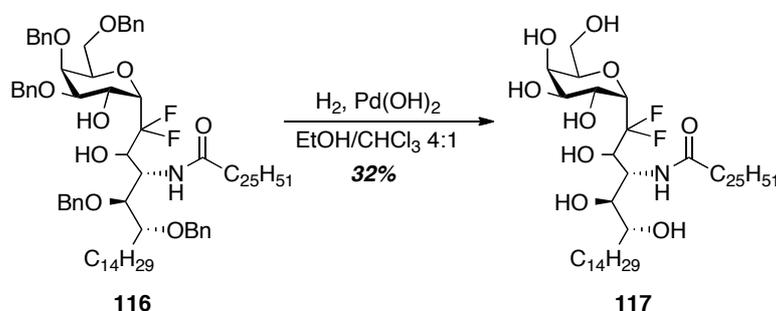
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 4.92-4.80 (m, 8H, OH and H₁₀), 4.64-4.36 (m, 3H, H₁₋₅₋₉), 4.12-3.97 (m, 4H, H₂₋₄₋₆₋₈), 3.95-3.89 (m, 1H, H₃), 3.86-3.70 (m, 2H, H₆₋₃₇), 3.66-3.59 (m, 1H, H₃₈), 2.12 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₁₂), 1.61-1.53 (m, 6H, H₁₃₋₃₉₋₄₀), 1.46-1.20 (m, 48H, H₁₄ to H₃₅ and H₄₁₋₄₂), 0.87 (m, 6H, H₃₆₋₄₃).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, MeOD): δ -109.2 (dd, *J* = 264.2 Hz, *J* = 14.5 Hz, 1F), -115.4 (d, *J* = 277.1 Hz, 1F).

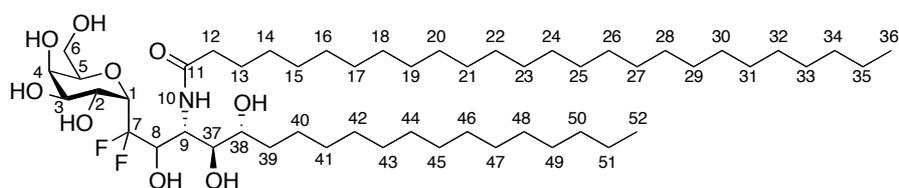
¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 171.3 (C₁₁), 119.6 (C₇), 78.8 (C₂ or C₄ or C₈), 76.4 (C₃₇), 72.9 (C₃₈), 72.0 (C₃), 71.1 (C₁), 69.7 (C₅), 68.4 (C₂ or C₄ or C₈), 67.8 (C₂ or C₄ or C₈), 60.6 (C₆), 54.0 (C₉), 37.2 (C₁₂), 33.3, 33.2, 33.1 (C₁₃₋₃₉₋₄₀), 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.3 (C₁₄ to C₃₂), 26.9, 26.5 (C₃₃₋₃₄₋₄₁), 23.8, 23.7 (C₃₅₋₄₂), 14.5 (C₃₆₋₄₃).

HRMS: (ESI-) *m/z* = 780.6 ([M-H]⁻).

***N*-((3*R*,4*S*,5*R*)-1,1-difluoro-2,4,5-trihydroxy-1-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)decan-3-yl)hexacosanamide**



The same procedure was applied to **116** (39 mg, 0.029 mmol, 1 equiv.). After complete reaction, the reaction mixture was filtered through a pad of celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure to afford **117** (8.3 mg, 32%) as a white solid.



117

$[\alpha]_D^{20} = +3.3$ (c 1.88, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 4.95-4.78 (m, 8H, OH and H₁₀), 4.66-4.34 (m, 3H, H₁₋₅₋₉), 4.12-4.01 (m, 4H, H₂₋₄₋₆₋₈), 3.96-3.87 (m, 1H, H₃), 3.84-3.72 (m, 2H, H₆₋₃₇), 3.66-3.57 (m, 1H, H₃₈), 2.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H₁₂), 1.58-1.50 (m, 6H, H₁₃₋₃₉₋₄₀), 1.48-1.14 (m, 46H, H₁₄ to C₃₅ and H₄₁ to H₅₁), 0.88 (m, 6H, H₃₆₋₅₂).

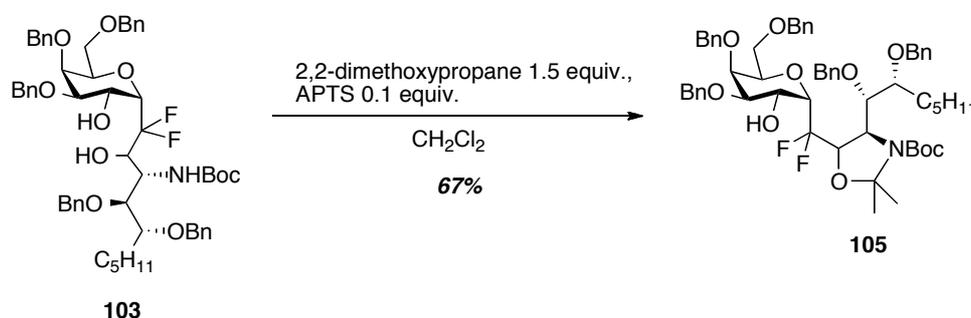
^{19}F NMR (282.5 MHz, MeOD): δ -109.2 (dd, $J = 264.1$ Hz, $J = 14.5$ Hz, 1F), -115.4 (d, $J = 277.3$ Hz, 1F).

