



HAL
open science

Synthèse de nouveaux détergents extractants et stabilisants des protéines membranaires et synthèse de dérivés d'aurones comme inhibiteurs d'ABCC2

Kim-Anh Nguyen

► **To cite this version:**

Kim-Anh Nguyen. Synthèse de nouveaux détergents extractants et stabilisants des protéines membranaires et synthèse de dérivés d'aurones comme inhibiteurs d'ABCC2. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV043 . tel-01685485

HAL Id: tel-01685485

<https://theses.hal.science/tel-01685485>

Submitted on 16 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Kim Anh NGUYEN

Thèse dirigée par **Marine PEUCHMAUR, Maître de Conférences,**
Université Grenoble Alpes

Codirigée par **Ahcène BOUMENDJEL, Professeur, Université**
Grenoble Alpes

préparée au sein du **Département de Pharmacochimie Moléculaire**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Synthèse de nouveaux détergents extractants et stabilisants des protéines membranaires et synthèse de dérivés d'aurones comme inhibiteurs d'ABCC2

Thèse soutenue publiquement le **14 septembre 2017,**
devant le jury composé de :

M. Jean-François POISSON

Professeur, Université Grenoble Alpes, Président

Mme. Marie-Christine LALLEMAND

Professeur, Université Paris Descartes, Rapporteur

Mme. Vania BERNARDES-GENISSON

Professeur, Université Toulouse III, Rapporteur

M. Pierre FALSON

Directeur de recherche CNRS, IBCP Lyon, Examineur



« Les passions sont les seuls orateurs qui persuadent toujours. »

François de La Rochefoucauld

Remerciements

Tout d'abord, je remercie chaleureusement les rapporteurs de cette thèse, Pr. Marie-Christine Lallemand et Pr. Vania Bernardes-Genisson, pour avoir accepté de juger ce travail. Mes grands remerciements vont également au Pr. Jean-François Poisson et au Dr. Pierre Falson, qui ont fait partie du jury et participé à chacun de mes comités de suivi de thèse.

Je souhaiterais remercier mon directeur de thèse, Dr. Marine Peuchmaur, pour m'avoir encadrée avec ses conseils avisés pendant trois ans de thèse ainsi que 6 mois de stage de Master 2. Je la remercie également pour avoir pris le temps qu'il fallait pour la lecture et la relecture de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr. Ahcène Boumendjel pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour sa gentillesse exceptionnelle et son encouragement.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Pierre Falson, notre collaborateur biologiste et mon troisième chef, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour ses idées originales.

Je remercie mes collaborateurs biologistes, notamment Elisabeta Baiceanu et Sandrine Magnard, sans qui ces travaux n'auraient pu aboutir.

Je n'aurais pu obtenir ces résultats sans les conseils pratiques et l'esprit critique du Dr. Cédric Boyère. Je le remercie d'avoir été toujours disponible, prêt à m'aider et pour son caractère bienveillant comme un grand frère.

Ensuite, je tiens à remercier Benjamin, Romain et Emile, qui, avec de la patience, ont consacré leur temps à lire, corriger et donner des remarques sur mon manuscrit.

Je souhaiterais aussi remercier Basile, Philippe, Yung, Martine, Marie-Carmen, Marie-Ange et tous les membres de l'équipe MedChem, qui ont été toujours chaleureusement prêts à tendre leurs mains quand j'avais besoin.

Mes trois années de thèse auraient été beaucoup moins animées et heureuses sans les doctorants et post-doctorants Laurent, Luma, Somayeh, Amel, Florent, Emma, Florine, Momo, Dounia, Flavia, Sam, Roseline, Benoit, Wael, Renaud, Julien, Sarah et Phuong.

Un grand merci aux stagiaires, Myriam, Eméline et Aurélie, pour leur contribution à ces travaux.

Je garderai à jamais dans mon cœur ma grande famille « DPM », et j'ai le regret de la quitter pour passer à une autre étape de ma vie.

Je remercie le Ministère délégué à l'Enseignement Supérieur et à la Recherche et l'Ambassade de France au Vietnam pour leurs supports financiers pour mon Master 2 et ma thèse de doctorat.

J'aimerais remercier mes amis en France et au Vietnam, grâce à qui je ne me suis jamais sentie seule, quelque soit la distance. Merci b2 Tr2 et Jackie, mes « grands-parents » à Grenoble.

Merci Madame Lan et Madame Mai, mes professeurs de français, pour m'avoir donné des ailes pour venir en France.

Je remercie mes professeurs de chimie : cô Quỳnh Liên, cô Phương, thầy Châu, thầy Nhân, pour m'avoir transmis leur passion pour la chimie.

Enfin, je voudrais dédier cette thèse à ma famille au Vietnam, mes parents, mes sœurs, ma grand-mère, mes tantes et mes oncles et anh Trường, pour leur soutien, leur encouragement. Je sais qu'ils sont toujours là pour moi.

Table des matières

Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des schémas	13
Abréviations	15
Avant-propos.....	19
Introduction générale	21
Chapitre 1 - Rappels bibliographiques.....	25
I. Les protéines membranaires (PMs)	27
I.1. Les membranes cellulaires.....	27
I.2. Les protéines membranaires (PMs)	29
I.2.1. Rôles.....	29
I.2.2. Organisation	29
I.2.3. Classification.....	29
I.2.4. Importance et caractéristiques des PMs	30
II. Etudes fonctionnelles et structurales des PMs – un défi.....	33
II.1. Généralités sur la biochimie et la biologie structurale de protéines.....	33
II.1.1. Procédure générale pour produire et isoler des protéines	33
II.1.2. Etudes fonctionnelles	33
II.1.3. Etudes structurales	34
II.1.2.1. <i>Modélisation computationnelle</i>	34
II.1.2.2. <i>Résonance magnétique nucléaire (RMN)</i>	35
II.1.2.3. <i>Microscopie électronique</i>	35
II.1.2.4. <i>Diffraction aux rayons X</i>	37
II.2. Difficultés relatives aux PMs	37
III. Relever le défi – Etat de l’art en biologie structurale de PMs.....	39
III.1. Systèmes cellulaires adaptés à l’expression de PMs.....	39
III.2. Système « cell-free ».....	40

III.3. Stabilisation par approches recombinantes	41
III.3.1. Par mutagenèse systématique	41
III.3.2. Par suppression de certaines régions déstabilisantes.....	42
III.3.3. Amélioration de la thermostabilité des PMs	42
III.4. Stabilisation par les systèmes mimétiques de la membrane	44
III.4.1. Les liposomes	44
III.4.2. Les bicelles	44
III.4.3. Les complexes nanoassemblés	45
III.4.3.1. Les nanodisques.....	45
III.4.3.2. Les SMALPs.....	46
III.4.3.3. Le Salipro	47
III.4.4. Les agents polymériques amphipathiques	47
III.5. Stabilisation par les détergents.....	49
IV. Les détergents	51
IV.1. Définition	51
IV.2. Caractéristiques physico-chimiques des détergents.....	52
IV.2.1. Auto-assemblage	52
IV.2.2. Réduction de tension de surface.....	53
IV.2.3. Solubilisation.....	54
IV.2.4. Concentration micellaire critique	54
IV.3. Les familles de détergents.....	55
IV.3.1. Comment classifie-t-on des détergents ?.....	55
IV.3.2. Les principales familles de détergents utilisés en biologie des PMs.....	55
IV.3.2.1. Les oxydes d'amine.....	55
IV.3.2.2. Les dérivés de phospholipides	56
IV.3.2.3. Les détergents peguylés	56
IV.3.2.4. Les alkyles glycosides	57
IV.3.2.5. Tripodes amphiphiles.....	58
IV.3.2.6. Amphiphiles faciales	58
IV.3.2.7. Les détergents peptidiques.....	59
IV.3.2.8. Les détergents perfluorés.....	60
IV.4. Problèmes liés aux détergents en biochimie des PMs	61
IV.4.1. Echange de détergents avec le milieu	61

IV.4.2. Problèmes liés à la longue chaîne grasse de détergents	61
IV.4.3. Perte de l'intégralité de PMs	61
IV.4.4. Perte de compacité entre les segments transmembranaires.....	62
IV.4.5. Perte de contact protéine-protéine.....	63
IV.5. Meilleure utilisation et conception de nouveaux détergents.....	63

Chapitre 2 - Synthèse de nouveaux détergents et étude

d'extraction et de stabilisation des PMs69

Avant-propos..... 71

I. Objectifs du projet 71

II. Synthèse 74

II.1. Conception..... 74

II.2. Synthèse de détergents « clips » de première génération 74

II.2.1. Stratégies initiales 74

II.2.2. Stratégie améliorée 76

II.3. Synthèse de détergents « clips » glycosylés 79

II.3.1. Synthèse de détergents glycosylés *via* la réaction thiol-ène..... 82

II.3.2. Synthèse de détergents glycosylés *via* la réaction de Huisgen..... 86

II.4. Synthèse de détergents peguylés 93

II.5. Synthèse d'un détergent dimérique 95

III. Caractéristiques physico-chimiques des détergents synthétisés..... 97

III.1. Concentration Micellaire Critique (CMC)..... 97

III.1.1. Introduction 97

III.1.2. Résultats 98

III.2. Diamètre hydrodynamique..... 100

III.2.1. Introduction 100

III.2.2. Résultats 100

III.3. Absorption UV 102

III.3.1. Introduction 102

III.3.2. Résultats 102

III.4. Capacité de chélation avec le Mg²⁺ 104

III.4.1. Introduction 104

III.4.2. Résultats 104

IV. Biochimie.....	106
IV.1. Les protéines étudiées : BmrA, AcrB et A _{2A} R	106
IV.2. Etude d'extraction des PMs par les détergents synthétisés.....	107
IV.2.1. Introduction	107
IV.2.2. Résultats	108
IV.3. Etude d'activité de BmrA après l'extraction par les détergents	113
IV.3.1. Introduction	113
IV.3.2. Résultats	114
IV.4. Etude de stabilité des PMs en présence des détergents synthétisés	124
IV.4.1. Introduction	124
IV.4.2. Résultats	124
IV.5. Etude de cristallisation de BmrA en présence des détergents synthétisés	127
Conclusion du chapitre 2	129
Chapitre 3 - Synthèse des dérivés d'aurones et étude d'inhibition	
d'ABCC2.....	131
Avant-propos.....	133
I. La protéine ABCC2	134
I.1. Structure d'ABCC2	134
I.2. Distribution tissulaire et fonctions biologiques d'ABCC2	134
I.3. Implication pharmacologique	135
II. Inhibiteurs d'ABCC2	136
III. Objectifs du projet	137
IV. Mise en place d'un test <i>in cellulo</i> d'inhibition d'ABCC2.....	138
V. Identification des inhibiteurs d'ABCC2 par criblage à haut débit des	
chimiothèques.....	140
V.1. Introduction	140
V.2. Résultats	140
VI. Les 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2<i>H</i>)-ones	143
VI.1. Introduction : les aurones.....	143
VI.1.1. Origine des aurones	143
VI.1.2. Stratégies de synthèse chimique des aurones	144

VI.1.3. Activités biologiques des aurones	145
VI.2. Synthèse des 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones	148
VI.2.1. Synthèse des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones	148
VI.2.1.1. Synthèse de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	148
VI.2.1.2. Synthèse des dérivés d'indole carboxaldéhydes <i>N</i> -substitués	148
VI.2.1.3. Synthèse des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones	150
VI.3. Activité inhibitrice des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)- ones vis-à-vis du transporteur ABCC2	153
VI.4. Sélectivité des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones vis-à- vis du transporteur ABCC2.....	156
VI.5. Synthèse des dérivés 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones en modifiant la substitution au niveau de la benzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	157
VI.6. Synthèse des dérivés dimériques des 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones	159
Conclusion du chapitre 3	163
Conclusion générale et perspectives	165
Partie expérimentale.....	171
I. Material and methods	173
II. Synthesis and evaluation of detergents.....	175
II.1. Synthesis of detergents	175
II.1.1. General procedures	175
II.1.2. Synthesis of detergents without saccharides.....	179
II.1.3. Synthesis of sugar-based detergents	193
II.1.3.1. Synthesis of sugar-based detergents via thiol-ene coupling	193
II.1.3.2. Synthesis of sugar-based detergents via CuAAC.....	200
II.1.4. Synthesis of PEGylated detergents	226
II.1.5. Synthesis of a dimeric detergent	231
II.2. Evaluation of synthesized detergents.....	233
II.2.1. Measurement of Critical Micellar Concentrations (CMC).....	233

II.2.2. Measurement of Hydrodynamic Radius (R_h) of Detergent Micelles by Dynamic Light Scattering (DLS)	233
II.2.3. UV-visible absorption measurement	233
III.2.4. Mg^{2+} chelating assay	233
IV.2.5. Protein extraction assay.....	234
IV.2.6. ATPase activity assays	234
IV.2.7. BmrA purification and stability of purified BmrA in solution	234
IV.2.8. Thermostability assay on solubilized MPs.....	235
IV.2.9. Crystallogensis of BmrA	235
III. Synthesis of 2-indolylmethylenbenzofuran-3(2H)-ones.....	237
III.1. Synthesis of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one	237
III.2. Synthesis of <i>N</i> -alkyl-indole carboxaldehydes.....	237
III.3. Synthesis of 2-indolylmethylene-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones	245
III.4. Synthesis of 2-indolylmethylenbenzofuran-3(2H)-ones with different substitutions on the benzofuran-3(2H)-one.....	255
III.4.1 Synthesis of 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and methoxylated benzofuran-3(2H)-ones	255
III.4.2. Synthesis of 2-indolylmethylenbenzofuran-3(2H)-ones	257
III.5. Synthesis of dimeric 2-indolylmethylenbenzofuran-3(2H)-ones	264
Bibliographie	273

Liste des figures

Figure 1 : Membrane cellulaire	27
Figure 2 : Phosphatidylcholine, un des phospholipides constituant la membrane cellulaire ..	28
Figure 3 : Membrane cellulaire en bicouche lipidique.....	28
Figure 4 : Quatres types de PMs	30
Figure 5 : (A gauche) Structure du récepteur β -adrénergique (en bleu) sur lequel se lie une protéine G (en rouge) et une hormone (en orange) ; (A droite) Structure du canal anionique voltage-dépendant chez l'homme.....	32
Figure 6 : Structure 3D de TRPA1 reconstruite par la cryo-ME	36
Figure 7 : Production de PMs en système « cell-free » en présence de différentes structures lipidiques	41
Figure 8 : Stabilisation par mutagenèse systématique	42
Figure 9 : Co-cristallisation du complexe protéine-détergent avec des fragments d'anticorps	43
Figure 10 : Cristallisation avec une protéine de fusion.....	43
Figure 11 : Insertion des PMs dans les liposomes en utilisant les détergents.....	44
Figure 12 : Formation de bicelles.....	45
Figure 13 : Structure d'un nanodisque	46
Figure 14 : Structure d'un complexe Salipro constitué de la saposine A, des lipides et d'une PM purifiée.....	47
Figure 15 : Structures des quatres familles d'amphipols.....	48
Figure 16 : Stabilisation d'une PM par des amphipols en échange avec les détergents.....	49
Figure 17 : Formation du complex protéine-détergent.....	50
Figure 18 : Structure de composés amphipathiques portant une partie hydrophile (en rose) et une partie hydrophobe (en bleu).....	51
Figure 19 : Micellisation des surfactants	52
Figure 20 : La géométrie des structures auto-assemblées.....	53
Figure 21 : Détermination de CMC	54
Figure 22 : Structure du LDAO	55
Figure 23 : Structure de la LPC et de la DPC, dérivés de la phosphatidylcholine.....	56
Figure 24 : Structure des détergents C_8E_6 , $C_{11}E_9$ et Triton X-100.....	57
Figure 25 : Structure générale des MNGs.....	58
Figure 26 : Structure des tripodes amphiphiles.....	58

Figure 27 : Structure des amphiphiles faciales dérivés du cholate et effet de l'orientation des groupements polaires sur l'organisation du complexe d'amphiphiles faciales-protéine	59
Figure 28 : Structure des détergents peptidiques	60
Figure 29 : Dissociation des composants d'une PM.....	62
Figure 30 : Perte de compacité lors de l'extraction.....	63
Figure 31 : Illustration d'un réseau cristallin de complexes PM-détergents	63
Figure 32 : Détergents utilisés pour l'extraction, purification (A) et cristallisation (B) des protéines membranaires chez les eukaryotes.....	64
Figure 33 : Détergents dérivés d'adamantane	65
Figure 34 : Structure générale de détergents norbornane maltosides	65
Figure 35 : Structures générales de détergents triglucosidiques et de détergents dérivés du mannitol.....	66
Figure 36 : Structure générale des calixarènes (à gauche) ; structure des détergents calix[4]aréniques (à droite)	72
Figure 37 : Illustration d'un complexe clip-PM	72
Figure 38 : Formule générale des détergents de première génération.....	74
Figure 39 : Structure des détergents de première génération	78
Figure 40 : Spectres de RMN ¹ H dans le CDCl ₃ du produit (16c) et du produit de départ (15c) de la réaction thiol-ène	84
Figure 41 : Spectres de RMN ¹ H du produit de départ (dans le CDCl ₃) et du produit de la déprotection du sucre (dans le CD ₃ OD), montrant une trans-estérification.....	85
Figure 42 : Spectres de RMN ¹ H et ¹³ C dans le CD ₃ OD du produit 24c	89
Figure 43 : Détermination de la CMC en mesurant la fluorescence du DPH	97
Figure 44 : Fluorescence du DPH en présence de concentrations croissantes de 26e et 26f ..	98
Figure 45 : Diamètre hydrodynamique des composés 26a-f , 31b , 43b et DDM.....	101
Figure 46 : Spectres d'absorption d'un détergent calix[4]arénique (C4C7) et des détergents synthétisés à 1 mM.....	103
Figure 47 : Turbidité des solutions des détergents synthétisés et d'un détergent calix[4]arénique (C4C12) en fonction de concentrations croissantes de MgCl ₂	105
Figure 48 : Cycle de transport de BmrA	107
Figure 49 : Extraction des PMs BmrA et AcrB à l'aide de détergents commerciaux et des clips de première génération	109
Figure 50 : Extraction de BmrA et AcrB à l'aide de détergents « clips » glycosylés et peguylés.....	111

Figure 51 : Mécanisme de la méthode d'enzymes couplées pour mesurer l'activité ATPasique	113
Figure 52 : Activité ATPasique et SDS-PAGE des fractions de BmrA solubilisées par les détergents commerciaux (DDM, LMNG et FA3)	115
Figure 53 : Activité ATPasique et SDS-PAGE des fractions de BmrA solubilisées par les détergents glycosylés <i>via</i> la réaction de Huisgen	119
Figure 54 : Activité ATPasique et SDS-PAGE des fractions de BmrA solubilisées par les détergents peguylés (43a et 43b) et le détergent dimérique (50)	120
Figure 55 : Stabilité dans le temps de BmrA purifiée en DDM et additionnée des composés 26c , 43a , du FA3 ou du DDM à 0,09 mM	125
Figure 56 : Thermostabilité de BmrA (a) et A _{2A} R (b) extraites par le DDM et additionnées du composé 26c	126
Figure 57 : Cristaux formés en présence des composés 31b et 31c	128
Figure 58 : Topologie de la protéine ABCC2	134
Figure 59 : Abondance des principaux transporteurs ABC dans le colon, l'intestin grêle et le foie	135
Figure 60 : Structure d'inhibiteurs d'ABCC2	137
Figure 61 : Mécanisme de fluorescence de la calcéine	138
Figure 62 : Structures du MK-571 et du GF-120918	139
Figure 63 : Principales classes des composés testés	141
Figure 64 : Résultats des molécules testées, exprimés en pourcentage d'inhibition du transport de la calcéine par ABCC2	142
Figure 65 : Structure des flavonoïdes	144
Figure 66 : Structure des 2-arylidèneimidazo[1,2- <i>a</i>]pyridinones	146
Figure 67 : Structures des aurones et HOPNO-aurones, inhibiteurs d'une tyrosinase humaine	147
Figure 68 : Inhibition du transport de la calcéine <i>via</i> ABCC2 (%) par les composés à 5 mM	154
Figure 69 : Inhibition du transport de la calcéine <i>via</i> les transporteurs humains ABCC2, ABCB1 et ABCC1 par des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones	156
Figure 70 : Structure des dimères d'apigénine	159
Figure 71 : Structure des dimères de flavonoïdes	160

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les plus grandes familles de PMs.....	29
Tableau 2 : PMs humaines étudiées et détergents utilisés pour les étapes d'extraction, de purification et de cristallisation	49
Tableau 3 : Problèmes lors de l'utilisation de détergents et solutions	64
Tableau 4 : Conditions de réaction de Huisgen étudiées	87
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des rendements du couplage par la réaction de Huisgen (après purification)	87
Tableau 6 : CMC des détergents	99
Tableau 7 : Extraction de BmrA et AcrB avec les détergents synthétisés	112
Tableau 8 : Tableau récapitulatif de l'activité ATPasique des détergents évalués	123
Tableau 9 : Liste non exhaustive des substrats connus d'ABCC2.....	135
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des structures synthétisées en précisant le rendement de la substitution nucléophile (après purification).....	150
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des structures synthétisées en précisant le rendement de la condensation aldolique (après purification)	152
Tableau 12 : Bilan des résultats biologiques des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones	155
Tableau 13 : Tableau récapitulatif des structures synthétisées (60a-d et 61a-f) en précisant le rendement de la condensation aldolique	159
Tableau 14 : Tableau récapitulatif des dimères synthétisés (64a-d , 65a-d) en précisant le rendement de la dimérisation	161

Liste des schémas

Schéma 1 : Utilisation de détergents dans la biologie des PMs	23
Schéma 2 : Stratégie initiale pour la synthèse de détergents non-sucrés	75
Schéma 3 : Mécanisme de cyclisation après la déprotection du Fmoc	75
Schéma 4 : Deuxième stratégie de synthèse des détergents de première génération	76
Schéma 5 : Troisième stratégie de synthèse de détergents de première génération	76
Schéma 6 : Synthèse du composé 8	77
Schéma 7 : Synthèse du composé 11	78
Schéma 8 : Stratégie initiale pour la glyco-conjugaison	79
Schéma 9 : Conditions de glycosylation étudiées	80
Schéma 10 : Synthèse réussie d'un détergent glycosylé (sous forme protégée).....	80
Schéma 11 : Réaction parasite de β -élimination	81
Schéma 12 : Stratégie générale pour la glyco-conjugaison.....	82
Schéma 13 : Synthèse des détergents glycosylés <i>via</i> la réaction thiol-ène	83
Schéma 14 : Mécanisme de racémisation d'ester d'un peptide.....	86
Schéma 15 : Préparation des composés 20a et 20b	86
Schéma 16 : Synthèse des détergents glycosylés <i>via</i> la réaction de Huisgen	88
Schéma 17 : Synthèse de l'acide 2- <i>n</i> -dodécyltétradécanoïque (27)	90
Schéma 18 : Synthèse des composés 31a-c	91
Schéma 19 : Synthèse du composé 37	92
Schéma 20 : Fonctionnalisation de la chaîne PEG par un groupement thiol ou azoture.....	93
Schéma 21 : Synthèse de détergents peguylés par la réaction de Huisgen	94
Schéma 22 : Essai de synthèse de détergents peguylés (45) par la réaction thiol-ène	94
Schéma 23 : Synthèse du détergent dimérique 50	96
Schéma 24 : Stratégies de synthèse d'aurones	145
Schéma 25 : Synthèse des composés 53a-z	150
Schéma 26 : Synthèse de 4-hydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	157
Schéma 27 : Synthèse des benzofuran-3(2 <i>H</i>)-ones méthoxylées.....	158
Schéma 28 : Synthèse des composés 60a-d et 61a-f	158
Schéma 29 : Synthèse du composé 62 par une déméthylation.....	160
Schéma 30 : Synthèse des dérivés dimériques à partir des composés 60c et 61c	161
Schéma 31 : Synthèse d'un dimère du composé 62	162

Abréviations

3D	Tridimensionnel
ABC	ATP-Binding Cassette
Ac	Acétyl
AcrB	Acriflavine resistance B
ADP	Adénosine diphosphate
Ar	Aromatique
Asc	Ascorbate
ATP	Adénosine triphosphate
BmrA	<i>Bacillus</i> multidrug resistance ATP
Bn	Benzyl
Boc	tert-Butoxycarbonyl
Bu	Butyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylamino]-2-hydroxy-1-propane sulfonate
CHS	Hémisuccinate de cholestérol
CMC	Concentration micellaire critique
CuAAC	Copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition
Cymals	Cyclohexyl-alkyl-maltosides
DCM	Dichlorométhane
DDM	n-Dodécyl- β -D-maltoside
DEA	Diéthylamine
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	4-(Diméthylamino)pyridine
DMPA	2,2-Diméthoxy-2-phénylacétophénone
DME	1,2-Diméthoxyéthane
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMSO	Diméthyl sulfoxide

DPC	Dodécylphosphocholine
DPH	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
DPM	Département de Pharmacochimie Moléculaire
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Electrospray ionisation
FC12	Fos-Choline-12
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
GP	Groupement protecteur
GNGs	Glucose-néopentylglycols
HRMS	High resolution mass spectrometry
IBCP	Institut de Biologie et de Chimie des Protéines
ICMG	Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LDAO	n-Dodécyl- <i>N,N</i> -diméthylamine- <i>N</i> -oxide
LMNG	Lauryl maltose néopentyl glycol
LPC	Lysophosphatidylcholine
MDCKII	Madin-Darby Canine Kidney II
Me	Méthyle
ME	Microscopie électronique
MNG	Maltose-néopentyl glycol
m.p.	Melting point
NADH (ou NAD ⁺)	Nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite (ou oxydée)
NBD	Nucleotide-Binding Domain
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
PM	Protéines membranaires
POE	Alkyles polyoxyéthylènes
ppm	parts per million
PTT	Tribromure de triméthylphénylammonium
Rdt	Rendement
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire

rt	room temperature
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis
SMALPs	Styrene-maleic acid copolymer lipid particles
TBTU	Tétrafluoroborate de <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography
TMD	Transmembrane domain
TRPA1	Transient Receptor Potential Ankyrin 1
Ts	Tosyl
TX100	Triton X-100
UV	Ultra-violet

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Université Grenoble Alpes (UGA) sous la direction du Dr. Marine Peuchmaur et du Pr. Ahcène Boumendjel au sein de l'équipe « MedChem » au DPM (UGA/CNRS-UMR 5063) en collaboration avec l'équipe de Pierre Falson à l'IBCP (Université Lyon 1/CNRS-UMR 5086).

Publications

Kim-Anh Nguyen, Marine Peuchmaur, Sandrine Magnard, Romain Haudecoeur, Cédric Boyère, Saravanan Mounien, Ikram Benammar, Veronica Zampieri, Kelly Garnier, Vincent Chaptal, Anass Jawhari, Ahcène Boumendjel, Pierre Falson, « Overstabilizing Dicarboxylate-Oside Detergents for Extraction, Long-term Stabilization at Room Temperature and Crystallization of Membrane Proteins ». (En préparation)

Elisabeta Baiceanu, *Kim-Anh Nguyen (premier co-auteur)*, Lucia Gonzalez-Lobato, Rachad Nasr, Helène Baubichon-Cortay, Felicia Loghin, Marc Le Borgne, Larry Chow, Ahcène Boumendjel, Marine Peuchmaur, Pierre Falson, « 2-Indolylmethylenbenzofuranone as first effective inhibitors of ABCC2 », European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 122, 408-418. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.06.039.

Brevet

Kim-Anh Nguyen, Sandrine Magnard, Marine Peuchmaur, Julien Dauvergne, Ahcène Boumendjel, Pierre Falson, « Composés-clips surfactants pour l'extraction et la stabilisation en solution de protéines membranaires ». (Déposé en mars 2017)

Communication orale à un congrès

Kim-Anh Nguyen, Elisabeta Baiceanu, Lucia Gonzalez-Lobato, Felicia Loghin, Marc Le Borgne, Pierre Falson, Ahcène Boumendjel, Marine Peuchmaur, « Aurone derivatives identified as the most efficient inhibitors of ABCC2 », 23^{ème} Journées Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, Lille, France (février 2016).

Communications par poster à des congrès

Kim-Anh Nguyen, Marine Peuchmaur, Sandrine Magnard, Romain Haudecoeur, Cédric Boyère, Saravanan Mounien, Ikram Benammar, Veronica Zampieri, Kelly Garnier, Vincent Chaptal, Anass Jawhari, Ahcène Boumendjel, Pierre Falson, « Generating salt bridges interactions for improving the stability of membrane proteins in aqueous solutions », EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Vienna, Austria (août 2017).

Kim-Anh Nguyen, Marine Peuchmaur, Sandrine Magnard, Romain Haudecoeur, Cédric Boyère, Saravanan Mounien, Ikram Benammar, Veronica Zampieri, Kelly Garnier, Vincent Chaptal, Anass Jawhari, Ahcène Boumendjel, Pierre Falson, « Stabilizing Detergents Through a Salt-bridges Network for Membrane Proteins Studies », 53rd International Conference on Medicinal Chemistry, Toulouse, France (juillet 2017).

Kim-Anh Nguyen, Elisabeta Baiceanu, Lucia Gonzalez-Lobato, Felicia Loghin, Marc Le Borgne, Pierre Falson, Ahcène Boumendjel, Marine Peuchmaur, « Aurone derivatives identified as the most efficient inhibitors of ABCC2 », 7ème Journées Scientifiques du Médicament « Epigenetic, toward new therapeutic targets », Grenoble, France (juin 2017).

Kim-Anh Nguyen, Elisabeta Baiceanu, Lucia Gonzalez-Lobato, Felicia Loghin, Marc Le Borgne, Pierre Falson, Ahcène Boumendjel, Marine Peuchmaur, « Aurone derivatives identified as the most efficient inhibitors of ABCC2 », Journée annuelle de doctorants de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV), Grenoble, France (juin 2016). Prix du meilleur poster.

Introduction générale

Un tiers des protéines sont membranaires et on y dénombre plus de 50% des cibles pharmacologiques.^[1,2] Accessibles pour un grand nombre d'entre-elles depuis le milieu extracellulaire, les protéines membranaires (PM) sont des cibles privilégiées dans le domaine thérapeutique. Préserver une topologie active de ces protéines après extraction avec des détergents est un prérequis pour leur étude fonctionnelle et structurale en solution. Les détergents disponibles sur le marché, d'abord conçus comme compétiteurs des lipides qui entourent les régions membranaires, ne présentent pas la même capacité de stabilisation. Le relâchement de la région membranaire qu'ils engendrent induit une perte de conformation fonctionnelle de la protéine, expliquant en partie le nombre modeste des structures 3D connues des PM, 696 à ce jour, beaucoup moins nombreux que les protéines solubles.^[3,4]

Une particularité des PMs concerne l'obligation d'ajouter des surfactants/détergents pour extraire ces protéines, habituellement incorporées dans la membrane cytoplasmique. De plus, la présence de ces agents est nécessaire tout au long du processus, de la purification jusqu'aux études fonctionnelles et structurales (**Schéma 1**).

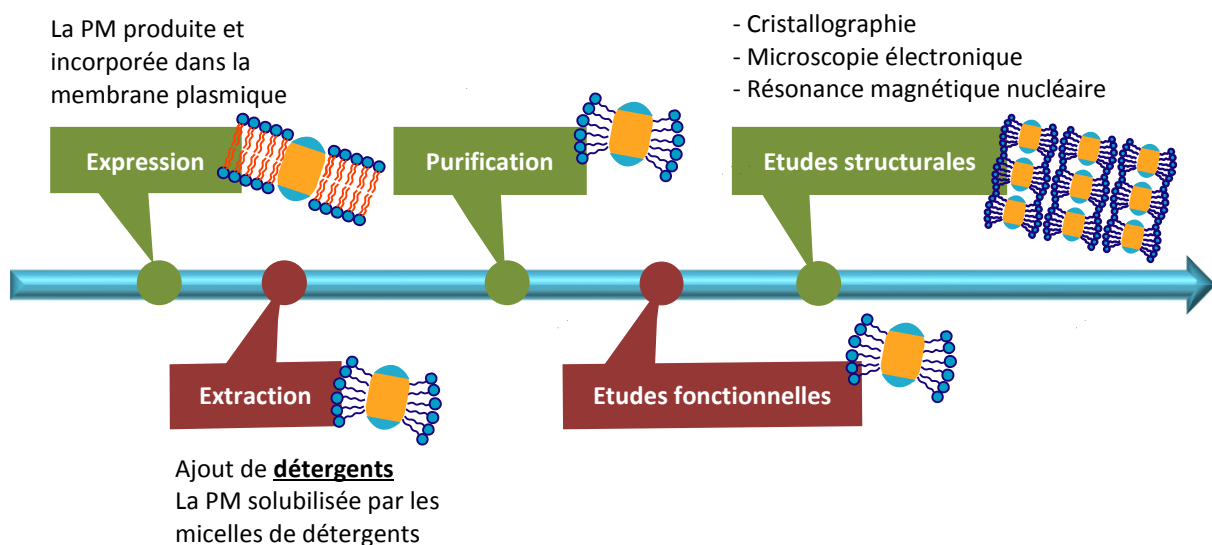


Schéma 1 : Utilisation de détergents dans la biologie des PMs

Néanmoins, l'utilisation de détergents peut engendrer des effets néfastes vis-à-vis des PMs. Dans ce contexte, nous proposons de concevoir, synthétiser et étudier une nouvelle génération de détergents ayant une capacité d'extraction des PMs tout en préservant leur activité et leur structure native. Ce projet constitue l'axe principal de cette thèse.

Toujours dans la sphère des PMs, les transporteurs membranaires de la famille ABC (ATP Binding Cassette) constitue un des centres d'intérêt majeurs du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) et de notre collaborateur, l'équipe du Dr. Pierre Falson à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) à Lyon. Ainsi, le deuxième objectif de ma thèse consiste à développer des inhibiteurs du transporteur ABCC2, une protéine très impliquée dans la pharmacocinétique des médicaments. Cette étude concerne l'identification de structures potentielles par le criblage à haut débit, suivie par la synthèse de leurs analogues afin d'établir la relation structure-activité. Ces inhibiteurs peuvent être utilisés comme adjuvants pour améliorer et optimiser la pharmacocinétique de certains médicaments substrats de la protéine ABCC2.

Ce manuscrit est alors organisé selon le plan suivant :

- Le premier chapitre est consacré à l'introduction des notions de base et des généralités en relation avec la biologie des PMs. Les points particuliers concernant la biochimie et la biologie structurale de ce genre de protéines seront abordés. A partir de ces informations, les difficultés souvent rencontrées seront analysées. Puis, nous présenterons les différentes solutions parmi lesquelles l'approche concernant l'utilisation de détergents qui sera développée à la fin de ce chapitre. En particulier, nous détaillerons les problèmes liés à l'utilisation de détergents ainsi que les pistes pour les surmonter.
- La dernière partie du chapitre bibliographique nous emmènera au deuxième chapitre, qui comprend la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux détergents stabilisant des PMs.
- Le troisième chapitre porte sur mes travaux de chimie médicinale concernant le développement des inhibiteurs du transporteur membranaire ABCC2.
- Enfin, dans la partie expérimentale, tous les protocoles expérimentaux et les caractérisations des molécules synthétisées seront décrits.

Chapitre 1 - Rappels bibliographiques

I. Les protéines membranaires (PMs)

I.1. Les membranes cellulaires

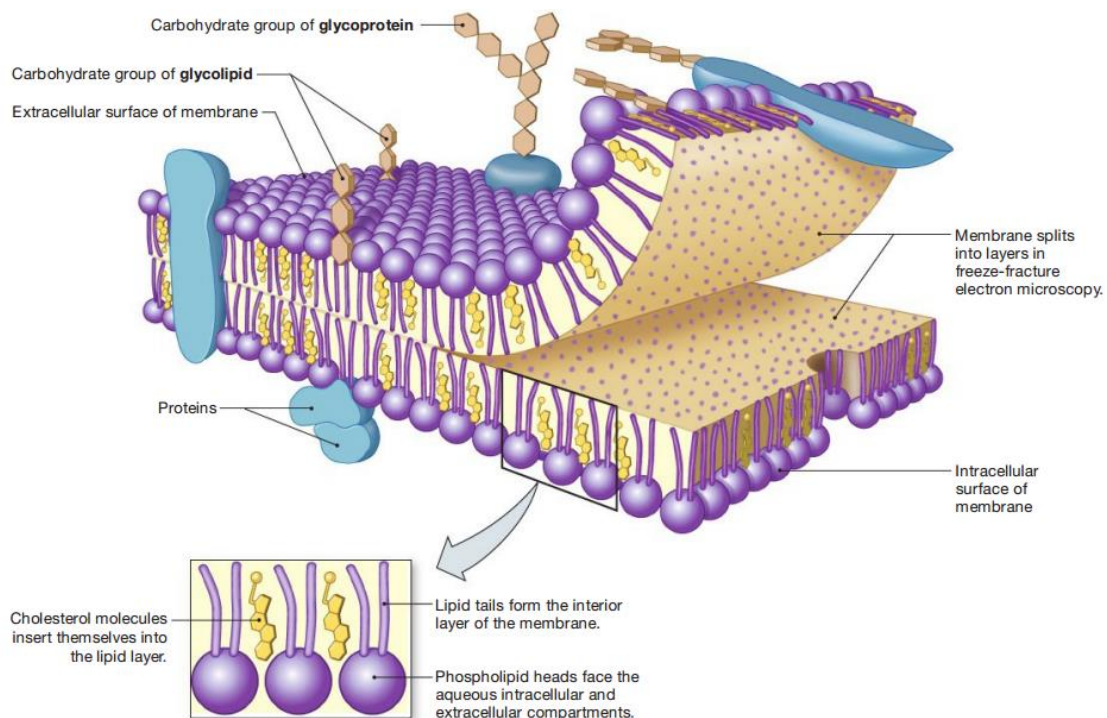


Figure 1 : Membrane cellulaire ^[5]

Une cellule vivante se sépare de l'extérieur par une enveloppe : la membrane plasmique (**Figure 1**). Il existe également chez les eucaryotes des membranes internes qui entourent des organites, par exemple les mitochondries, l'appareil de Golgi ou bien le réticulum endoplasmique. Quelle que soit leur localisation, toutes les membranes sont constituées d'une bicouche de lipides. Ce fait a été remarqué par Gorter et Grendel en 1925 lors d'une expérience d'extraction de lipides d'érythrocytes,^[6] ensuite confirmé par les images en microscopie électronique (ME).

Les lipides les plus abondants de la membrane cellulaire sont des phospholipides, constitués d'une tête hydrophile et de deux queues hydrocarbonées hydrophobes. Les phospholipides se distinguent par la tête hydrophile, à savoir phosphatidylcholine, phosphatidylsérine et phosphatidylinositol. La structure de la phosphatidylcholine est illustrée dans la **Figure 2**.

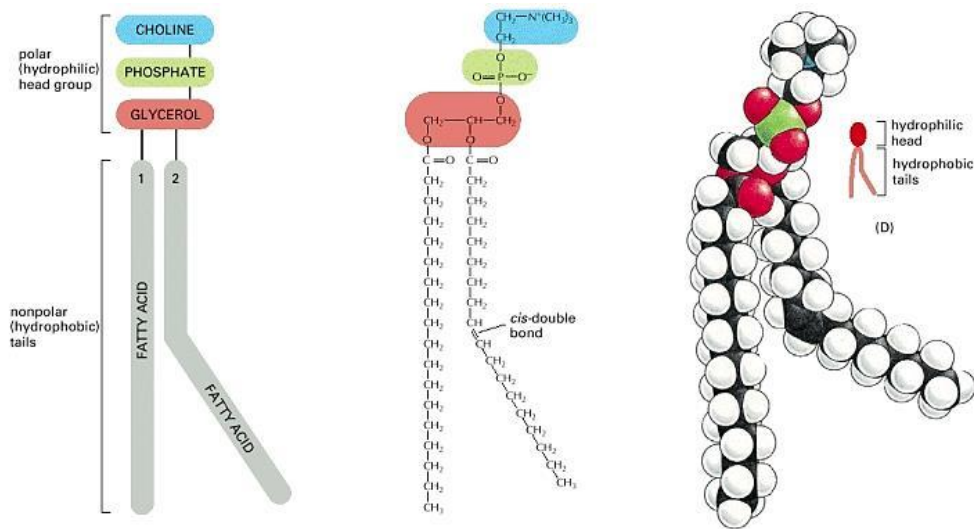


Figure 2 : Phosphatidylcholine, un des phospholipides constituant la membrane cellulaire ^[7]

Cette particularité structurale, dite amphipathique, confère à ces molécules la capacité de s'auto-organiser en milieu aqueux – en bicouche lipidique dans laquelle les têtes polaires s'orientent vers l'extérieur pour établir des liaisons électrostatiques ou des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau, alors que les queues hydrophobes se tournent à l'intérieur pour limiter le contact défavorable avec les molécules d'eau environnantes (**Figure 3**).

Il existe d'autres lipides membranaires : les stérols, notamment le cholestérol chez la cellule animale, les sphingolipides et les glycolipides. Ces molécules partagent également ce caractère amphipathique.