^{13}C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 171.2 (C₁₁), 119.3 (C₇), 78.7 (C₂ or C₄ or C₈), 76.4 (C₃₇), 72.9 (C₃₈), 72.1 (C₃), 71.3 (C₁), 69.7 (C₅), 68.3 (C₂ or C₄ or C₈), 67.9 (C₂ or C₄ or C₈), 60.7 (C₆), 54.1 (C₉), 37.2 (C₁₂), 33.3, 33.2, 33.1 (C₁₃₋₃₉₋₄₀), 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.3, 30.2, 30.1 (C₁₄ to C₃₂ and C₄₁ to C₄₉), 26.9, 26.5, 26.3 (C₃₃₋₃₄₋₅₀), 23.8, 23.7 (C₃₅₋₅₁), 14.4 (C₃₆₋₅₂).

HRMS: (ESI-) $m/z = 906.7$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

4.5. Selective protection of hydroxyle group (O-2')

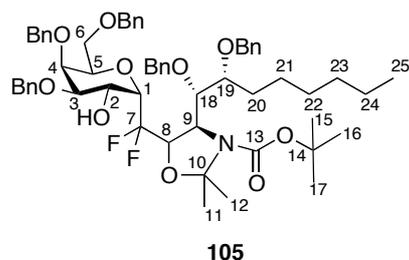
(4R)-tert-butyl-5-(((2S,3R,4R,5S,6R)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-3-hydroxy tetrahydro-2H-pyran-2-yl)difluoromethyl)-4-(((1S,2R)-1,2-bis(benzyloxy)octyl)-2,2-dimethylloxazolidine-3-carboxylate



To a solution of **103** (220 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.) in dichloromethane (5 mL) was added 2,2-dimethoxypropane (0.4 mL, 0.35 mmol, 1.5 equiv.) and APTS (4 mg, 0.023 mmol, 0.1 equiv.). The resulting mixture was stirring for three hours at room temperature. Then

Experimental Section

saturated aqueous NaHCO₃ was added, and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was then purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 to 70:30) to afford the desired product **105** (154 mg, 67%) as a white oil.



R_f = 0.58 (20% EtOAc in cyclohexane).

[α]_D²⁰ = +12.2 (*c* 1.07, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.48-7.12 (m, 25H, Ph), 4.73-4.50 (m, 10H, CH₂Ph), 4.48 (s, 1H, H₂ or H₈), 4.47-4.46 (m, 1H, H₂ or H₈), 4.06-3.91 (m, 5H, H₁₋₃₋₅₋₆₋₉), 3.85-3.66 (m, 3H, H₄₋₆₋₁₈), 3.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁₉), 1.61-1.55 (m, 2H, H₂₀), 1.50 (s, 9H, H₁₅₋₁₆₋₁₇), 1.16-1.05 (m, 14H, H₁₁₋₁₂₋₂₁₋₂₂₋₂₃₋₂₄), 0.77 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H₂₅).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -113.2 (s, 2F).

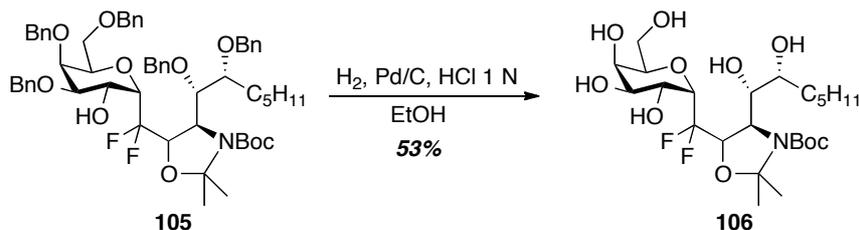
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.5 (C₁₃), 138.7, 138.5, 138.4, 138.2, 137.8, 130.6, 129.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4 (Ph), 121.0 (t, *J* = 252.5 Hz, C₇), 101.9 (C₁₀), 80.5 (C₁₉), 80.1 (C₁₈), 79.3 (C₁₄), 77.3 (C₄), 76.0 (C₂ or C₈), 75.8 (C₁), 73.4, 73.3, 73.2, 72.6, 72.0, 71.6, 68.4 (CH₂Ph, C₃ and C₅), 66.3 (C₆), 65.7 (C₈ or C₂), 53.5 (C₉), 32.1 (C₂₀), 28.8 (C₁₅₋₁₆₋₁₇), 25.6 (C₂₁), 24.9 (C₂₂), 24.6 (C₂₃), 23.8 (C₂₄), 22.8 (C₁₁₋₁₂), 14.3 (C₂₅).

IR (neat): ν_{max} 2928 (OH), 1721 (C=O), 1450 (C=C), 1164 (CN), 1073, 1050 (C-O), 696 (CH₂) cm⁻¹.

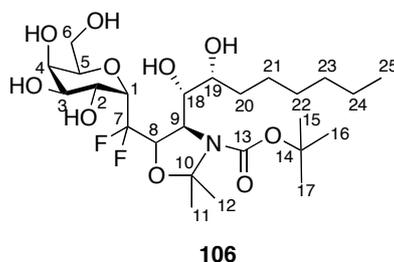
MS (ESI⁺): *m/z* = 1016.3 ([M+Na]⁺).

Anal. Calcd for C₆₀H₇₅F₂NO₁₀: C, 71.28; H, 7.40; N, 1.41. Found: C, 71.21; H, 7.33; N, 1.44.

(4R)-tert-butyl-5-(((2S,3R,4R,5S,6R)-4,5-bis(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)-3-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)difluoromethyl)-4-((1S,2R)-1,2-bis(benzyloxy)octyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate



To a solution of **105** (125 mg, 0.126 mmol, 1 equiv.) in absolute ethanol (5 mL) and HCl 1 N (0.1 mL), was added a catalytic amount of Pd/C (10%). The reaction flask was flushed with hydrogen, and the reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere overnight. After complete reaction, the reaction mixture was filtered through a pad of celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure to afford **106** (36.2 mg, 53%) as a white solid.



$[\alpha]_D^{20} = +17.1$ (*c* 0.51, MeOH).

¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 5.24-4.74 (m, 6H, OH), 4.54-4.46 (m, 2H, H₁₋₈), 4.37-4.28 (m, 2H, H₂₋₅), 4.20-4.05 (m, 2H, H₃₋₉), 3.95-3.87 (m, 1H, H₄), 3.85-3.82 (m, 2H, H₆₋₁₈), 1.92-1.71 (m, 2H, H₂₀), 1.65-1.50 (m, 2H, H₂₁), 1.46-1.15 (m, 21H, H₁₁₋₁₂₋₁₅₋₁₆₋₁₇₋₂₂₋₂₃₋₂₄), 0.91 (m, 3H, H₂₅).

¹⁹F NMR (282.5 MHz, MeOD): δ -108.6 (d, *J* = 275.4 Hz, 1F), -116.3 (d, *J* = 265.3 Hz, 1F).

¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD): δ 155.2 (C₁₃), 122.5 (C₇), 102.5 (C₁₀), 80.5 (C₁₉), 79.8 (C₁₄), 74.2 (C₁₈), 73.9 (C₈), 73.6 (C₂ or C₄), 72.9 (C₃), 70.0 (C₁), 69.6 (C₅), 67.0 (C₂ or C₄), 58.9 (C₆), 55.9 (C₉), 35.0 (C₂₀), 33.1 (C₂₁), 28.8 (C₂₂), 27.8 (C₂₃), 26.6 (C₁₅₋₁₆₋₁₇), 26.1 (C₂₄), 23.8 (C₁₁₋₁₂), 14.5 (C₂₅).

HRMS: (ESI-) m/z = 556.3 ([M-H]⁻).

Annexes

Annexes

COLOMBEL Sophie
85 rue descroizilles
76000 ROUEN
Tel : 06 74 81 79 03
colombel.sophie@gmail.com

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

- 2009 - 2012 **Thèse :** « *Synthèse d' α -C-galactosylcéramides fluorés et évaluation de leurs propriétés immunorégulatrices pour le traitement des maladies auto-immunes systémiques* »
INSA de Rouen, UMR CNRS 6014 (IRCOF)
Directeurs de thèse : Pr. Xavier PANNECOUCKE (xavier.pannecoucke@insa-rouen.fr; 02 35 52 29 20) et Dr. Eric LECLERC (eric.leclerc@insa-rouen.fr; 02 35 52 29 01)
- 2009 - 2012 **Moniteur :** enseignante contractuelle à l'INSA de ROUEN (TP et TD de chimie générale)
- 2009 **Stage de Master 2 :** « *Synthèse d'analogues de l'Antigène Tn pour l'élaboration d'un vaccin anticancer* »
TFChemistry Pharma Parc II (VAL DE REUIL)
Directeurs de stage : Dr. Géraldine DELIENCOURT-GODEFROY (geraldine.deliencourt@tfchemistry.com; 02 32 09 01 16) et Dr. Hyacinthe FILLON (hyacinthe.fillon@tfchemistry.com; 02 32 09 01 16)
- Été 2008 **Stage d'été :** « *Synthèse et solubilité de dérivés propioniques* »
Université de Rouen, SMS EA 3233 (IRCOF)
Directeur de stage : Pr. Gérard COQUEREL (gerard.coquerel@univ-rouen.fr; 02 35 52 29 27)
- 2008 **Stage de Master 1 :** « *Synthèse d'hydantoïnes trifluorométhylées* »
Université de Rouen, SMS EA 3233 (IRCOF)
Directeur de stage : Pr. Jean-Philippe BOUILLON (jean-philippe.bouillon@univ-rouen.fr; 02 35 52 24 22)
- 2007 **Stage de Licence 3 :** « *Synthèse régiosélective du dérivé mono-3,6-anhydro- β -cyclodextrine perméthylée* »
Université de Rouen, SMS EA 3233 (IRCOF)
Directeurs de stage : Pr. Jean-Philippe BOUILLON (jean-philippe.bouillon@univ-rouen.fr; 02 35 52 24 22) et Dr. Séverine TISSE (severine.tisse@univ-rouen.fr; 02 35 52 24 13)
- 2006 **Stage de Licence 2 :** « *Synthèse régiosélective de dérivés de γ -cyclodextrines* »
Université de Rouen, SMS EA 3233 (IRCOF)
Directeurs de stage : Pr. Jean-Philippe BOUILLON (jean-philippe.bouillon@univ-rouen.fr; 02 35 52 24 22) et Dr. Séverine TISSE (severine.tisse@univ-rouen.fr; 02 35 52 24 13)
- 2005 **Stage d'IUT :** « *Dosage des bromures dans les céréales* »
SGS Multilab, Laboratoire d'analyse (ROUEN)
Directeur de stage : Yvon GERVAISE (yvon.gervaise@sgsgroup.com; 02 35 07 91 40)