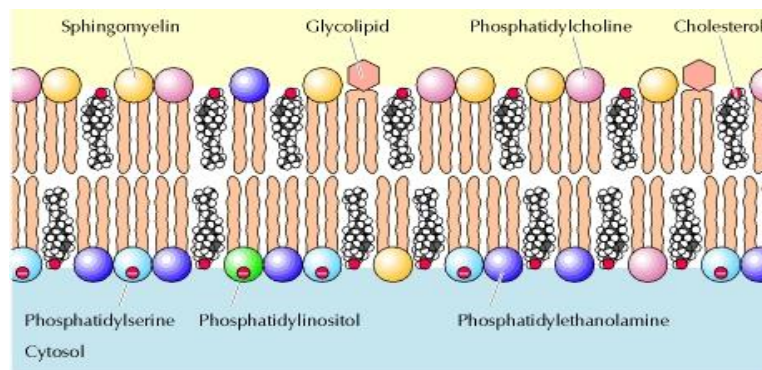


Figure 3 : Membrane cellulaire en bicouche lipidique ^[8]

I.2. Les protéines membranaires (PMs)

I.2.1. Rôles

La membrane plasmique en plus de former une barrière pour enfermer le contenu de la cellule est impliquée dans le transport de différents éléments, la mobilité et la communication avec l'extérieur. Ces tâches sont assumées principalement par les protéines qui s'associent de différentes manières à la bicouche lipidique. Ce sont les canaux, les transporteurs, les récepteurs, ainsi que les enzymes et les protéines d'ancrage qui rendent possible des échanges de nutriments, de signaux chimiques, de déchets métaboliques avec l'environnement extracellulaire. Dans le **Tableau 1** sont présentées les plus grandes familles de PMs.

Rang	Famille
1	Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)
2	Superfamille majeure de facilitateurs
3	Transporteurs ABC (ATP Binding Cassette)
4	Canaux potassiques
5	Récepteurs kinases

Tableau 1 : Les plus grandes familles de PMs ^[9]

I.2.2. Organisation

Le modèle de la mosaïque fluide, proposé par Nicolson *et al.*, décrit les PMs comme des îlots flottant dans une mer de phospholipides.^[10] En fait, il a été récemment montré que la plupart des PMs s'organisent en microdomaines où la concentration de protéines est beaucoup plus importante.^[11] De plus, dans ces clusters, il y a une interaction étroite lipides-protéine et protéine-protéine.^[12]

I.2.3. Classification

Les PMs se classent en quatre catégories selon le type d'association à la membrane lipidique (**Figure 4**) :

- les protéines transmembranaires ;
- les protéines associées à la membrane par un domaine amphipathique ;
- les protéines liées de façon covalente avec les lipides membranaires ;

- les protéines attachées à la membrane de façon indirecte *via* une autre PM.

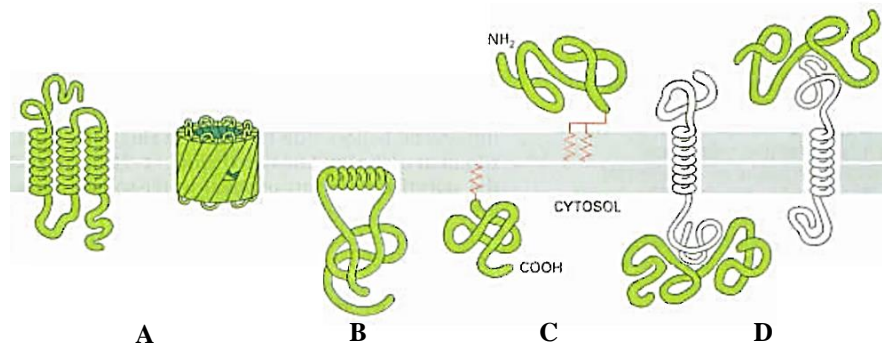


Figure 4 : Quatres types de PMs. (A) Protéines transmembranaires ; (B) Protéine associée à la membrane par un domaine amphipathique ; (C) Protéine liée de façon covalente avec les lipides membranaires ; (D) Protéines attachées à la membrane indirectement *via* une autre PM.^[7]

Les PMs de la première catégorie sont également appelées les PMs intégrales. Celles des autres catégories sont les PMs périphériques, qui peuvent être intrinsèques (protéines intracellulaires) ou extrinsèques (protéines extracellulaires). Des canaux, des transporteurs nommés ci-dessus, sont les protéines transmembranaires.

Les PMs peuvent être classées en fonction de leur topologie. Ce terme regroupe la structure secondaire des segments, leur localisation (membranaire/cytosolique/extracellulaire) et leur orientation par rapport à la membrane. Si une protéine est en contact avec la membrane sur un seul côté, il s'agit alors d'une protéine monotopique. Au contraire, une PM est polytopique si on peut la retrouver sur les deux faces de la membrane. C'est le cas en effet des protéines transmembranaires.

Par la suite, le terme « PMs » dans cet ouvrage désignera les protéines transmembranaires.

I.2.4. Importance et caractéristiques des PMs

Dans ce projet, nous nous intéressons particulièrement aux protéines transmembranaires pour plusieurs raisons. En premier lieu, elles assurent un rôle crucial dans les processus biologiques concernant le contrôle de la croissance, la régulation des fonctions physiologiques, de signalisation et du transfert de matériel entre la cellule et son environnement. L'importance de ce genre de protéines s'illustre par leur taux de gènes codant – de 20 à 30% des génomes chez les eubactéries, les archées et les eucaryotes.^[1] Chez l'homme, plus de 50% de ces protéines sont impliquées dans des maladies graves telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, le diabète ou encore le paludisme.^[2] D'ailleurs, leur emplacement à la surface des cellules les rend plus accessible aux principes actifs. Ces cibles

membranaires sont donc particulièrement pertinentes pour le développement rationnel de médicament. En effet, elles représentent 60% des cibles pharmacologiques connues à ce jour. Ce chiffre pourrait encore augmenter jusqu'à 80% du nombre total des cibles potentielles (3000 protéines), estimé par les analyses génomiques.^[2,13]

De plus, les protéines transmembranaires possèdent des propriétés très différentes des protéines solubles. Elles sont constituées à la fois des régions hydrophiles (exposées à l'environnement aqueux des deux côtés de la membrane) et des régions hydrophobes (nichées contre les queues hydrocarbonées de la bicouche lipidique). La polarité régionale dépend de la composition en résidus d'acides aminés : les segments qui traversent la membrane sont essentiellement composés d'acides aminés à chaînes latérales hydrophobes, à savoir, leucine, alanine, valine, isoleucine, glycine et phénylalanine. Au contraire, les chaînes polypeptidiques des régions à l'interface membrane-cytoplasme/matrice extracellulaire sont dotées d'acides aminés polaires et chargés, comme arginine, acide aspartique, acide glutamique, lysine.^[14] Il est à noter que la charge issue de ces derniers est distribuée de façon asymétrique sur les deux côtés de la membrane. Von Heijne *et al.* ont trouvé que le côté cytosolique est chargé positivement avec la présence abondante d'arginine et de lysine alors que l'autre côté porte plutôt une charge négative. Ce phénomène, nommé « positive-inside rule » s'applique universellement sur toutes sortes de membranes.^[15,16] Cette différence de charge paraît importante pour orienter les protéines dans la membrane ainsi que pour les empêcher de s'en échapper.^[14]

Par ailleurs, vu les fonctions spécifiques de ce genre de protéines (canaux, transporteurs, récepteurs), elles sont souvent polymériques et multi-domaines. Par exemple, les transporteurs ABC sont généralement composés de quatre domaines : deux domaines transmembranaires (TMD – Transmembrane Domain) qui reconnaissent et transportent des substrats ; deux domaines cytosoliques qui hydrolysent l'ATP (NBD – Nucleotide-Binding Domain). Concernant la topologie, une PM peut se former par l'association de plusieurs segments transmembranaires, sous forme d'hélice α ou de tonneau β . Cette organisation permet de protéger les liaisons peptidiques polaires par les chaînes latérales hydrophobes, qui entrent en contact direct avec les lipides. La **Figure 5** illustre les structures d'une protéine en hélice α (le récepteur β -adrénergique) et d'une protéine en tonneau β (le canal anionique voltage-dépendant).

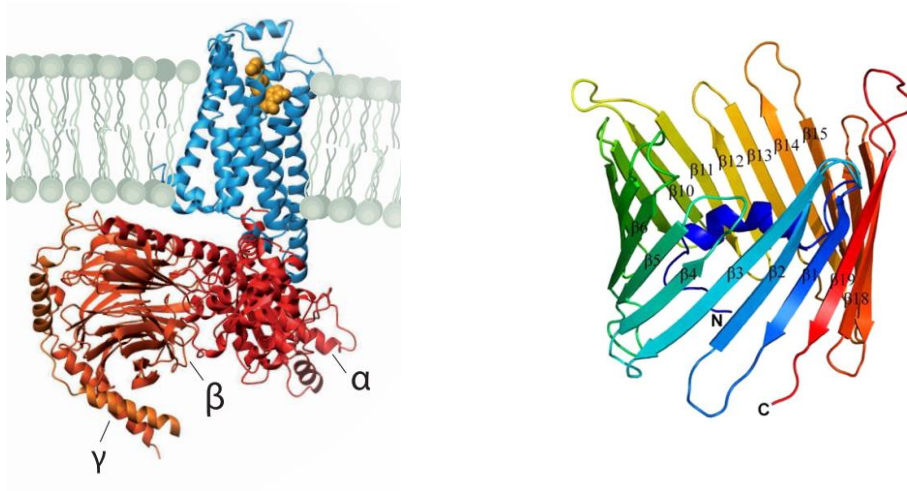


Figure 5 : (A gauche) Structure du récepteur β -adrénergique (en bleu) sur lequel se lie une protéine G (en rouge) et une hormone (en orange) ; (A droite) Structure du canal anionique voltage-dépendant chez l'homme.^[17,18]

II. Etudes fonctionnelles et structurales des PMs – un défi

II.1. Généralités sur la biochimie et la biologie structurale de protéines

II.1.1. Procédure générale pour produire et isoler des protéines

En général, une protéine est présente dans la cellule d'origine en quantité très faible, seulement suffisante pour son fonctionnement normal. C'est pourquoi il est nécessaire d'induire la surexpression dans un autre type de cellule « hôte », dont la croissance est plus importante. Ce système d'expression est destiné à obtenir rapidement la protéine souhaitée en quantité raisonnable pour les études fonctionnelles et structurales. La protéine produite de cette façon est appelée « recombinante », c'est-à-dire le gène codant pour la protéine, isolé de l'organisme d'origine, est introduit dans l'organisme hôte. Il existe cinq systèmes d'expression classiques, à savoir les bactéries, les levures, les cellules d'insectes, les cellules mammaires et le poisson zèbre.

Dès que l'on parvient à faire surexprimer la protéine, l'étape suivante consiste à rompre la cellule pour la libérer. Ensuite, elle est isolée des autres composantes de la cellule en appliquant les techniques de purification, notamment, les différents types de chromatographie sur colonne (d'affinité, d'exclusion de taille, d'échange d'ions et d'interaction hydrophobe). La protéine purifiée peut être enfin engagée dans les essais biologiques ou cristallographiques.

II.1.2. Etudes fonctionnelles

L'activité des protéines peut être étudiée de manière directe dans la cellule - *in cellulo* ou bien, selon les cas, *in vitro*, c'est-à-dire lorsque la protéine est séparée des autres composants de la cellule. Etudier une protéine isolée permet de supprimer les éléments qui peuvent perturber les résultats.

II.1.3. Etudes structurales

II.1.2.1. Modélisation computationnelle

La détermination de structure des PMs par les techniques expérimentales reste encore un défi difficile à relever. Pour pallier le manque de connaissances au niveau structural, dans l'ère numérique, de plus en plus de modèles sont générés *in silico* ces dernières années. Cette méthode permet de prédire la structure secondaire, la topologie, ainsi que la structure 3D des PMs.

Même avant la résolution de structure 3D par les techniques plus difficiles à mettre en œuvre, on peut déjà acquérir une vue générale sur la topologie, c'est-à-dire cerner les segments transmembranaires, la structure secondaire, le nombre de domaines, etc. Pour ce faire, les méthodes de prédiction les plus anciennes s'étaient basées uniquement sur l'hydrophobie. Plus tard, la prédiction était améliorée en prenant en compte le phénomène « positive-inside rule » (voir section I.2.4). Actuellement, il existe huit méthodes d'apprentissage *in silico* pour construire la topologie de PMs à partir de leurs gènes : MEMSAT3, MEMSAT-SVM, Phobius, SCAMPI, SPOCTOPUS, TMHMM, THUMBUP et MDM. De manière générale, le principe de ces méthodes consiste en la comparaison d'une séquence avec une base de données comprenant les protéines dont la topologie est connue.^[19]

La résolution de la structure 3D est l'ultime objectif de la biologie structurale. Il existe trois principales méthodes *in silico* pour construire la structure 3D d'une protéine :

- la prédiction par homologie : la structure 3D d'une protéine est construite en empruntant la structure connue d'une autre protéine dont la séquence peptidique est la plus proche. La pertinence du modèle dépend donc du degré de similarité entre les deux structures primaires.
- l'alignement multiple des séquences est la technique utilisée si le degré de similarité des séquences est très faible (inférieur à 25%). La séquence peptidique de la protéine étudiée est alignée avec plusieurs structures disponibles dans les bases de données pour en sortir le meilleur modèle.
- les expériences de repliement *de novo* sont utilisées si aucune structure similaire n'est disponible. La technique consiste à établir la structure 3D d'une PM par fragments selon la topologie de la protéine. Ces fragments sont par la suite rassemblés pour générer les modèles de la protéine entière.^[20]

Les prédictions structurales doivent être ensuite confirmées et raffinées par les techniques expérimentales décrites ci-dessous.

II.1.2.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN des protéines utilise principalement les isotopes ^1H , ^{13}C , ^{15}N et ^2H . Pour les études en RMN, les PMs doivent être enrichies avec ces isotopes qui ne sont pas naturellement abondants (à l'exception de ^1H).

Puisque les membranes biologiques sont tellement complexes, les PMs sont purifiées et reconstituées dans des systèmes mimétiques de la membrane. Par exemple, les PMs peuvent être étudiées en RMN sous forme solubles dans les micelles ou les bicelles. La composition en lipides et détergents de ces systèmes doit être sélectionnée et optimisée pour chaque PM étudiée.^[21]

Les progrès techniques en RMN rendent possible la détermination de la structure 3D de protéines dans leur environnement lipidique, dans lequel elles conservent leur conformation native. La spectroscopie de RMN à l'état solide est la seule technique capable de fournir les informations structurales des PMs immobilisées dans la bicouche lipidique native et dans les conditions physiologiques. Les autres techniques nécessitent l'utilisation des mélanges de détergents/lipides non naturels, et des protéines modifiées (très courante en cristallographie). De plus, ces expériences sont réalisées à des températures très basses. Finalement, ces conditions non-physiologiques peuvent altérer la structure, la dynamique et l'activité des protéines.^[22]

II.1.2.3. Microscopie électronique

La cryo-microscopie électronique (cryo-ME) consiste à congeler rapidement des échantillons biologiques en solution dans l'éthane liquide. Les milliers d'images 2D obtenues par irradiation d'un échantillon avec un faisceau d'électrons sont traitées et combinées pour reconstruire une image 3D.

Cette technique permet de figer et d'observer les macromolécules dans un état proche de leur état natif en solution et non pas sous forme cristallisée. En plus, la cryo-ME représente un avantage remarquable pour les macromolécules difficiles à cristalliser comme les PMs. Elle révèle également tous les conformations existantes en solution, ce qui est en effet le cas de plusieurs transporteurs membranaires.^[23]

Autrefois, les structures obtenues par cette technique étaient de très faible résolution. Pour améliorer la qualité de diffraction, d'une part, les signaux et la résolution peuvent être intensifiés en faisant des cristaux bidimensionnels (2D) des PMs. Cette technique s'applique particulièrement bien dans le cas où la protéine est trop petite pour pouvoir acquérir ses images sous forme monodispersée.^[24]

D'autre part, au cours de ces dernières années, la technique de cryo-ME des protéines monodispersées a été améliorée et affinée pour obtenir des structures dont la résolution a atteint le niveau sub-atomique. Concernant les PMs, l'équipe de Cheng et Julius a pu résoudre la structure à haute résolution (4 Å) de TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) (**Figure 6**), le canal ionique responsable de la détection des stimulants thermiques et chimiques au niveau des nocicepteurs. On peut citer aussi l'exemple de la structure d'une protéine ABC, le canal ionique CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), résolue à 3,9 Å en 2017.^[25] La structure de bonne qualité de ces protéines permet de révéler leur mécanisme d'action au niveau atomique ainsi que leur mode d'interaction avec les petites molécules. Ces travaux ouvrent donc la voie à la conception de nouveaux médicaments ciblant ces protéines.

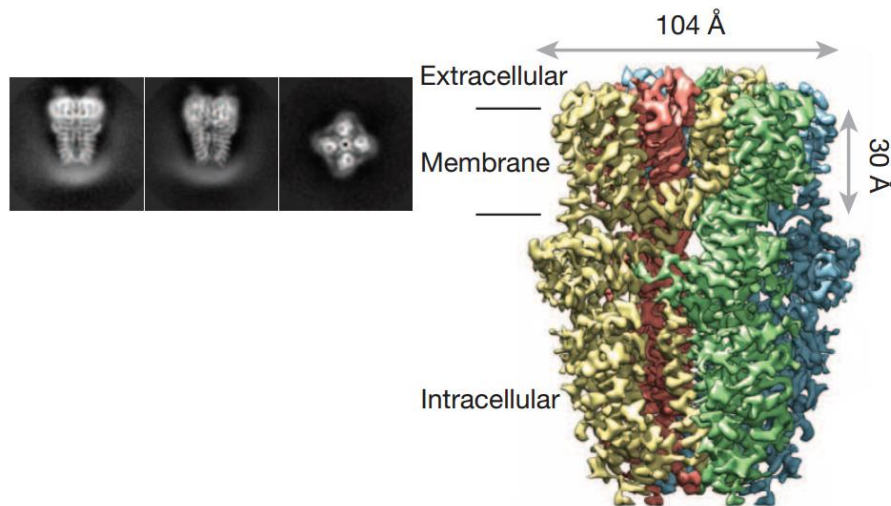


Figure 6 : Structure 3D de TRPA1 reconstruite par la cryo-ME ^[26]

Grâce à ces dernières avancées de la biologie structurale, la cryo-ME peut maintenant concurrencer la cristallographie aux rayons X quand il s'agit de biomacromolécules dont les cristaux 3D sont difficiles à obtenir.^[23]

II.1.2.4. Diffraction aux rayons X

La majorité des structures de protéines, notamment celles de meilleures résolutions, ont été déterminées par la cristallographie aux rayons X.^[4] En pratique, les cristaux 3D d'une molécule sont irradiés avec un faisceau de rayons X pour donner son image de diffraction, qui se traduit en densité électronique et permet de déchiffrer la structure 3D au niveau atomique. Cette technique requiert des cristaux 3D de bonne qualité au niveau de leur taille et de leur organisation, ce qui est particulièrement difficile dans le cas des PMs. Toutefois, les études de cristallogenèse sont devenues moins lourdes grâce à l'automatisation, ce qui permet d'effectuer le screening de multiples conditions de cristallisation en parallèle.^[27] De plus, la cristallisation en phase cubique facilite la formation des cristaux plus rigides et améliore la diffraction.^[28] Cette technique, adaptée spécifiquement pour les PMs, les intègre dans un environnement lipidique organisé tout au long de la cristallisation.^[29]

II.2. Difficultés relatives aux PMs

La première structure 3D d'une PM a été résolue en 1985. Depuis (jusqu'à juin 2017), seules 696 structures sont disponibles dans les bases de données telle que la banque de données des protéines (Protein Data Bank).^[3,4] Ce nombre paraît en fait très modeste par rapport au nombre total de protéines structurellement connues (118 000) et au nombre de PMs estimé chez l'homme (plus de 5500).^[19] Malgré la croissance exponentielle des structures résolues, la biologie structurale des PMs est un domaine très difficile pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, l'expression en quantité conséquente de PMs constitue le premier défi. Le problème se pose lors de la surexpression de PMs dans un organisme hôte. La présence excessive d'une protéine étrangère peut déséquilibrer le fonctionnement normal de la cellule. L'expression des PMs dans un organisme non natif provoque inévitablement des dissimilarités concernant la composition de lipides membranaires et la modification post-traductionnelle. Or, ce sont des facteurs en lien direct avec le repliement correct et la structure de la PM produite. Chez *Escherichia coli* (*E. coli*), le système d'expression le plus utilisé, les PMs sont souvent produites sous forme d'agrégats dénaturés dans le cytoplasme, nommés corps d'inclusion, et non dans la membrane plasmique. Par conséquent, il faut envisager une éventuelle étape de renaturation par traitement avec les détergents, généralement très peu efficace. En effet, l'adressage et l'insertion de la PM dans la membrane nécessitent des systèmes biologiques particuliers.^[30]

Un problème non moins important concerne la crédibilité de la structure cristallisée par rapport à la structure native. En effet, les PMs peuvent être elles-mêmes très flexibles comme dans le cas des transporteurs, qui adoptent plusieurs conformations selon le cycle de transport,^[31] ou des RCPG, qui peuvent se lier ou non aux protéines G et par conséquent donner lieu à deux conformations en équilibre.^[32] Ce caractère multiconformationnel est problématique en cristallographie.

Dans le cas le moins souhaitable mais courant lorsqu'on s'intéresse aux PMs, la structure obtenue peut correspondre à un état inactif.^[33,34] En effet, à cause des caractéristiques hydrophobes et polymériques, les PMs sont susceptibles de perdre leur conformation native et peuvent s'agréger lors de la cristallisation ou au cours des manipulations biochimiques en milieu aqueux. Le changement du milieu lipidique de la membrane pour une solution aqueuse semble très dramatique et délétère sur le plan structural car ces protéines sont conçues pour fonctionner au sein de la membrane lipidique. D'ailleurs, pour faire cristalliser les protéines à partir d'une solution aqueuse, il faut que les protéines y soit stable à long terme car ce processus peut durer plusieurs jours voire plusieurs semaines. L'instabilité en solution aqueuse des PMs y fait donc obstacle. De plus, les résolutions obtenues pour les PMs sont en général plus modestes que celles des protéines solubles, car la qualité des cristaux est souvent moins bonne. D'ailleurs, comme les PMs sont en général beaucoup plus grandes, il est nécessaire d'utiliser des cristaux de taille supérieure pour assurer une bonne diffraction.

L'exactitude à l'échelle atomique de la structure est cependant primordiale pour comprendre les mécanismes de fonctionnement et concevoir de nouveaux médicaments par une approche assistée par la structure 3D des cibles – « Structure-based drug design ».^[35-37] L'obtention des cristaux de qualité tout en préservant l'activité et la structure native devient un enjeu central de la biologie structurale et de la chimie médicinale à l'heure actuelle.

III. Relever le défi – Etat de l’art en biologie structurale de PMs

Dans les paragraphes précédents, nous avons décrit les difficultés liées à l’étude des PMs. A cause de leurs caractéristiques bien particulières, il faut des protocoles et des systèmes spécifiquement adaptés à des études (expression, extraction, purification, recristallisation, etc.).

Dans cette partie, nous allons introduire les stratégies existantes pour l’expression et la stabilisation des PMs. Bien entendu, en pratique, ces techniques doivent être combinées et optimisées pour atteindre un résultat optimal.

III.1. Systèmes cellulaires adaptés à l’expression de PMs

E. coli est le système d’expression le plus utilisé pour fabriquer des protéines recombinantes. Cependant, lors de l’expression des PMs chez cette bactérie, ces PMs ne se replient très souvent pas correctement et sont stockées dans le corps d’inclusion sous forme d’agrégats. Plusieurs souches d’*E. coli* génétiquement modifiées ont été générées pour améliorer la tolérance de la bactérie aux concentrations élevées des PMs. Certaines modifications génétiques permettent d’exprimer et d’intégrer les PMs dans la membrane interne de la bactérie. Dans une autre approche développée, les PMs sont coexprimées avec des systèmes impliqués dans la biogenèse et le repliement des PMs.^[38]

Néanmoins, les caractéristiques d’*E. coli* ne sont pas les plus idéales et les plus adaptées à l’expression des PMs. Dans une approche plus systématique, il est nécessaire de tester et de comparer différents systèmes d’expression (les bactéries, les levures, les cellules d’insecte, les cellules mammaliennes et les systèmes « cell-free »).^[38,39]

III.2. Système « cell-free »

En principe, les protéines sont fabriquées par des systèmes *in vitro* issus des lysats d'*E. coli*, des germes de blé ou des réticulocytes de lapin. Sans cellules vivantes, la production protéique peut quand même aboutir à condition que tous les éléments nécessaires pour la transcription-traduction soient présents (les acides aminés, les enzymes, les ARN de transfert, etc.) (**Figure 7**).

Cette approche *in vitro*, développée ces dernières années, apparaît prometteuse, particulièrement pour les PMs car elle permet de surmonter certaines difficultés techniques majeures chez les systèmes cellulaires (insertion dans la membrane, toxicité des PMs surexprimées pour les cellules hôte). Dans le cas particulier des PMs, il est important de noter qu'il est nécessaire de rajouter au milieu des molécules amphiphiles et des lipides capables de créer artificiellement une sorte d'environnement hydrophobe pour héberger les PMs (les nanodisques, les liposomes, les bicelles, etc.) (**Figure 7**).^[40] Ces dernières années, plusieurs PMs, précédemment difficilement exprimées dans les cellules hôte, ont été produites par cette méthode avec succès. C'est le cas par exemple de NS4B, une PM à l'origine du virus de l'hépatite C, qui a été produite par un système « cell-free » à base de germes de blé, en présence du MNG-3.^[41] Le système acellulaire est néanmoins relativement moins productif. Ainsi, le coût élevé de réactifs et la courte durée de vie du système limitent son application.^[42]

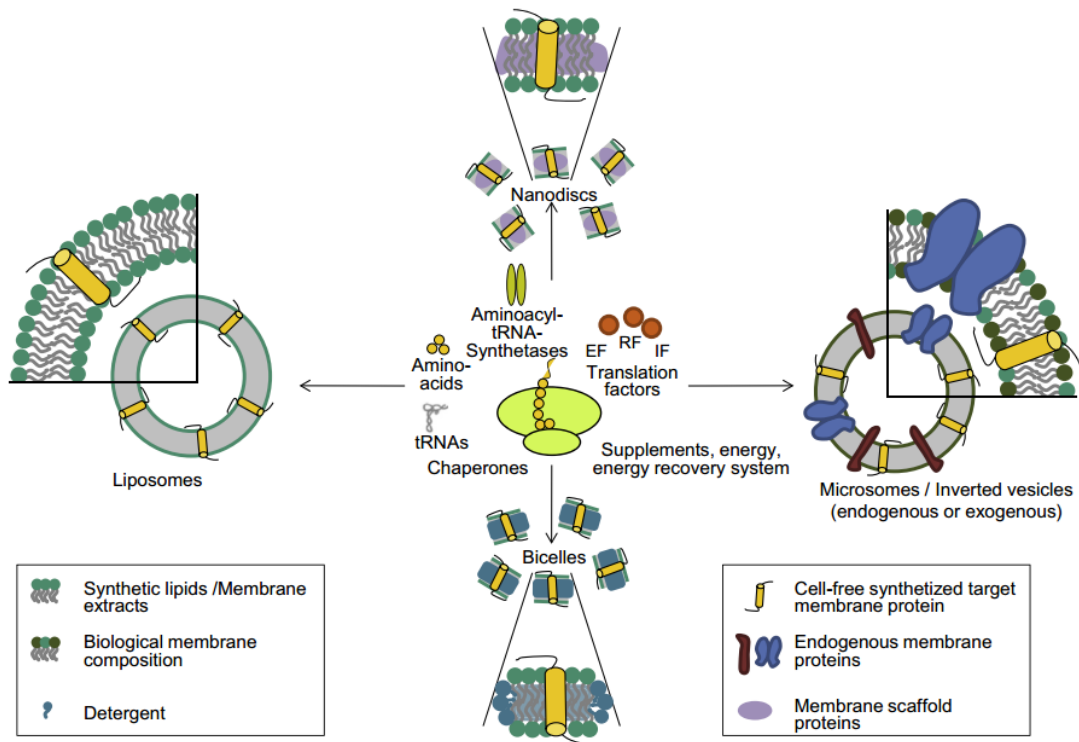


Figure 7 : Production de PMs en système « cell-free » en présence de différentes structures lipidiques ^[40]

III.3. Stabilisation par approches recombinantes

La plupart des PMs natives sont difficiles à manipuler à cause de leur instabilité inhérente. Pour surmonter cet obstacle, les biologistes cherchent à créer des versions plus stables en modifiant structurellement les PMs recombinantes. Cette partie détaillera les trois stratégies principales.

III.3.1. Par mutagenèse systématique

Un panel de protéines mutées est généré par substitution de quelques acides aminés. Leur stabilité en solution est ensuite testée en espérant trouver des mutants plus stables que la version originale.^[43] Par exemple, avec 3 mutations, le récepteur à la sérotonine humain a été cristallisé et structurellement résolu à 3.15 Å. Cela a permis de visualiser le mécanisme moléculaire de fixation des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine – le (S)-citalopram et la paroxétine.^[44]

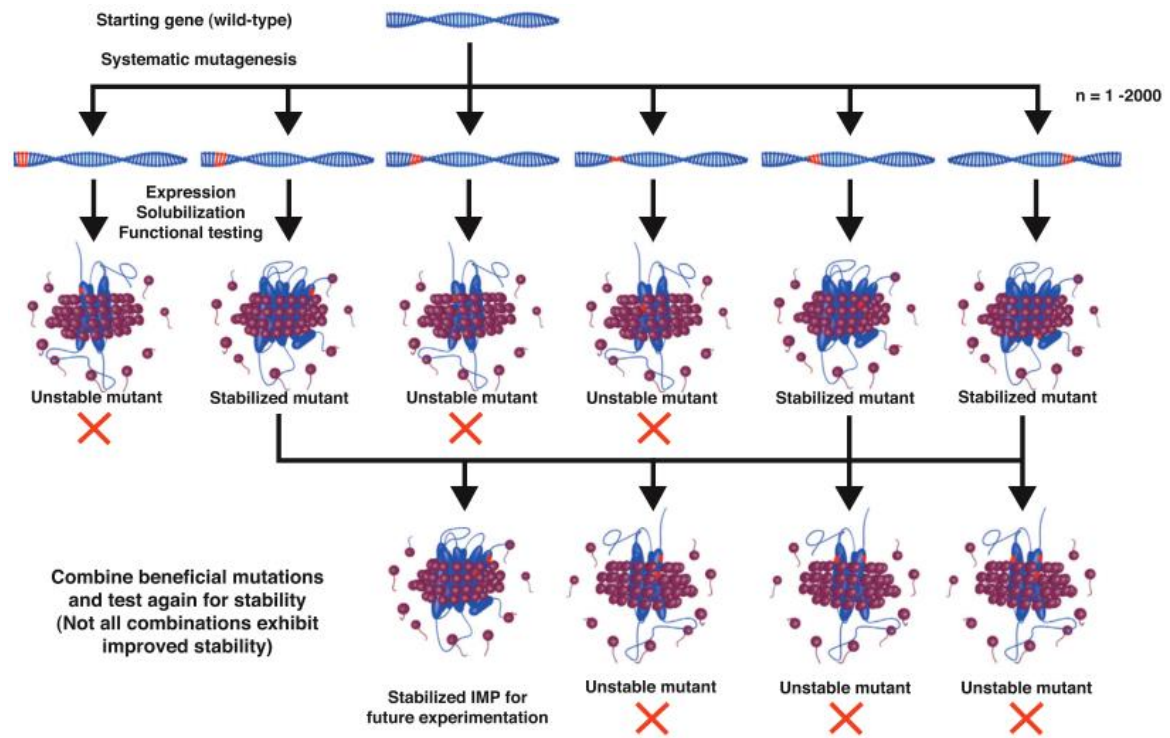


Figure 8 : Stabilisation par mutagenèse systématique ^[43]

III.3.2. Par suppression de certaines régions déstabilisantes

Certaines PMs, souvent à cause de leur mode de fonctionnement, sont très flexibles. Par exemple, les transporteurs ABC ont plusieurs conformations d'ouverture et de fermeture coexistant dans la même solution. Cela présente un véritable challenge pour obtenir des cristaux bien homogènes, primordial pour une bonne qualité de diffraction.

Pour résoudre ce problème, on peut modifier la protéine en supprimant ou réduisant les segments flexibles. En diminuant la longueur du linker entre deux monomères de la P-glycoprotéine murine, Esser *et al.* sont parvenus à limiter sa flexibilité et à obtenir sa structure à une résolution de 3,3 Å. ^[45]

III.3.3. Amélioration de la thermostabilité des PMs

Après de multiples étapes d'extraction et de purification, les PMs sont finalement soumises à la cristallisation. Elles se trouvent néanmoins en solution, au sein de différents systèmes pour les stabiliser et les maintenir sous formes solubles (bicelles, complexe micellaire avec les détergents, etc.). Lors de la cristallogénèse, les PMs enfouies dans ces complexes ne peuvent pas entrer en contact entre eux, ce qui rend la formation des cristaux encore plus difficile. Cependant, cette contrainte peut être réduite d'une part en limitant la taille du complexe pour

conserver l'exposition des régions polaires de la PM, ou d'autre part, en assurant une interaction protéine-protéine – cruciale pour la cristallo-genèse. Dans cette dernière approche, les PMs sont cristallisées en complexe avec des fragments d'un anticorps monoclonal ou par fusion avec une chaîne peptidique. Les cristaux se forment alors par l'intermédiaire de cette partie supplémentaire (**Figure 9**). Par exemple, dans les travaux de Coleman *et al.*, le transporteur a été non seulement muté mais aussi cristallisé sous forme d'un complexe avec le fragment Fab.^[44]

Fragment d'un anticorps

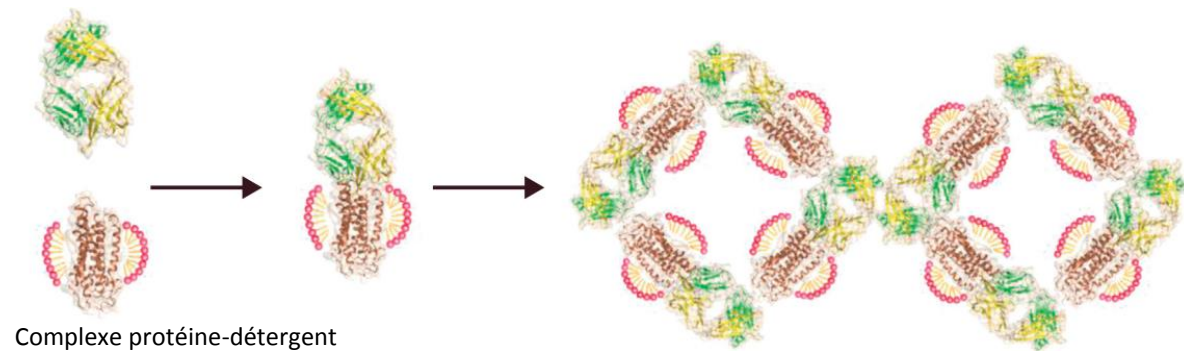


Figure 9 : Co-cristallisation du complexe protéine-détergent avec des fragments d'anticorps ^[46]

Dans une autre alternative proposée par Privé *et al.*, les PMs résistantes à la cristallisation sont modifiées au niveau génétique pour insérer une autre protéine soluble dans la région polaire (**Figure 10**).^[47,48]

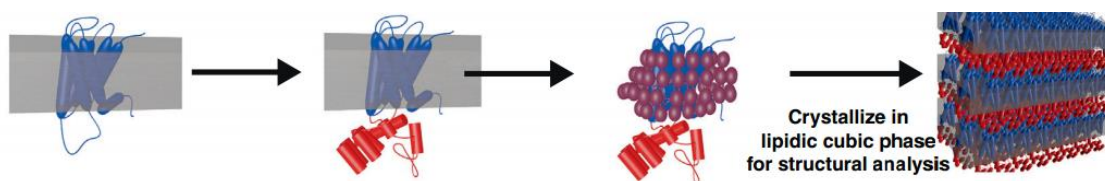


Figure 10 : Cristallisation avec une protéine de fusion ^[43]

Grâce à cette stratégie, de nombreuses informations ont pu être obtenues au niveau structural pour des PMs autrefois impossibles à cristalliser.^[49] Néanmoins, les protéines fusionnées sont souvent moins actives. En effet, il doit y avoir inévitablement des altérations structurales par rapport aux protéines natives.

III.4. Stabilisation par les systèmes mimétiques de la membrane

III.4.1. Les liposomes

Nous avons vu précédemment que les PMs peuvent perdre leur fonctionnement correct dès qu'elles sont privées de leurs lipides membranaires. C'est pourquoi après avoir isolé les PMs de leur membrane native en bicouche lipidique, il est préférable de les reconstituer dans un environnement proche de celui d'origine pour pouvoir ensuite mener à bien les études biologiques (tests de transport, test d'inhibition, etc.) et biophysiques (RMN, ME, etc.).

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une double couche phospholipidique, dans laquelle les PMs peuvent être insérées. La formation des protéoliposomes est illustrée dans la **Figure 11**. Les liposomes sont préalablement préparés puis sont déstabilisés par ajout du détergent. Ensuite, ils sont incubés avec les PMs extraites et purifiées, qui sont en complexe avec les détergents. Pour que des PMs soient reconstituées dans les liposomes, les détergents doivent être retirés de la solution (par dialyse, dilution, chromatographie d'exclusion de taille ou par résine absorbante).^[50]

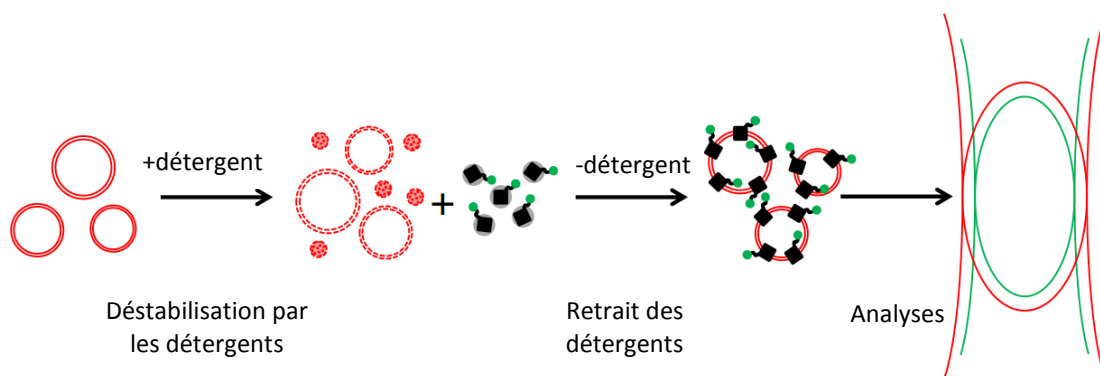


Figure 11 : Insertion des PMs dans les liposomes en utilisant les détergents ^[51]

Les PMs reconstituées peuvent ensuite être étudiées dans des tests biologiques divers. Par exemple, les protéines ABC sont couramment reconstituées dans des liposomes pour étudier leur mécanisme de transport,^[52] ou bien pour effectuer des criblages des petites molécules à la recherche de leurs inhibiteurs potentiels.^[53]

III.4.2. Les bicelles

Les bicelles sont des structures auto-assemblées discoïdales composées d'une bicouche de phospholipides (dimyristoylphosphatidyl choline (DMPC) ou ditridécanoylphosphatidyl

choline). Les disques lipidiques sont stabilisés et maintenus en solution par ajout de lipides à chaîne courte (dihexanoylphosphatidyl choline) ou de détergents (CHAPSO), qui entourent et protègent le cœur lipidique hydrophobe (**Figure 12**).^[54]

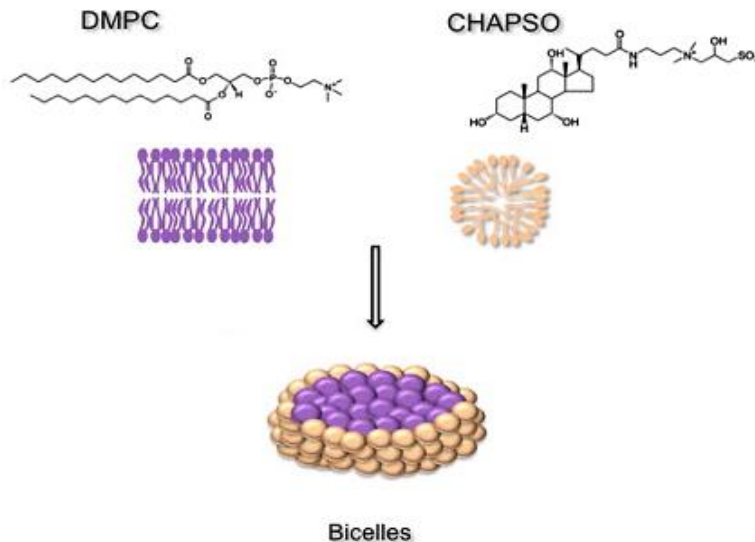


Figure 12 : Formation de bicelles ^[54]

Cette structure mimétique de la membrane a été initialement employée dans les études de RMN des PMs, grâce à sa propriété particulière de s'aligner spontanément dans un champ magnétique intense.^[55,56] Plus tard, quelques PMs en bicelles ont été cristallisées avec succès, par exemple la bactériorhodopsine (2,0 Å) chez *Halobacterium salinarum*,^[57] le canal anionique voltage-dépendant chez la souris (2,3 Å),^[58] ou encore le récepteur β -adrénergique (3,4-3,7 Å) chez l'homme.^[59] Toutefois, le nombre d'études cristallographiques de PMs sous cette forme reste très modeste par rapport aux autres méthodes.^[60]

III.4.3. Les complexes nanoassemblés

Les complexes nanoassemblés sont constitués de lipides organisés en bicouche. Une PM se trouve au milieu de ce système mimétique de la membrane. Pour maintenir et stabiliser ces systèmes en solution, différentes structures polymériques amphipathiques ayant une affinité pour les lipides forment une ceinture autour du complexe.

III.4.3.1. Les nanodisques

Les nanodisques ont la forme de disques lipidiques qui ressemblent aux bicelles. La différence avec ces dernières, c'est que la stabilisation du complexe en solution est assurée

non pas par des détergents ou des lipides à chaîne courte, mais par des lipoprotéines hélicoïdales appelées « membrane scaffolding proteins », qui entourent le disque phospholipidique comme une ceinture, masquant ainsi les chaînes hydrophobes des phospholipides (**Figure 13**).

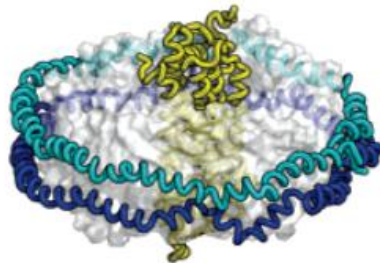


Figure 13 : Structure d'un nanodisque. Deux protéines (en bleu et en cyan) forment une ceinture autour d'une bicouche lipidique, dans laquelle se situe une protéine membranaire (en jaune).^[61]

Puisque la taille des lipoprotéines, facteur déterminant de la taille des nanodisques, est bien définie, ce système macromoléculaire est plus homogène par rapport aux autres (liposomes, bicelles, détergents). Un autre avantage est la thermostabilité remarquable des PMs encapsulées pour une gamme assez large de température.^[61]

En ce qui concerne les applications de ce système, il est utilisé principalement dans les études fonctionnelles, car les PMs peuvent conserver leur activité dans cet environnement mimétique de la membrane. Quant aux études structurales, les nanodisques sont également employés pour les analyses de RMN. Plusieurs études de ME sur ce type de complexe ont été effectuées.^[62,63] Les nanodisques forment de grandes structures auto-assemblées.^[64] De plus, les PMs dans les nanodisques sont très mobiles.^[63] Ce sont les raisons pour lesquelles jusqu'à ce jour, aucune PM n'est cristallisée en nanodisque.

III.4.3.2. Les SMALPs

En partant du même principe que les nanodisques contenant les lipoprotéines, les SMALPs (styrene-maleic acid copolymer lipid particles) sont stabilisées par des copolymères styrène-acide maléique.^[65] Ces systèmes ont été récemment développés pour résoudre le problème lié à l'absorption d'UV des lipoprotéines, ce qui interfère dans la détection des protéines.

III.4.3.3. Le Salipro

Les saposines sont des protéines d'origine lysosomale. Elles sont impliquées dans le processus de dégradation de certains sphingolipides.^[66] Ce rôle explique leur affinité vis-à-vis des lipides et leur capacité à former des nanoparticules avec les lipides et les détergents.^[67] Ce système a donc été étudié pour reconstituer et stabiliser les PMs dans un environnement lipidique (**Figure 14**).

Un avantage considérable de ce système est la thermostabilité favorisée par les hélices amphipathiques et les ponts disulfure formés par six résidus cystéine de la saposine A. En outre, plus petit que le complexe en nanodisque, ce système donne une meilleure résolution en cryo-EM. De plus, alors que la taille des lipoprotéines des nanodisques doit être optimisée pour chaque PM étudiée, le nombre de saposines du Salipro est avantageusement adaptable en fonction de la taille de la PM.^[68]

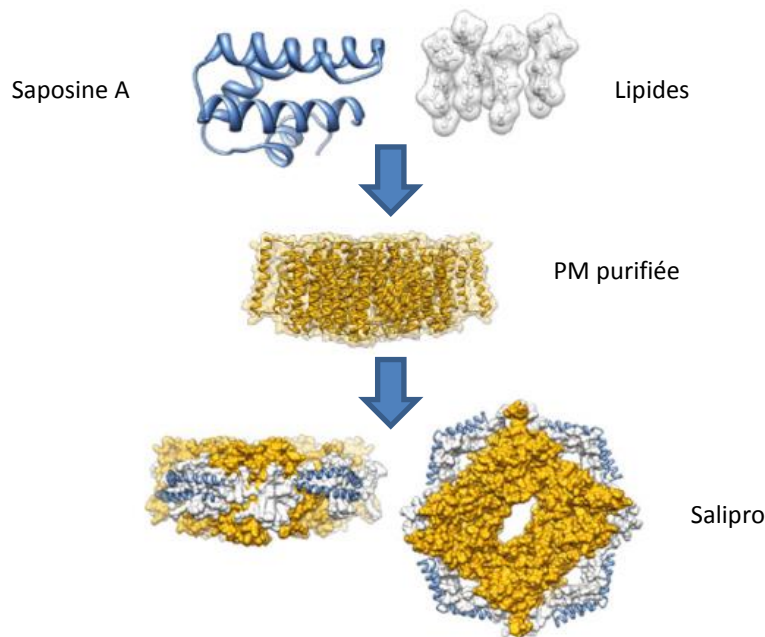


Figure 14 : Structure d'un complexe Salipro constitué de la saposine A, des lipides et d'une PM purifiée.^[68]

III.4.4. Les agents polymériques amphipathiques

Les « amphipols » sont des polymères amphipathiques développés en premier par Tribet *et al.* pour maintenir et stabiliser les PMs.^[69]

Dérivé de polyacrylates, le squelette de base peut être fonctionnalisé *via* les groupements carboxylates avec les éléments polaires et les queues hydrophobes alternativement. En

fonction du groupement hydrophile mis en jeu, on distingue quatre familles d'amphipols dont les structures apparaissent dans la **Figure 15**. Concernant l'organisation supramoléculaire en solution, les polymères s'auto-organisent pour former des structures globulaires ressemblant aux micelles.^[70]

Les queues hydrophobes des amphipols jouent le rôle de points d'interaction avec la région transmembranaire des PMs, alors que les parties hydrophiles assurent la solubilisation du complexe amphipol-protéine en solution aqueuse. Au cours des vingt années d'études et de développement, il a été montré que ces polymères peuvent non seulement maintenir les PMs en solution mais aussi préserver leur activité et leur stabilité.^[70]

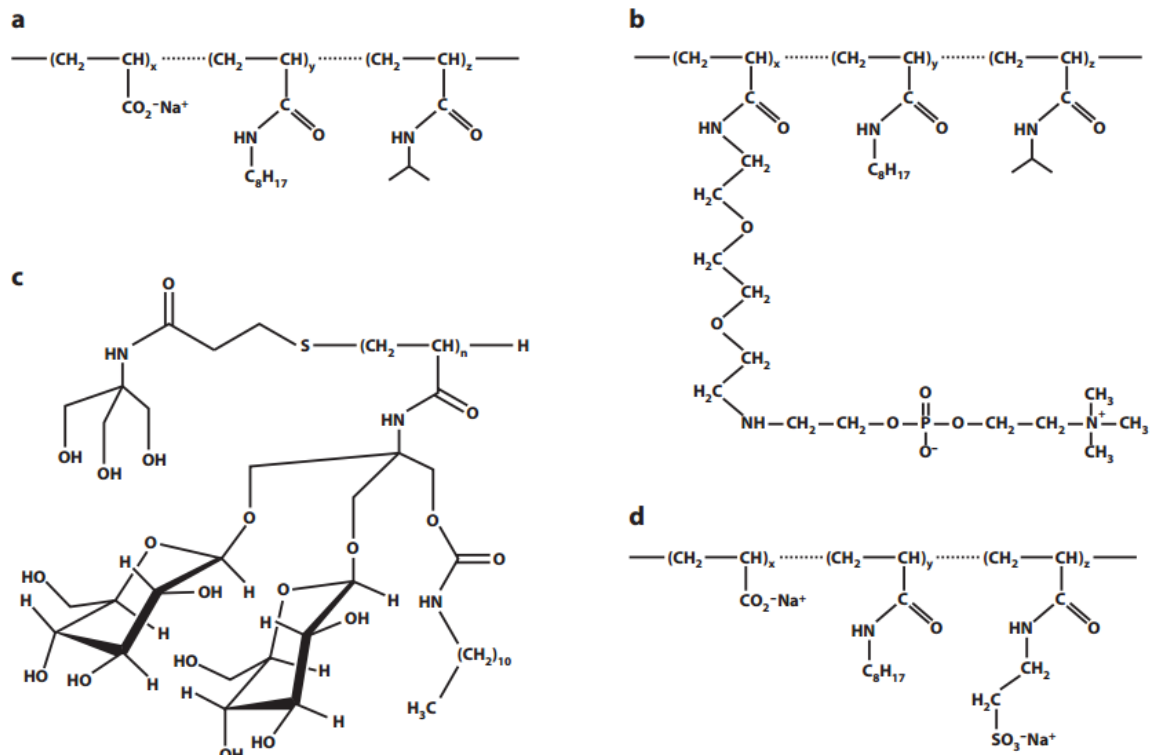


Figure 15 : Structures des quatre familles d'amphipols. (a) polyacrylate-based amphipols ; (b) phosphocholine-based amphipols ; (c) glucose-based amphipols (d) sulfonate-based amphipols.^[70]

Malgré leur capacité remarquable de stabilisation des PMs, ces agents amphipathiques ne peuvent pas extraire ces dernières de la membrane. Il est donc nécessaire de les solubiliser en utilisant des agents plus extractants (voir section III.5) et de procéder ensuite à un échange avec des amphipols (**Figure 16**).^[71]

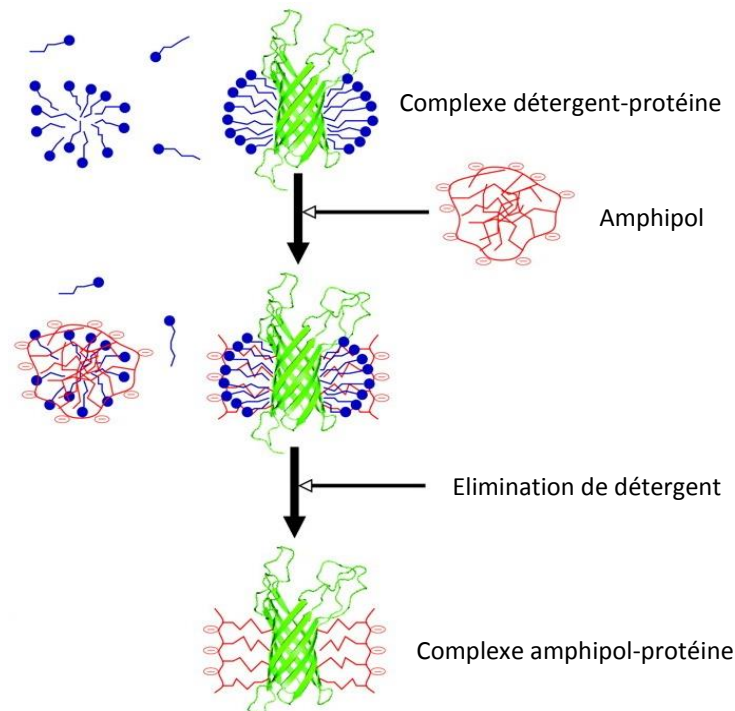


Figure 16 : Stabilisation d'une PM par des amphipols en échange avec les détergents [72]

III.5. Stabilisation par les détergents

La plupart des PMs sont cristallisées en complexe avec les détergents. Ces agents sont en effet couramment utilisés comme additifs pour maintenir les PMs en solution aqueuse après leur extraction de la membrane. Le **Tableau 2** montre quelques exemples remarquables des PMs étudiées à l'aide de détergents au cours de ces dernières années.

PMs	Détergent extraction	Détergent purification	Détergent cristallisation	Résolution (Å)
Récepteur muscarinique M2 ^[73]	Digitonin/cholate	Décylmaltoside	MNG	3,0
Récepteur opioïde δ ^[74]	DDM	DDM	DDM	1,8
Transporteur de la sérotonine ^[44]	DDM	Octylmaltoside	Octylmaltoside	3,15
P-glycoprotéine ^[45]	DDM	DDM/cholate	Cymal-7	3,3

Tableau 2 : PMs humaines étudiées et détergents utilisés pour les étapes d'extraction, de purification et de cristallisation. DDM = n-Dodécyl- β -D-maltoside ; MNG = Maltose-néopentyl glycol ; Cymal-7 = 7-Cyclohexyl-1-heptyl- β -D-maltoside.

Grâce à leur caractère amphipathique, les détergents peuvent rompre la structure membranaire où se trouvent les PMs et former un complexe protéine-détergent soluble en solution aqueuse

(Figure 17).^[75] Au sein de ce complexe, en étant couvertes par la queue hydrophobe du détergent, les régions transmembranaires hydrophobes n'entrent pas en contact avec les molécules d'eau, ce qui les épargne du risque d'aggrégation.^[76]

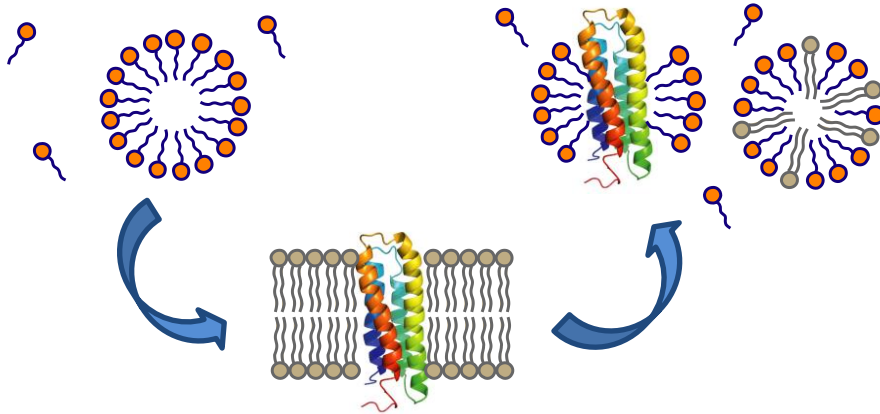


Figure 17 : Formation du complexe protéine-détergent

Comme l'objectif principal de mes travaux de thèse consiste à développer de nouveaux détergents, un rappel bibliographique plus détaillé sur ces agents sera abordé dans la partie suivante.

IV. Les détergents

IV.1. Définition

Les termes « détergents », « surfactants », « tensioactifs », « amphipathiques » ou « amphiphiles » font référence à plusieurs composés de différentes structures et de multiples applications qui partagent néanmoins des caractéristiques structurales et physico-chimiques communes.

La structure caractéristique de ces composés est constituée d'une partie qui a très peu d'affinité pour le solvant, le groupe **lyophobe**, et une autre partie co-existante qui est au contraire **lyophile** et présente une forte attraction pour le solvant. En particulier, si l'eau est le solvant, ces deux éléments sont nommés « hydrophobe » et « hydrophile ». En bref, les molécules qui portent ces groupements, quelques soient la structure, sont amphipathiques ou amphiphiles.^[77]

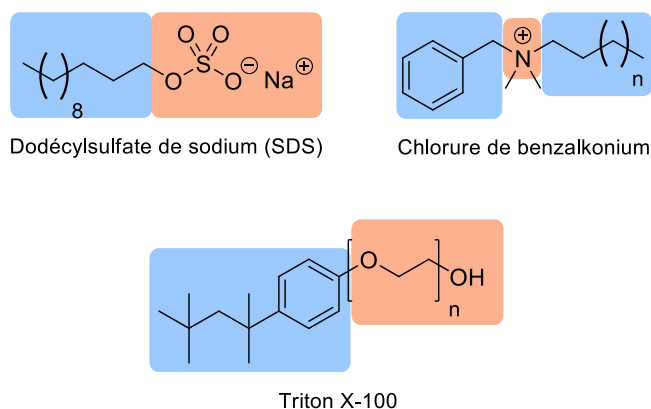


Figure 18 : Structure de composés amphipathiques portant une partie hydrophile (en rose) et une partie hydrophobe (en bleu)

Cette particularité structurale est à l'origine des comportements bien spécifiques de ces molécules, notamment la réduction de la tension de surface. C'est pour cette raison qu'ils sont également appelés **surfactants** (surface-active agent) ou **tensioactifs**.

Le terme « détergents » désigne en général des molécules amphiphiles possédant une propriété particulière – la détergence – ou le pouvoir nettoyant. Ceci regroupe en effet certains processus incluant l'adsorption aux interfaces, l'altération des tensions interfaciales, la solubilisation et l'émulsification.^[77] Les surfactants utilisés pour solubiliser les PMs et « éliminer les graisses » sont appelés également « détergents » par les biologistes.

IV.2. Caractéristiques physico-chimiques des détergents

IV.2.1. Auto-assemblage

Lorsqu'une molécule hydrophobe est entourée de molécules d'eau, ces dernières ne peuvent plus former autant de liaisons hydrogène qu'habituellement. Cette contrainte organisationnelle de la structure d'eau représente une perte d'entropie du système, et est donc défavorable sur le plan énergétique.^[78] C'est la raison pour laquelle les molécules hydrophobes dans un environnement aqueux ont tendance à se rassembler pour minimiser le nombre de molécules d'eau en contact. C'est le cas par exemple de gouttelettes d'huile dans une émulsion huile/eau : au cours du temps ces gouttelettes peuvent s'agréger voire conduire à deux phases séparées.

Dans le cas des espèces amphipathiques, avec une concentration croissante d'un surfactant dans une solution aqueuse, on observe tout d'abord la formation d'une monocouche de molécules amphipathiques à l'interface eau-air. Leur tête polaire s'oriente vers la solution pour interagir avec les molécules d'eau. Leur queue hydrophobe, au contraire, se dirige vers l'air. Si la concentration dépasse une certaine valeur où la surface eau-air est tout occupée par les surfactants, la micellisation survient. C'est-à-dire au sein de la solution apparaît les particules d'agrégation (**Figure 19**). Cet assemblage a pour but également de minimiser le contact entre l'eau et les structures hydrophobes.

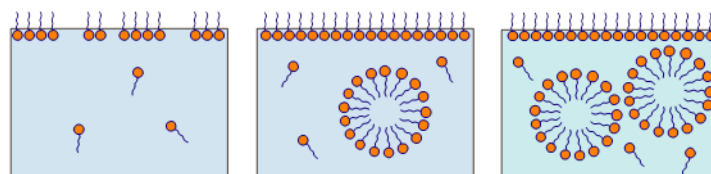


Figure 19 : Micellisation des surfactants

La géométrie des structures auto-assemblées dépend du volume de la tête polaire par rapport à celui de la queue hydrophobe. Un surfactant classique comprend une seule queue hydrophobe.

Par conséquent, il a en général la forme d'un cône. L'auto-association de celui-là donne lieu à une structure supramoléculaire, appelée « micelle » de forme sphéroïdale. Les phospholipides cylindriques forment plutôt une bicouche. Dans le troisième cas, des structures dont le volume de la partie hydrophobe est plus dominant que la tête polaire, à savoir, le diacylglycérol, le cholestérol et les amphiphiles faciales, ont tendance à former des micelles inverses (**Figure 20**).

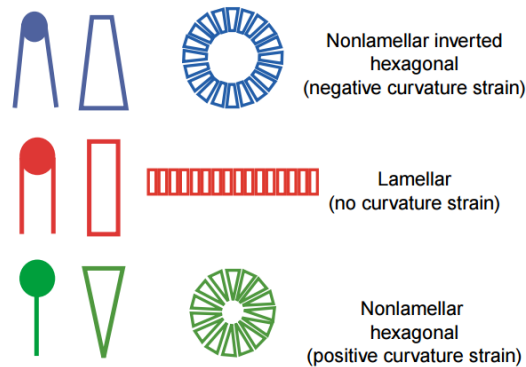


Figure 20 : La géométrie des structures auto-assemblées ^[79]

Un surfactant se caractérise non seulement par sa forme géométrique mais aussi par sa taille et son nombre d'agrégation (nombre de molécules de surfactant composant un agrégat).

IV.2.2. Réduction de tension de surface

Les molécules à la surface d'un liquide, entourées par moins de molécules similaires à elles, ont des énergies potentielles supérieures à celles de molécules similaires à l'intérieur du liquide. Par conséquent, une quantité de travail égale à cette différence d'énergie potentielle doit être dépensée pour amener une molécule de l'intérieur à la surface. La tension superficielle ou la tension de surface est définie comme la quantité minimale de travail nécessaire pour amener suffisamment de molécules de l'intérieur à la surface afin d'étendre la surface, et ceci par unité de surface.

En présence de molécules amphiphiles formant une monocouche à l'interface liquide-air, les molécules à la surface du liquide peuvent former cette fois-ci des interactions supplémentaires avec les amphiphiles. L'énergie potentielle des molécules ainsi que la tension superficielle du liquide sont réduites.^[77] La réduction de la tension de surface ou interfaciale est l'une des propriétés les plus caractéristiques des amphiphiles.

IV.2.3. Solubilisation

La solubilisation est définie comme le processus de dissolution d'une matière dans un solvant. Les agents de surface ont la capacité d'améliorer la solubilisation d'une matière peu soluble par l'intermédiaire des interactions entre cette matière à solubiliser et les micelles pour former des complexes thermodynamiquement stable.^[77]

IV.2.4. Concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) est la concentration à laquelle les surfactants commencent à former des structures micellaires. Associés à ce phénomène de micellisation, plusieurs propriétés de la solution sont également altérées, ce qui nous permet de mesurer la valeur de CMC : la tension de surface, la conductivité, la diffusion de la lumière, la fluorescence de certaines molécules, etc. Quant à la tension de surface, rappelons-nous que la formation des micelles survient lorsque la surface est saturée par les molécules surfactantes. On observe donc que la tension de surface atteint la valeur minimale à la CMC (**Figure 21**).

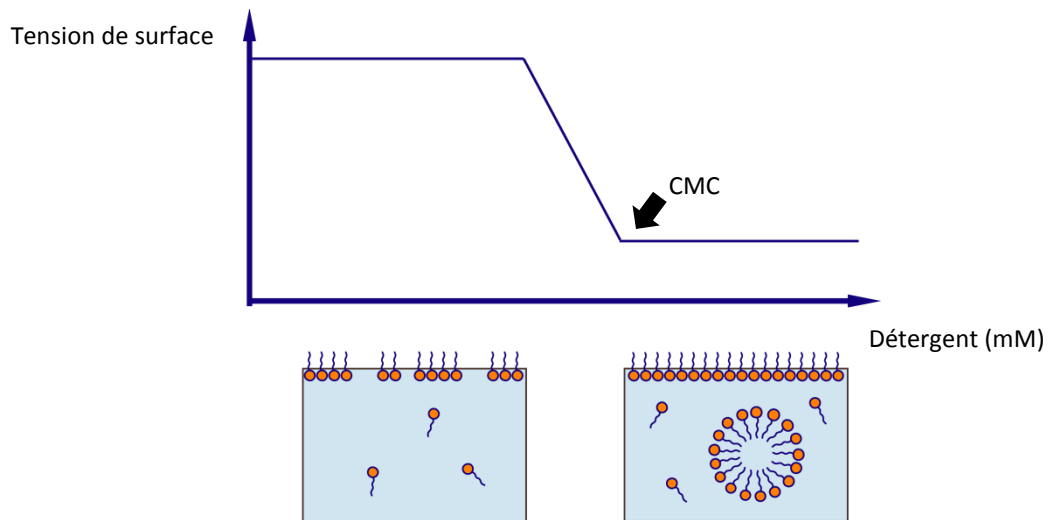


Figure 21 : Détermination de CMC

La valeur de CMC est un moyen d'estimer la tendance d'un surfactant à s'auto-assembler. Elle dépend de la température, de la présence de solutés en solution ainsi que de la structure du surfactant (le type, la longueur et la ramification de la queue hydrophobe, la charge de la tête polaire, le type du contre-ion, etc.).^[80]

Il est à noter que, pour une température donnée, si la CMC dépasse la solubilité du surfactant, la tension superficielle minimale est atteinte à la concentration saturée, plutôt qu'à la CMC. Le point de Krafft est la température à laquelle la solubilité d'un surfactant ionique devient égale

à la CMC. En dessous de cette température, on observe une précipitation au lieu de la micellisation aux concentrations élevées du surfactant.^[77]

IV.3. Les familles de détergents

IV.3.1. Comment classifie-t-on des détergents ?

Il existe différentes façons de classifier les détergents. Ils sont le plus souvent regroupés en quatre catégories en fonction de la charge portée par leur tête polaire :

- Les **détergents anioniques** portent une charge négative issue de groupements sulfate (le SDS), carboxylate (les savons), sulfonate (les alkylbenzène sulfonates) ou phosphate (les esters de phosphate).
- Les **détergents cationiques** sont chargés positivement par une tête polaire de type ammonium (les surfactants peptidiques) ou ammonium quaternaires (le chlorure de benzalkonium).
- Les **tensioactifs zwitterioniques** possèdent à la fois une charge négative et une charge positive (les oxydes d'amine).
- Les **tensioactifs non ioniques** ne possèdent aucune charge. Ce sont par exemple des dérivés saccharidiques (les MNGs), ou peguylés (le Triton X-100).

IV.3.2. Les principales familles de détergents utilisés en biologie des PMs

IV.3.2.1. Les oxydes d'amine

Cette famille de détergents zwitterioniques présente des propriétés particulièrement intéressantes pour les études structurales. Ces détergents peuvent former des micelles de petite taille, ce qui favorise la cristallogenèse et les études RMN. A cause de leur tête polaire chargée, ils sont toutefois des détergents forts et dénaturants.^[80] La **Figure 22** montre la structure du LDAO (n-dodécyl-*N,N*-diméthylamine-*N*-oxide).

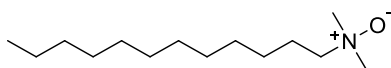


Figure 22 : Structure du LDAO

IV.3.2.2. Les dérivés de phospholipides

Les lysophospholipides sont des dérivés des phospholipides, produits par une hydrolyse de l'acide gras en position 2 du glycérol des phospholipides. Par exemple, la lysophosphatidylcholine (LPC) est un détergent zwitterionique dérivé de la phosphatidylcholine (**Figure 23**). Les lysophospholipides présentent les caractéristiques de détergents, ils sont capables de s'incorporer dans les membranes lipidiques et de les perturber. La déstabilisation des membranes est due à la forme géométrique conique de ces dérivés monoacylés, contrairement aux phospholipides qui sont cylindriques. Par conséquent, ils forment préférentiellement des structures micellaires dans l'eau plutôt que les bicouches lipidiques.^[81]

Les alkyles phosphocholines sont des analogues de la LPC dont la chaîne grasse est attachée directement à la choline *via* une liaison de type phosphoester. Par exemple, la **Figure 23** montre la structure de la dodécylphosphocholine (DPC ou Fos-Choline-12).

Ces détergents forment avantageusement de petites micelles. Ils sont souvent utilisés comme un système mimétique de la membrane dans les études RMN des PMs en solution.^[82,83]

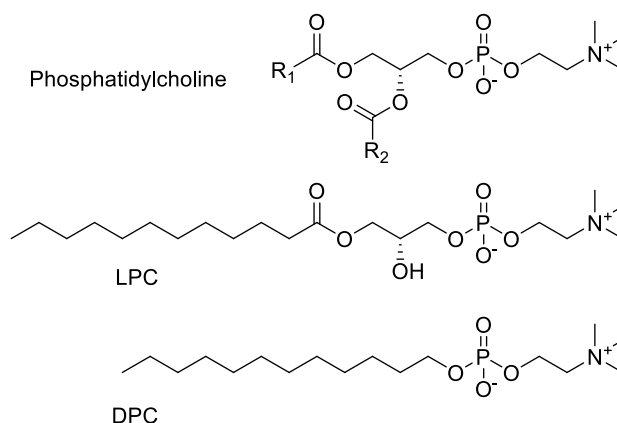


Figure 23 : Structure de la LPC et de la DPC, dérivés de la phosphatidylcholine

IV.3.2.3. Les détergents peguylés

Les alkyles polyoxyéthylènes (POEs) ont des formules de type C_xE_y (de C_8E_4 à $C_{12}E_{14}$), où « x » représente le nombre de groupes méthylène de la chaîne alkyle et « y » indique le nombre d'unités d'oxyéthylène de la chaîne polyéthylène glycol (PEG). Ces détergents se trouvent parmi les plus utilisés en cristallisation des PMs.^[84] On peut trouver également des agents

surfactants dont la chaîne alkyle linéaire est remplacée par d'autres motifs hydrophobes (e.g. Triton X-100). Quelques exemples de détergents peguylés sont regroupés dans **Figure 24**.

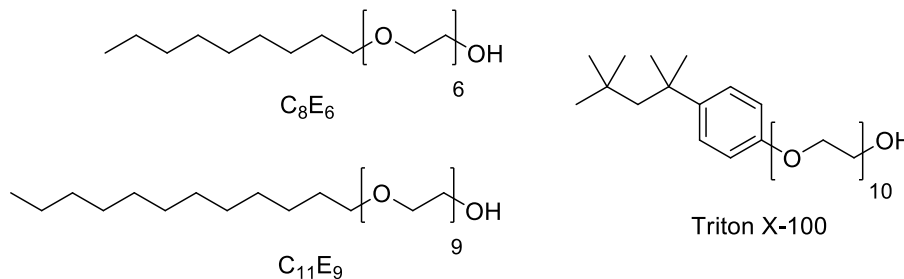


Figure 24 : Structure des détergents C₈E₆, C₁₁E₉ et Triton X-100

IV.3.2.4. Les alkyles glycosides

Les détergents non ioniques de type alkyle polyoxyéthylène ont été largement utilisés pour la solubilisation et la purification des PMs grâce à leur caractère doux et non-dénaturant. Toutefois ils sont difficiles à éliminer par dialyse à cause de leur faible CMC. Les alkyles glycosides ont été introduits pour pallier à ce problème. Ce type de détergents attire de plus en plus d'attention puisqu'ils permettent d'extraire efficacement les protéines tout en préservant leur activité. Les premiers alkyles glycosides décrits comprenaient simplement une chaîne hydrocarbonée linéaire liée à des saccharides, à savoir un glucoside (octyl glucoside – OG, par exemple) ou un maltoside (dodécyl maltoside – DDM, par exemple).^[85,86]

Plusieurs variantes de cette structure ont été proposées par la suite, aussi bien sur la tête polaire que sur la queue hydrophobe. Par exemple, un cyclohexyle est intégré dans la chaîne grasse pour produire les cyclohexyl-alkyl-maltosides (Cymals). Les modifications peuvent se situer au niveau de la liaison glycosidique où l'oxygène est remplacé par le soufre (alkyles thioglycosides). Le tréhalose peut aussi être une alternative intéressante au glucose et au maltose (alkyles tréhalosides).^[87]

Par doublement des groupements alkyles et des oses, on obtient une version dimérique dite « gemini », qui peut présenter une meilleure capacité d'auto-assemblage que l'analogue monomérique.^[77] A ce jour, les néopentylglycosides, incluant les MNGs (maltose-néopentylglycols) (**Figure 25**),^[88,89] et les GNGs (glucose-néopentylglycols),^[90] font partie des détergents les plus utilisés.^[84]

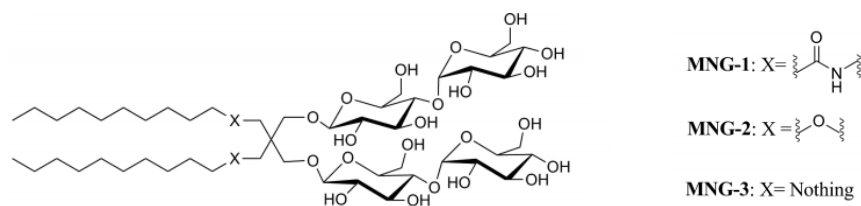


Figure 25 : Structure générale des MNGs

IV.3.2.5. Tripodes amphiphiles

Les détergents classiques contiennent généralement une longue queue hydrocarbonée. La flexibilité importante de cette chaîne empêche le complexe protéine-détergent de former les cristaux ordonnés. Pour pallier à ce problème, McQuade *et al.* ont conçu les tripodes amphiphiles, qui contiennent trois groupes alkyles portés par un carbone quaternaire. Cette contrainte rend ces détergents plus rigides ce qui favorise la formation des cristaux. Trois groupements apolaires augmentent également la surface hydrophobe et protègent plus efficacement les régions hydrophobes des PMs.^[91] En outre, cela rend les tripodes amphiphiles plus perturbants vis-à-vis de la membrane et améliore leur capacité extractante.^[92]

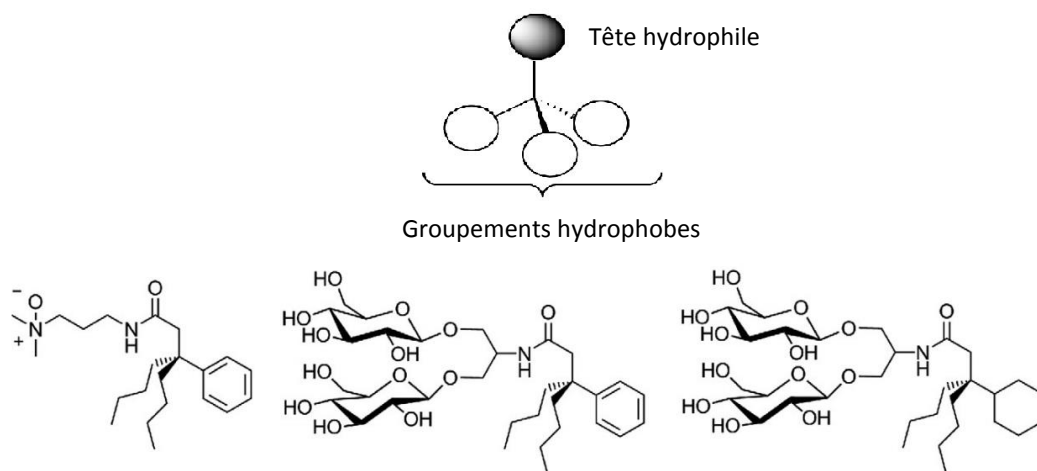


Figure 26 : Structure des tripodes amphiphiles ^[91,92]

IV.3.2.6. Amphiphiles faciales

Les « amphiphiles faciales » désignent une famille de molécules amphiphiles dérivées des acides biliaires. La plus grande surface hydrophobe confère à ces molécules un mode d'interactions bien différent avec les régions transmembranaire des PMs par rapport aux détergents classiques. En effet, ces détergents ont montré une bonne capacité stabilisante car

ils peuvent couvrir de manière plus efficace les régions hydrophobes des PMs, tout en formant un petit complexe protéine-détergent.^[93]

Les premiers amphiphiles faciaux introduits sont les dérivés zwitterioniques du cholate : le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate) et le CHAPSO (3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate) (**Figure 27**). Le caractère facial est amélioré en intégrant la tête polaire *via* les groupements hydroxyles au sein du noyau stéroïdien. Cette orientation latérale oblige les molécules à interagir face-à-face avec les régions transmembranaires des PMs.^[93,94]

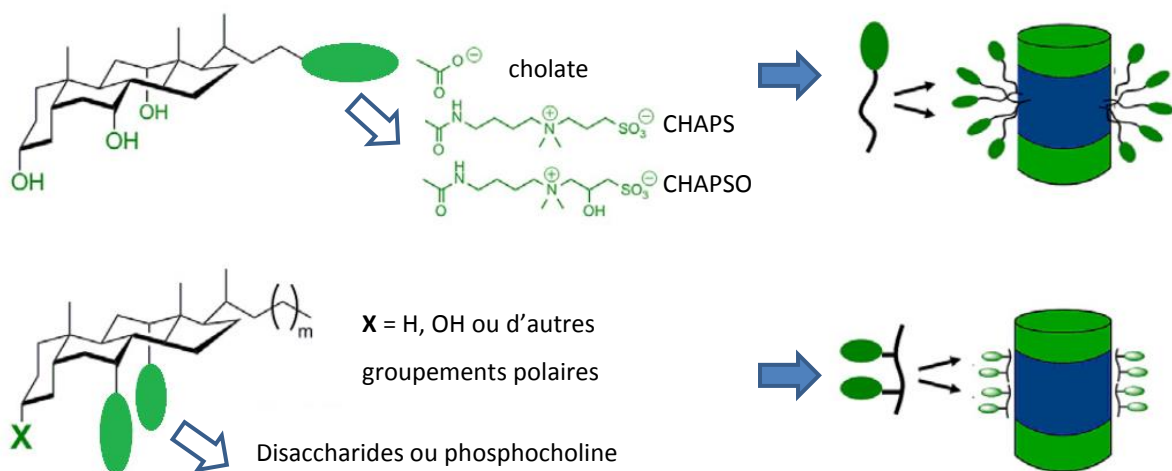


Figure 27 : Structure des amphiphiles faciaux dérivés du cholate et effet de l'orientation des groupements polaires sur l'organisation du complexe d'amphiphiles faciaux-protéine.^[95]

IV.3.2.7. Les détergents peptidiques

Les lipopeptides sont des peptides amphiphiles sous forme d'une hélice α comprenant 25 acides aminés qui portent deux chaînes alkyles à chaque extrémité. Cette architecture a pour objectif de reproduire l'épaisseur d'une bicouche lipidique afin de mimer l'interaction faciale entre une PM et les lipides membranaires. Ces lipopeptides non-dénaturants peuvent être ajoutés ou échangés avec les détergents classiques avant de mettre en place les études en cristallographie ou en RMN.^[96] Tao *et al.* ont proposé un autre design de lipopeptides, dont la structure générale consiste en huit acides aminés hydrophobes et hydrophiles alternés.^[97] Cette architecture forme une structure secondaire de type feuillet β et confère une amphiphilicité faciale. Malgré les propriétés intéressantes en terme de stabilisation, leur inconvénient majeur reste la difficulté d'obtention de ces composés à grande échelle.^[96]

Les détergents peptidiques à chaîne courte comprennent sept acides aminés. Cette chaîne peptidique est divisée en une tête hydrophile constituée d'un acide aspartique ou d'une lysine et d'une queue hydrophobe composée de six résidus d'alanine ou de valine. Ces peptides amphiphiles sont plus accessibles en grande quantité par rapport aux détergents lipopeptidiques. De plus, leur capacité stabilisante remarquable a été démontrée.^[98,99] Cependant, aucune structure de PM n'est résolue à ce jour en présence de ces détergents.

La troisième famille de surfactants peptidiques s'appelle les β -peptides, qui sont constitués des acides aminés hydrophobes et hydrophiles se liant alternativement. A chaque extrémité de la séquence peptidique, une chaîne alkyle est intégrée pour augmenter la lipophilie. Les peptides résultants s'organisent en feuillet β . Cette conformation leur confère la capacité de former de multiples liaisons hydrogène avec les régions transmembranaires. Cela est probablement la raison de leur propriété stabilisante remarquable pour les PMs.^[97]

La **Figure 28** illustre la structure des trois familles de détergents peptidiques.

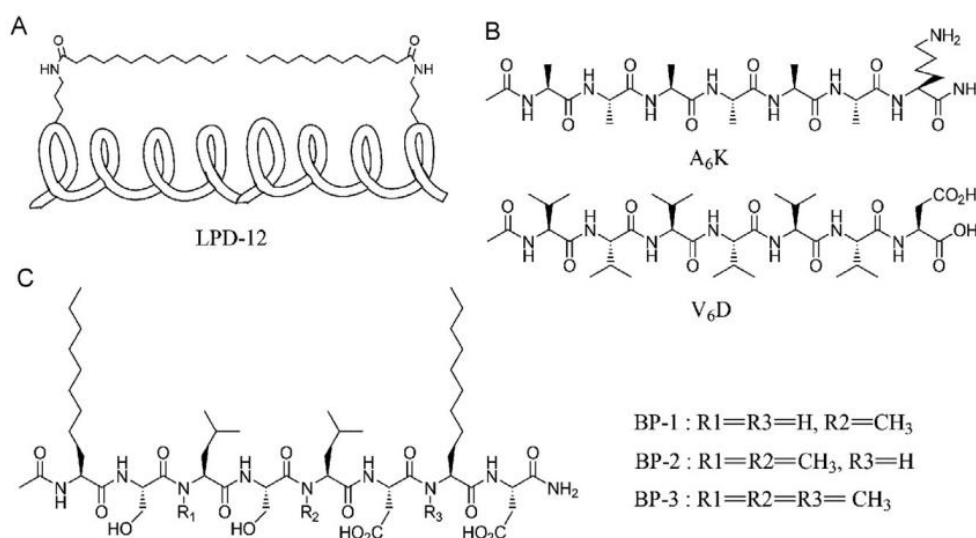


Figure 28 : Structure des détergents peptidiques. (A) Détergent lipopeptidique ; (B) peptides courts ; (C) β -peptides.^[92]

IV.3.2.8. Les détergents perfluorés

Ayant une valeur de CMC plus faible par rapport à leurs analogues hydrogénés, les surfactants fluorocarbonés sont donc intéressants pour former des micelles de petite taille favorable à la cristallographie.^[100] De plus, les chaînes alkyles fluorées sont à la fois hydrophobes et lipophobes. Leur contact défavorable avec les lipides membranaires pourrait

donc participer à une meilleure conservation des interactions lipide-protéine. Ils sont par conséquent considérés comme des détergents « doux », qui évitent la perte des lipides et des cofacteurs qui peuvent être essentiels pour l'activité et la stabilité des protéines. En outre, les chaînes fluorées, plus encombrantes, les empêchent de s'introduire dans la structure de la protéine et de déstabiliser leur interaction interne. Par contre, le caractère lipophile rend ces molécules moins extractantes. Par conséquent, il est nécessaire d'utiliser d'autres détergents lors de l'extraction et d'échanger ultérieurement avec un détergent fluoré.^[101]

IV.4. Problèmes liés aux détergents en biochimie des PMs

Conçus comme compétiteurs des lipides qui entourent les régions membranaires, les détergents ne présentent pas la même capacité de stabilisation. Afin d'optimiser l'utilisation des détergents à disposition et d'en concevoir de meilleures générations, il faut avoir conscience des problèmes souvent rencontrés et dont les détergents sont responsables.