FORMATION

- 2009 - 2012 **Thèse en Chimie** à l'INSA de ROUEN spécialité Chimie Organique
- 2008 - 2009 **Master 2 Recherche** à l'université de Rouen, option chimie du vivant (Mention Assez bien)
- 2007 - 2008 **Master 1** Chimie à l'université de Rouen, option chimie organique (Mention Bien)
- 2006 - 2007 **Licence 3** Chimie à l'université de Rouen (Mention Bien)
- 2003 – 2005 **D.U.T. Chimie** à l'université de Rouen

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Publication:** ✓ Sophie Colombel, Morgane Sanselme, Eric Leclerc,* Jean-Charles Quirion, and Xavier Pannecoucke, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5238-5241.
« Straightforward Preparation of Functionalized α -CF₂-Galactosides through an Oxygen to Carbon Acyl Migration »

- **Communications:** ✓ 3^{ème} Séminaire JANSSEN-CILAG (ROUEN, Décembre 2010)
« Synthèse d' α -C-galactosylcéramides fluorés »

- ✓ 8^{ème} Colloque Francophone de Chimie Organique du Fluor (OBERNAI, Mars 2011)
« Synthesis of fluorinated α -C-galactosylceramides »

- **Posters:** ✓ ANORCQ X (SOUTHAMPTON, Avril 2010)
« *Addition of Electrophilic Radicals to 2-Benzyloxyglycals : A Novel Access to Fluorinated α -C-Galactosides and Application to the Synthesis of α -GalCer Analogues* »

- ✓ Journée de l'école doctorale (CAEN, Juin 2010) 1^{er} prix
« *Addition of Electrophilic Radicals to 2-Benzyloxyglycals : A Novel Access to Fluorinated α -C-Galactosides and Application to the Synthesis of α -GalCer Analogues* »

- ✓ Journée de Chimie Organique (PALAISEAU, Septembre 2010)
« *A Novel Access to Fluorinated α -C-Galactosides and Application to the Synthesis of α -GalCer Analogues* »

- ✓ GLEN Glyco-Lipid European Network (REIMS, Novembre 2010) 2^{ème} prix
« *A Novel Access to Fluorinated α -C-Galactosides and Application to the Synthesis of α -GalCer Analogues* »

- ✓ BOSS XIII (Leuven, Juillet 2012)
« *Synthesis of fluorinated α -Galactosylceramide by Addition of Electrophilic Radical to Glycals* »

DOMAINES DE COMPETENCES

Langues :

- Anglais : lu, écrit, parlé
- Allemand : notions scolaires

Outils :

- Chem Draw
- Scifinder

Hygiène et sécurité :

- Formation hygiène et sécurité
- Formation manipulation d'extincteurs
- Formation Sauveteur Secouriste du Travail

LOISIRS ET INTERETS

- **Membre de l'ADIRCOF** : association des doctorants de l'IRCOF

Sports :

- Tennis
- Piscine
- Badminton
- Randonnée

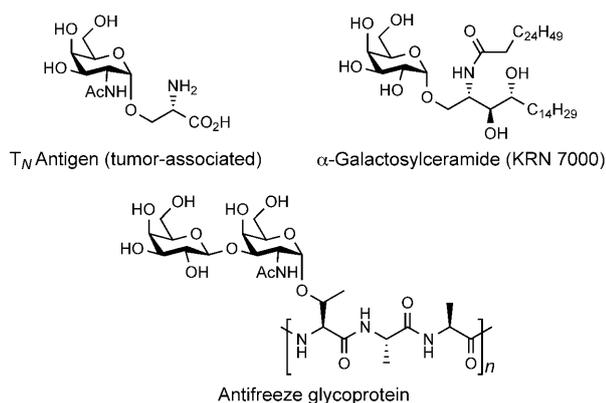
Loisirs :

- Cinéma
- Sport
- Voyages

Straightforward Preparation of Functionalized α -CF₂-Galactosides through an Oxygen to Carbon Acyl Migration

Sophie Colombel,^[a] Morgane Sanselme,^[b] Eric Leclerc,^{*,[a]} Jean-Charles Quirion,^[a] and Xavier Pannecoucke^[a]

A high number of O-glycoconjugates of therapeutic interest feature an α -galactose or 2-deoxy-2-acetamido- α -galactose unit in their structure, often serving as the link between the aglycon and the glycosidic parts.^[1] For example, this motif is found in tumor-associated antigens, antifreeze glycoproteins (AFGP) or in immunoregulative α -galactosylceramides. This last family of glycosphingolipids (agelasphins) exhibit strong *in vivo* activities against infectious diseases and tumor metastases, which were found to be related to their immunoregulative properties.^[2–4]