IV.4.1. Echange de détergents avec le milieu

Contrairement aux lipides, les détergents dans les micelles s'échangent très vite avec ceux qui sont dans le milieu.^[102] Les régions hydrophobes des PMs, par conséquent exposées même si de façon temporaire avec le milieu, ont tendance à s'assembler et s'agréger pour se protéger mutuellement du milieu aqueux.

IV.4.2. Problèmes liés à la longue chaîne grasse de détergents

Des PMs peuvent être déstabilisées par l'intrusion de la longue chaîne aliphatique du détergent dans leur structure. Pour que le contact protéine-détergent soit limité seulement d'une manière superficielle, cette longue chaîne pourrait être remplacée par une structure plus rigide et encombrante en augmentant la surface hydrophobe.^[33]

D'autre part, comme abordé dans la section IV.3.2.5, la flexibilité de la chaîne grasse pose également des problèmes en cristallographie des PMs.

IV.4.3. Perte de l'intégralité de PMs

En présence du détergent, surtout aux concentrations élevées, la solution est considérée comme un bain hydrophobe dans lequel des éléments stabilisants pour les PMs tels que des lipides, des cofacteurs ou des sous-unités peuvent se dissocier, provoquant l'inactivation des

protéines (**Figure 29**). Il vaut donc mieux maintenir la concentration du détergent proche de la valeur de la CMC.^[33]

Les études cristallographiques ont montré que les lipides membranaires autour de la protéine peuvent contribuer à la préservation de sa structure 3D.^[103,104] De plus, certains lipides membranaires sont indispensables pour le fonctionnement normal des PMs.^[12] C'est pourquoi il faudrait retenir certains lipides natifs et éviter une délipidation complète. De préférence, un détergent devrait mimer les interactions lipide-protéine et devenir un substitut des lipides natifs.

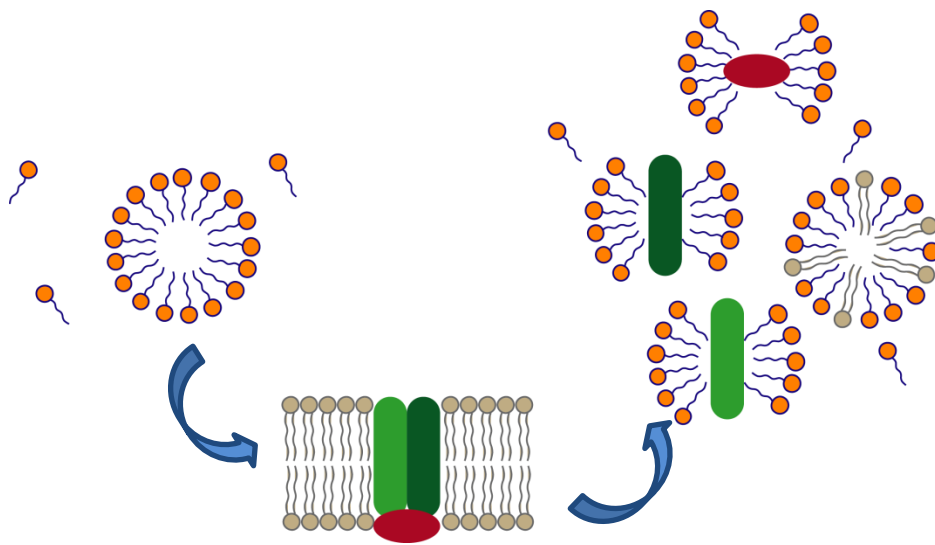


Figure 29 : Dissociation des composants d'une PM

IV.4.4. Perte de compacité entre les segments transmembranaires

L'organisation des lipides membranaires en double-couches est différente de la structure sphéroïdale des micelles. Dans la membrane, les segments interagissent de manière plus étroite alors que ces interactions sont plus relâchées au sein du complexe micellaire protéine-détergent (**Figure 30**).^[34,105]

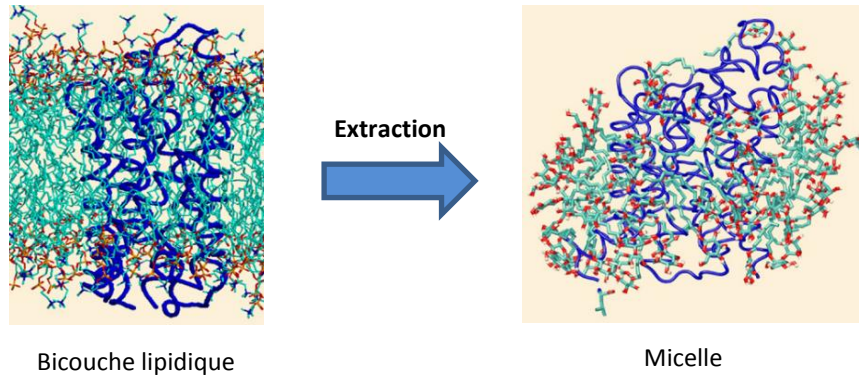


Figure 30 : Perte de compacité lors de l'extraction ^[34]

IV.4.5. Perte de contact protéine-protéine

Une des raisons pour laquelle les PMs sont difficiles à cristalliser est que les PMs elles-mêmes disposent d'une surface polaire limitée. Or l'interaction protéine-protéine est nécessaire pour développer et maintenir un réseau cristallin. De plus, pour maintenir les PMs en solution, celles-ci se trouvent au milieu des structures micellaires de détergents. Par conséquent, les protéines sont encore plus éloignées pour pouvoir cristalliser. Par ailleurs, les cristaux obtenus ne sont pas bien tassés (**Figure 31**).^[95] Il est donc conseillé de choisir les détergents qui forment de petites micelles pour favoriser la cristallisation. Malheureusement, ces détergents sont en général plus dénaturants par rapport à ceux qui forment de grands complexes avec les PMs.

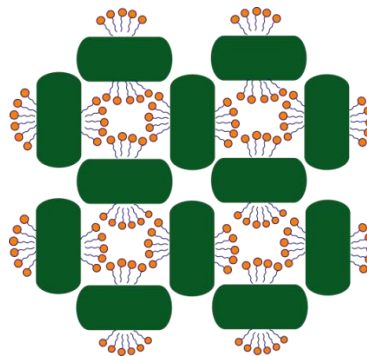


Figure 31 : Illustration d'un réseau cristallin de complexes PM-détergents

IV.5. Meilleure utilisation et conception de nouveaux détergents

Actuellement, il existe plus d'une centaine de détergents commercialement disponibles pour permettre aux biologistes de mener les études sur les PMs. Or, ils ont une efficacité limitée car seulement un nombre très modeste de détergents sont utilisés avec succès, dont les alkyles glycosides représentent la majeure partie (**Figure 32**).

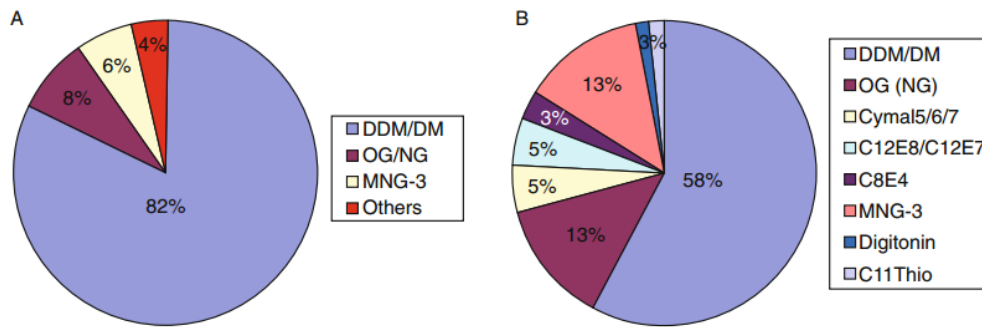


Figure 32 : Détergents utilisés pour l'extraction, purification (A) et cristallisation (B) des PMs chez les eukaryotes.^[84]

D'autre part, les caractéristiques de ces agents sont bien différentes, ce qui requiert une sélection prudente à chaque étape de manipulation. Le choix du détergent doit prendre en compte les risques potentiels (section IV.4) et les moyens pour les éviter. Les problèmes et les solutions proposées sont résumés dans le **Tableau 3**.

La conception de meilleurs détergents est un domaine très actif ces dernières années. On est encore à la recherche d'agents plus efficaces sur le plan de l'extraction, de la stabilisation ainsi que sur le plan de la cristallisation. En se basant sur les facteurs structuraux qui provoquent l'inactivation des PMs, la stratégie principale consiste à optimiser l'architecture de la tête polaire ainsi que celle de la queue hydrophobe pour optimiser l'interaction avec les PMs et former des micelles de petite taille.

Problèmes	Solutions
Dynamique de la structure micellaire	Renforcement de l'interaction protéine-détergent
Intrusion de la chaîne grasse	Queue hydrophobe plus rigide et encombrante
Délipidation	- Ajout de lipides en solution - Détergents ressemblant aux lipides
Perte d'intégralité	Concentration en détergent proche de la CMC
Perte de compacité	Détergents ressemblant aux lipides
Perte de contact protéine-protéine	- Réduction de la taille des micelles - Rigidification de la queue hydrophobe

Tableau 3 : Problèmes lors de l'utilisation de détergents et solutions

Optimisation de la partie hydrophobe

Les agents amphipathiques possédant une chaîne alkyle fluorée, plus encombrante, interfèrent d'une façon moindre dans l'interaction interne des PMs par rapport à leurs homologues hydrogénés. Cette propriété réduit le risque de dissociation des lipides et des cofacteurs essentiels pour les protéines (section IV.3.2.8).^[92]

Des alternatives à une chaîne grasse linéaire ont été proposées telles que des structures hydrophobes ramifiées,^[106] ou contenant des motifs cycliques, par exemple, les cyclohexyl-alkyl-maltosides (Cymals). Chae *et al.* ont proposé une structure hydrophobe contenant un adamantane afin de la rendre plus rigide tout en réduisant la taille des micelles (**Figure 33**).^[107]

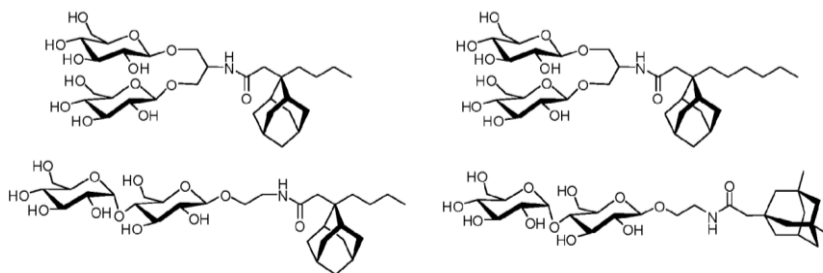


Figure 33 : Détergents dérivés d'adamantane ^[107]

Suite au succès des néopentylglycosides, plusieurs structures proposées récemment sont de type « gemini ». ^[108–111] La présence de deux chaînes aliphatiques permet de réduire leur longueur (et la taille des micelles) et confère à la molécule une géométrie cylindrique, plus proche de celle du phospholipide. Le même raisonnement a été appliqué pour concevoir les tripodes amphiphiles (section IV.3.2.5). Par ailleurs, afin de rendre la structure encore plus rigide, Das *et al.* ont introduit un cycle norbornane sur lequel les deux chaînes grasses sont fixées (**Figure 34**).^[108]

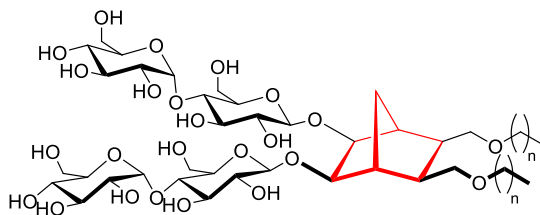


Figure 34 : Structure générale de détergents norbornane maltosides

Comme nous avons vu dans la section IV.3.2.6, une partie hydrophobe de type stéroïdien est aussi une bonne alternative à une chaîne grasse linéaire.

Optimisation de la partie hydrophile

On observe en général que les dérivés saccharidiques attirent le plus d'attention, grâce à leur nature non-ionique et non-dénaturante. Il est à noter que les dérivés les plus récents contiennent des motifs glycosidiques très ramifiés, au lieu d'un di-, tri- ou tétrasaccharide linéaire (**Figure 35**).^[109–111] Cette ramification permet de réduire considérablement la flexibilité et la taille du complexe protéine-détergent et de favoriser la cristallogénèse.

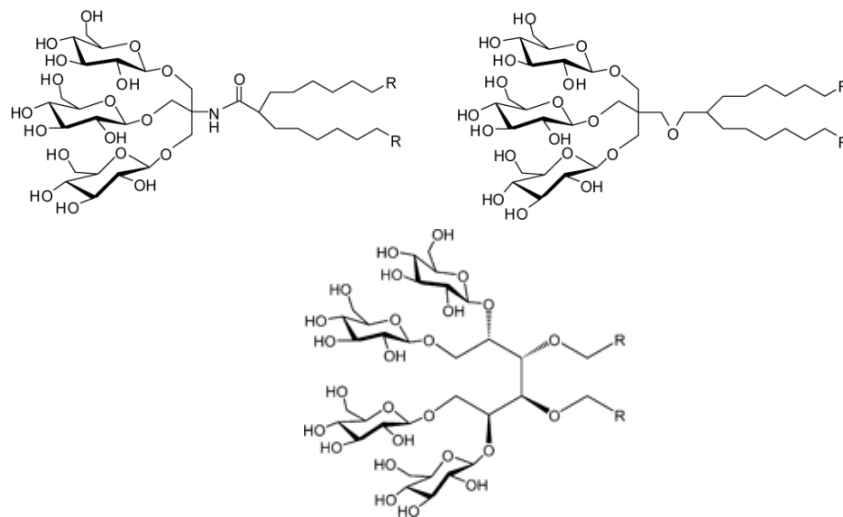


Figure 35 : Structures générales de détergents triglucosidiques et de détergents dérivés du mannitol ^[109,110]

L'équilibre entre la partie hydrophobe et hydrophile joue un rôle primordial qui devrait être pris en compte dans la sélection et la conception du détergent. De plus, cet équilibre se traduit par la capacité extractante et stabilisante. Cela veut dire que les détergents plus polaires (ioniques ou zwitterioniques) extraient mieux mais présentent un plus grand risque d'inactivation des PMs.

La biologie structurale des PMs attire de plus en plus d'attention et d'investissement de la part des scientifiques. Néanmoins, le chemin vers la résolution de structure de PMs est parsemé de difficultés. Certes, les nouveaux détergents sont de plus en plus sophistiqués pour mieux extraire, purifier, stabiliser et cristalliser les PMs. La structure de ces détergents est optimisée en prenant en compte des facteurs influençant la stabilité et l'intégralité des PMs. Or, très peu de détergents peuvent satisfaire les biologistes et démontrer leur efficacité en pratique. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au développement de nouveaux détergents. Dans le

chapitre suivant, nous détaillerons la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de ces agents sur les différentes PMs.

Dans un deuxième axe de mes travaux de thèse, nous avons focalisé notre intérêt sur ABCC2, un transporteur membranaire. Comme d'autres PMs, la structure 3D d'ABCC2 est actuellement inconnue, empêchant le développement d'inhibiteurs par approche « Structure-based drug design ». Pour pallier à ce manque de connaissance au niveau de la cible, nous introduirons dans le chapitre 3 une stratégie d'identification d'inhibiteurs d'ABCC2, suivie par une pharmacomodulation sur ces molécules afin de comprendre la relation structure-activité.

Chapitre 2 - Synthèse de nouveaux détergents et étude d'extraction et de stabilisation des PMs

Avant-propos

Dans le premier chapitre, nous avons fait une brève introduction sur la biochimie des PMs, comment les produire, les isoler et les étudier. L'état de l'art du domaine a été évoqué afin de comprendre les problèmes actuels ainsi que les mesures à prendre pour pallier à ceux-ci, pour lesquelles les détergents constituent un élément indispensable.

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps la conception de nouveaux agents surfactants. Nous détaillerons dans un second temps les différentes stratégies de synthèse pour obtenir les produits désirés. Les caractérisations physicochimiques seront présentées par la suite ainsi que les méthodes et les résultats obtenus concernant leur efficacité en biochimie des PMs.

I. Objectifs du projet

Les détergents actuellement utilisés ont été conçus en jouant sur l'optimisation de la balance hydrophilie-hydrophobie et des interactions classiques détergent-protéine, c'est-à-dire les interactions de van der Waals entre la partie hydrophobe des détergents et les acides aminés de la région transmembranaire. Plusieurs molécules récemment introduites sont des analogues de détergents connus.^[106,107,109,111-113] Paradoxalement, peu de détergents sont efficaces dans les études cristallographiques. L'introduction de nouvelles structures offrirait plus d'options aux biologistes, en particulier dans le screening cristallographique à haut débit.^[60]

Nos collaborateurs, l'équipe du Dr. Pierre Falson de l'IBCP, ont précédemment travaillé sur les détergents calix[4]aréniques (C₄C_n – n correspond au nombre d'atomes de carbone de la queue aliphatique) (**Figure 36**), dont l'originalité repose sur l'incorporation de fonctions carboxylate.^[36,114,115] Cet élément structural confère à cette famille de détergent de nouvelles interactions de type ionique avec les PMs, diminuant l'échange de détergents dans le complexe protéine-détergents avec ceux dans le milieu environnant. En effet, au pH

physiologique, ces fonctions sont chargées négativement pouvant former ainsi des ponts salins avec les résidus d'acide aminé chargés positivement (Lys, Arg). Ces derniers sont, en effet, nombreux dans la région cytoplasmique des PMs. De plus, cette propriété topologique universelle^[15,16,116] rendrait ce concept de « clip moléculaire » applicable pour toutes les PMs.

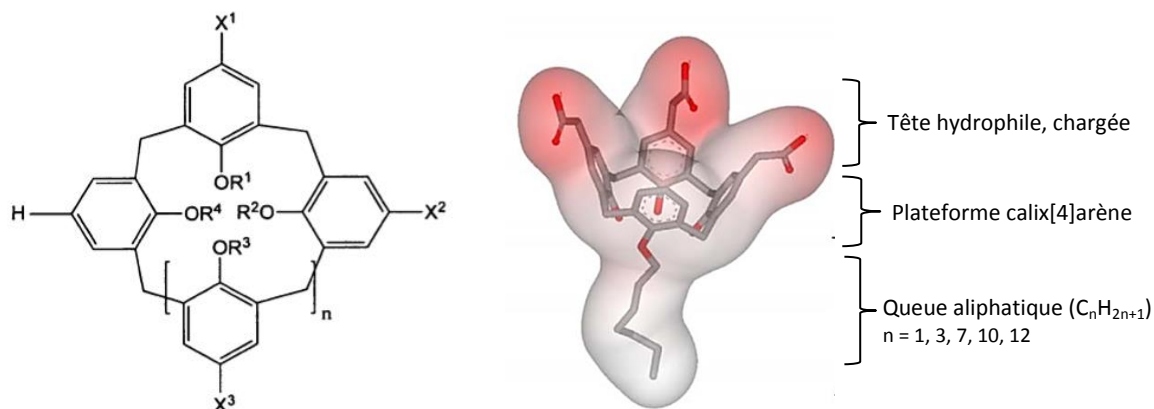


Figure 36 : Structure générale des calixarènes (à gauche) ; structure des détergents calix[4]aréniques (à droite)

[36,115]

Ces détergents calix[4]aréniques présentent néanmoins deux inconvénients. Premièrement, l'absorption UV de 220 à 330 nm gêne la détection et la quantification des protéines à 280 nm lors de protocoles de purification. D'autre part, ces composés peuvent chélater les cations divalents et, par conséquent, précipiter et bloquer les réactions biologiques dans lesquelles les métaux sont en jeu.

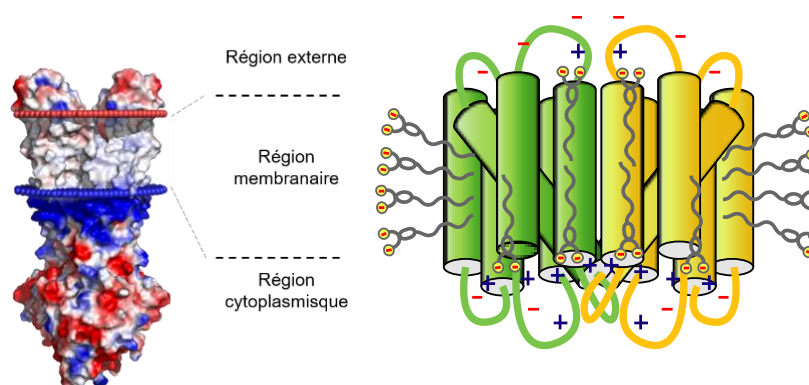


Figure 37 : Illustration d'un complexe clip-PM (modifiée selon ^[36])

Compte tenu de ces inconvénients, nous nous sommes investis dans la conception et la synthèse d'une nouvelle famille de détergents, en se basant toujours sur le principe de ponts

salins *via* des fonctions acides. Le nombre ainsi que la nature des fonctions acides sont des éléments-clés à respecter : il en faut au moins deux pour former un « clip » qui évite le relâchement de la PM en solution (**Figure 37**) ; il faut que la fonction acide soit préférentiellement de type carboxylique (ou carboxylate au pH physiologique) car elles sont plus douces et non dénaturantes pour les protéines. D'autres types d'acide comme l'acide sulfurique et l'acide sulfonique, que l'on retrouve par exemple dans le dodécylsulfate de sodium (SDS), peuvent dénaturer les protéines.

II. Synthèse

II.1. Conception

A propos du design de cette nouvelle famille de détergents « clips », trois éléments structuraux (tête polaire, queue hydrophobe et deux groupements carboxylates) sont inclus et construits sur une « plateforme » – la sérine – qui dispose de trois sites de fonctionnalisation : les fonctions acide, amine et hydroxyle. Nous envisagions initialement d'intégrer les groupements carboxylate *via* la fonction acide de la sérine et la queue hydrophobe *via* sa fonction amine. La fonction hydroxyle, laissée libre dans un premier temps, pourra être impliquée dans la conjugaison avec d'autres structures polaires stabilisantes comme les saccharides ou les chaînes PEG dans un deuxième temps.

II.2. Synthèse de détergents « clips » de première génération

Tout d'abord, nous avons préparé les détergents en nous focalisant seulement sur le couplage avec des fonctions carboxylate et une chaîne grasse (**Figure 38**).

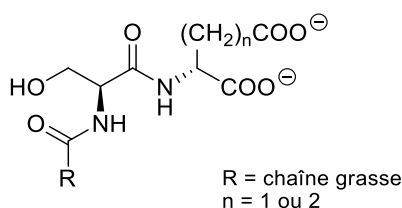


Figure 38 : Formule générale des détergents de première génération

II.2.1. Stratégies initiales

La synthèse envisagée comporte six étapes à partir de la sérine dont l'amine et l'hydroxyle sont protégés par un fluorénylméthoxycarbone (Fmoc) et un groupement *tert*-butyl (*t*-Bu) respectivement (**Schéma 2**). Les deux groupements carboxylates désirés sont ensuite

introduits sous forme d'ester méthylique de l'acide glutamique, par couplage avec la sérine *via* la formation d'une liaison amide en milieu basique, à l'aide du TBTU (tétrafluoroborate de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium) comme agent de couplage.

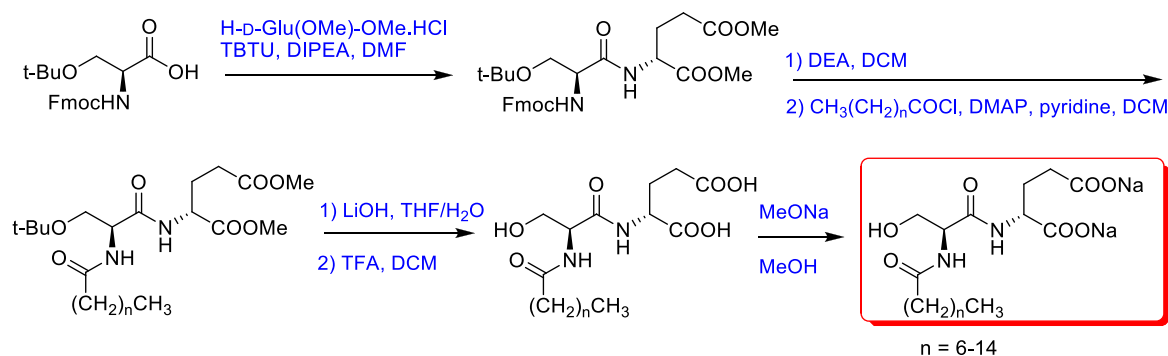


Schéma 2 : Stratégie initiale pour la synthèse de détergents non-sucrés

Après déprotection du Fmoc par la diéthylamine (DEA), une chaîne grasse est greffée sur l'amine déprotégée par une acylation avec le chlorure d'acyle correspondant. La synthèse s'enchaîne par une hydrolyse des esters en présence d'hydroxyde de lithium (LiOH) puis une déprotection du *t*-Bu est réalisée en présence d'acide trifluoroacétique (TFA).

Il faut noter qu'aussitôt la déprotection du Fmoc est réalisée, l'amine libre nucléophile peut attaquer sur le carbonyle de la fonction ester. Le produit de cette cyclisation, appelé dicétopipérazine, très stable, est obtenu majoritairement et empêche la poursuite de la synthèse (**Schéma 3**).

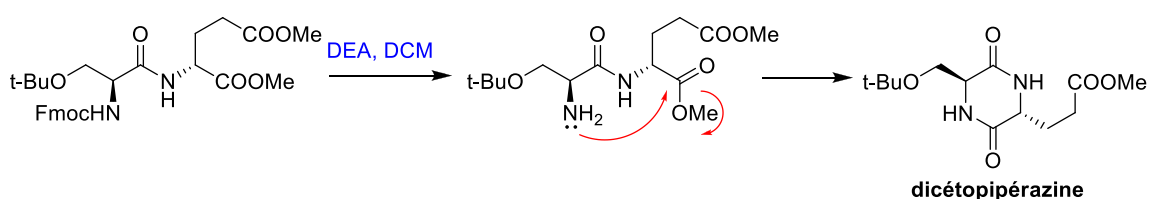


Schéma 3 : Mécanisme de cyclisation après la déprotection du Fmoc

Par la suite, pour éviter cette réaction indésirable, l'étape d'acylation de l'amine a été réalisée avant le couplage peptidique sérine-glutamate. Cette modification nécessite deux étapes en plus pour protéger (par une benzylation) et déprotéger (par une hydrogénation) la fonction acide de la sérine. En plus, cette stratégie est moins convergente pour obtenir une série d'analogues avec la chaîne grasse de différentes longueurs (**Schéma 4**).

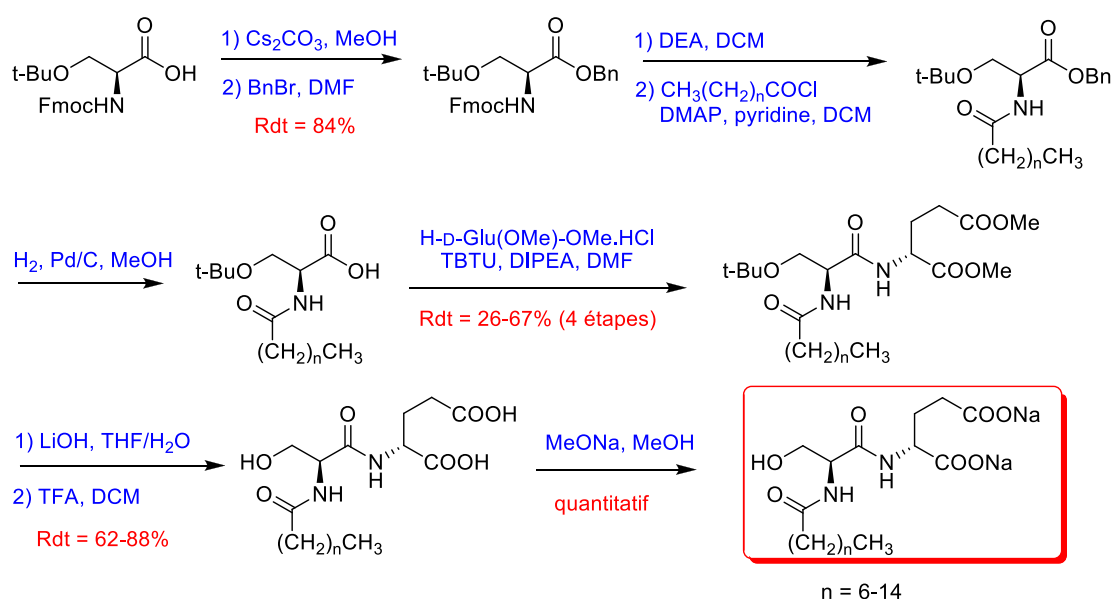


Schéma 4 : Deuxième stratégie de synthèse des détergents de première génération

II.2.2. Stratégie améliorée

Afin de poursuivre l'amélioration de la synthèse de ces détergents, la formation de la dicétopipérazine a pu être limitée par une deuxième approche, visant le remplacement des esters méthyliques par les esters benzyliques. En effet, ces derniers sont plus encombrants pour une attaque nucléophile de l'amine libre. La stratégie initiale, ne comportant que six étapes de synthèse, a ainsi pu être reprise (**Schéma 5**).

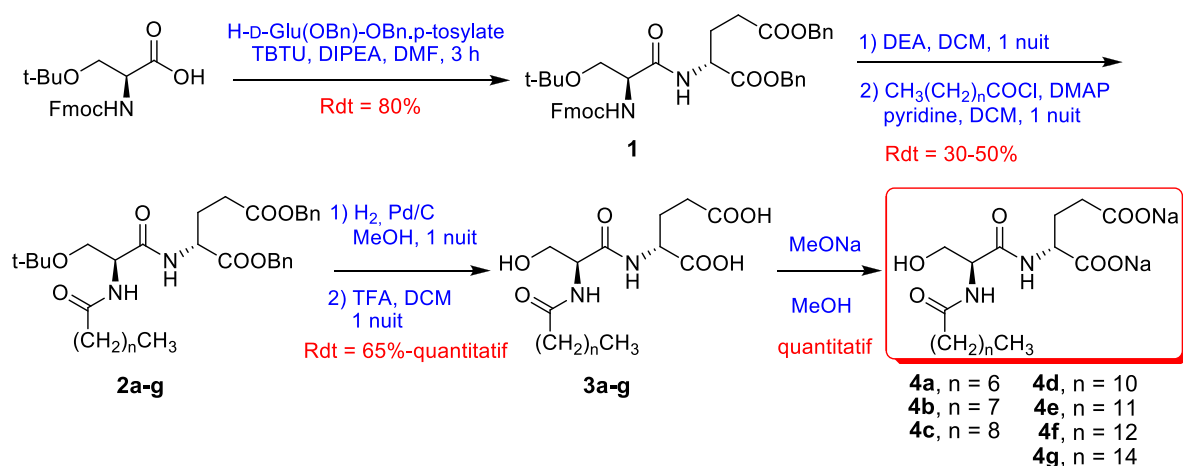


Schéma 5 : Troisième stratégie de synthèse de détergents de première génération

Sachant que la longueur de la queue hydrophobe représente un facteur influençant les propriétés physicochimique des surfactants, nous avons préparé 7 analogues (**4a** à **4g**) en faisant varier la longueur de la chaîne hydrocarbonée (n = 6-14). Ensuite, pour estimer l'effet

de la distance entre les deux groupements carboxylates sur le comportement physicochimique et l'efficacité en biochimie des PMs, nous avons préparé le composé **8**, un analogue du composé **4f**, en suivant les mêmes conditions de synthèse mais en remplaçant le réactif H-D-Glu(OBn)-OBn.p-tosylate par le H-D-Asp(OBn)-OBn.p-tosylate (**Schéma 6**). Ce dernier a été préparé par benzylation de l'acide D-aspartique (H-D-Asp-OH) en présence d'alcool benzylique et d'acide p-tosylique.

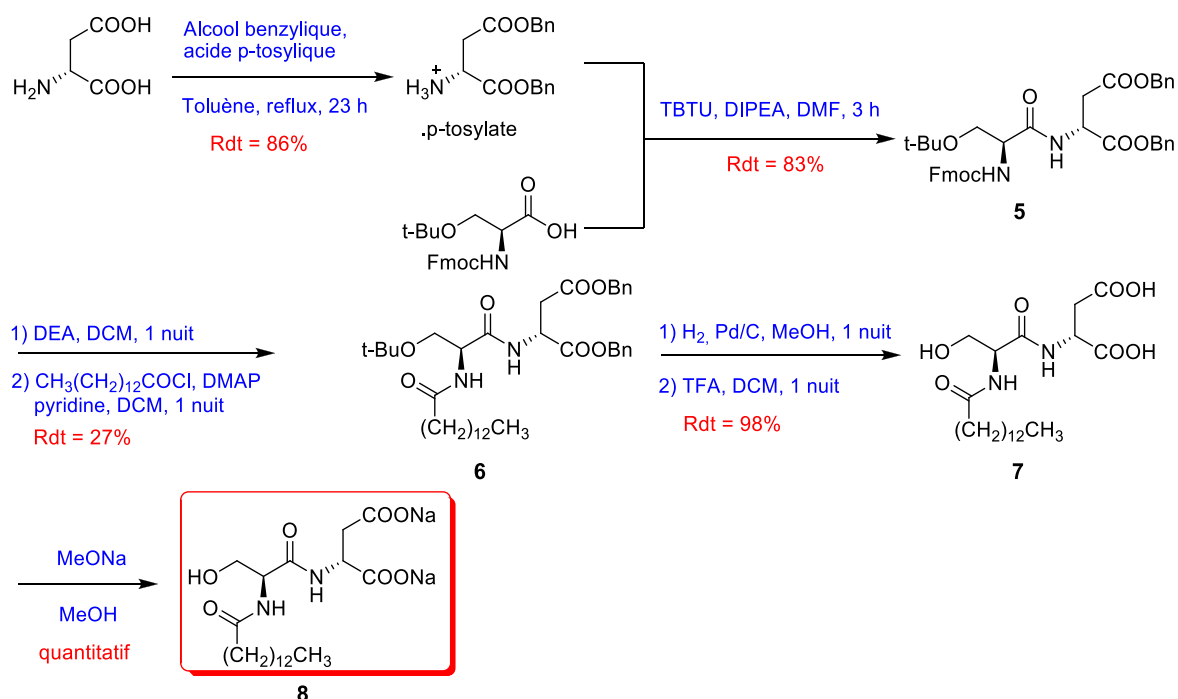


Schéma 6 : Synthèse du composé **8**

Nous avons synthétisé le composé **11**, un dérivé du **4d** dont la chaîne grasse est deutérée. Ce composé est utilisé comme étalon dans les essais de dosage de son analogue non deutéré par spectrométrie de masse.^[117] Concernant sa synthèse, puisque le chlorure d'acyle correspondant de l'acide dodécanoïque deutéré n'est pas commercialement disponible, nous avons décidé d'effectuer le couplage peptidique direct entre l'acide dodécanoïque deutéré et le composé **1** déprotégé (**Schéma 7**). L'obtention du bon produit a été vérifiée par RMN ¹³C et HRMS. Malgré une faible intensité, le signal du carbone -CD₃ se voit sur la RMN ¹³C sous forme d'un septuplet ; ceux des carbones -CD₂- sont sous forme de quintuplet (¹J_{C,D} = 18-20 Hz).

Afin de comparer l'impact du type de contre-ion des groupements carboxylates, le composé **12**, un analogue du **4f**, a été préparé sous forme de sel de potassium à la place de sodium (**Figure 39**).

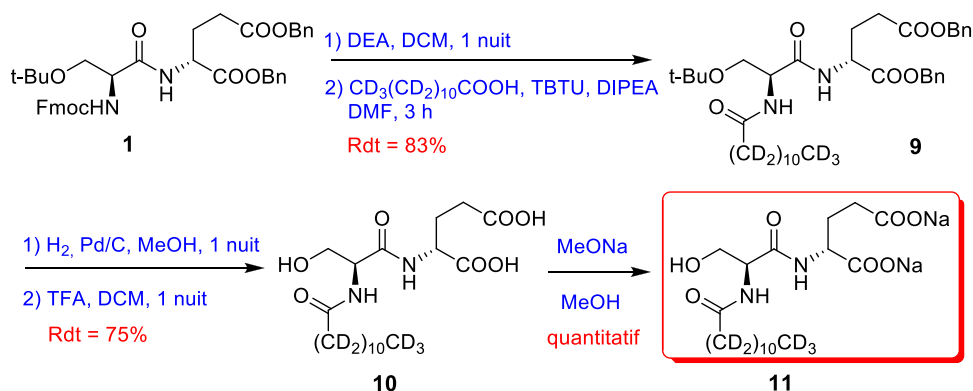


Schéma 7 : Synthèse du composé **11**

La **Figure 39** regroupe la structure de tous les produits finaux de la première famille. Ces « prototypes » servent à valider notre design et déterminer la (les) meilleure(s) structure(s) destinée(s) à la synthèse des dérivés conjugués (parties II.3 et II.4).

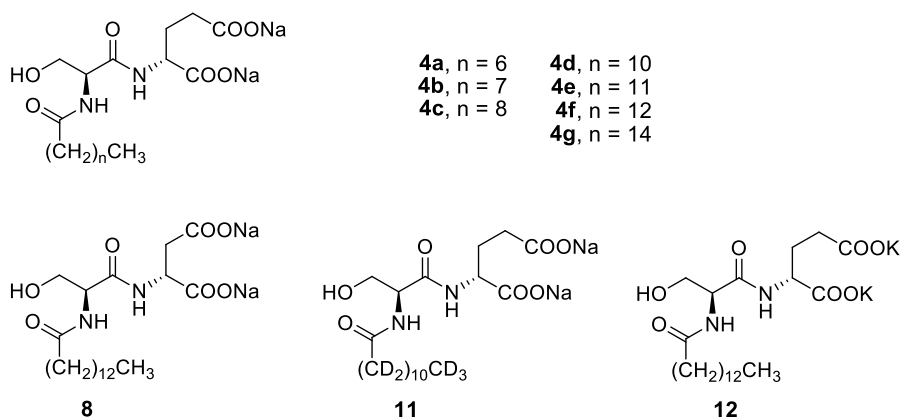


Figure 39 : Structure des détergents de première génération

II.3. Synthèse de détergents « clips » glycosylés

Dans un deuxième temps, nous avons mis au point la conjugaison d'un élément stabilisant complémentaire dans la tête polaire. Comme les détergents portant un mono ou disaccharide (par exemple MNG, OG, etc.) présentent une capacité stabilisante supérieure, il est raisonnable d'essayer d'intégrer ce motif dans la structure de nos détergents, dans le but de les rendre plus stabilisants pour les PMs.

Lors de travaux préliminaires, l'équipe a essayé d'intégrer un saccharide sur la « plateforme » (**Figure 38**) *via* le groupement hydroxyle de la sérine. Les tests ont été menés en premier lieu par glycosylation sur le groupement hydroxyle préalablement déprotégé par le TFA. Cette stratégie permettrait d'obtenir des glycoconjugués (sous forme protégée) directement en une étape (**Schéma 8**).

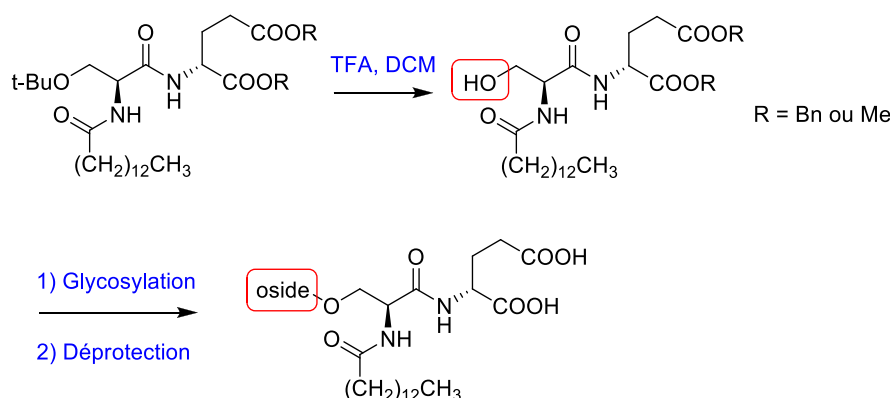
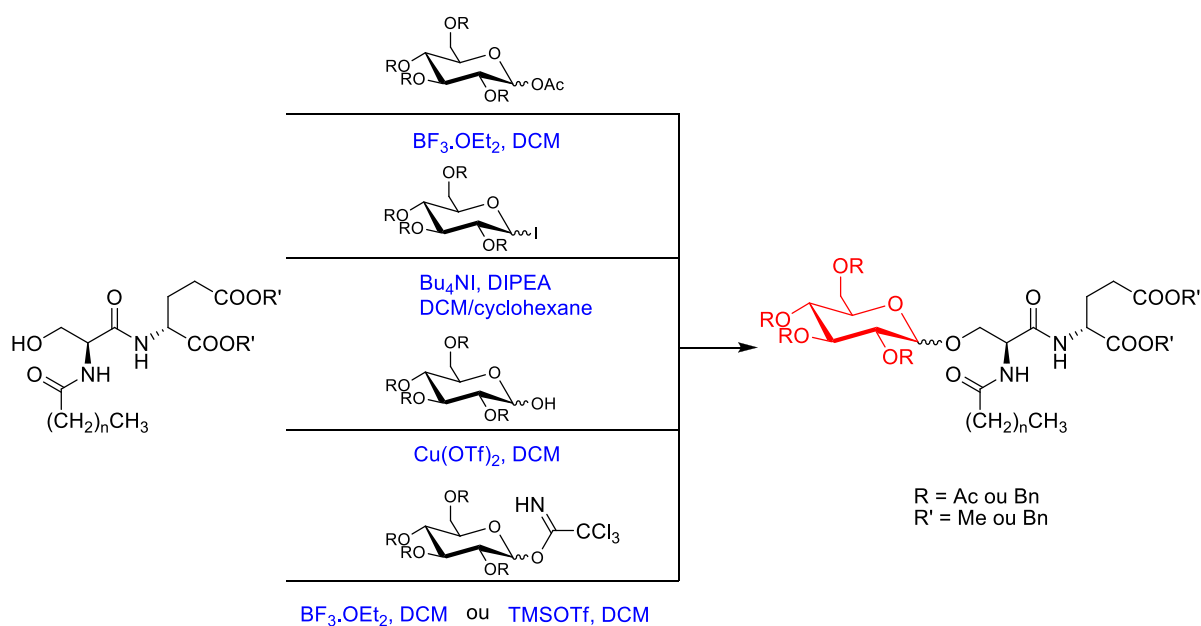


Schéma 8 : Stratégie initiale pour la glyco-conjugaison

Les conditions de glycosylation étudiées pendant les travaux de thèse du Dr. Amel Meguellati (**Schéma 9**) se sont avérées difficiles et ont mené à des rendements très faibles : glycosylation en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ avec le D-glucopyranose peracétylé ou activé en trichloroacétimide ; greffage du D-glucopyranose protégé en présence de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$; glycosylation avec le D-glucopyranose protégé et activé sous forme de trichloroacétimide ou d'iodure en utilisant le TMSOTf ou le Bu_4NI .^[118]

Schéma 9 : Conditions de glycosylation étudiées ^[118]

Seules les conditions en présence du $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ont permis d'obtenir les produits désirés sous forme protégée (Schéma 10).

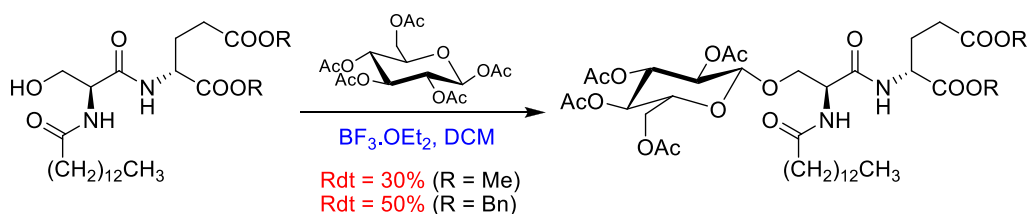
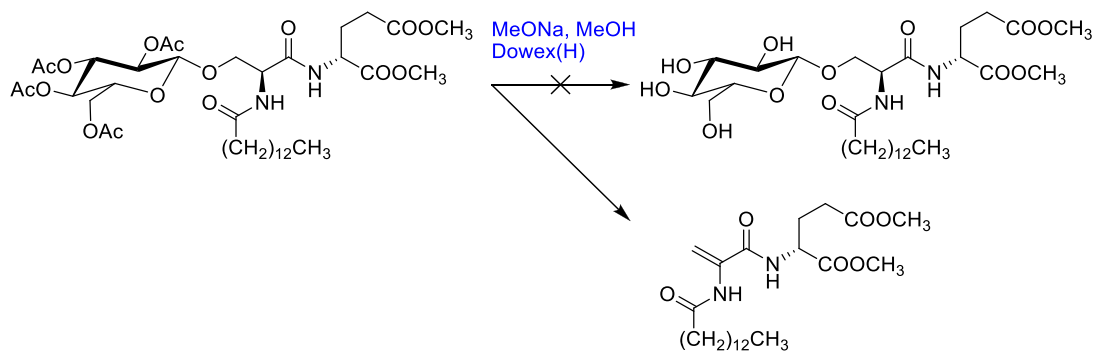


Schéma 10 : Synthèse réussie d'un détergent glycosylé (sous forme protégée)

Par la suite, il a fallu déprotéger les acétates sur le sucre en utilisant le méthanolate de sodium (MeONa) dans le méthanol (réaction de Zemplén). Même si le MeONa a été utilisé en quantité catalytique, le produit n'a pas été retrouvé. Les analyses de RMN et MS ont mis en évidence une coupure au niveau de la liaison glycosylique selon un mécanisme de β -élimination en milieu basique. Cette réaction indésirable est courante en chimie des glycopeptides si la glycosylation se trouve au niveau de C_β de thréonine ou sérine,^[119,120] car elle forme favorablement un carbonyl α,β insaturé stabilisé.

Schéma 11 : Réaction parasite de β -élimination

Pour contourner ce problème, nous avons tenté de remplacer les conditions de déprotection conventionnelles avec le MeONa par une voie enzymatique avec la lipase WG187. Cette réaction s'est avérée longue et n'a donné qu'une conversion partielle.

Nous avons finalement décidé de revoir dès le début notre stratégie pour arriver à l'idée de greffer des saccharides *via* la chimie « click ». Ce terme, introduit en premier par le Professeur K. B. Sharpless et ses collaborateurs en 2001,^[121] comprend les réactions de couplage *via* la formation de liaisons contenant un hétéroatome de type C-X-C. Elles doivent satisfaire quelques critères : il s'agit de réactions de hauts rendements, stéréospécifiques, modulables, qui se produisent dans des conditions douces, pouvant être utilisées à grande échelle et dont les produits sont facilement purifiés. Les réactions ont pour but de créer rapidement et de manière combinatoire des molécules avec une grande diversité. C'est pourquoi la chimie « click » trouve ses champs d'application surtout en nanotechnologie, nanomédecine, bioconjugaison et chimie médicinale.^[122,123]

Afin qu'une réaction puisse satisfaire à ces paramètres, les deux réactifs doivent réagir entre eux pour conduire à un produit particulièrement favorable d'un point de vue thermodynamique. Prenons quelques exemples : les réactions de cycloadditions incluant la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen ou la réaction de Diels-Alder, la réaction thiol-ène, les substitutions nucléophiles qui impliquent l'ouverture des hétérocycles à haute tension, à savoir les époxydes, les aziridines, les ions d'aziridinium, etc.^[121]

En empruntant cette stratégie, on s'attendait tout d'abord à ce que le rendement de conjugaison soit amélioré puisqu'il s'agit d'un des avantages de la chimie « click ». D'autre part, l'encombrement stérique au niveau du site réactionnel est réduit, en intercalant un bras

espaceur entre le sucre et l'autre partie de la molécule. Par ailleurs, la β -élimination ne pourrait plus se reproduire.

Pour ce faire, nous avons préparé d'une part les dérivés saccharidiques et d'autre part la sérine fonctionnalisés tous les deux par des groupements réagissant l'un avec l'autre selon les réactions de chimie « click ». La stratégie générale est illustrée dans le **Schéma 12**. Nous avons envisagé deux stratégies, la première a été mise au point *via* la réaction thiol-ène, la deuxième *via* la réaction de Huisgen ou CuAAC (Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition).

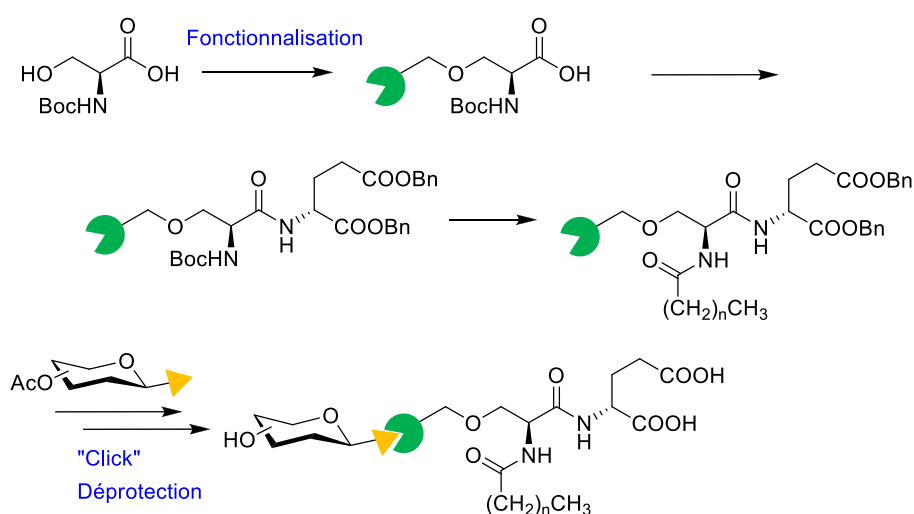


Schéma 12 : Stratégie générale pour la glyco-conjugaison

II.3.1. Synthèse de détergents glycosylés *via* la réaction thiol-ène

La réaction thiol-ène consiste en un couplage entre deux molécules : la première porte un groupement thiol (-SH) qui s'additionne sur la double liaison C=C de la deuxième. La réaction « click » se reproduit sous irradiation UV selon un mécanisme radicalaire. Il faut alors utiliser un photoinitiateur, en l'occurrence la 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA), qui se dégrade sous UV en formant les radicaux libres et initie la réaction en chaîne.

Au niveau synthétique, la sérine est fonctionnalisée *via* son groupement hydroxyle par une allylation. La double liaison C=C introduite peut alors réagir selon la réaction thiol-ène avec un dérivé saccharidique possédant un groupement thiol. Le 1-thio- β -D-glucose peracétylé commercial est utilisé. La réaction de couplage se termine assez rapidement au bout de 2

heures à température ambiante sous UV, avec une conversion totale (**Schéma 13**). Les produits ont été isolés par chromatographie sur colonne avec environ 70% de rendement.

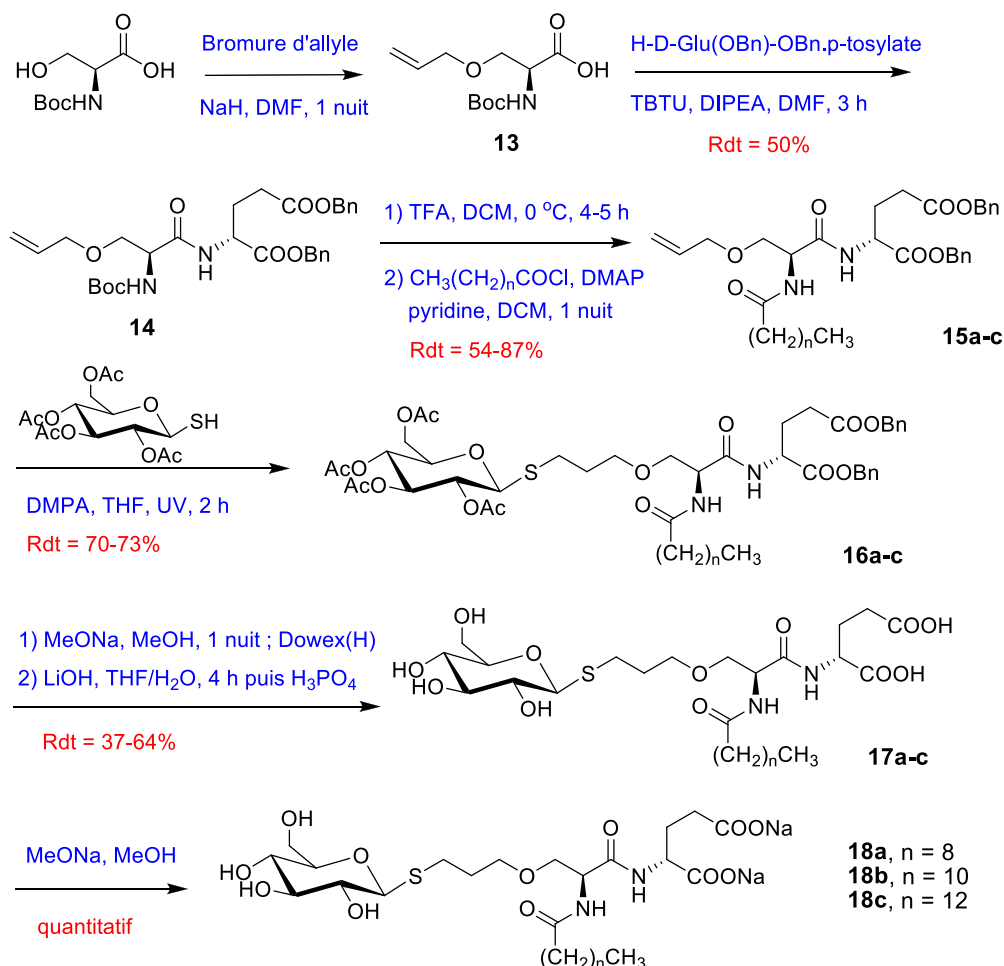


Schéma 13 : Synthèse des détergents glycosylés *via* la réaction thiol-ène

Lors de la réaction de couplage, la formation du produit désiré a été confirmée par RMN ^1H : des signaux des protons éthyléniques vers 5,20 et 5,80 ppm disparaissent et, mis à part la présence des protons saccharidiques supplémentaires, nous avons observé un nouveau multiplet vers 2,68 ppm et un multiplet vers 1,78 ppm, chacun intégrant pour deux protons du bras espaceur formé $\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ (**Figure 40**).

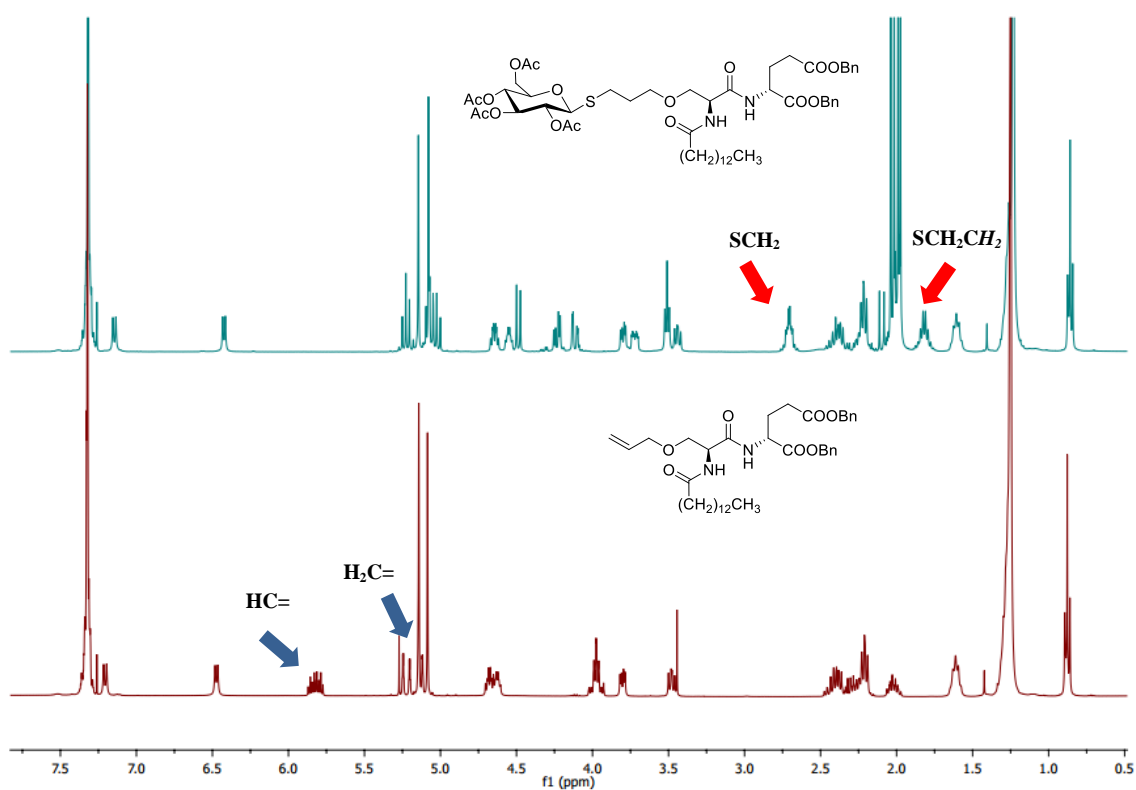


Figure 40 : Spectres de RMN ^1H dans le CDCl_3 du produit (**16c**) et du produit de départ (**15c**) de la réaction thiol-ène

Lors de l'étape suivante de déprotection des groupements acétates dans les conditions de Zemplén, nous avons observé une trans-estérification, même lorsqu'une quantité catalytique du MeONa a été mise en réaction. Le produit formé n'est pas sous forme d'ester benzylique mais sous forme d'ester méthylique, détecté par l'apparition de deux singulets qui intègrent pour trois protons vers 3,60 ppm en RMN ^1H (**Figure 41**).

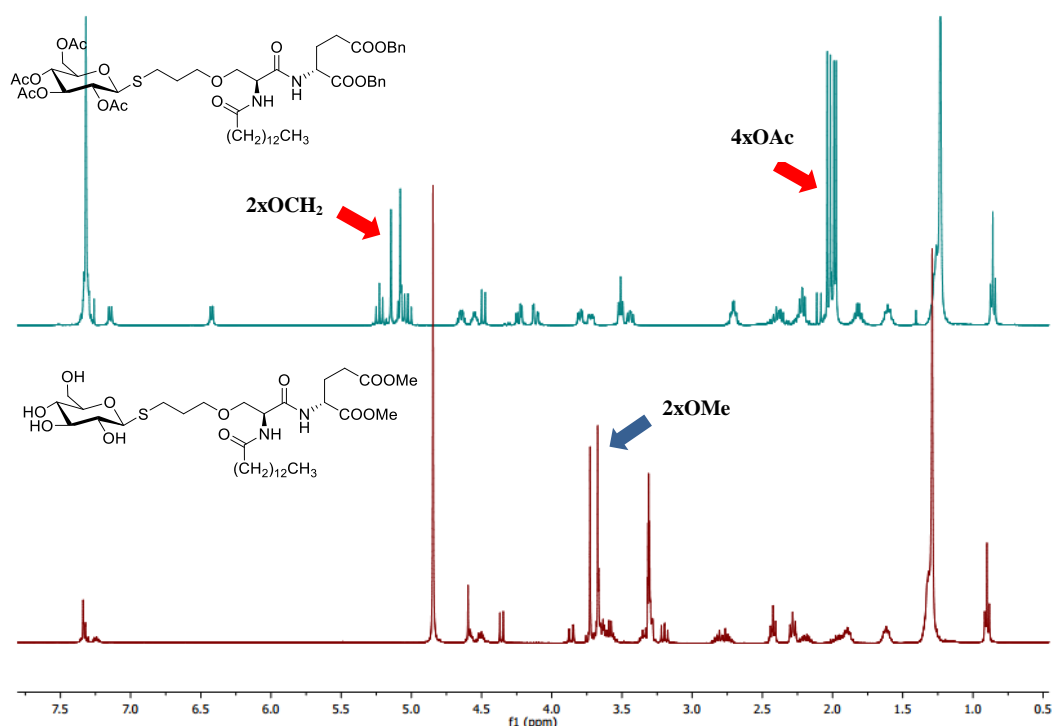
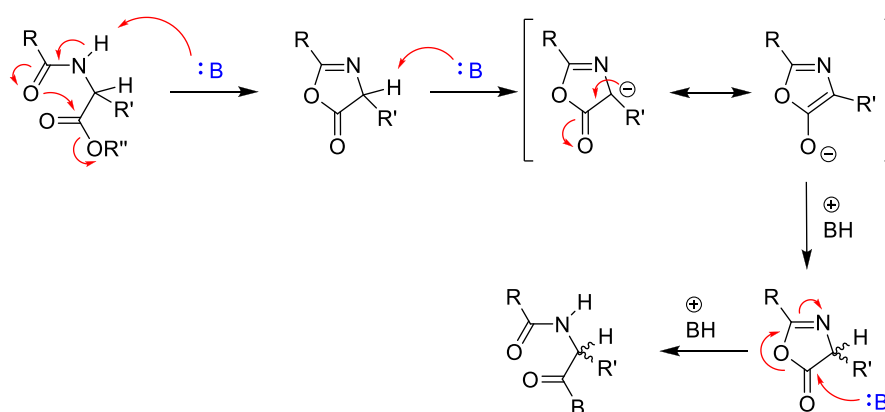


Figure 41 : Spectres de RMN ¹H du produit de départ (dans le CDCl₃) et du produit de la déprotection du sucre (dans le CD₃OD), montrant une trans-estérification

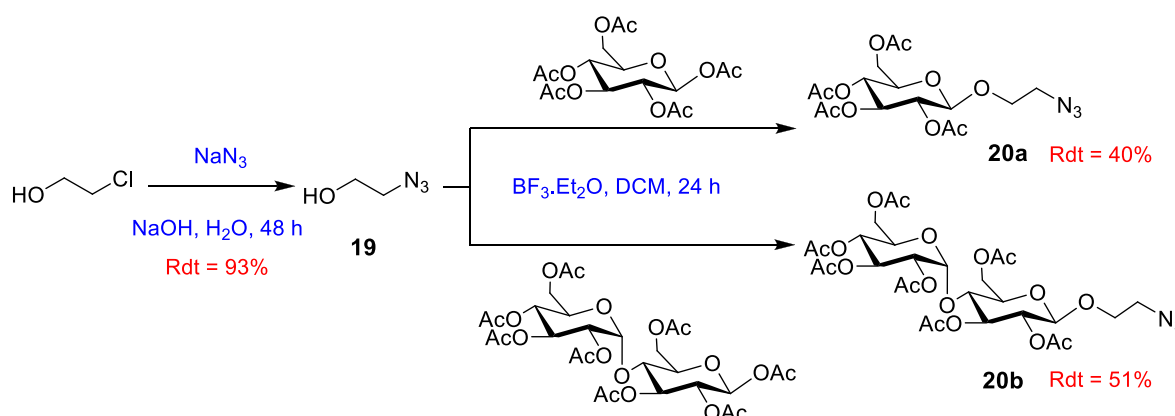
La débenzylation par hydrogénation initialement prévue a donc dû être remplacée par une hydrolyse en présence du LiOH, ce qui peut entraîner un risque d'épimérisation des centres asymétriques. En effet, une racémisation du C_α du glutamate a déjà été rapportée dans la littérature s'il est sous forme d'ester.^[124–126] Le mécanisme, catalysé par une base, consiste en une cyclisation par attaque nucléophile de l'oxygène de la fonction amide sur le carbonyle de la fonction ester. Le cycle oxazolone formé subit par la suite une racémisation au niveau du C_α en présence d'une base (**Schéma 14**). Nous avons observé par RMN, occasionnellement, la formation d'un mélange de diastéréoisomères lorsque le pH ou le temps de réaction étaient excessifs.

Sachant que la stéréochimie influence considérablement les propriétés physicochimiques des surfactants,^[127] cette étape s'avère la plus délicate dans la synthèse. Il est en effet primordial de contrôler très précisément le pH, la température, le temps de réaction et les concentrations des réactifs afin d'avoir une hydrolyse totale tout en évitant la racémisation.

Schéma 14 : Mécanisme de racémisation d'ester d'un peptide ^[124]

II.3.2. Synthèse de détergents glycosylés *via* la réaction de Huisgen

La réaction de Huisgen consiste en une cycloaddition entre deux molécules : la première porte un groupement azoture $\text{—N}^{\ominus}\text{—N}^{\oplus}\text{≡N}$ qui réagit avec la liaison acétylénique —C≡CH de la deuxième. Sans catalyseur métallique, deux produits de type 1,2,3-triazole sont formés si l'alcyne est asymétrique : le 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué et le 1,2,3-triazole 1,5-disubstitué. En présence de cuivre(I), un seul régioisomère est sélectivement formé : le 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué. Cette réaction est nommée CuAAC (Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition). Afin de mettre en place le couplage par CuAAC, les dérivés du glucose et du maltose portant un azoture (**20a** et **20b**) ont été préparés en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ à partir de l'azido éthanol (**19**) et du glucose ou du maltose peracétylé (Schéma 15).

Schéma 15 : Préparation des composés **20a** et **20b**

Dans un deuxième temps, nous avons préparé la sérine propargylée *via* son groupement hydroxyle, dans les conditions similaires à celles de l'allylation pour préparer le composé

13.^[128] Les composés **23a-d**, dotés d'une liaison acétylénique, se prêtent par la suite à réagir avec les composés **20a** ou **20b** selon la réaction « click » de Huisgen (**Schéma 16**). Les différentes conditions reportées dans la littérature ont été étudiées (**Tableau 4**). Ces réactions ont été catalysées par deux formes de cuivre (CuI et CuSO₄), à température ambiante ou chauffées par micro-ondes à différentes températures. La meilleure condition implique le Cu(I) formé *in situ* en réduisant le sulfate de cuivre(II) (CuSO₄) par l'ascorbate de sodium (NaAsc) dans le DMF sous micro-ondes à 140 °C.^[129] Cette condition aboutit à une conversion totale et rapide (constatée par CCM avant la purification).

	Forme de cuivre	Additifs et solvants	Temps et température	Remarques
1 ^[130]	CuI	DIPEA, AcOH, DCM	36 h, température ambiante	Conversion partielle
2 ^[131]	CuSO ₄ .5H ₂ O	NaAsc, PhCOOH, MeCN/ <i>t</i> -BuOH/H ₂ O	1 nuit, température ambiante	Pas de réaction
3	CuI	DIPEA, AcOH, DCM	10 min, 50 °C aux micro-ondes	Pas de réaction
4 ^[132]	CuSO ₄ .5H ₂ O	NaAsc, DMF/H ₂ O	45 min, 80 °C aux micro-ondes	Conversion partielle
5 ^[129]	CuSO ₄ .5H ₂ O	NaAsc, DMF/H ₂ O	30 min, 140 °C aux micro-ondes	Conversion totale

Tableau 4 : Conditions de réaction de Huisgen étudiées

Les produits (**24a-d**) ont été isolés et purifiés par chromatographie sur colonne avec de bons rendements (**Tableau 5**).

Référence	Queue hydrophobe	Osido	Rendement (%)
24a	-(CH ₂) ₈ CH ₃	Glucoside	71
24b	-(CH ₂) ₁₀ CH ₃		72
24c	-(CH ₂) ₁₂ CH ₃		77
24d	-(CH ₂) ₁₇ CH ₃		87
29a	-CH[(CH ₂) ₄ CH ₃] ₂		38
29b	-CH[(CH ₂) ₁₁ CH ₃] ₂		90
29c	-(CH ₂) ₄ cyclohexyle		80
35	-(CH ₂) ₁₂ CH ₃		61
24e	-(CH ₂) ₁₂ CH ₃	Maltoside	74
24f	-(CH ₂) ₁₇ CH ₃		83

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des rendements du couplage par la réaction de Huisgen (après purification)

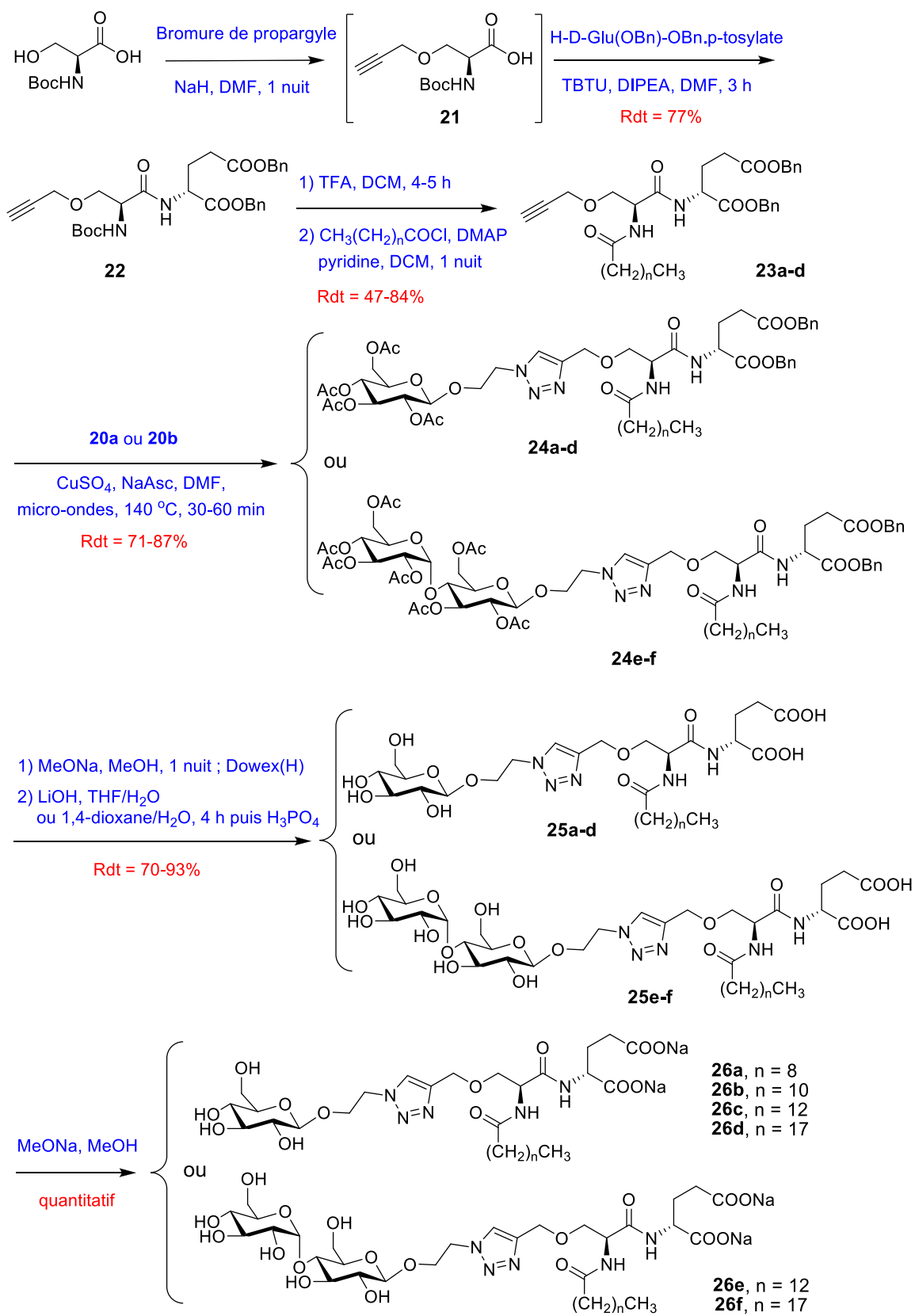


Schéma 16 : Synthèse des détergents glycosylés via la réaction de Huisgen

En RMN ^1H , la formation du produit est confirmée par la disparition du signal du proton propargylique vers 2,30 ppm et l'apparition d'un singulet vers 7,80 ppm caractéristique du proton du cycle triazole ; d'ailleurs, en RMN ^{13}C , les deux carbones du cycle se voient vers 126 ppm et 145 ppm (**Figure 42**).

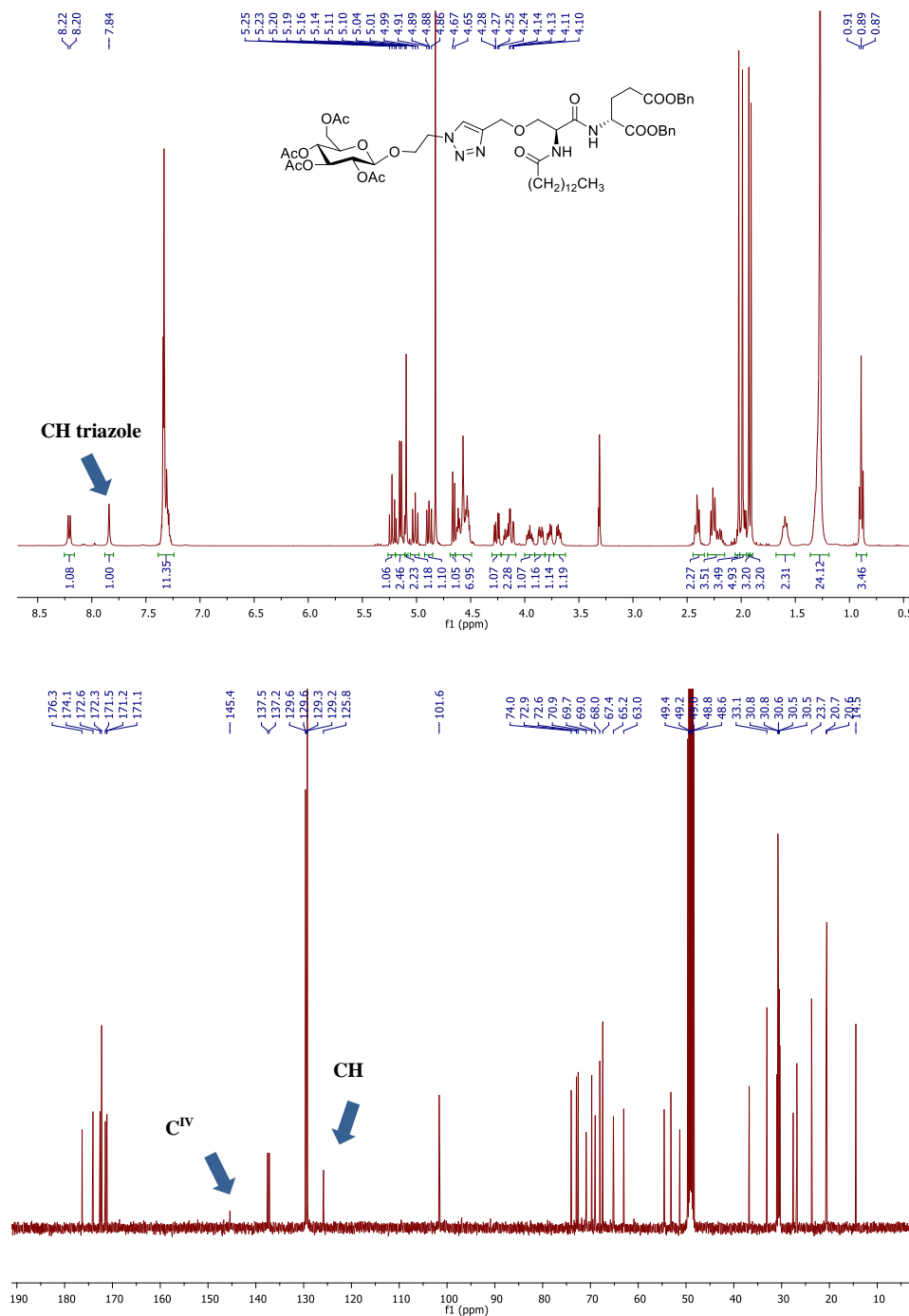


Figure 42 : Spectres de RMN ^1H et ^{13}C dans le CD_3OD du produit 24c

Après la désacétylation et la déméthylation, la purification des produits finaux consiste à les isoler sous forme acide, en acidifiant le milieu réactionnel jusqu'à pH = 1-2 pour s'assurer que les deux fonctions carboxylates sont complètement reprotonnées. En fonction de la solubilité des produits en milieu aqueux, ils peuvent être filtrés, extraits par AcOEt ou récupérés par une courte colonne C18.

Une chaîne hydrocarbonée plus longue ($n = 17$) rend la saponification difficile dans les conditions habituelles, même lorsque le temps de réaction est allongé ou la quantité de LiOH est augmentée. Ceci s'expliquant probablement par une diminution de solubilité dans le mélange réactionnel (THF/H₂O 1:1), nous avons remplacé le THF par le 1,4-dioxane : ce changement permet d'aboutir à une saponification totale sans racémisation.

Les détergents portant deux chaînes grasses pourraient être avantageux par rapport à ceux qui portent une chaîne unique (avec le même nombre d'atomes de carbone). En effet, la taille des micelles serait réduite et l'interaction hydrophobe entre la PM et le détergent pourrait être renforcée tout en évitant son intrusion profonde qui peut perturber l'organisation interne de la protéine (cf. page 61).

L'acide carboxylique qui dispose de deux chaînes hydrocarbonées de 5 carbones (acide 2-n-pentylheptanoïque) est commercial alors que celui de 12 carbones (acide 2-n-dodécyltétradécanoïque) ne l'est pas. Il nous a fallu préparer ce dernier par une α -alkylation à partir de l'acide myristique selon la condition décrite par Yamamoto *et al.* (**Schéma 17**).^[133]

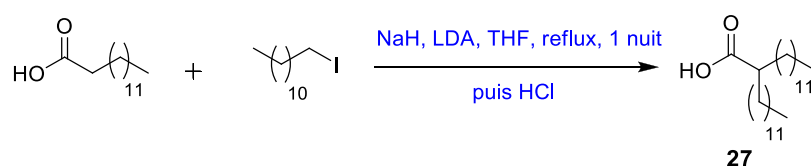
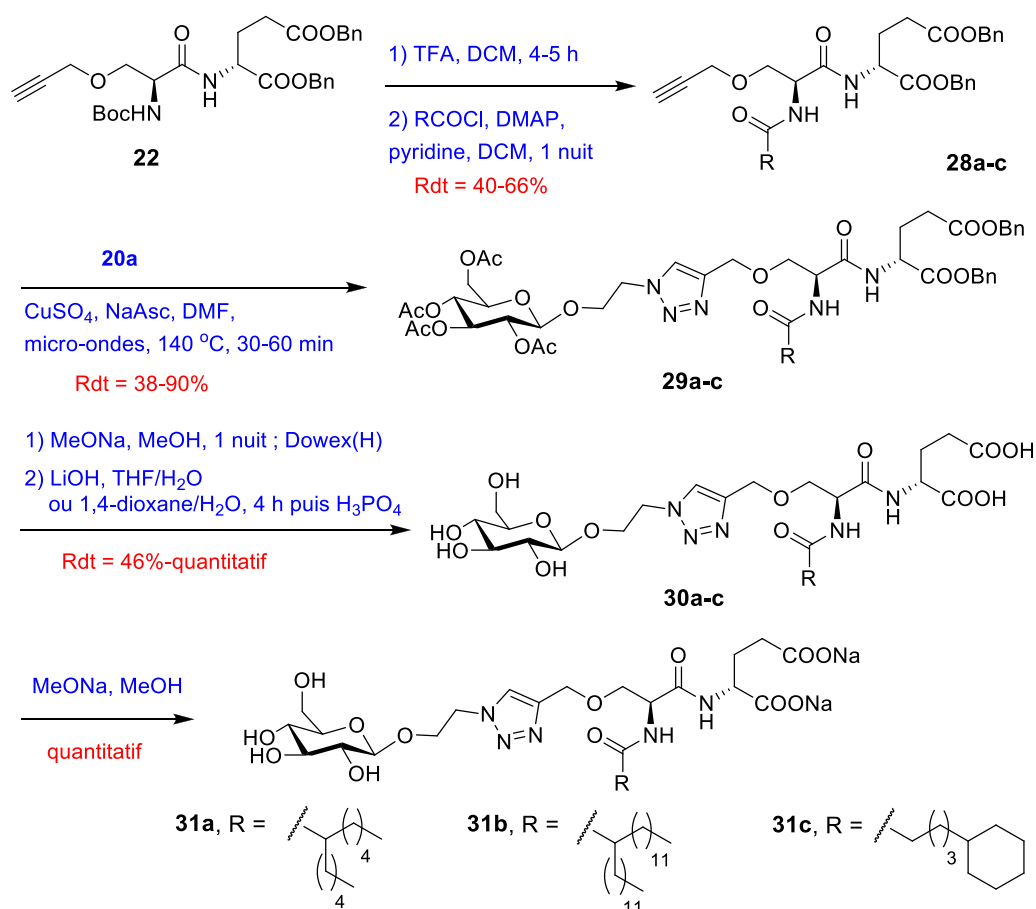


Schéma 17 : Synthèse de l'acide 2-n-dodécyltétradécanoïque (**27**)

L'acide 2-n-pentylheptanoïque, l'acide 2-n-dodécyltétradécanoïque et l'acide 5-cyclohexylpentanoïque ont été transformés en dérivés de chlorure d'acide par le chlorure de thionyle pendant 2 heures à 80 °C. Par la suite, en poursuivant la même stratégie de synthèse que celle des composés **26a-f**, nous avons préparé deux détergents possédant deux chaînes grasses – **31a** et **31b**, ainsi que le **31c** – dont la queue hydrocarbonée est dotée d'un cyclohexyle (**Schéma 18**). Cet élément cyclique peut réduire la flexibilité de la partie hydrophobe ainsi que la taille des micelles (cf. page 65).

Schéma 18 : Synthèse des composés **31a-c**

Nous avons envisagé d'étudier l'impact de la distance entre les deux charges sur le comportement des produits résultants. Dans un premier temps, cette distance a été réduite par le remplacement du glutamate par l'aspartate (composé **8**). A l'inverse, le composé **37**, un analogue du composé **26c**, porte deux fonctions carboxylates plus éloignées. Ce dernier a été préparé en intégrant une glycine *via* un des groupements carboxylate du glutamate par une amidification dans la première étape de la synthèse (Schéma 19). La suite de la synthèse est similaire à celle des composés **26a-f**.