In 2004, the Franck group reported the synthesis of the CH₂ analogue of the α -galactosylceramide KRN 7000.^[5] Besides the remarkable synthetic achievement of this work, the results obtained in terms of immunostimulation were groundbreaking: α -CH₂-GalCer displayed a 1000-fold more potent antimalaria activity and a 100-fold more potent anti-

metastatic activity than the parent O-glycosidic molecule. Although there was no evidence that this enhancement of bioactivity was due to the hydrolytic stability of this analogue, the relevance of testing C-glycosidic surrogates of O-glycoconjugate-based drugs was thus established.^[6]

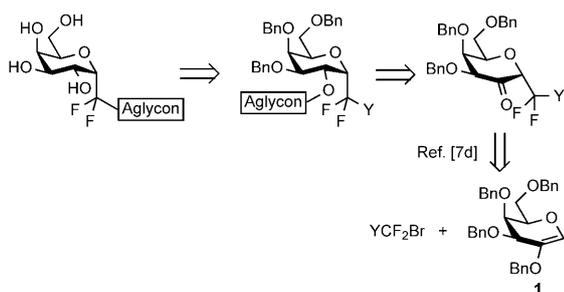
Our group has been investigating for many years the synthesis of fluorinated C-glycosides, in which the glycosidic link is replaced by a CF₂ moiety.^[7] The electronic properties of this group were expected to impart improved mimicking abilities to these surrogates, relative to classical C-glycosides. The incorporation of fluorine atoms into drug candidates has become more and more frequent in the past two or three decades.^[8] The unique properties of the fluorine atom undoubtedly account for this trend, because its introduction into a biologically active molecule might allow alterations of crucial biological functions within limited structural modifications.^[9] The synthesis of CF₂-glycopyranosides, which combine the hydrolytic stability of C-glycosidic carbohydrate analogues with these properties, was pioneered by Motherwell and co-workers and further investigated by other groups.^[10] Our team aimed to provide methodologies that applied this synthesis to several carbohydrate series (glucose, mannose, and galactose) and for any pseudo-anomeric center configuration (α or β). In this context, disclosing an efficient methodology for the synthesis of CF₂ analogues of α -galactosides was thus a very attractive challenge due to the many applications one could think of for these surrogates. To the best of our knowledge, the only reported example of such an analogue is an aryl- α -CF₂-D-galactoside, a compound that was therefore not suitable for the preparation of functionalized α -galactoconjugate mimetics.^[10k]

Our approach relies on the introduction of a fluorinated moiety that would feature an appropriate functional group to introduce the desired side chain (Scheme 1). A sequence involving a radical addition to galactal **1** followed by a stereoselective reduction of the resulting 2-oxogalactoside was envisioned to provide such an intermediate. If the efficiency of the radical addition was previously established, disclosing a stereoselective reduction reaction and an efficient functionalization methodology were still issues to be addressed.^[7d] Herein, we are pleased to report a solution to both problems due to a new reduction method that enables the preparation of fluorinated α -C-galactosides through an original reductive acyl-chain transfer from O-2 to C-1'. This last

[a] S. Colombel, Dr. E. Leclerc, Prof. Dr. J.-C. Quirion, Prof. Dr. X. Pannecoucke
UMR6014 & FR3038-IRCOF, CNRS
Université et INSA de Rouen, 1 rue Tesnière
76821 Mont Saint-Aignan Cedex (France)
Fax: (+33)2-35-52-29-59
E-mail: eric.leclerc@insa-rouen.fr

[b] M. Sanselme
UPRES EA 3233, Université de Rouen
1 rue Tesnière, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex (France)

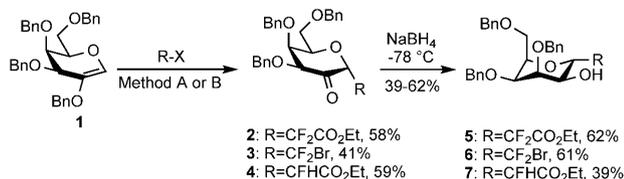
Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201100183>.



Scheme 1. Our approach to functionalized α -CF₂-galactosides. Bn = benzyl; Y = Br, CO₂Et.

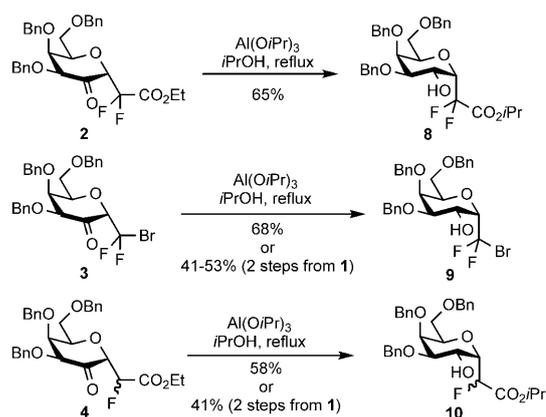
synthetic modification provides a convergent and elegant method for the preparation of analogues of α -galactose-derived glycoconjugates.