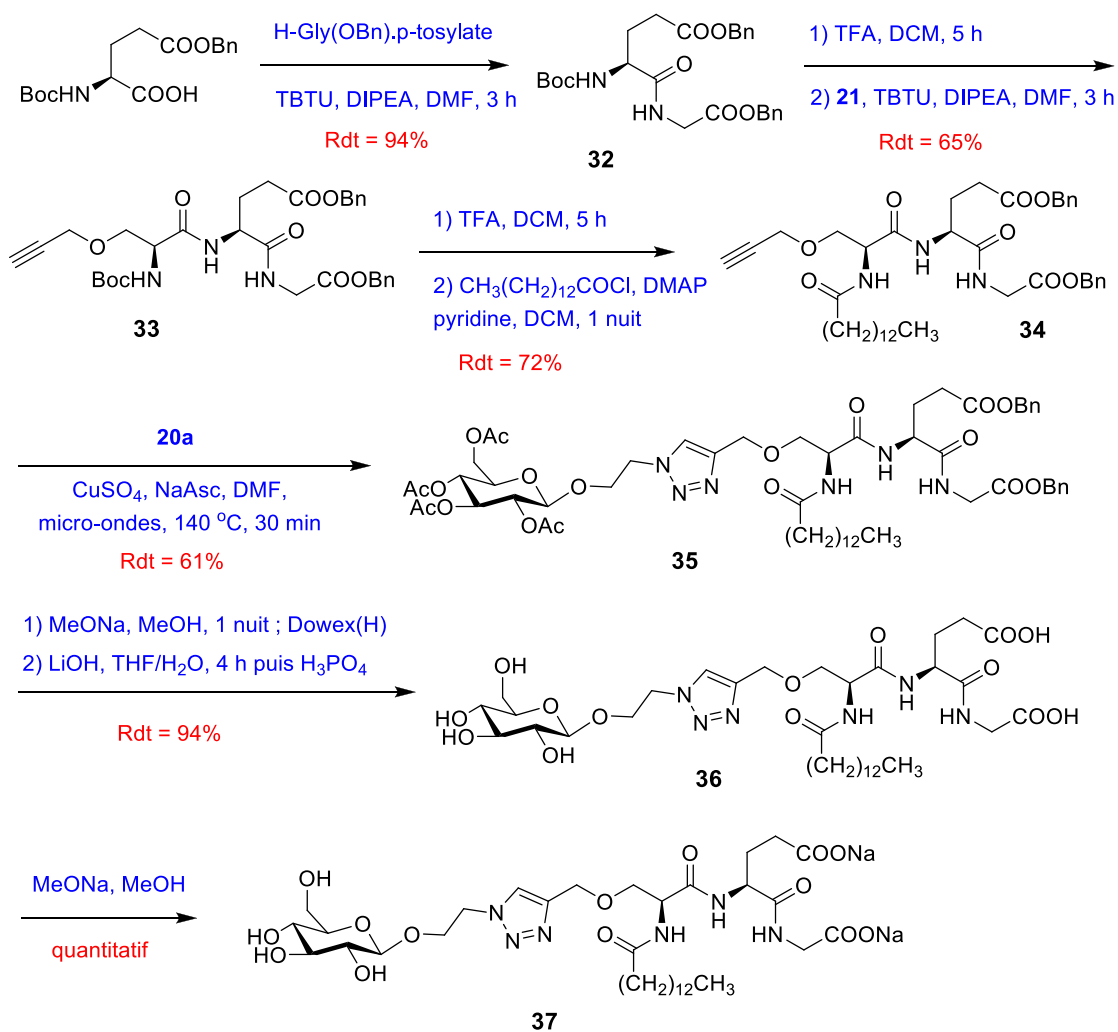


Schéma 19 : Synthèse du composé 37

II.4. Synthèse de détergents peguylés

La synthèse de détergents glycosylés nécessite des conditions de déprotection en milieu basique (MeONa et LiOH). Lors de cette étape, les produits mis en réaction sont très vulnérables, puisqu'ils peuvent être touchés au niveau des centres asymétriques. Par ailleurs, le traitement de ces réactions est plutôt long et lourd. Ces arguments d'ordre pratique ainsi que la volonté d'élargir notre nouvelle famille de détergents à des structures originales nous ont motivé à étudier d'autres alternatives aux têtes polaires de type saccharidique. Nous nous sommes en particulier orientés vers les chaînes polyéthylèneglycol (PEG). En plus, la stratégie de synthèse permet de varier facilement la structure à coupler, offrant la possibilité de produire, évaluer et comparer l'efficacité de différentes têtes polaires. Pour ce faire, nous n'avons qu'à préparer une chaîne PEG fonctionnalisée par un groupement azoture (**39**) ou thiol (**40**) (**Schéma 20**).

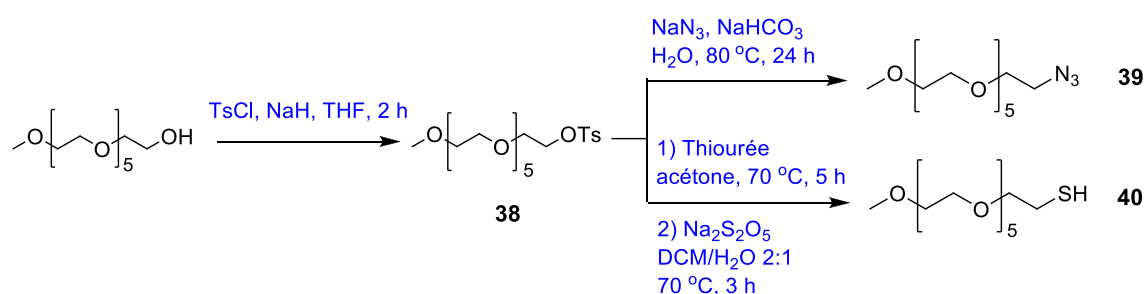


Schéma 20 : Fonctionnalisation de la chaîne PEG par un groupement thiol ou azoture

Grâce à la réaction de Huisgen, deux dérivés peguylés (**43a** et **43b**) ont été préparés avec de très hauts rendements (**Schéma 21**). Les esters benzyliques se déprotègent par une hydrogénation en présence de palladium sur charbon sans avoir besoin de deux étapes d'hydrolyse en milieu basique (problème que nous avons rencontré lors de la synthèse des dérivés à tête saccharidique). D'ailleurs, les produits finaux purs ont été obtenus simplement par un lavage avec du cyclohexane et/ou du DCM sans purification par colonne C18 (purification qui avait été nécessaire dans le cas des détergents glycosylés).

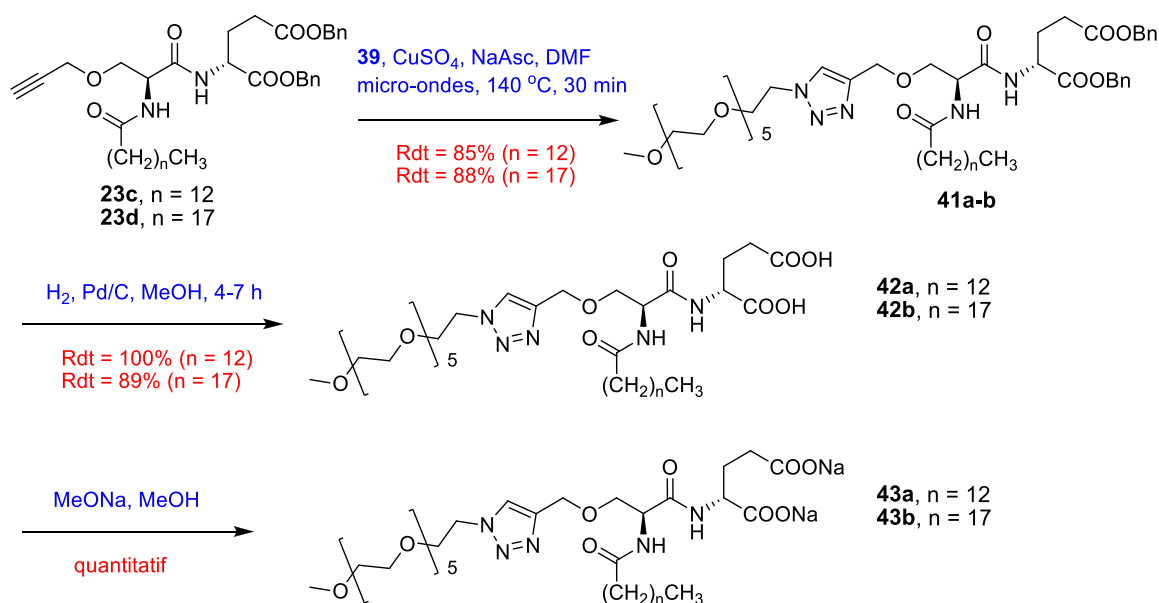
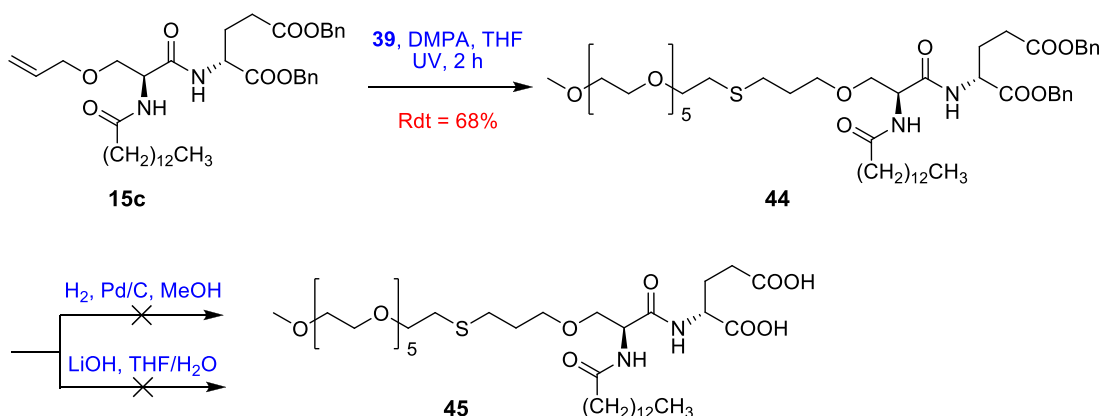


Schéma 21 : Synthèse de détergents peguylés par la réaction de Huisgen

Dans le cas de la réaction thiol-ène, après l'obtention du produit peguylé sous forme d'esters benzyliques (**44**), l'hydrogénation n'a pas abouti au composé souhaité à cause de l'empoisonnement du palladium par le soufre.^[134] Nous avons par conséquent essayé de saponifier le diester **44** en présence de LiOH dans un mélange $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$. Dans ces conditions, le composé **44** a été oxydé et dégradé. La synthèse du **45** n'a pas été poursuivie à ce jour (Schéma 22).

Schéma 22 : Essai de synthèse de détergents peguylés (**45**) par la réaction thiol-ène

II.5. Synthèse d'un détergent dimérique

Un détergent dimérique ou « gemini » possède deux têtes polaires et deux queues hydrophobes. Il peut présenter des propriétés plus avantageuses que son analogue monomérique en terme de capacité d'auto-assemblage et de solubilité.^[77] D'ailleurs, un détergent « clip » dimérique pourrait davantage renforcer l'organisation compacte de PMs par son double réseau de ponts salins.

Un analogue dimérique de notre famille de détergents a pu être préparé en se basant sur la synthèse du détergent peguylé **43a**. A partir d'une chaîne PEG dihydroxylée commerciale, l'analogue diazoture **47** a été préparé après tosylation et substitution nucléophile en présence de NaN₃. Utilisée sous forme brute sans purification, cette chaîne joue le rôle d'un bras espaceur qui peut ensuite réagir avec deux équivalents du composé **23c** pour produire le dimère (**48**) selon la réaction de Huisgen (**Schéma 23**).

III. Caractéristiques physico-chimiques des détergents synthétisés

III.1. Concentration Micellaire Critique (CMC)

III.1.1. Introduction

Pour mesurer la CMC de nos détergents, nous utilisons une méthode qui repose sur l'encapsulation d'une « sonde » fluorescente, le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH). Cette sonde, qui n'est pas fluorescente en solution aqueuse, fluoresce en revanche fortement lorsque la concentration de détergent est supérieure à la CMC (**Figure 43**). Lorsque les micelles se forment, le DPH hydrophobe est encapsulé dans ces structures. Ce phénomène conduit au changement du spectre fluorescent du DPH, car le caractère fluorescent d'une molécule varie en fonction de la polarité de son environnement.^[135] Cette méthode est à la fois simple, sensible et rapide pour déterminer la CMC.^[136] Un autre avantage non négligeable est que cette méthode ne consomme que très peu de matière puisque les mesures peuvent se faire dans des micro-puits de 160 μL .

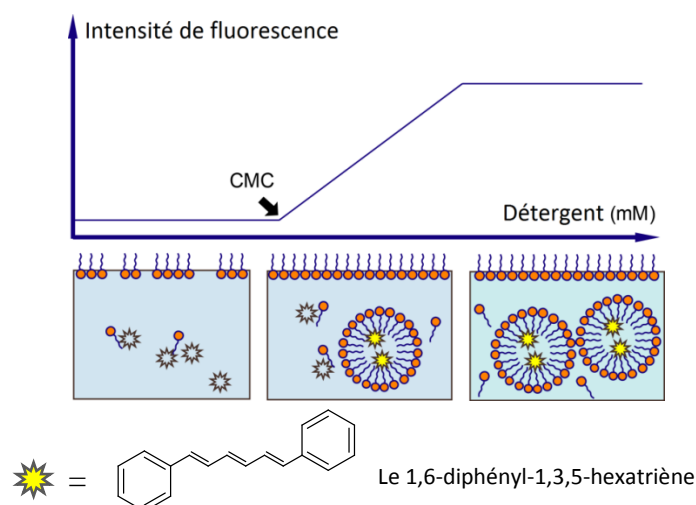


Figure 43 : Détermination de la CMC en mesurant la fluorescence du DPH

III.1.2. Résultats

Nous avons vu que la CMC correspond à la concentration à partir de laquelle la rupture de pente est constatée (**Figure 43**). Les mesures de la CMC réalisées selon la méthode précédemment décrite ont montré que la CMC varie en fonction de la nature et de la taille de la tête polaire et de la queue hydrophobe. En particulier, elle diminue inversement proportionnellement avec la longueur de la chaîne aliphatique : **4a** à **4g** ; **18a** à **18c** ; **26a** à **26d** ; **26e** à **26f** ; **31a** à **31b** ; **43a** à **43b**. De manière générale, la CMC des composés « clips » est relativement élevée, vu que la partie polaire dans la structure est assez importante. La **Figure 44** illustre la détermination de la CMC dans le cas des détergents **26e** et **26f** ; le **Tableau 6** regroupe les valeurs de la CMC de tous les composés synthétisés.

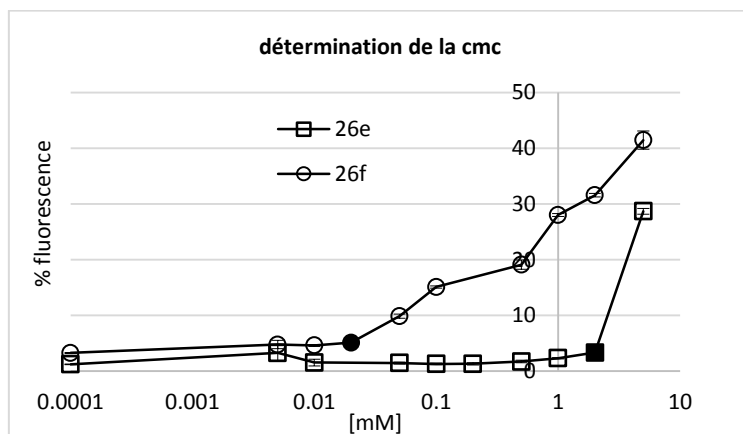


Figure 44 : Fluorescence du DPH en présence de concentrations croissantes de **26e** et **26f**. La CMC est de 2 mM pour le composé **26e** et de 0,02 mM pour le composé **26f** (symboles noirs).

Référence	Queue hydrophobe	Oside/PEG	CMC (mM)
8	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$		2,00
4a	$-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$		5,00
4b	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$		3,50
4c	$-(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$		2,00
4d	$-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$		1,00
4e	$-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$		0,80
4f	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$		1,00
4g	$-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$		0,50
18a	$-(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$		3,00
18b	$-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$	Glucoside	2,00
18c	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$		1,00
26a	$-(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$		2,00
26b	$-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$	Glucoside	1,50
26c	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$		1,00
26d	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$		0,02
26e	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	Maltoside	2,00
26f	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$		0,02
31a	$-\text{CH}[(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]_2$		1,00
31b	$-\text{CH}[(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]_2$	Glucoside	0,02
31c	$-(\text{CH}_2)_4\text{cyclohexyl}$		1,00
37	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$		1,00
43a	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	CH ₃ -PEG	1,00
43b	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$		0,01
50	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	-PEG-	0,01
DDM	$-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$	Maltoside	0,20
LMNG	$-[(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3]_2$	Dimaltoside	0,01
FA3	Stéroïde	Dimaltoside	0,18

Tableau 6 : CMC des détergents

III.2. Diamètre hydrodynamique

III.2.1. Introduction

La taille de nanoparticules et de micelles en solution peut être estimée par plusieurs techniques, à savoir, Microscopie Electronique en Transmission (MET), Small Angle X-ray Scattering (SAXS) et Diffusion dynamique de la lumière (DLS – Dynamic Light Scattering).

Nous avons utilisé la technique de DLS pour estimer la taille des micelles formées par les détergents synthétisés. Les particules en solution effectuent des mouvements incessants et aléatoires (mouvement brownien). Lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon, il sera diffusé à la rencontre des particules. La technique de DLS repose sur le mode de fluctuation de la lumière diffusée, qui dépend de la vitesse de mouvement des particules. Puisque les particules de taille plus grande se déplacent à une vitesse plus faible, l'appareil peut donc calculer le diamètre moyen des particules en solution, appelé « diamètre hydrodynamique ».

III.2.2. Résultats

Les diamètres estimés des détergents testés sont, à l'exception du composé **31b**, de l'ordre de 3 à 5 nm. Ils forment donc des micelles de taille relativement petite. Le composé **31b**, dont la taille des micelles est de l'ordre de 60 nm, se comporte probablement comme les MNGs, qui possèdent également deux chaînes aliphatiques et par conséquent forment particulièrement de grandes micelles.^[88,117] La **Figure 45** illustre certains résultats obtenus.

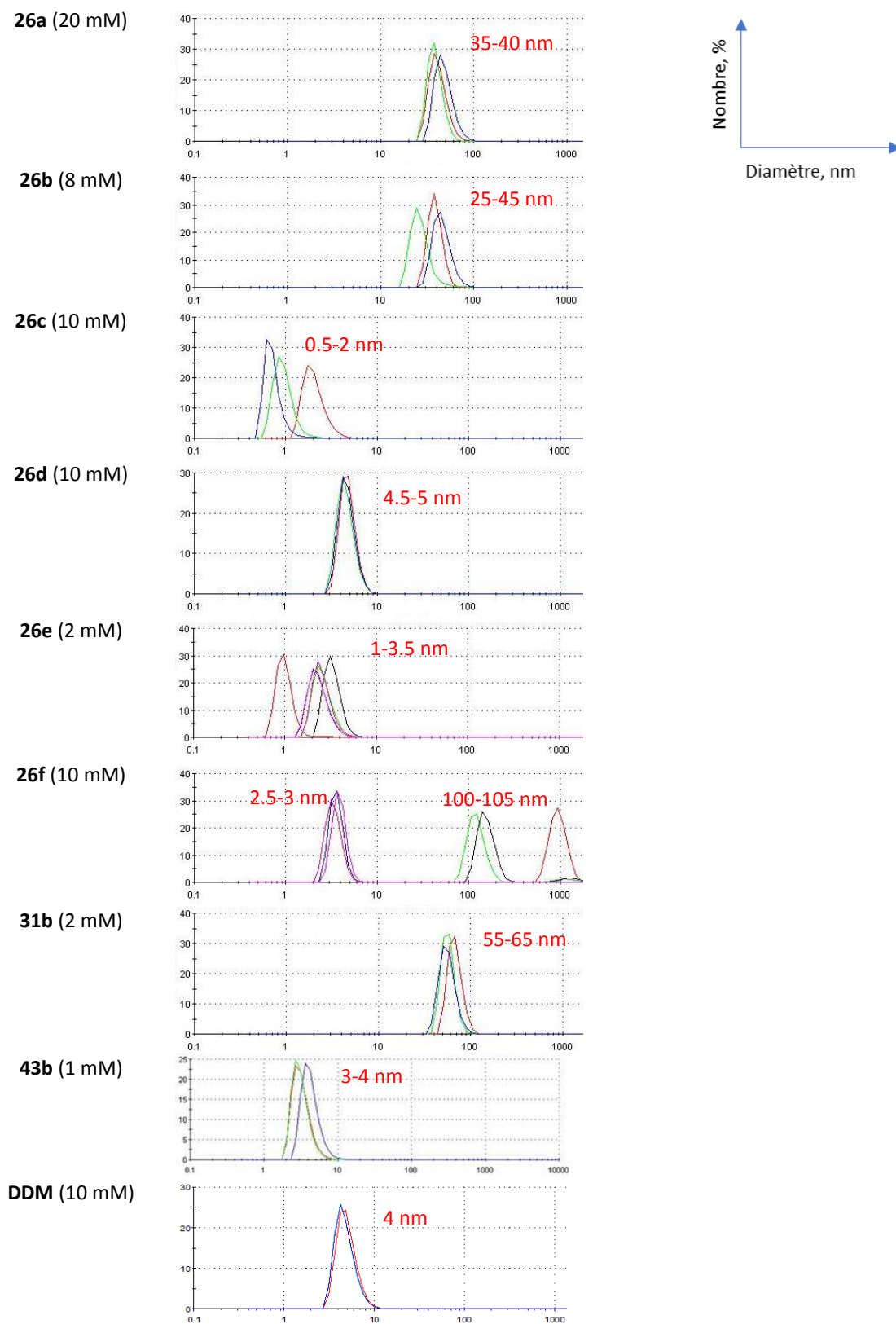


Figure 45 : Diamètre hydrodynamique des composés 26a-f, 31b, 43b et DDM

III.3. Absorption UV

III.3.1. Introduction

Notre projet a pour objectif de concevoir de nouveaux détergents, en se basant sur le même concept que celui des calix[4]arènes.^[36] Malgré leur intérêt démontré concernant leur capacité à stabiliser les PMs, ces derniers absorbent fortement la lumière dans l'UV. Tous les détergents calix[4]aréniques, possédant quatre cycles aromatiques, présentent cette caractéristique. Cela pose un problème technique survenant principalement au cours des évaluations biologiques. En effet, les protéines absorbent la lumière UV, car elles contiennent plus ou moins d'acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane). Au laboratoire, les protéines sont couramment détectées à 280 nm pendant les manipulations (suivie, quantification, purification, etc.). La présence additionnelle de détergents absorbant à des longueurs d'onde UV rend tous ces processus difficiles. Pour éviter ce problème, nous avons dès le début conçu nos molécules en évitant au maximum les systèmes insaturés ou aromatiques potentiellement absorbants dans l'UV. Afin de vérifier la compatibilité de nos détergents avec l'analyse des protéines, nous avons mesuré les spectres d'absorption des molécules synthétisées.

III.3.2. Résultats

Le spectre d'absorption des calix[4]arènes est exemplifié avec le C4C7 dans le premier panneau de la **Figure 46**. Nous constatons que le C4C7 absorbe bien dans l'UV, notamment de 220 à 330 nm. De plus, le pic d'absorption correspond à la zone des longueurs d'ondes utilisées pour détecter les protéines (aux environs de 280 nm).

Contrairement aux détergents calix[4]aréniques, les molécules synthétisées n'absorbent absolument pas ou de façon négligeable la lumière dans les longueurs d'onde balayées, de 220 à 500 nm (**Figure 46**). Nous sommes donc rassurés car ces résultats confirment que les nouveaux détergents ne perturbent pas la détection des protéines à 280 nm.

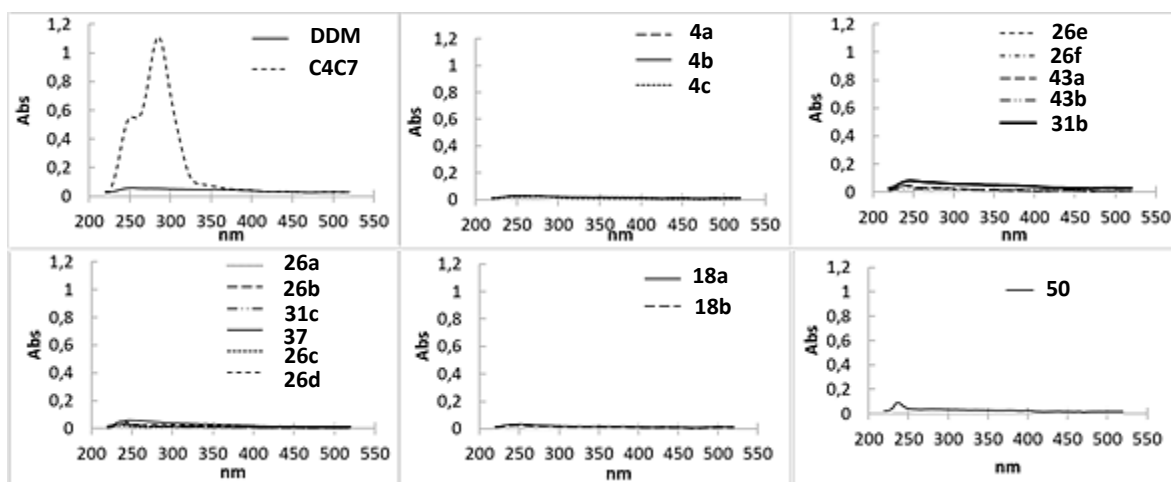


Figure 46 : Spectres d'absorption d'un détergent calix[4]arénique (C4C7) et des détergents synthétisés à 1 mM

III.4. Capacité de chélation avec le Mg^{2+}

III.4.1. Introduction

Les molécules possédant des groupements carboxylates sont susceptibles de se complexer avec des métaux bivalents tels que le calcium ou le magnésium. Par exemple, l'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) est utilisé en cas d'intoxication aux métaux lourds, car ce composé est un agent chélatant très puissant. En biochimie, cette interaction présente un inconvénient pour le fonctionnement correct de protéines et les réactions enzymatiques qui requièrent les co-facteurs métalliques, notamment le calcium et le magnésium.

Les études antérieures ont montré que les calix[4]arènes peuvent former des complexes métalliques stables insolubles. La capacité de chélation peut être quantifiée en mesurant la turbidité de la solution en présence des cations bivalents. En effet, si une molécule peut se complexer avec le Mg^{2+} , on observe une précipitation du complexe en augmentant la concentration de Mg^{2+} . La chélation des calix[4]arènes, par exemple du C4C12, est complète à partir de 5 mM de $MgCl_2$ (**Figure 47**). Ce phénomène est très perturbant, car l'activité ATPasique de BmrA est mesurée en présence de plus de 7 mM de $MgCl_2$.

Puisque les nouveaux détergents disposent également de deux groupements carboxylates, il faut donc vérifier s'ils possèdent cette propriété chélatante indésirable.

III.4.2. Résultats

Les molécules synthétisées ont été testées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude du C4C12. Comme exemplifié dans la **Figure 47**, il n'y a pas de précipitation quand le magnésium est ajouté, même jusqu'à 10 mM. Finalement, bien que les nouvelles molécules possèdent deux fonctions carboxylates, elles ne forment pas de complexe insoluble avec le magnésium.

Cette absence d'interaction avec des métaux est aussi très avantageuse lors des étapes de purification de protéines par chromatographie d'affinité de métal. Cette technique utilise une phase stationnaire contenant du nickel ou du cobalt pour capter spécifiquement certaines séquences peptidiques présentes dans les protéines (polyhistidine par exemple). En présence de fortes concentrations d'agents chélatants comme les calix[4]arènes, cette technique ne peut pas être mise en œuvre.

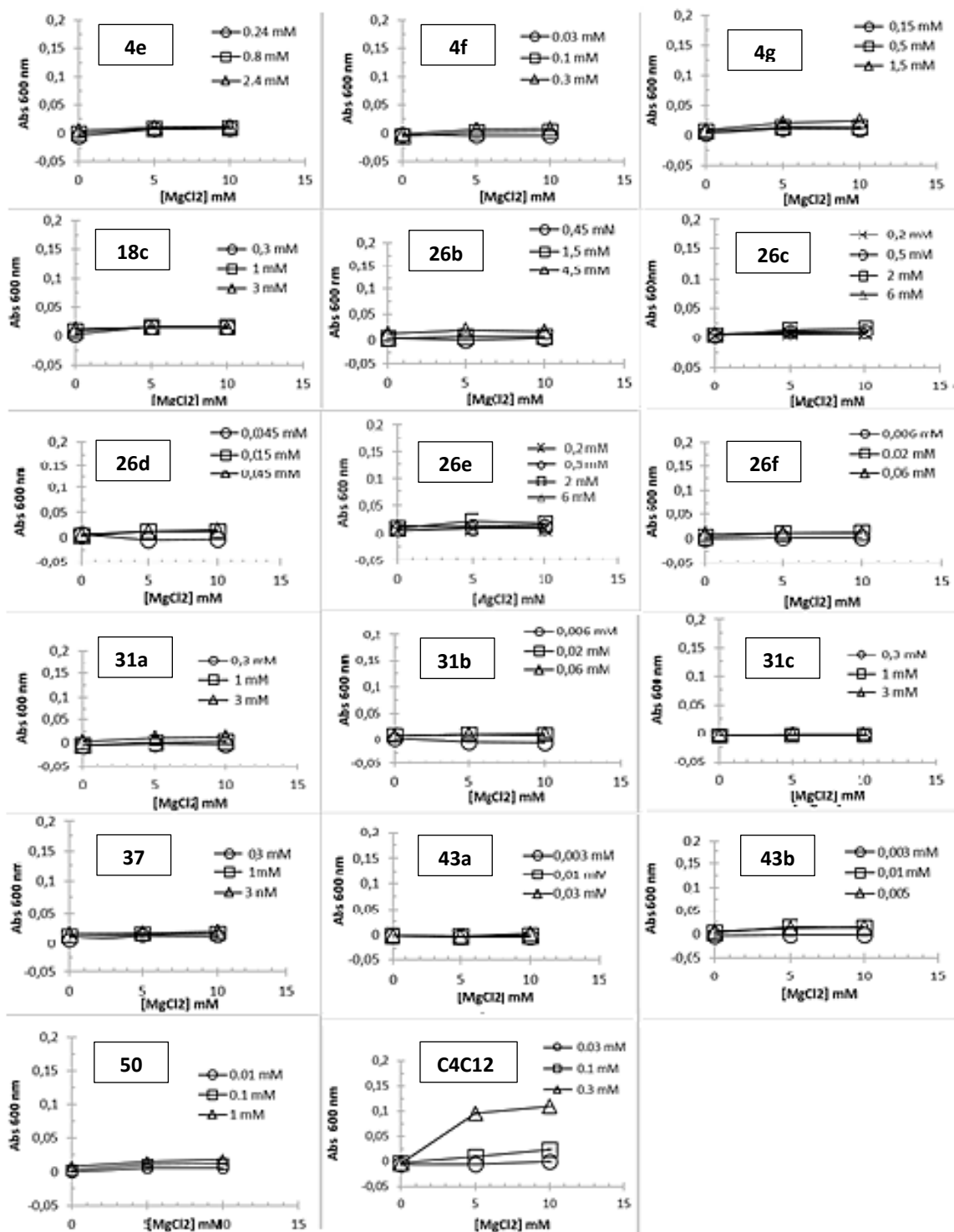


Figure 47 : Turbidité des solutions des détergents synthétisés et d'un détergent calix[4]arénique (C4C12) en fonction de concentrations croissantes de $MgCl_2$

IV. Biochimie

IV.1. Les protéines étudiées : BmrA, AcrB et A_{2A}R

BmrA – « *Bacillus* Multidrug Resistance ATP » – est un membre de la famille des protéines ABC (ATP Binding Cassette). Il s'agit d'un transporteur à l'origine de *Bacillus subtilis*, une bactérie à Gram positive. Il est impliqué dans la résistance multidrogue chez la bactérie sauvage.^[137,138] Effectivement, cette pompe d'efflux peut reconnaître plusieurs molécules comme substrats, à savoir, la doxorubicine, la daunorubicine, la clindamycine, la spiromicine, etc.^[137] BmrA est une PM polytopique qui partage la topologie commune de la famille ABC. Il a été montré que la protéine fonctionne sous forme d'un homodimère.^[139,140] Les deux domaines transmembranaires (TMDs – Transmembrane Domains) reconnaissent et transportent des substrats alors que les deux domaines cytosoliques (NBDs – Nucleotide-Binding Domains) hydrolysent l'ATP. Quand un substrat se lie aux TMDs du côté intracellulaire, un changement conformationnel survient qui expose le substrat vers l'extérieur pour l'évacuer. Après le transport, la protéine reprend sa conformation initiale en libérant de l'ADP et du phosphate inorganique, produits de l'hydrolyse de l'ATP au sein des NBDs (**Figure 48**).^[141]

AcrB est une pompe d'efflux chez les bactéries à Gram négatif, un des responsables principaux de la résistance multi-drogue bactérienne. Il s'agit d'un échangeur de proton, qui fonctionne sous forme d'un trimère de 3x100 kDa. Sa structure 3D a été résolue à 2,9-3,0 Å par Seeger *et al* par la cristallographie aux rayons X en présence de cyclohexyl-n-hexyl-β-D-maltoside.^[142]

Le récepteur A_{2A} de l'adénosine (A_{2A}R) est l'un des quatre sous-types (A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R, A₃R) des récepteurs de l'adénosine. Faisant partie des RCPG, ils stimulent la production de l'AMP cyclique intracellulaire lors de la fixation et l'activation par l'adénosine extracellulaire.

A_{2A}R est impliqué dans le fonctionnement du système nerveux central, cardiovasculaire et immunitaire. Ce récepteur représente donc une cible thérapeutique importante, en particulier pour le traitement de la maladie de Parkinson.^[143] Plusieurs équipes de recherche ont reporté la structure cristallographique de différentes versions modifiées d'A_{2A}R pour améliorer sa stabilité.^[144–148] Or à l'heure actuelle, la protéine native n'est pas encore cristallisée.

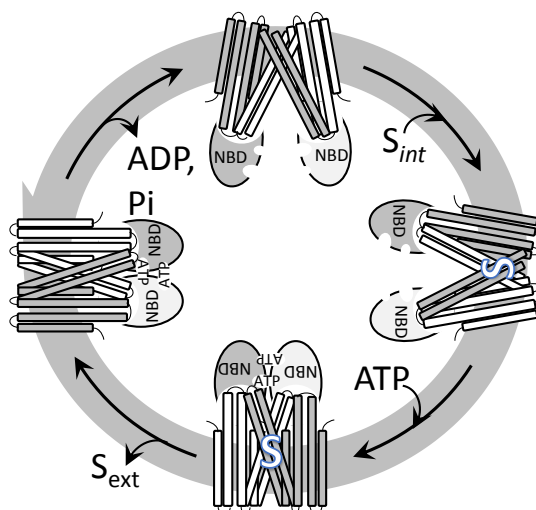


Figure 48 : Cycle de transport de BmrA

IV.2. Etude d'extraction des PMs par les détergents synthétisés

IV.2.1. Introduction

Comme le premier objectif du projet consiste à préparer des outils qui aident à solubiliser les PMs, la capacité d'extraction des molécules synthétisées doit être évaluée au préalable. D'autre part, ces tests nous permettent d'avoir des premières pistes concernant la relation structure-activité et donc nous guident dans les modifications structurales à effectuer pour produire des analogues plus efficaces.

Nous avons choisi le transporteur BmrA pour mettre en œuvre l'étude d'extraction. Ce transporteur est surexprimé avec un bon rendement chez *E. coli*.^[149] Il a été utilisé comme modèle pour évaluer les détergents calix[4]aréniques.^[36] Afin de pouvoir comparer les résultats, le même modèle est utilisé pour évaluer les nouvelles molécules. Nous avons également réalisé l'étude d'extraction avec la protéine AcrB. Ce transporteur a été surexprimé chez une souche d'*E. coli* C41DE3, génétiquement modifiée pour spécifiquement surexprimer les PMs.^[150]

IV.2.2. Résultats

Les protéines extraites en solution sont visualisées en SDS-PAGE après centrifugation à haute vitesse pour séparer celles qui sont insolubles. BmrA migre sous sa forme monomérique et se voit à hauteur de la bande de 55 kDa ; AcrB migre sous forme monomérique et se voit à hauteur de 100 kDa. Selon la quantité de protéine extraite, on peut estimer et comparer l'efficacité extractante des molécules.

En l'absence de détergent, BmrA et AcrB ne sont pas solubles en solution et sont éliminées en grande partie lors de centrifugations. On constate par conséquent qu'il reste très peu de protéines en solution dans les puits « S » (Surnageant) par rapport aux puits « T » (Total).

Si on s'intéresse aux détergents commerciaux, le SDS et la FC12 sont les plus efficaces pour extraire toutes les protéines, car BmrA et AcrB se retrouvent dans les surnageants correspondants. Ils sont alors utilisés comme témoin positif d'extraction. Le DDM et le TX100 permettent de solubiliser les protéines mais un peu moins bien (**Figure 49**).

Concernant nos nouveaux détergents, nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux résultats de test d'extraction de BmrA et AcrB à l'aide de composés « clips » de première génération (non glycosylées et non peguylées). A l'exception des composés **4a** (n = 6) et **4b** (n = 7), les molécules synthétisées sont capables d'extraire efficacement les deux protéines. Leur activité extractante est en effet comparable voire supérieure aux détergents commerciaux (SDS, DDM, FC12 et TX100). Le fait que les composés **4a** et **4b** intègrent des chaînes hydrocarbonées plus courtes explique leur inefficacité. En augmentant la longueur de la chaîne grasse, les autres composés atteignent une balance hydrophile-hydrophobe nécessaire pour l'activité extractante. En somme, avec la tête polaire conçue, il faut que les détergents portent une chaîne hydrophobe d'au moins 9-11 atomes de carbone (n = 8-10).

En terme d'efficacité extractante, le composé **4d** (n = 10) et son analogue deutéré **11** sont équivalents. Comparons les deux formes de sel de sodium (**4f**) et de potassium (**12**) à 10 g/L, il n'y a pas de différence remarquable quant à l'extraction de BmrA et AcrB. En ce qui concerne l'effet du changement de distance entre les deux groupements carboxylate, on constate que le détergent **8** (dont les carboxylates sont à l'origine de l'aspartate au lieu du glutamate) peut extraire aussi bien la protéine BmrA mais moins bien la protéine AcrB en comparaison avec les composés **4f** et **12**.

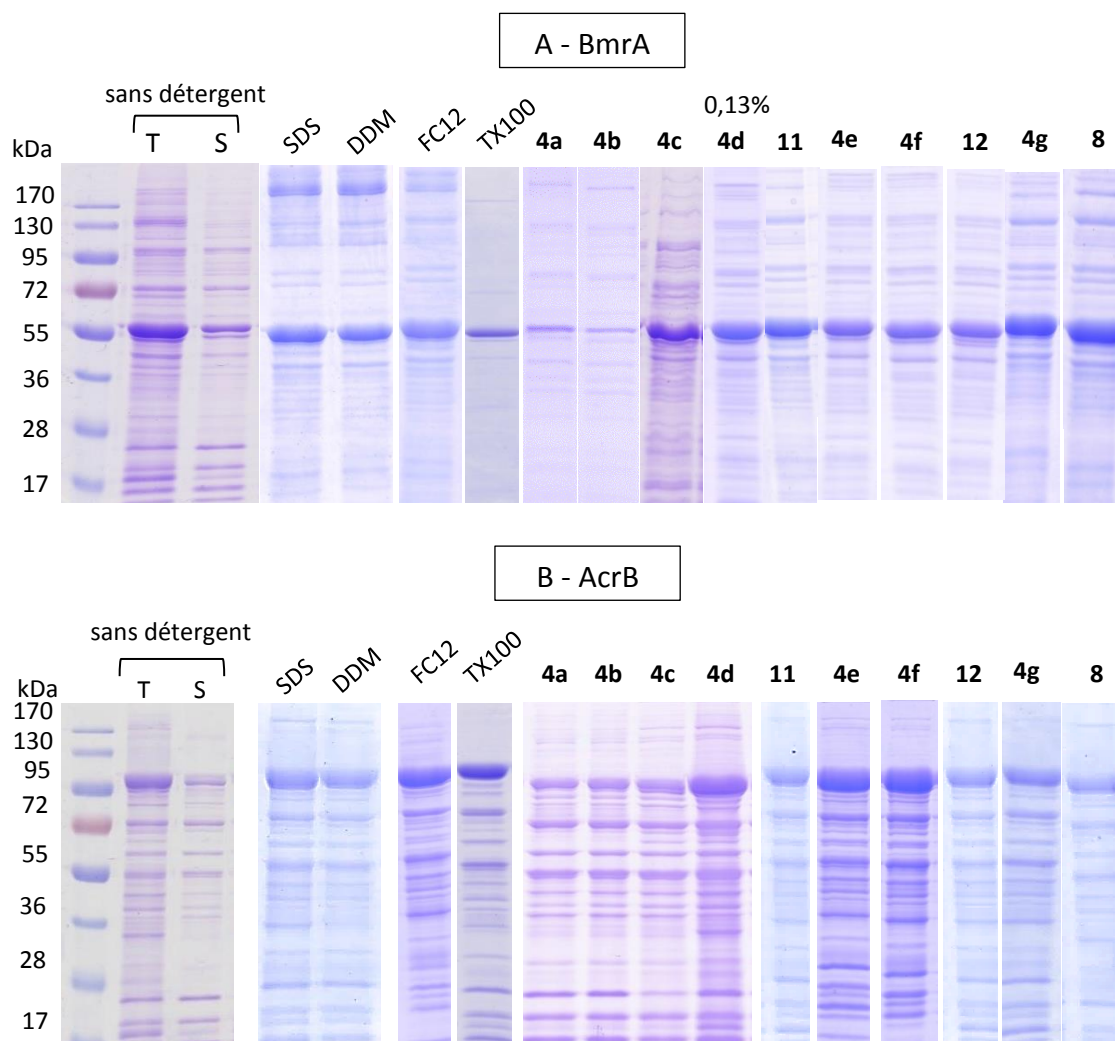


Figure 49 : Extraction des PMs BmrA et AcrB à l'aide de détergents commerciaux et des clips de première génération. Les détergents sont ajoutés à 10 g/L (1%) sauf indication. BmrA migre à hauteur de la bande de 55 kDa ; AcrB migre à hauteur de 100 kDa.

Dans un deuxième temps, le test d'extraction de BmrA et AcrB a été réalisé en présence de détergents « clips » glycosylés et peguylés (**Figure 50**). Encore une fois, l'équilibre entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe joue un rôle important pour acquérir la capacité extractante. En effet, les composés dont la queue hydrophobe est relativement courte (**18a**, **26a**, **26b**, **31a**, **31c**) sont incapables de solubiliser BmrA et AcrB. La quantité de protéine extraite est améliorée en augmentant le nombre d'atomes de carbone de la chaîne grasse : **18a** à **18c** ; **26a** à **26d** ; **26e** à **26f** ; **31a** à **31b**. Par ailleurs, si on augmente la polarité en remplaçant le glucosyle (**26c**) par le maltosyle (**26e**), l'activité extractante diminue de façon considérable. Pour contrebalancer la plus grande tête polaire, il faut donc augmenter la longueur de la queue hydrophobe. Effectivement, malgré la même tête polaire contenant un

maltosyle, le composé **26f** (n = 17) est plus extractant que le composé **26e** (n = 12). L'activité du **26f** est d'ailleurs comparable à celle du **26c** (glucosylé, n = 12) et ils font partie des meilleurs détergents en terme de solubilisation de PMs. Toujours selon le même principe, il faut noter qu'une queue excessivement longue n'est pas bénéfique pour la solubilisation (**31c** par rapport aux **26c** et **26d**).

Les dérivés peguylés (**43a**, n = 12 et **43b**, n = 17) ont une bonne capacité de solubilisation, équivalente à celle de leurs analogues glycosylés (**26c** et **26d**) et maltosylés (**26f**).

AcrB est un contaminant de cristallisation bien connu qui se cristallise facilement même à l'état de trace. Par conséquent, il génère de nombreux artéfacts lorsqu'on veut cristalliser d'autres PMs.^[151] Il est donc souhaitable de mettre au point un détergent qui serait capable d'extraire sélectivement cette protéine contaminante ou au contraire, d'extraire que la PM désirée. Dans ce contexte, il faut noter que le composé **18c** est capable de ne pas ou peu extraire AcrB, contrairement à BmrA. A l'inverse, le composé dimérique **50** peut solubiliser plus efficacement et sélectivement AcrB.

En bref, pour BmrA, les composés extractants sont **4c-g**, **8**, **11**, **12**, **18c**, **26c**, **26f**, **37**, **43a-b**. Dans le groupe des partiellement extractants on trouve **18b**, **26d**, **31b** et dans celui des non-extractants **4a-b**, **18a**, **26a-b**, **26e**, **31a**, **31c**, **50**. Pour AcrB, les composés extractants regroupent **4d-g**, **8**, **11**, **12**, **18a-b**, **26c-f**, **31b**, **37**, **43b**, ceux qui extraient partiellement sont **4a-c**, **18c**, et ceux qui n'extraient pas sont **26a-b**, **31a**, **31c**. Le **Tableau 7** résume les résultats de tous les détergents évalués.

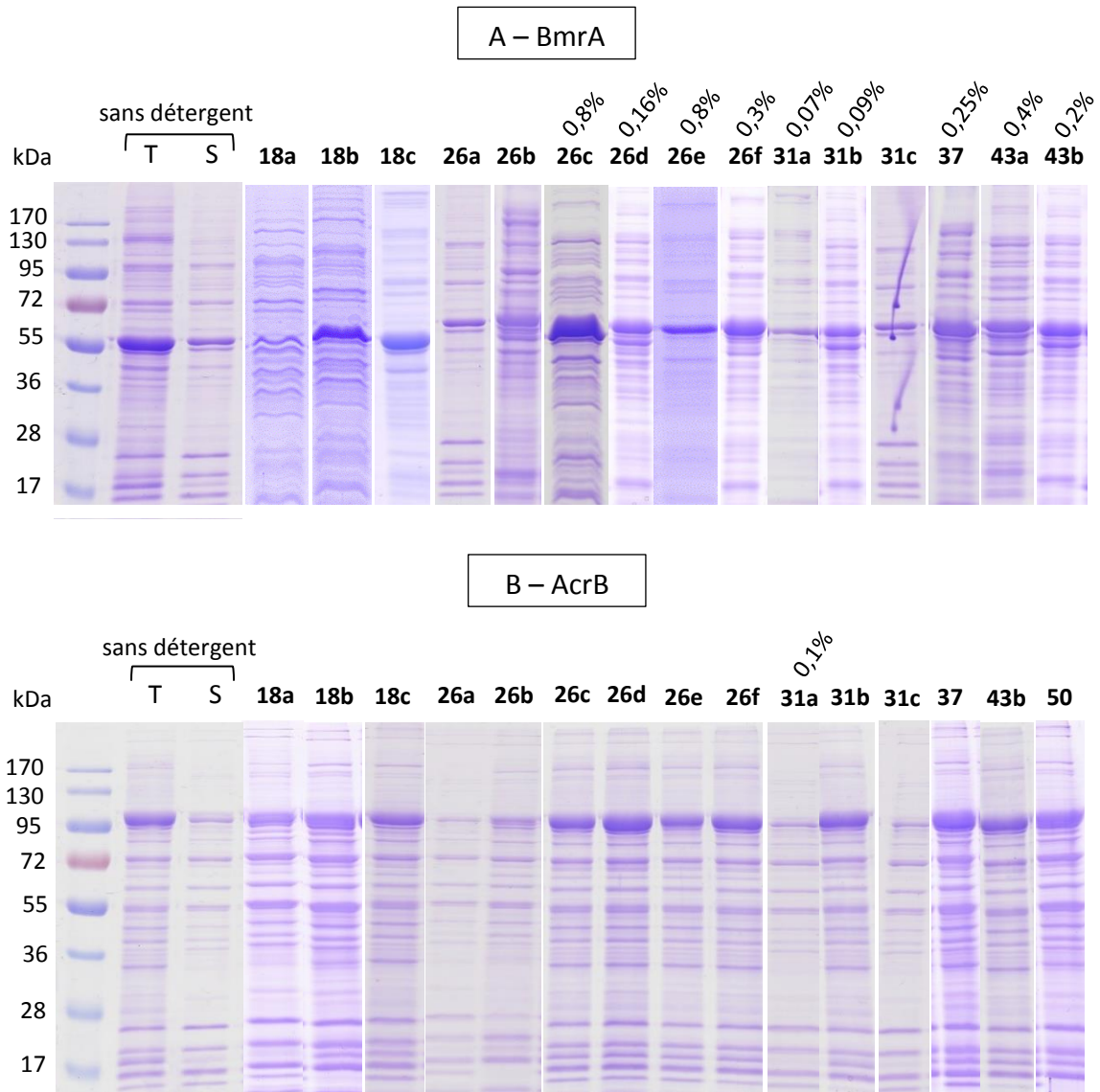


Figure 50 : Extraction de BmrA et AcrB à l'aide de détergents « clips » glycosylés et peguylés. Les détergents sont ajoutés à 10 g/L (1%) sauf indication. BmrA migre à hauteur de la bande de 55 kDa ; AcrB migre à hauteur de 100 kDa.

	BmrA	AcrB
8	+++	++
4a	-	++
4b	-	++
4c	+++	++
4d	+++	+++
2.3f	+++	+++
2.3g	+++	+++
2.3h	+++	+++
2.3i	+++	+++
18a	-	++
18b	++	+++
18c	+++	+

	BmrA	AcrB
26a	-	-
26b	++	-
26c	+++	+++
26d	++	+++
26e	+	++
26f	+++	+++
31a	-	-
31b	++	+++
31c	-	-
37	+++	+++
43a	+++	/
43b	+++	+++
50	-	+++

Tableau 7 : Extraction de BmrA et AcrB avec les détergents synthétisés. +++ : extraction complète ; ++ : extraction partielle ; + : extraction faible ; - : pas d'extraction ; / : non testé

IV.3. Etude d'activité de BmrA après l'extraction par les détergents

IV.3.1. Introduction

L'objectif principal de notre projet est de créer de nouveaux agents solubilisant et stabilisant les PMs. Autrement dit, nous nous intéressons aux molécules avec lesquelles les PMs sont extraites et fonctionnent bien dans l'environnement micellaire. L'activité après l'extraction représente donc notre critère de sélection le plus important.

Comme tous les transporteurs ABC, BmrA hydrolyse de l'ATP au cours de son cycle de transport. En mesurant son activité enzymatique, nous pouvons donc évaluer son état de fonctionnement. Nous avons utilisé une méthode indirecte pour quantifier la quantité de l'ATP hydrolysé : la méthode d'enzymes couplées.^[152] En pratique, deux enzymes (la pyruvate kinase et la lactate déhydrogenase) sont ajoutées dans le milieu, ainsi que le phosphoénolpyruvate (PEP) et le NADH. Plus l'ATP est hydrolysée et plus le NADH sera consommé par des réactions enzymatiques qui s'enchaînent (**Figure 51**). Ainsi, l'activité ATPasique est quantifiée de façon indirecte par dosage de l'absorbance du NADH à 340 nm.

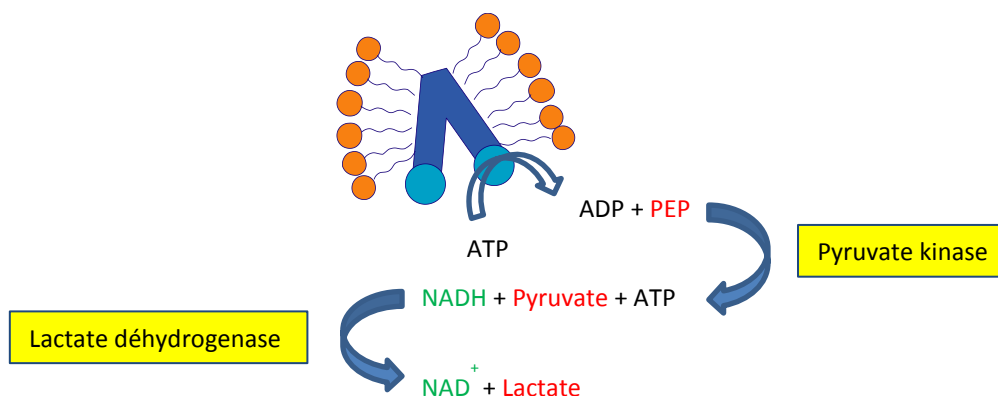


Figure 51 : Mécanisme de la méthode d'enzymes couplées pour mesurer l'activité ATPasique

L'activité ATPasique reflète la proportion de la protéine active par rapport à l'ensemble de la protéine extraite, c'est-à-dire la capacité stabilisante du détergent. Il faut noter que l'activité apparente dépend également de l'efficacité extractante du détergent. Nous avons par conséquent vérifié la quantité de BmrA extraite en solution en faisant le SDS-PAGE des fractions solubles en présence de différentes concentrations de détergent.

IV.3.2. Résultats

Les détergents qui sont efficaces dans le test d'extraction de BmrA (section IV.2) ont été testés à différentes concentrations sub-solubilisantes et solubilisantes, pour évaluer leur impact sur le fonctionnement de la protéine.

Le degré de déstabilisation à cause de l'extraction en présence de détergents est estimé par l'activité ATPasique de BmrA solubilisée par rapport à celle de BmrA dans la membrane lipidique, c'est-à-dire, avant extraction (en pourcentage). Comme illustré dans la **Figure 52**, la présence de détergent, même à une concentration sub-solubilisante peut perturber l'activité ATPasique de BmrA. Il y a donc une forte chance que sa structure ne soit plus dans son état natif, voire dénaturée. Regardons au premier abord les détergents de référence. Le LMNG, un des meilleurs détergents commerciaux, réduit 75% l'activité de BmrA à 10 mM, une concentration nécessaire pour solubiliser la protéine. Le DDM, très largement utilisé dans le domaine, diminue l'activité ATPasique de BmrA de 50 à 85% aux concentrations qui permettent la solubilisation (au-delà de 5 mM). Le même effet est observé pour le FA3, un détergent stéroïdien dimaltosylé qui supprime au moins 75% de l'activité ATPasique de BmrA aux concentrations extractantes (à partir de 9 mM).

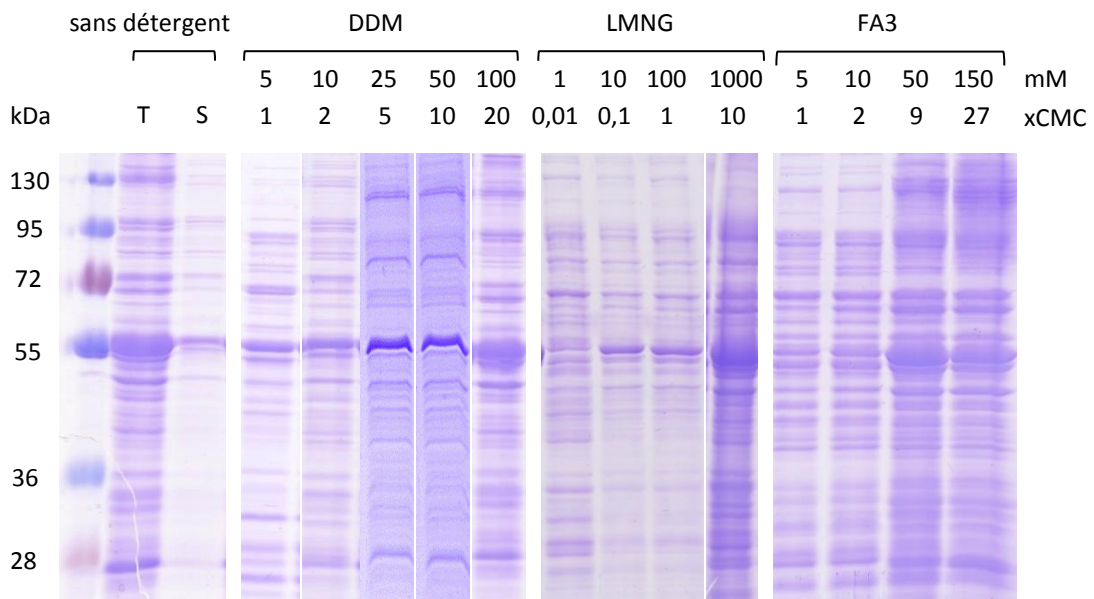
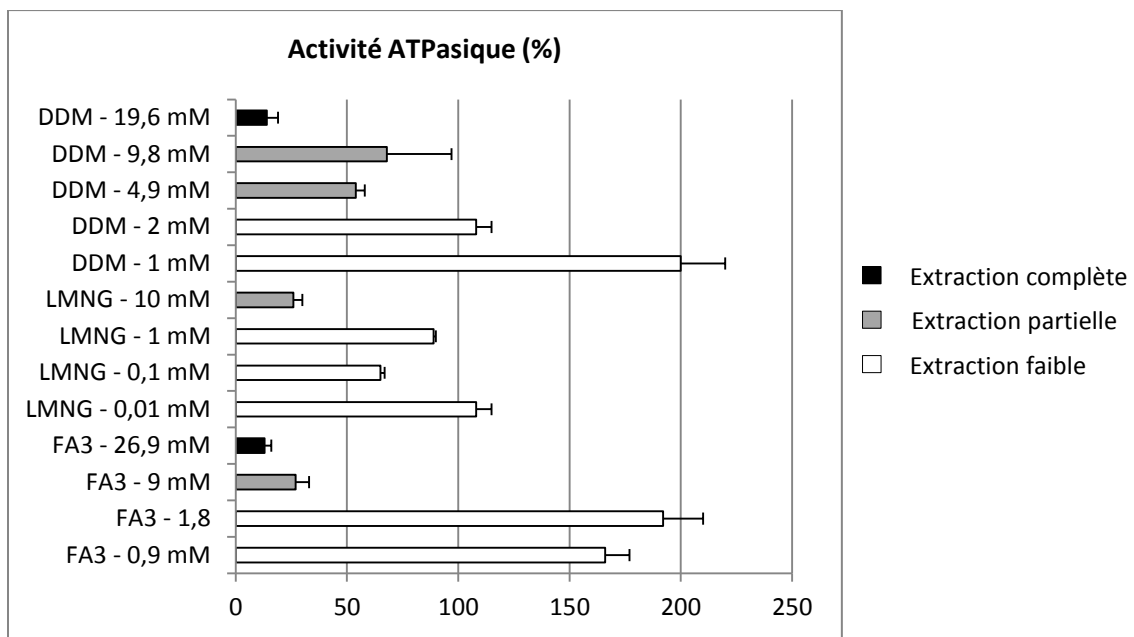


Figure 52 : Activité ATPasique et SDS-PAGE des fractions de BmrA solubilisées par les détergents commerciaux (DDM, LMNG et FA3)

Certains détergents préparés dans le cadre de notre projet s'avèrent délétères. Malgré une capacité d'extraction remarquable des PMs (section IV.2), la première génération (non glycosylée et non peguylée) supprime presque la totalité de l'activité ATPasique de BmrA. Il est possible qu'ils manifestent un caractère détergent très fort avec deux charges et sans élément structural stabilisant comme les saccharides. Bien qu'un glucoside en plus soit couplé

par la réaction thiol-ène, les composés **18b** et **18c** sont non stabilisants (**Tableau 8**). Cette mauvaise performance pourrait être expliquée par l'hydrophobie du bras espaceur, qui se trouve au sein du secteur polaire et est défavorable à la formation des interactions plutôt polaires avec des protéines.

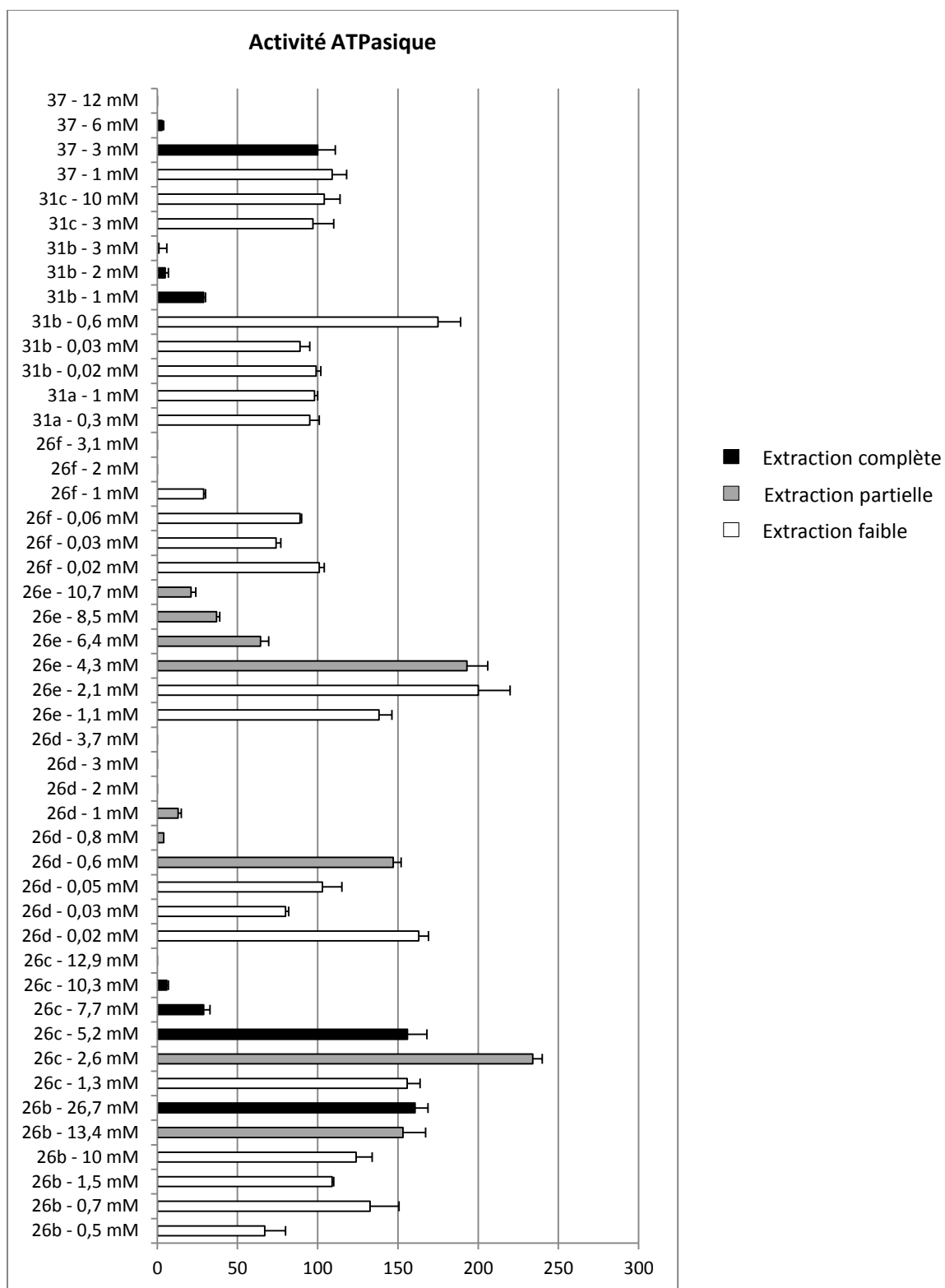
Les composés glycosylés résultant de la réaction de Huisgen permettent en revanche à la fois d'extraire et conserver l'activité ATPasique à un bon niveau (**Figure 53**). Certains peuvent même maintenir l'activité enzymatique de la protéine à une forte concentration solubilisante. Les composés les plus efficaces sont **26b** (glucosylés, n = 10), **26c** (glucosylé, n = 12), **26e** (maltosylé, n = 12), **31b** (glucosylé, n = 11x2), **37** (glucosylé, n = 12, deux carboxylates éloignés) ces deux derniers extrayant BmrA tout en préservant son activité ATPasique. En particulier, les composés **26b** et **26c** augmentent 1,5 fois et le composé **26e** double l'activité enzymatique de la protéine. En fait, cette augmentation d'activité démontre que le transporteur fonctionne très bien, car l'activité basale des transporteurs ABC peut être multipliée jusqu'à 2,5 fois en présence de solutés. Les résultats entre la première génération de détergents non-glycosylés et cette seconde famille de détergents « clips » montrent que l'intégration d'un saccharide dans la structure apporte une stabilisation remarquable de la protéine BmrA. D'ailleurs, le maltoside semble plus stabilisant que le glucoside (**26c** vs **26e**). Il faut noter que, comparés aux produits de la réaction thiol-ène, le cycle triazole résultant de la réaction de Huisgen contribue probablement à leur effet stabilisant (en comparant les paires qui ne se distinguent que par le bras espaceur, à savoir, **18b** vs **24b** ; **18c** vs **24c**). En effet, ce cycle, considéré comme un bioisostère de la fonction amide, est capable de participer à la formation des liaisons hydrogène et aux interactions dipôle-dipôle.^[153]

En revanche, la conjugaison avec un oside augmente l'importance de la tête polaire, ce qui explique l'inefficacité des composés **26a** et **31a** dont la queue hydrophobe n'est pas suffisamment longue pour contrebalancer l'autre partie polaire de la molécule. Par conséquent, il leur est difficile de former des structures micellaires pour solubiliser les PMs. Puisque le composé **26b** possède une queue hydrophobe plus courte que celle du **26c**, la valeur de CMC du **26b** est plus élevée (1,5 mM) que celle du **26c** (1,0 mM). C'est pourquoi il faut monter la concentration du **26b** jusqu'à 26,7 mM pour extraire efficacement BmrA alors que le composé **26c** a besoin seulement d'une concentration beaucoup plus faible (5,2 mM).

Toutefois, on constate qu'une longue queue hydrophobe peut engendrer des effets néfastes sur l'activité de la protéine, qui chute rapidement selon la concentration croissante du **26c** à partir de la concentration solubilisante (5,2 mM). D'ailleurs, si la longueur de chaîne hydrocarbonée est plus importante (**26d**), la CMC est abaissée jusqu'à 0,02 mM et la concentration extractante est considérablement réduite (à partir de 2,0 mM). Néanmoins, la protéine extraite perd la totalité de son activité ATPasique. On s'attend alors au même résultat négatif dans le cas du composé **31b**, portant deux chaînes dont le nombre total d'atomes de carbone est encore plus important que celui du **26d**. La protéine extraite à l'aide du **31b** fonctionne encore même si à un degré plus modeste, ce qui veut probablement dire qu'en limitant la longueur de la chaîne hydrophobe, on évite son invasion profonde dans la structure de la PM, une des raisons d'inactivité des PMs par les détergents.

Les dérivés peguylés sont moins extractants par rapport aux dérivés glycosylés. Néanmoins, le **43a** augmente jusqu'à 2,5 fois l'activité enzymatique de BmrA. Cela veut dire que la protéine extraite par le **43a** fonctionne parfaitement bien. Il pourrait donc être intéressant de l'utiliser à une concentration faible comme un agent stabilisant, en association avec d'autres détergents pour compenser son pouvoir extractant. Le composé **43b** se comporte comme le **26d** et **26f**, qui portent également une longue chaîne aliphatique ($n = 17$) ce qui confirme encore une fois son impact délétère sur l'activité de la protéine.

Le résultat du dérivé dimérique (**50**) s'est révélé décevant, car il n'est ni extractant ni stabilisant. Il faudra probablement optimiser la structure pour améliorer le résultat, en variant la longueur du bras espaceur ainsi que celle de la chaîne hydrocarbonée. Les résultats des composés **43a**, **43b** et **50** sont présentés dans la **Figure 54**.



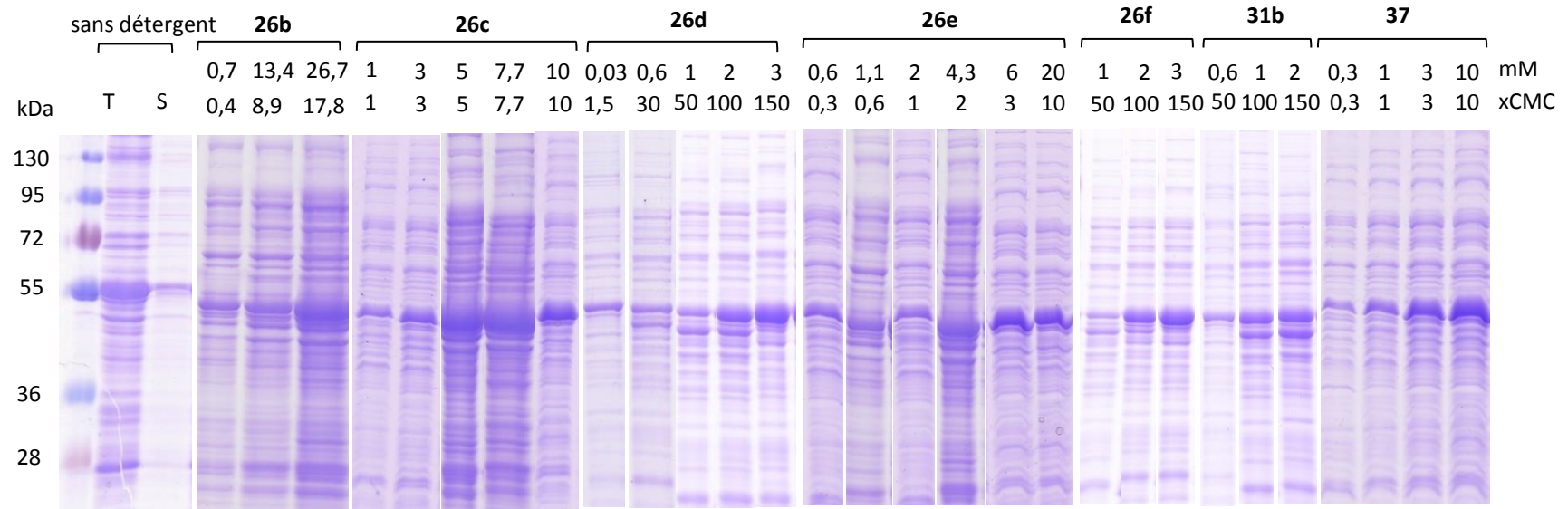


Figure 53 : Activité ATPasique et SDS-PAGE des fractions de BmrA solubilisées par les détergents glycosylés *via* la réaction de Huisgen

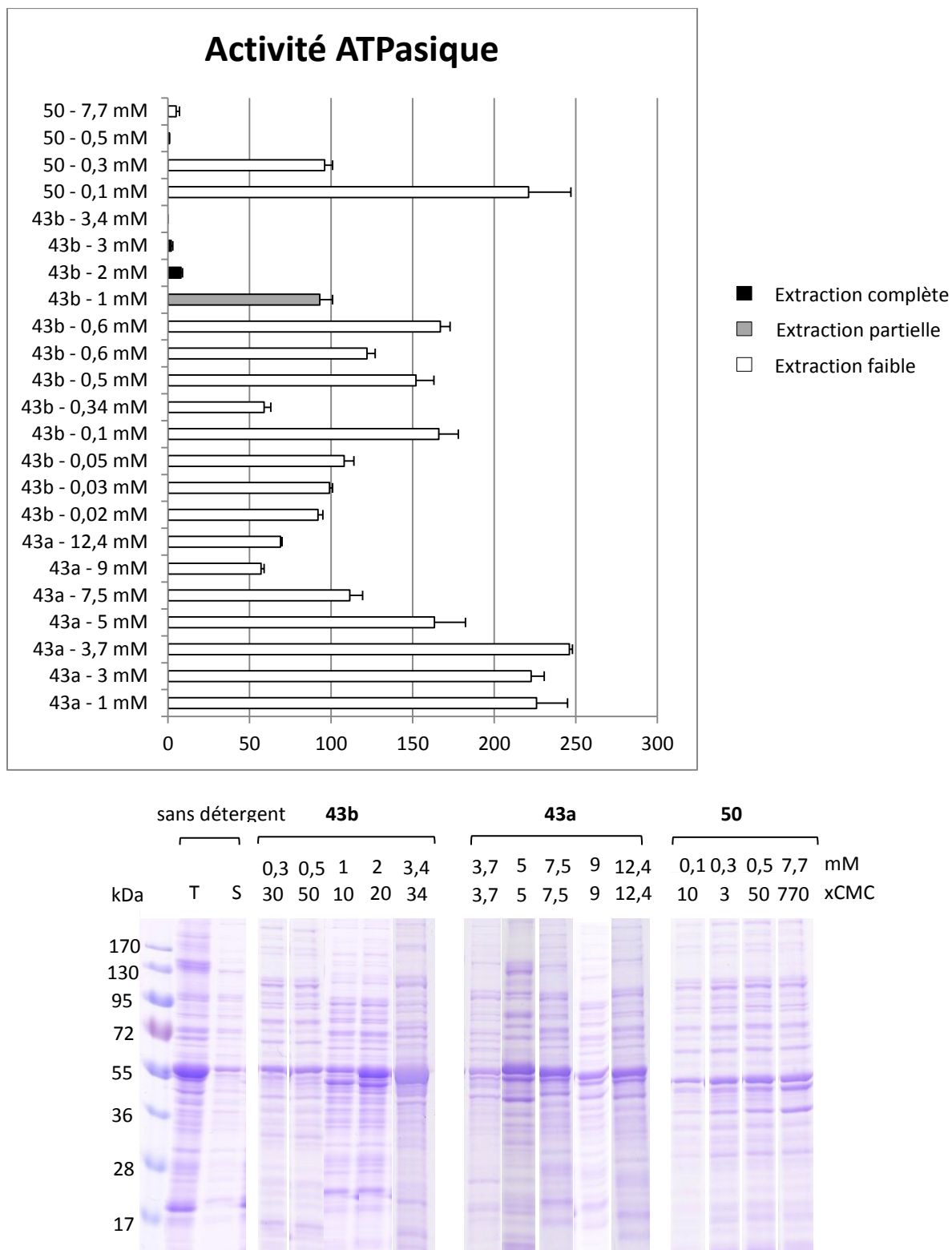


Figure 54 : Activité ATPasique et SDS-PAGE des fractions de BmrA solubilisées par les détergents peguylés (**43a** et **43b**) et le détergent dimérique (**50**)

Détergent	CMC (mM)	C (mM)	xCMC	Activité ATPasique (%)	SD (%)
FA3	0,18	1	5	166	11
		2	10	192	18
		9	50	27	6
		27	149	13	3
LMNG	0,01	0,01	1	108	7
		0,1	10	65	2
		1	100	89	1
		10	1000	26	4
DDM	0,20	1	5	200	20
		2	10	108	7
		5	25	54	4
		10	50	68	29
		20	100	14	5
4c	2,00	23,1	11,6	3	14
4d	1,00	21,7	21,7	0	0
4e	0,80	21,1	26,4	0	0
4f	1,00	20,5	20,5	0	0
8	2,00	3,2	1,6	9	5
12	1,00	19,2	19,2	0	0
18b	2,00	14,4	7,2	0	0
18c	1,00	12,5	12,5	0	0
26b	1,50	0,5	0,3	67	13
		0,7	0,5	133	18
		1,5	1	109	1
		10	6,7	124	10
		13,4	8,9	153	14
		26,7	17,8	161	8
26c	1,00	1,3	1,3	156	8
		2,6	2,6	234	6
		5,2	5,2	156	12
		7,7	7,7	29	4
		10,3	10,3	6	1
		12,9	12,9	0	0

Détergent	CMC (mM)	C (mM)	xCMC	Activité ATPasique (%)	SD (%)
26d	0,02	0,02	1	163	6
		0,03	1,5	80	2
		0,05	2,5	103	12
		0,6	30	147	5
		0,8	40	4	0
		1	50	13	2
		2	100	0	0
		3	150	0	0
		3,7	185	0	0
26e	2,00	1,1	0,6	138	8
		2,1	1,1	200	20
		4,3	2,2	193	13
		6,4	3,2	64	5
		8,5	4,3	37	2
		10,7	5,4	21	3
26f	0,02	0,02	1	101	3
		0,03	1,5	74	3
		0,06	3	89	1
		1	50	29	1
		2	100	0	0
		3,1	155	0	0
31a	0,10	0,3	3	95	6
		1	10	98	2
31b	0,02	0,02	1	99	3
		0,03	1,5	89	6
		0,6	30	175	14
		1	50	29	1
		2	100	5	2
		3	150	1	5
31c	1,00	3	3	97	13
		10	10	104	10
37	1,00	1	1	109	9
		3	3	100	11
		6	6	3	1
		12	12	0	0

Détergent	CMC (mM)	C (mM)	xCMC	Activité ATPasique (%)	SD (%)
43a	1,00	1	1	226	19
		3	3	223	8
		3,7	3,7	246	2
		5	5	163	19
		7,5	7,5	111	8
		9	9	57	2
		12,4	12,4	69	1
43b	0,01	0,02	2	92	3
		0,03	3	99	2
		0,05	5	108	6
		0,1	10	166	12
		0,34	34	59	4
		0,5	50	152	11
		0,6	60	122	5
		0,6	60	167	6
		1	100	93	8
		2	200	8	1
		3	300	2	1
		3,4	340	0	0
50	0,01	0,1	10	221	26
		0,3	30	96	5
		0,5	50	1	0
		7,7	770	5	2

Tableau 8 : Tableau récapitulatif de l'activité ATPasique des détergents évalués. Les meilleures valeurs sont colorées en rouge.

IV.4. Etude de stabilité des PMs en présence des détergents synthétisés

IV.4.1. Introduction

Cette étude a été mise en œuvre dans l'objectif de chercher les détergents qui stabilisent les PMs à long terme, c'est-à-dire ceux qui peuvent préserver l'activité et la structure intacte des PMs pendant un certain temps, temps nécessaire aux études biologiques et structurales.

Dans le cadre de cette étude, deux des meilleurs détergents issus des tests précédents, **26c** et **43a**, ont été évalués pour leur capacité à stabiliser la protéine BmrA, après purification, au cours du temps (40 jours). Ces deux détergents ont été comparés avec le DDM et le FA3, qui sont largement utilisés par les biologistes (le LMNG n'a pas été utilisé car la protéine est inactivée au bout de quelques heures en présence de ce détergent). Après avoir été extraite et purifiée en présence du DDM, à 4 fractions contenant 0,2 g/L de BmrA a été ajouté 0,09 mM de détergents (**26c**, **43a**, **DDM** ou **FA3**). Les différents échantillons ont été stockés à 18 °C. L'activité ATPasique a été mesurée aux temps indiqués dans la **Figure 55** pendant 40 jours.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré la thermostabilité de BmrA et A_{2A}R. Cet essai permet d'estimer la stabilité globale des protéines et représente un des premier critère de sélection des PMs cristallisables.^[154] L'essai correspond à une étude thermodynamique dans laquelle une protéine est chauffée aux températures élevées afin de déterminer sa température de dénaturation (T_m). Cette valeur est en effet en corrélation avec la stabilité thermique de la protéine.^[155] Pour ce faire, les protéines ont été extraites par le DDM 10 mM (BmrA) ou 2 mM (A_{2A}R), additionnées du composé **26c** (1 mM). Les surnageants contenant BmrA ou A_{2A}R solubilisée ont été incubés 30 min à diverses températures allant de 25 à 72 °C, puis centrifugés pour éliminer les agrégats. La quantité des protéines restantes en solution a été déterminée par SDS-PAGE et Western Blot. Les résultats sont comparés avec ceux des échantillons sans le composé **26c** ou additionnés de l'hémisuccinate de cholestérol (CHS).

IV.4.2. Résultats

Le résultat est illustré dans la **Figure 55**. Dans les conditions du test, BmrA purifiée est stable pendant au moins 20 jours à 18 °C, quel que soit le détergent utilisé. Au-delà de 20 jours, la protéine commence à perdre son activité en présence du DDM ou du FA3. En revanche, l'addition de **26c** ou **43a** permet de préserver complètement l'activité ATPasique de BmrA au

moins 40 jours. De plus, la capacité de maintenir la stabilité à une température si élevée (18 °C) est rapportée pour la première fois et particulièrement intéressante pour accélérer la formation des cristaux, ce qui n'est pas toujours possible quand il s'agit des PMs (les PMs sont habituellement cristallisées à 4 °C pour ralentir la dégradation).

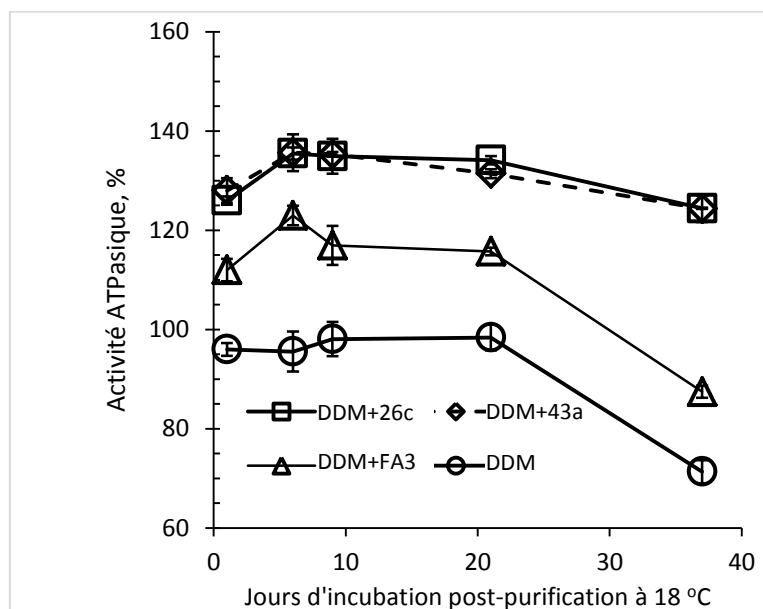


Figure 55 : Stabilité dans le temps de BmrA purifiée en DDM et additionnée des composés **26c**, **43a**, du FA3 ou du DDM à 0,09 mM

Comme illustré dans la **Figure 56**, BmrA est thermostable jusqu'à 54 °C. Au-delà de cette température, la protéine se dégrade rapidement. La valeur de T_m mesurée est de 47,8 °C pour les échantillons extraits par DDM uniquement. La présence du composé **26c** améliore significativement la T_m de BmrA, de 47,8 °C à 60,8 °C. Une augmentation de T_m de 13 °C est également observée pour le récepteur $A_{2A}R$. Effectivement, la valeur de T_m d' $A_{2A}R$ extrait par le DDM est de 37,5 °C ; celle d' $A_{2A}R$ extrait par un mélange du DDM et le CHS augmente à 40,6 °C. L'ajout du composé **26c** accroît la thermostabilité de la protéine jusqu'à 50,5 °C. Ce résultat est particulièrement remarquable, car ce détergent permet d'étudier le récepteur sous sa forme native qui ne subit aucune modification structurale pour améliorer sa stabilité.^[144,156] A ce jour, il existe très peu de détergents ayant une capacité stabilisante comparable au composé **26c**.