The radical addition of BrCF₂CO₂Et and CF₂Br₂ to 2-benzyloxyglucal and 2-benzyloxygalactal provided 2-oxoglycosides with interesting α selectivity (Scheme 2).^[7d,11] The hydride-mediated reduction of the glucose derivatives led to



Scheme 2. Radical addition onto 2-benzyloxygalactal **1** and sodium borohydride reduction of the resulting 2-oxogalactosides. Methods: A) BrCF₂CO₂Et or CF₂Br₂, BEt₃, DMF, air; B) EtOC(S)SCF₂CO₂Et, di-lauroyl peroxide (DLP), 1,2-dichloroethane (DCE)/*t*BuOH, reflux. See ref. [7d].

the expected α -CF₂-D-glucoside, however, their galactose counterparts **2–4** behaved differently. A reversal of diastereoselectivity occurred through a major ¹C₄ conformation, to give the α -CF₂-D-talloside analogues **5–7** (Scheme 2). Since the use of other hydrides (diisobutylaluminium hydride (DIBAH), L-Selectride, Et₃BHLi, and so forth) led to the same stereoselectivity, we reasoned that the diastereoselectivity issue we met with kinetically-controlled reductions could be tackled under thermodynamic control. A reversible hydride transfer would indeed favor the most stable diastereomer, which was not expected to be compound **5** because of the possibility of a strong 1,3-diaxial interaction between the C-3 and C-5 substituents. The Meerwein–Ponndorf–Verley (MPV) reduction is a well-known hydride-transfer reaction for the reversible reduction of aldehydes and ketones and was therefore chosen to challenge this assumption.^[12] To our delight, the classical Al(O*i*Pr)₃-mediated reaction was extremely efficient and cleanly delivered CF₂-glycosides **8–10** from **2–4** (Scheme 3). Moreover, these conditions were compatible with a direct reduction of the crude compound obtained from the radical addition, which was not the case with sodium borohydride. The two-step procedure allowed us to significantly improve the global yields,

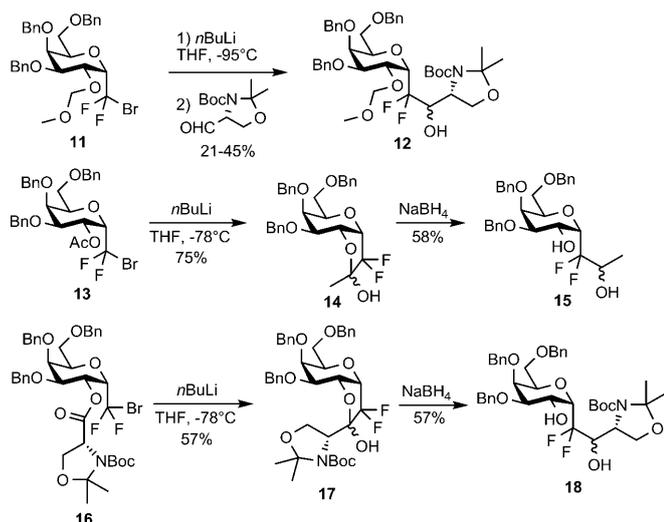


Scheme 3. Meerwein–Ponndorf–Verley reduction of **2–4**.

especially in the case of **3** (Scheme 3). Due the moderate stability of **3** on silica gel, when this compound undergoes chromatography immediately after the radical addition, a disappointing 41% yield is observed (Scheme 2). On the other hand, if the crude material is directly engaged in a MPV reduction, compound **9** is obtained in an appreciable 53% yield over two steps from galactal **1** (Scheme 3). A slight decrease in yield was observed when the reaction was performed on a larger scale (41% starting from 2 g of galactal).

The analytical data clearly indicated that **6** and **9** were diastereomers and therefore that **9** was the desired α -CF₂-D-galactoside. The saponification of ethyl esters **5** and **7** and isopropyl esters **8** and **10** led to carboxylic acids with different NMR data, to give the same conclusion. An X-ray diffraction study on **9** eventually confirmed the C-2 configuration.^[13] To our surprise, and unlike the results obtained by Jiménez-Barbero and Vogel for a fully deprotected α -CF₂-galactoside, this benzyloxy derivative crystallized under a ¹C₄ chair conformation.^[10k] The conformational flexibility of this compound in solution was however demonstrated by the sole H-3/H-5 NOESY correlation. This NMR data is indeed only compatible with a ¹S₃-skew-boat or a ⁴C₁-chair conformation and the ¹C₄-chair conformation is therefore exclusive only in the solid state.

Having in hand several fluorinated α -C-galactosides, the next step was to explore further synthetic modifications that would enable future preparations of α -GalCer analogues. The CF₂Br group of **9** appeared suitable to introduce aglycon moieties through a Br/Li exchange, followed by a nucleophilic addition on the appropriate electrophile. However, we were worried about the thermal stability of the corresponding CF₂Li compound due to its carbenoid nature. This prediction was confirmed by the poor results obtained from many attempts to perform a Br/Li exchange on **11**, followed by an intermolecular addition (Scheme 4). Low and irreproducible yields of addition products **12** were indeed obtained when the CF₂Li compound was allowed to react with Garner's aldehyde. On the other hand, a trapping of the lithium species with an internal electrophile attached to O-2 ap-



Scheme 4. Br/Li exchange and intramolecular trapping with an electrophile. Boc = *tert*-butoxycarbonyl.

peared as a method of choice to circumvent the potential problem of stability. To challenge this intramolecular strategy, acetate **13** was thus prepared from **9** by using a standard acetylation procedure ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{NEt}_3$). We were pleased to see that a Br/Li exchange on **13** indeed resulted in the immediate trapping of the lithium species by the neighboring acetate to afford the stable hemiketal species **14** in 75% yield.^[14] A reduction of this intermediate provided the alcohol **15** in 68% yield and the global transformation can be analyzed as a formal addition of the lithiated anion of **9** to acetaldehyde. This reductive migration of an ester from O-2 to C-1' appeared to be a good approach to O-glycoconjugate analogues, if a highly functionalized ester was introduced at the 2-position of **9**. Ester **16** was thus prepared from **9** and from the corresponding D-serine-derived acid (through an *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPC)-mediated coupling, 85% yield) to challenge this hypothesis. To our delight, a Br/Li exchange with *n*BuLi at -78°C provided hemiketal **17** in 57% yield, which could be reduced to the desired α -C-galactoside **18** in 57% yield. If the intermolecular trapping of the lithiated anion at low temperature can still be investigated, this last intramolecular strategy appears much more preferable for the synthesis of highly functionalized glycoconjugate analogues. The high chemical and configurational stability of α -aminoesters and acids compared with α -aminoaldehydes is indeed appreciable for the preparation of the aglyconic moiety.

An efficient synthesis of fluorinated α -C-galactosides has thus been described. The method involves an addition of difluoromethyl radicals to 2-benzyloxygalactal, followed by a Meerwein-Ponndorf-Verley reduction of the resulting 2-ketohexopyranosides. An efficient synthetic modification of these compounds, through a Br/Li exchange, followed by an intramolecular trapping of the resulting lithium species by the neighboring ester group on O-2, has also been disclosed. This sequence is desirable for the future syntheses of O-gly-

coconjugate analogues because it would allow the introduction of various aglycon moieties in the pseudo-anomeric position through a simple, mild, and convergent process. The synthesis of difluorinated α -C-galactosylceramides and a thorough conformational study of α -CF₂-galactosides are currently under investigation. Results in these areas will be reported in due course.

Experimental Section

Representative procedure for the reductive acyl chain transfer: *n*BuLi (1.53 M in hexane, 0.337 mL, 0.52 mmol) was added dropwise to a solution of acetate **13** (0.260 g, 0.43 mmol; obtained by acetylation of **9** using $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NEt}_3/\text{cat.}$ 4-dimethylaminopyridine (DMAP)) in THF (5 mL) at -78°C under an argon atmosphere. The mixture was stirred for 1 h at -78°C then quenched with 1 M HCl (5 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL) and brine (10 mL), dried over Na_2SO_4 , and evaporated. Chromatography on a flash purification system (3–30% EtOAc in cyclohexane) gave intermediate **14** as a colorless oil (0.171 g, 75%). The two diastereomers could not be separated at this stage. NaBH_4 (0.019 g, 0.50 mmol) was added to a solution of **14** (0.171 g, 0.32 mmol) in MeOH (5 mL) at 0°C . The mixture was stirred for 3 h at 0°C , at which point TLC monitoring showed complete conversion of **14** (eluent: cyclohexane/EtOAc 70:30). The mixture was then warmed up to RT, quenched with sat. NH_4Cl and extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over Na_2SO_4 , and evaporated. Chromatography on a flash purification system (7–60% EtOAc in cyclohexane) gave **15** as a colorless oil (0.098 g, 58%).

Acknowledgements

Prof. Dr. A. Vasella is deeply acknowledged for his fruitful suggestions regarding the reduction reaction. We also thank the Agence Nationale de la Recherche (ANR) for a PhD grant to S.C. and for funding, and the Région Haute-Normandie (CRUNCH network) for funding.

Keywords: fluorine • glycoconjugates • organolithium • radical reactions • reduction

- [1] a) S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836; b) S. J. Keding, S. J. Danishefsky in *Carbohydrate-Based Drug Discovery, Vol. 1* (Ed.: C.-H. Wong) Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, pp. 381–406.
- [2] T. Natori, M. Morita, K. Akimoto, Y. Koezuka, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2771–2784.
- [3] a) D. I. Godfrey, M. Kronenberg, *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1379–1388; b) M. Kronenberg, *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 877–900; c) N. A. Borg, K. S. Wun, L. Kjer-Nielsen, M. C. J. Wilce, D. G. Pellicci, R. Koh, G. S. Besra, M. Bharadwaj, D. I. Godfrey, J. McCluskey, J. Rossjohn, *Nature* **2007**, *448*, 44–49.
- [4] a) K. Seino, S. Motohashi, T. Fujisawa, T. Nakayama, M. Taniguchi, *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 807–812; b) L. Linsen, V. Somers, P. Stinissen, *Hum. Immunol.* **2005**, *66*, 1193–1202.
- [5] a) G. Chen, M. Chien, M. Tsuji, R. W. Franck, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1017–1022; b) R. W. Franck, M. Tsuji, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 692–701; c) G. Yang, J. Schmieg, M. Tsuji, R. W. Franck, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3906–3910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3818–3822.
- [6] a) T. Nishikawa, M. Adachi, M. Isobe in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology, Vol. 3*, 2nd ed. (Eds.: B. Fraser Reid, K. Tat-

- stuta, J. Thiem, G. L. Coté, S. Flitsch, Y. Ito, H. Kondo, S. Nishimura, B. Yu), Springer, Berlin, **2008**, pp. 755–811; b) B. Vauzeilles, D. Urban, G. Doisneau, J. M. Beau in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Vol. 9, 2nd ed. (Eds.: B. Fraser Reid, K. Tatstuta, J. Thiem, G. L. Coté, S. Flitsch, Y. Ito, H. Kondo, S. Nishimura, B. Yu), Springer, Berlin, **2008**, pp. 2021–2077.
- [7] a) S. Marcotte, F. D'Hooge, S. Ramadas, X. Pannecoucke, C. Feason, J.-C. Quirion, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5879–5882; b) A. B. Cuenca, F. D'Hooge, V. Gouge, G. Castelot-Deliencourt, H. Oulyadi, E. Leclerc, P. Jubault, X. Pannecoucke, J.-C. Quirion, *Synlett* **2005**, 2627–2630; c) N. P. Karche, C. Pierry, F. Poulain, H. Oulyadi, E. Leclerc, X. Pannecoucke, J.-C. Quirion, *Synlett* **2007**, 123–126; d) B. Moreno, C. Quehen, M. Rose-Hélène, E. Leclerc, J.-C. Quirion, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2477–2480; e) F. Poulain, A.-L. Serre, J. Lalot, E. Leclerc, J.-C. Quirion, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2435–2438; f) F. Poulain, E. Leclerc, J.-C. Quirion, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1803–1805; g) V. Gouge-Ibert, C. Pierry, F. Poulain, A.-L. Serre, C. Largeau, V. Escriviou, D. Scherman, P. Jubault, J.-C. Quirion, E. Leclerc, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1957–1960.
- [8] a) P. Kirsch in *Modern Fluoroorganic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, pp. 237–277; b) H. J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 637–643; c) J.-P. Bégué, D. Bonnet-Delpon in *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, Wiley, New York, **2008**, pp. 279–341; d) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320–330.
- [9] a) A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441–451; b) J. C. Biffinger, H. W. Kim, S. G. DiMagno, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 622–627; c) D. O'Hagan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308–319; d) J.-P. Bégué, D. Bonnet-Delpon in *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, Wiley, New York, **2008**, pp. 72–98.
- [10] a) J. S. Houlton, W. B. Motherwell, B. C. Ross, M. J. Tozer, D. J. Williams, A. M. Z. Slawin, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8087–8106; b) T. Brigaud, O. Lefebvre, R. Plantier-Royon, C. Portella, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6115–6116; c) T. F. Herpin, W. B. Motherwell, J.-M. Weibel, *Chem. Commun.* **1997**, 923–924; d) H. Berber, T. Brigaud, O. Lefebvre, R. Plantier-Royon, C. Portella, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 903–909; e) A. Wegert, R. Miethchen, M. Hein, H. Reinke, *Synthesis* **2005**, 1850–1858; f) A. Wegert, M. Hein, H. Reinke, N. Hoffmann, R. Miethchen, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2641–2652; g) J. Picard, N. Lubin-Germain, J. Uziel, J. Augé, *Synthesis* **2006**, 979–982; h) G. Hirai, T. Watanabe, K. Yamaguchi, T. Miyagi, M. Sodeoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15420–15421; i) K. A. Tony, R. W. Denton, A. Dilhas, J. Jiménez-Barbero, D. R. Mootoo, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1441–1444; j) R. W. Denton, K. A. Tony, J. J. Hernandez-Gay, F. J. Canada, J. Jiménez-Barbero, D. R. Mootoo, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1624–1635; k) M. Kolypadi, M. Fontanella, C. Venturi, S. André, H.-J. Gabius, J. Jimenez-Barbero, P. Vogel, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2861–2873; l) J. L. Chaytor, R. N. Ben, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5251–5254.
- [11] For other radical additions of BrCF₂CO₂Et, see: a) D. Morel, F. Dawans, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1445–1447; b) K. Sato, M. Omote, A. Ando, I. Kumadaki, *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 509–515; c) E. Godineau, C. Schäfer, Y. Landais, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4871–4874; d) X. Yang, W. Yuan, S. Gu, X. Yang, F. Xiao, Q. Shen, F. Wu, *J. Fluorine Chem.* **2007**, *128*, 540–544; e) E. Godineau, K. Schenk, Y. Landais, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6983–6993.
- [12] C. F. de Graauw, J. A. Peters, H. van Bekkum, J. Huskens, *Synthesis* **1994**, 1007–1017.
- [13] CCDC-785396 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.
- [14] For a related cyclization of a difluoromethyl lithium species, see: a) R. S. Timofte, B. Linclau, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3673–3676; b) B. Linclau, A. J. Boydell, R. S. Timofte, K. J. Brown, V. Vinader, A. C. Weymouth-Wilson, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 803–814.

Received: January 18, 2011

Published online: April 11, 2011