Les détergents étudiés ici présentent donc une propriété de stabilisation à long terme particulièrement intéressante, voire meilleure que celle des détergents commerciaux classiquement utilisés.

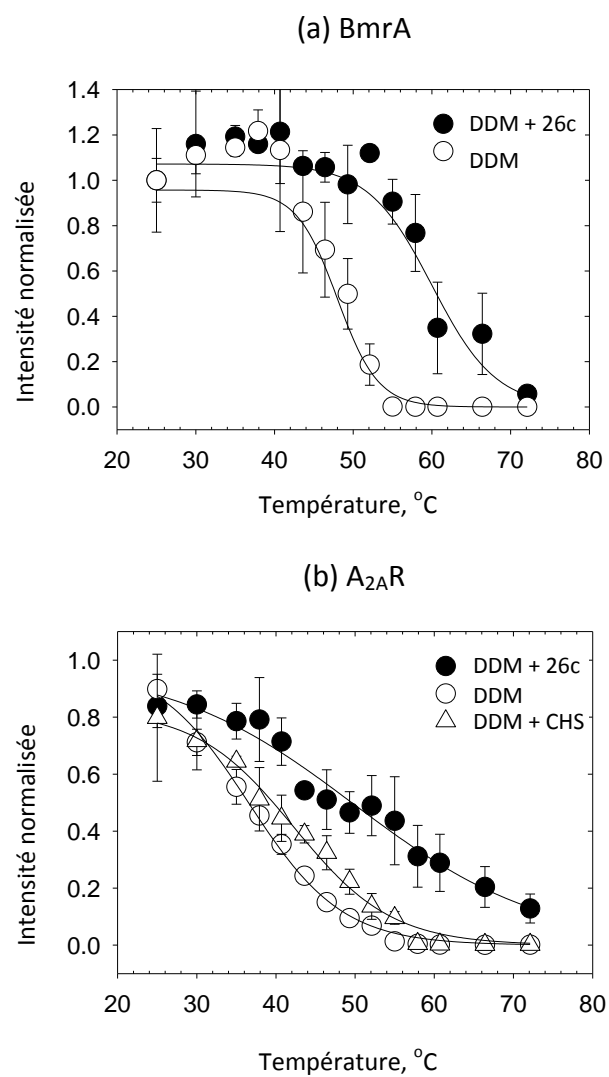


Figure 56 : Thermostabilité de BmrA (a) et A_{2A}R (b) extraites par le DDM et additionnées du composé **26c**

IV.5. Etude de cristallisation de BmrA en présence des détergents synthétisés

Dans l'objectif de développer des détergents universels, utilisés non seulement en extraction, purification mais aussi en cristallisation, nous avons tenté de cristalliser la protéine BmrA en présence de nos détergents. BmrA se cristallise en présence de PEG1000, donnant des cristaux qui diffractent jusqu'à 6-8 Å.^[36]

Parmi les détergents testés, les composés **31b** et **31c** ont conduit à la formation de cristaux bien organisés de manière répétable. De plus, les cristaux résultants ont donné des résolutions marquantes en diffraction aux rayons X, jusqu'à 3,99 Å (**Figure 57**). La raison expliquant ce résultat n'est pas encore connue, mais provient probablement de la variation de la partie hydrophobe. En effet, la ramification de la chaîne aliphatique du composé **31b** ou l'introduction d'un cyclohexyle dans le cas du composé **31c**, pourrait conférer aux micelles une plus grande compacité. A cela s'ajoute une rigidité considérable issue de la stéréochimie des acides aminés et de la partie glycosidique, qui peuvent entraîner une meilleure organisation interne dans les micelles. De plus, le composé **31b**, ayant une queue hydrophobe qui ressemble à des phospholipides membranaires, peut se lier plus étroitement à la région membranaire de BmrA ; le motif cyclohexyle du composé **31c** peut perturber la couronne de détergents autour de BmrA, favorisant le contact protéine-protéine, important pour la formation des cristaux.

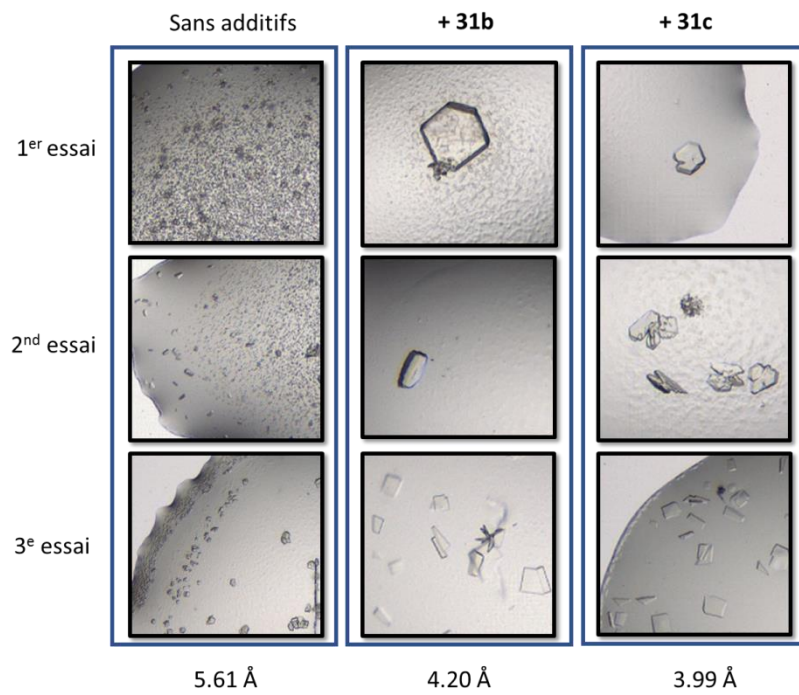


Figure 57 : Cristaux formés en présence des composés **31b** et **31c**

Conclusion du chapitre 2

Nous avons développé une nouvelle famille de détergents à partir d'un concept de « clip » moléculaire *via* deux groupements carboxylates. Les interactions entre ces charges négatives et les résidus d'acide aminé chargés positivement pourraient permettre de conserver la structure des PMs inaltérée lors des étapes d'extraction, de purification et de cristallisation.

L'originalité du projet repose également sur la stratégie de synthèse modulable avec laquelle les éléments polaires et hydrophobes souhaités sont intégrés par des étapes de synthèse peptidique. La conjugaison avec des saccharides ou une chaîne PEG a été menée à bien grâce aux réactions « click ». Dans ce chapitre, nous avons présentés la préparation et l'évaluation des différents « clips » : une série non glycosylée et non peguylée, une série glycosylée *via* la réaction de thiol-ène, une série glycosylée *via* la réaction de Huisgen ainsi que les « clips » peguylés et un « clip » dimérique.

Avantageusement, les molécules issues de cette conception n'absorbent pas, ou de façon négligeable, les UV et ne perturbent donc pas la détection des protéines à 280 nm. De plus, nos composés ne forment pas de complexe insoluble avec des métaux divalents essentiels pour le bon fonctionnement des PMs.

En outre, les « clips » ont démontré une bonne capacité de solubilisation des protéines BmrA et AcrB. Certains permettent non seulement d'extraire mais aussi de préserver voire d'augmenter l'activité de la protéine extraite (preuve d'un fonctionnement parfait du transporteur). Les deux composés les plus prometteurs sont le **26c** (glucosylé par CuAAC, $n = 12$) et le **43a** (peguylé, $n = 12$), qui ont démontré leur efficacité au niveau de l'extraction et de la stabilisation, et ceci pendant une très longue durée (40 jours). De plus, le composé **26c** améliore fortement la thermostabilité de BmrA et d'A_{2A}R natif.

Cette capacité de cette famille de détergents favorise finalement les études cristallographiques. Les cristaux formés en présence des composés **31b** ou **31c** sont particulièrement de bonnes résolutions, jusqu'à 3,99 Å, une valeur difficile à atteindre en cristallographie pour les PMs.

Chapitre 3 - Synthèse des dérivés d'aurones et étude d'inhibition d'ABCC2

Avant-propos

Nous avons vu dans les chapitres précédents les problèmes liés aux études structurales des PMs. Par conséquent, la recherche de médicaments ciblant ces protéines semble rencontrer un obstacle insurmontable. Sans connaissance sur leur structure, nous devons mettre de côté l'approche directe pour concevoir les principes actifs se basant sur la structure tridimensionnelle de la cible. Face à cette situation, nous avons heureusement d'autres stratégies pour contourner ce problème dont cette partie illustre un exemple.

Dans ce chapitre, nous décrivons un projet s'intéressant à l'identification de nouveaux inhibiteurs du transporteur ABCC2. Lors d'études précédentes effectuées par notre équipe en collaboration avec l'équipe du Dr. Pierre Falson à l'IBCP, une partie de la chimiothèque du DPM, ainsi que des composés provenant d'un autre laboratoire, ont été criblés sur ABCC2, ce qui a permis d'identifier quelques structures à exploiter. Par la suite, mon travail personnel a consisté à effectuer une étude de pharmacomodulation et à établir les premières observations concernant les relations structure-activité de cette famille d'inhibiteurs.

Dans ce chapitre, je présenterai tout d'abord le contexte et l'objectif du projet. La deuxième partie décrira comment identifier les meilleurs inhibiteurs. Puis, je détaillerai la synthèse de cette famille d'inhibiteurs. Enfin, les relations structure-activité et les perspectives seront discutées.

I. La protéine ABCC2

I.1. Structure d'ABCC2

ABCC2, appelé autrefois cMOAT (Canacular multispecific organic anion transporter), MRP2 ou cMRP, est un transporteur transmembranaire, un des membres de la superfamille des protéines ABC.

Chez l'homme, cette superfamille de transporteurs ABC se divise en 7 sous-familles, nommées de A à G, en fonction de l'homologie de séquence et de la topologie ainsi que des analyses phylogénétiques.^[157] La sous-famille ABCC comprend à ce jour 13 transporteurs, allant d'ABCC1 à ABCC13. Les transporteurs ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6, ABCC8, ABCC9 et ABCC10 partagent une particularité structurale : en plus de la structure commune - deux TMDs et deux NBDs, ils possèdent un TMD supplémentaire composé de cinq hélices transmembranaires vers l'extrémité N-terminale (**Figure 58**).

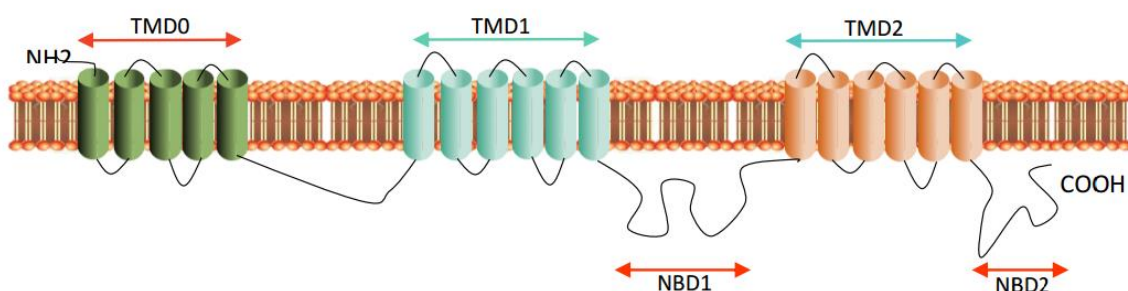


Figure 58 : Topologie de la protéine ABCC2 ^[158]

I.2. Distribution tissulaire et fonctions biologiques d'ABCC2

Le transporteur ABCC2 est exprimé dans les barrières physiologiques importantes, telles que les entérocytes, les cellules épithéliales des tubules proximaux des reins et la membrane canaliculaire des hépatocytes. Parmi ces sites, ABCC2 joue le rôle le plus important dans la membrane canaliculaire. En effet, ce transporteur est impliqué dans l'élimination par voie biliaire des molécules endogènes et exogènes (**Tableau 9**), notamment des anions organiques conjugués, car il se situe uniquement dans la membrane apicale,^[159] alors que les autres protéines ABCC se localisent dans la membrane basolatérale. Une mutation dans son gène codant provoque le syndrome de Dubbin-Johnson : une maladie hépatique qui se manifeste

par un ictère léger, dû à l'augmentation de la bilirubinémie, des douleurs abdominales et les urines foncées.^[160]

Types de molécules	Substrats d'ABCC2
Molécules endogènes	Glutathione, leukotriène C4, sels biliaires conjugués, bilirubine glucuronides, stéroïdes (β -estradiol 3- β -D-glucuronide, éthinylestradiol-3-O-glucuronide, estrone 3-sulfate)
Anticancéreux	Doxorubicin, étoposide, méthotrexate, cisplatine, vincristine, vinblastine
Antiviraux	Indinavir, ritonavir, saquinavir, adéovir, cidofovir
Antibiotiques	Ampicillin, cétodizime, ceftriaxone, grépaflxacine, irinotecan
Autres médicaments	Pravastatine, témocaprilate, diclofénac, paracétamol
Toxiques	S-Glutathionyl-1,2,4-dinitrobenzene, acide S-glutathionyl éthacrynique, ochratoxine A, complexes des métaux lourds
Molécules fluorescentes	Fluo-3, carboxydichlorofluorescéine, sulfobromaphtaléine, calcéine

Tableau 9 : Liste non exhaustive des substrats connus d'ABCC2 ^[158]

ABCC2 est un des principaux transporteurs dans l'intestin, le colon et le foie (**Figure 59**). Sa présence abondante (jusqu'à 25% des PMs du colon) suggère un rôle biologique important, en particulier dans l'élimination et la détoxification.^[158]

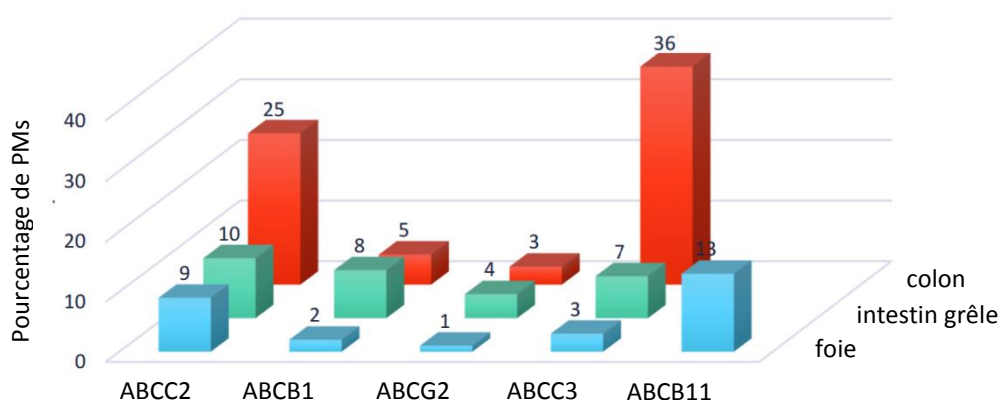


Figure 59 : Abondance des principaux transporteurs ABC dans le colon, l'intestin grêle et le foie ^[158]

I.3. Implication pharmacologique

Sur le plan pharmacologique, les transporteurs membranaires sont très impliqués dans la pharmacocinétique du médicament, les interactions médicamenteuses et la multi-résistance aux drogues des cellules cancéreuses.

Certains transporteurs sont responsables des interactions médicamenteuses. Prenons l'exemple de la digoxine, un principe actif toxique utilisé uniquement dans les cas graves d'insuffisance cardiaque. Après l'absorption dans les entérocytes, une partie du médicament est rejetée dans la lumière intestinale par le transporteur ABCB1. Ce transport est inactivé si un inhibiteur d'ABCB1, comme la clarithromycine (un antibiotique), est co-administré. Par conséquent, la concentration sanguine de la digoxine sera augmentée, entraînant des effets toxiques.^[161]

Vu la distribution tissulaire et le rôle biologique important d'ABCC2, il est un des acteurs principaux dans l'absorption, l'élimination des médicaments, les interactions médicamenteuses ainsi que la détoxification des produits toxiques.^[162,163]

D'autre part, ABCC2 est détecté dans plusieurs tissus tumoraux, incluant les tissus tumoraux hépatocellulaire, rénal, colorectal, ovarien, pulmonaire, les leucémies, le cancer du sein, de la vessie et de l'estomac. La surexpression de ce transporteur provoque la résistance aux anticancéreux qui sont ses substrats. Par exemple, la résistance au cisplatine est associée à une augmentation de l'expression d'ABCC2.^[159]

II. Inhibiteurs d'ABCC2

Jusqu'à ce jour, les inhibiteurs d'ABCC2 identifiés par les tests cellulaires sont très peu nombreux et présentent une efficacité limitée, à savoir, le MK-571 ($K_i = 26 \mu\text{M}$), la réserpine ($K_i = 295 \mu\text{M}$), l'étoposide ($K_i = 750 \mu\text{M}$),^[164] la gémifloxacin ($CI_{50} = 16 \mu\text{M}$)^[165] et la cyclosporine A ($CI_{50} = 20 \mu\text{M}$)^[166] (**Figure 60**). A cela s'ajoute un problème de sélectivité puisque, à cause de leur similarité structurale, les protéines ABC partagent très souvent leurs inhibiteurs. Par exemple, la cyclosporine A inhibe également ABCB1 et ABCC1.^[166]

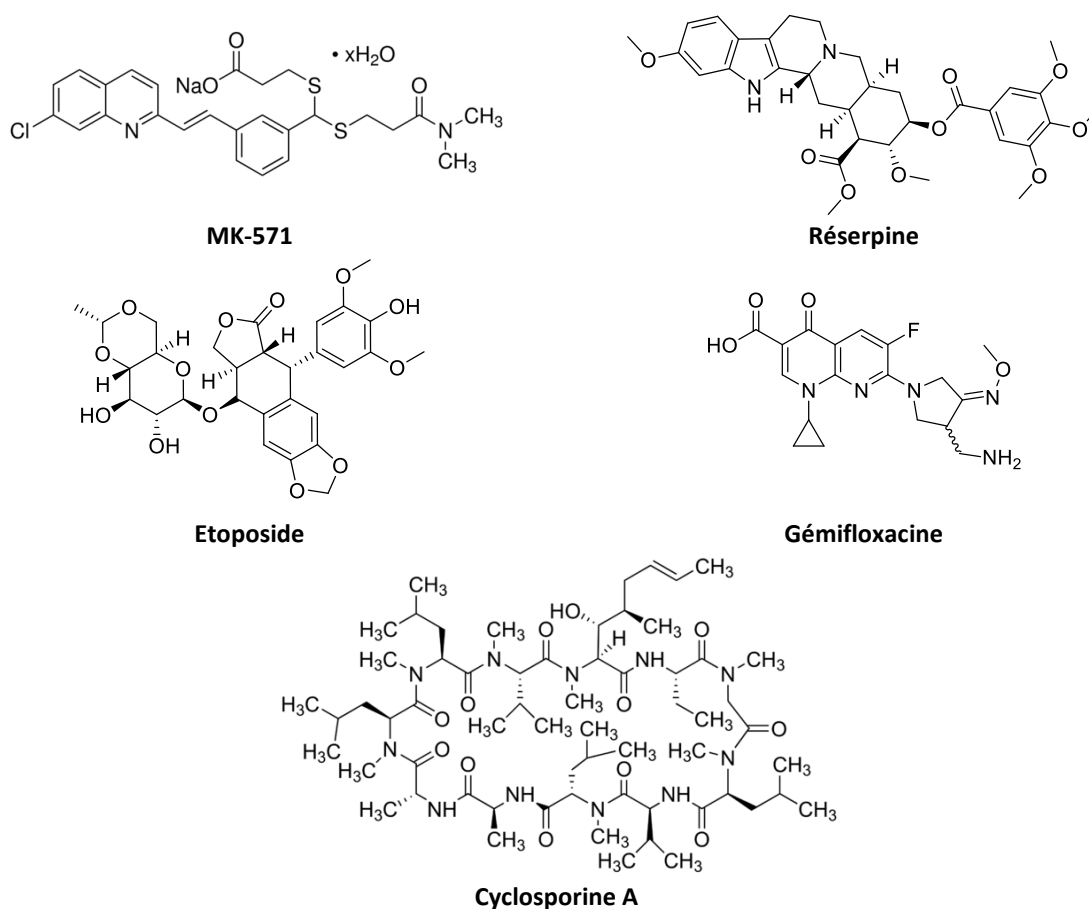


Figure 60 : Structure d'inhibiteurs d'ABCC2

III. Objectifs du projet

Au cours du développement de nouveaux médicaments, il est souhaitable de pouvoir prédire de manière précoce les interactions potentielles des candidats médicaments avec les systèmes déterminants du profil pharmacocinétique et toxicologique, à savoir, les enzymes hépatiques (cytochromes P450) et les transporteurs. Ces connaissances permettent de mieux envisager les interactions médicamenteuses et d'estimer la posologie. L'importance de cet aspect a été soulignée par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA - Food and Drug Administration) et l'Agence européenne des médicaments.^[167,168]

Pour mettre en place les modèles de prédiction *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*, il faut avoir en mains des inhibiteurs connus du transporteur en question.^[169] Dans le cas d'ABCC2, un inhibiteur efficace est toujours recherché.

Puisque la structure haute résolution tridimensionnelle d'ABCC2 n'est pas encore résolue, on ne peut pas compter sur le « Structure-based drug design » pour concevoir les inhibiteurs de

cette protéine. Nous allons donc présenter notre approche de criblage de chimiothèques à la recherche de molécules possédant une activité inhibitrice sur ABCC2. Des études préliminaires de pharmacomodulation pour établir une relation structure-activité ont été mises en œuvre et sont exposées dans cette partie.

IV. Mise en place d'un test *in cellulo* d'inhibition d'ABCC2

La cytométrie en flux détecte les cellules émettant des signaux fluorescents. Afin d'utiliser cette méthode et de profiter de sa robustesse pour le criblage à haut débit, il nous a fallu mettre en place un essai de transport *in cellulo* d'un substrat fluorescent d'ABCC2. Parmi les molécules fluorescentes étudiées, nous avons sélectionné la calcéine, un substrat d'ABCC2.

Lorsque la forme non fluorescente apolaire (l'ester méthylique de la calcéine) est incubée avec les cellules, elle pénètre la membrane cellulaire par diffusion passive. À l'intérieur de la cellule, les fonctions ester sont hydrolysées en présence d'estérases pour produire la calcéine fluorescente (**Figure 61**). Cette forme ionique, incapable de diffuser librement à travers la membrane plasmique, ne peut s'échapper de la cellule que par l'efflux grâce à des transporteurs membranaires dont ABCC2.

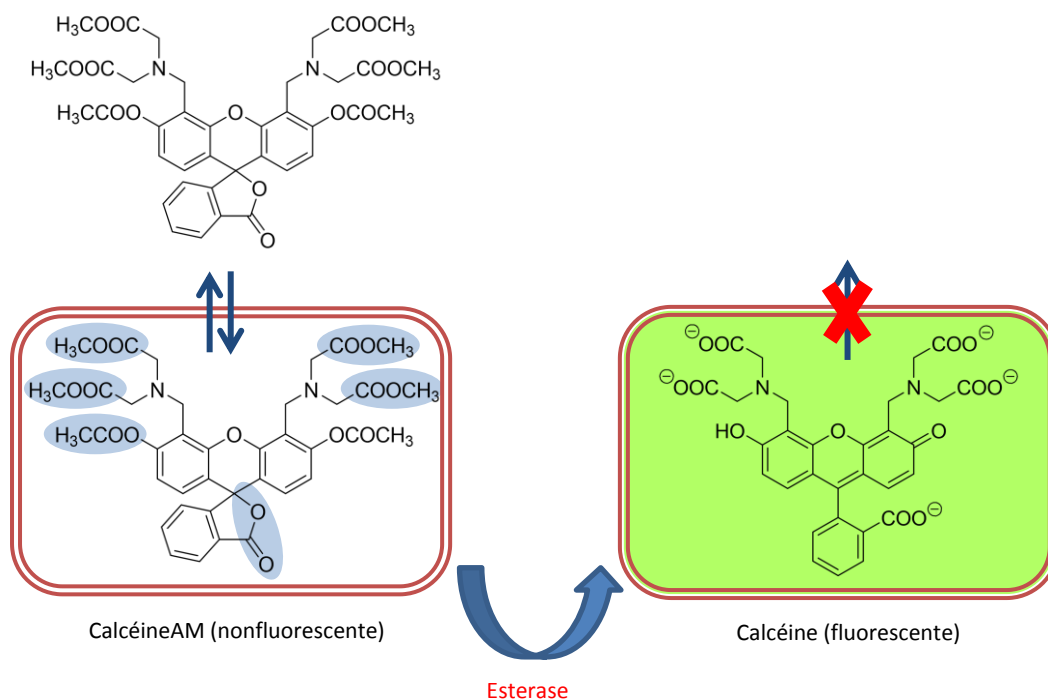


Figure 61 : Mécanisme de fluorescence de la calcéine

En utilisant les cellules MDCKII (Madin-Darby Canine Kidney II) exprimant la protéine ABCC2 par transfection, la quantité de calcéine accumulée, qui se traduit par la fluorescence mesurée, est proportionnelle à l'activité inhibitrice de la molécule testée vis-à-vis du transporteur ABCC2.

Il faut noter que dans ce type de cellules, il existe naturellement d'autres transporteurs ABC, notamment ABCB1 et ABCC1 dont la calcéine est un substrat commun. C'est pourquoi il faut ajouter deux inhibiteurs de ces transporteurs : le GF-120918 (inhibiteur d'ABCB1) et le MK-571 (inhibiteur d'ABCC1) (**Figure 62**). Il a été démontré qu'aux concentrations utilisées, ces deux molécules n'exercent aucune activité inhibitrice sur le transporteur ABCC2.

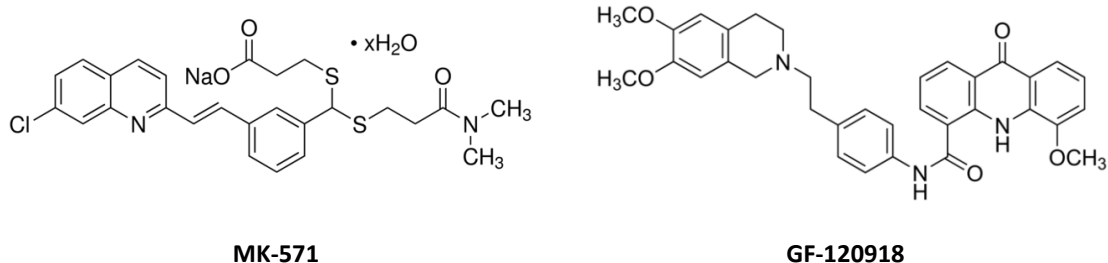


Figure 62 : Structures du MK-571 et du GF-120918

V. Identification des inhibiteurs d'ABCC2 par criblage à haut débit des chimiothèques

V.1. Introduction

Lors de l'étape de criblage, plus de 500 composés d'une vingtaine de familles ont été testés, y compris les dérivés de flavonoïde : flavone, flavonol, flavanone, flavanol, chromone, aurone, chalcone,^[170-172] xanthone, les flavonoïdes dimérisés, les dérivés de quinolone, alcaloïde, acridone, thiourée, les diphényloxazolines, les biphénylimines, les analogues de stéroïde et de peptide,^[173] les indenoindoles, les benzofuranes, les phthalimides, les carbazoles, les indazoles, les acides carboxyliques, les carbamazones (**Figure 63**). Ces composés ont été choisis car il a été démontré que les molécules d'origine naturelle et leurs analogues synthétiques peuvent interagir avec les protéines ABC, y compris ABCC2.^[158]

L'essai *in cellulo* d'inhibition de transport de la calcéine a été établi par l'équipe de l'IBCP dans le cadre des travaux de thèse du Docteur Elisabeta Baiceanu. Cet essai, effectué sur un cytomètre Macsquant VYB (Miltenyi Biotec), permet de screener rapidement les chimiothèques à la vitesse de 20 composés/heure en utilisant des microplaques à 96 puits. Les composés ont été testés à 5 μM et comparés à la cyclosporine A, utilisée à 25 μM .

V.2. Résultats

Les résultats de criblage sont résumés dans la **Figure 64**. Les composés d'une même famille dérivée d'aurones, les 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2*H*)-ones, se sont révélés être les plus actifs (barres oranges) comme inhibiteurs de transport d'ABCC2 (une analyse plus détaillée sur ces composés sera décrite dans la section suivante). Plus précisément, tous les dérivés criblés sont dihydroxylés en position 4 et 6. Il faut noter que les aurones et les azaurones sont inactifs malgré leur similarité structurale avec les dérivés indoliques, suggérant un rôle important du cycle indole.

D'après ces résultats de criblage, nous avons par la suite focalisé nos travaux sur cette famille de 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2*H*)-ones. Mes travaux personnels ont consisté à effectuer une étude de pharmacomodulation en modifiant la position et la nature des substituants, dans un premier temps au niveau du cycle indole. L'interprétation des résultats

biologiques permettaient par la suite de cerner les structures les plus actives et d'en retirer les relations structure-activité.

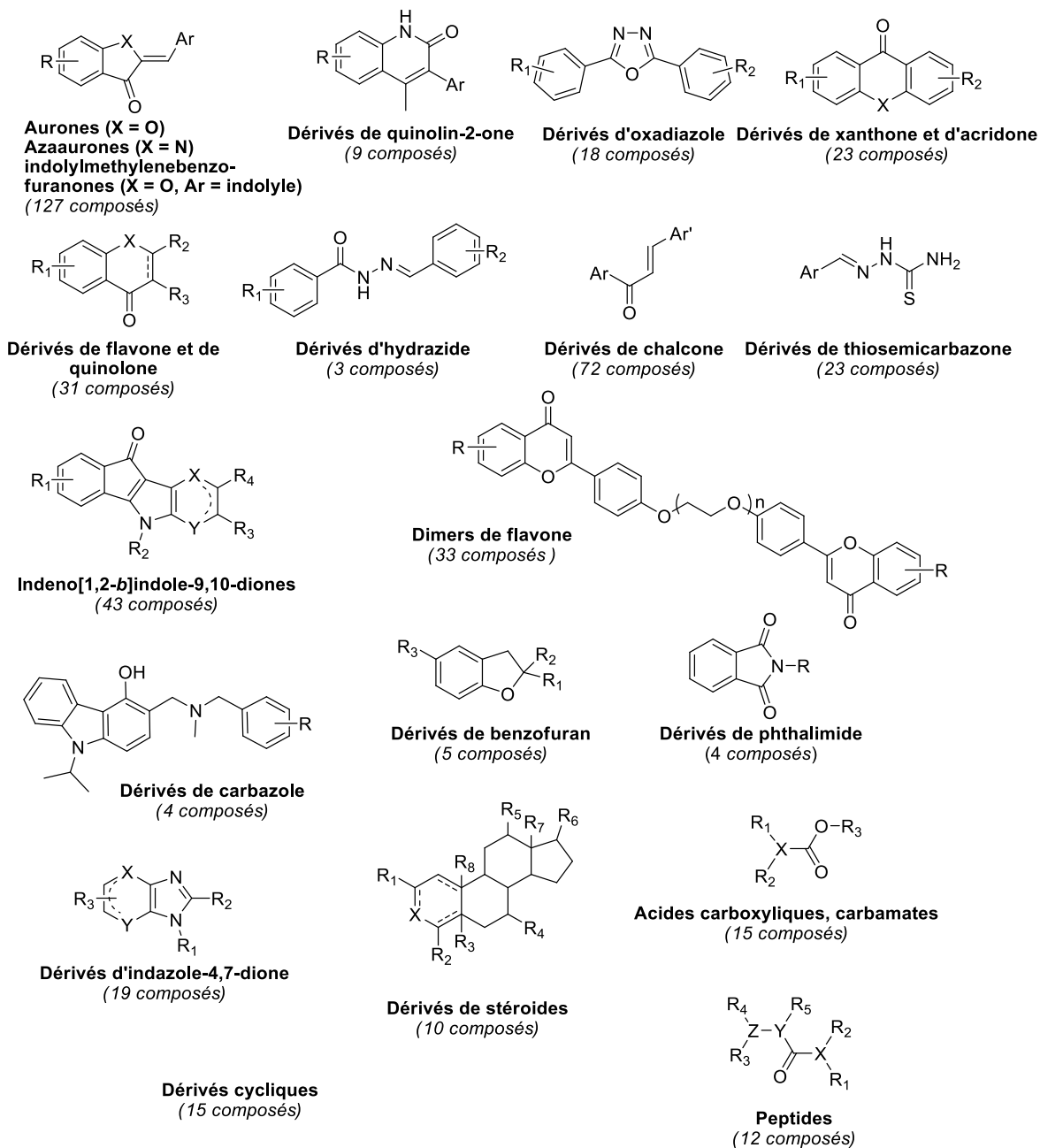


Figure 63 : Principales classes des composés testés

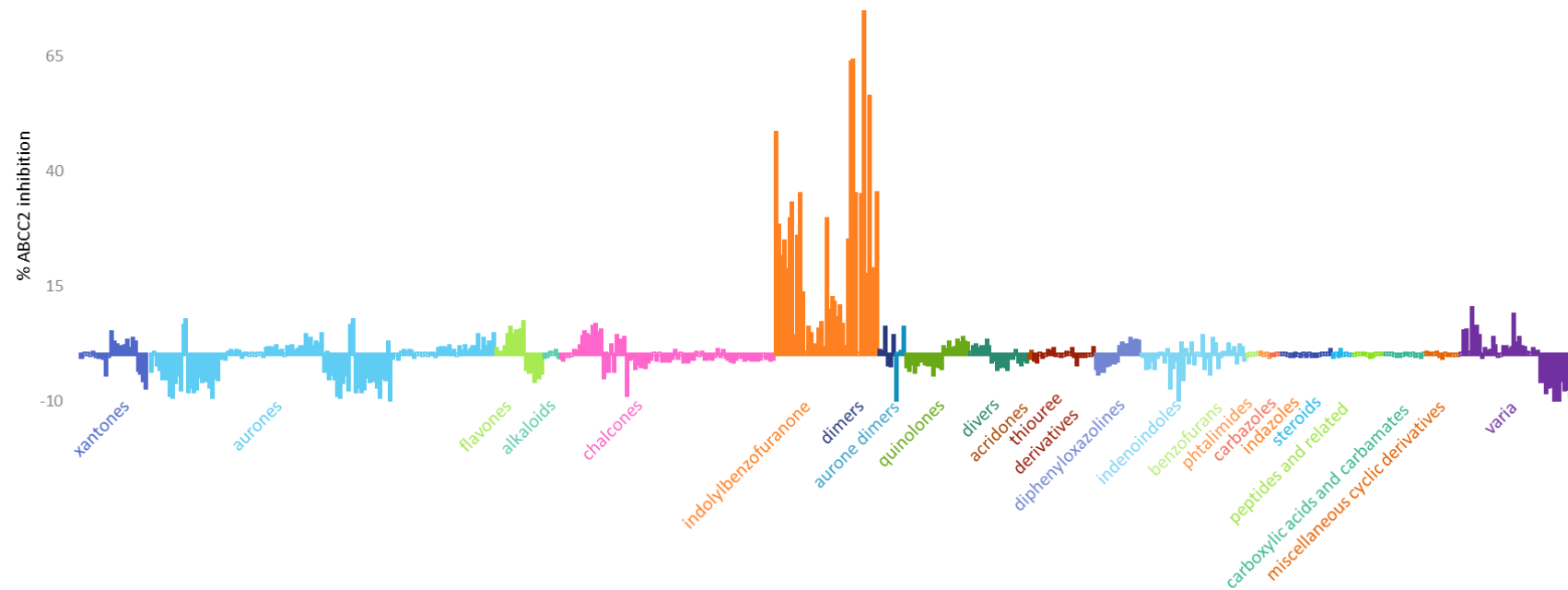


Figure 64 : Résultats des molécules testées, exprimés en pourcentage d'inhibition du transport de la calcéine par ABCC2. Les cellules sont incubées avec les molécules à 5 μ M. Les valeurs négatives sont dues à la variation de quantité de calcéine accumulée dans la cellule après le traitement avec les molécules.

VI. Les 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2*H*)-ones

VI.1. Introduction : les aurones

VI.1.1. Origine des aurones

La plupart des flavonoïdes sont les pigments naturels largement distribués dans les plantes, responsables de la coloration jaune à rouge des fleurs et des fruits (leur nom vient du terme latin *flavus* qui signifie « jaune »). Ces métabolites secondaires sont classés dans huit sous-groupes : les chalcones, les flavanones, les flavones, les flavonols, les flavanediols, les anthocyanidines et les proanthocyanidines et les aurones.^[174]

La structure des flavonoïdes comprend deux cycles aromatiques (nommés cycle A et cycle B) reliés par trois carbones (C₆-C₃-C₆). Ces trois carbones font souvent partie d'un hétérocycle (nommé cycle C) à 5 (aurones) ou 6 chaînons (flavones, flavonols, etc.) ou forment simplement une chaîne (chalcones). La structure des sous-groupes des flavonoïdes est illustrée dans la **Figure 65**.

Les flavonoïdes assurent des fonctions biologiques diverses, par exemple, la protection contre le rayonnement UV et les phytopathogènes, la modulation du transport d'auxine (une phytohormone), ainsi que la coloration des fleurs pour attirer les pollinisateurs, etc.^[174]

En ce qui concerne les aurones ((*Z*)-2-benzylidène-benzofuran-3(2*H*)-ones), les cycles A et C forment un noyau benzofuran-3(2*H*)-one dont la position 2 est reliée avec un phényle (cycle C) par une double liaison en configuration *Z*. Présents dans la nature moins fréquemment que les flavones ou flavonols, les aurones ont tout de même des activités pharmacologiques intéressantes à étudier et exploiter.^[175]

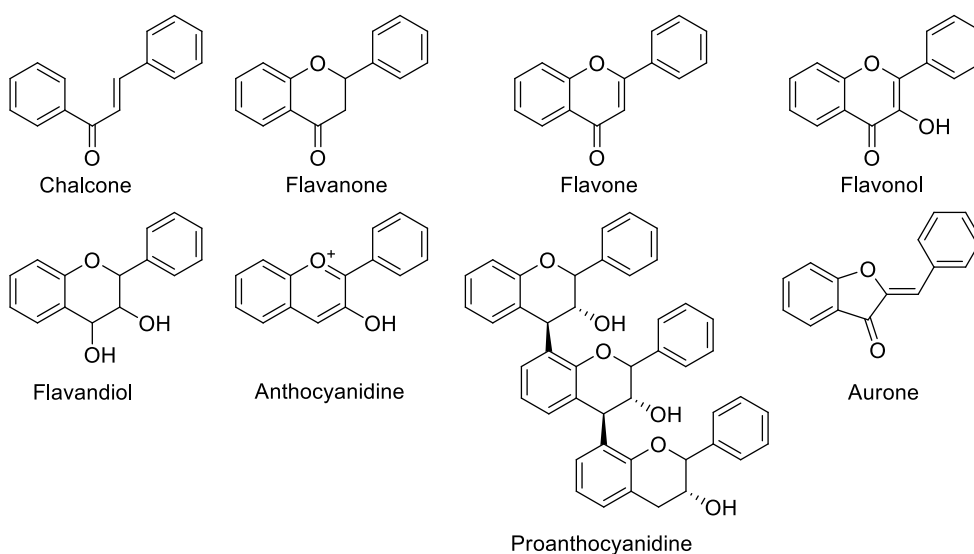


Figure 65 : Structure des flavonoïdes

VI.1.2. Stratégies de synthèse chimique des aurones

Les aurones naturelles sont présentes en très faible quantité dans certaines fleurs. D'ailleurs, l'extraction et la séparation des produits naturels dans les plantes représentent un véritable challenge. Pour obtenir des quantités plus conséquentes de ces dérivés, différentes voies de synthèse ont été proposées (**Schéma 24**). Cela permet d'assurer une source suffisante pour étudier leurs activités biologiques. En outre, la synthèse chimique peut générer facilement des analogues non-naturels pour élargir la diversité structurale nécessaire à la pharmacomodulation.

Premièrement, les aurones peuvent être préparés à partir des 2'-hydroxychalcones correspondantes *via* une cyclisation oxydante en présence de bromure de cuivre(II) dans le DMSO,^[176] ou en présence d'acétate de mercure(II) dans l'acide acétique ou dans la pyridine.^[177]

Une autre approche propose de synthétiser les aurones en trois étapes à partir d'un 2-hydroxybenzaldéhyde et un dérivé d'éthynylbenzène *via* une réaction d'alcynylation. Le 1,3-diphénylprop-2-yn-1-ol obtenu est cyclisé en présence d'un sel d'or(I) (AuCl). La dernière étape consiste en une oxydation du groupe hydroxyle de la position 3 en cétone par le dioxyde de manganèse.^[178]

Concernant la troisième stratégie, il s'agit d'une réaction de Suzuki entre un dérivé de 2-(bromométhylène)-benzofuran-3(2*H*)-one et un acide phénylboronique.^[179]

Enfin, la stratégie la plus utilisée actuellement consiste en une condensation aldolique entre une benzofuran-3(2*H*)-one et un dérivé de benzaldéhyde. Cette réaction peut être effectuée dans plusieurs conditions différentes, en présence d'une base ou d'un acide, par exemple, l'hydroxyde de potassium dans le méthanol à température ambiante ou à reflux,^[180] ou bien en présence d'acide acétique glacial et d'acide chlorhydrique concentré.^[181] Dans certains cas, la condensation peut être réalisée en conditions douces sur alumine neutre dans le DCM à température ambiante.^[182] Néanmoins, la réactivité des substrats de départ et le rendement de la réaction dépendent considérablement des substituants présents sur les cycles aromatiques.^[183]

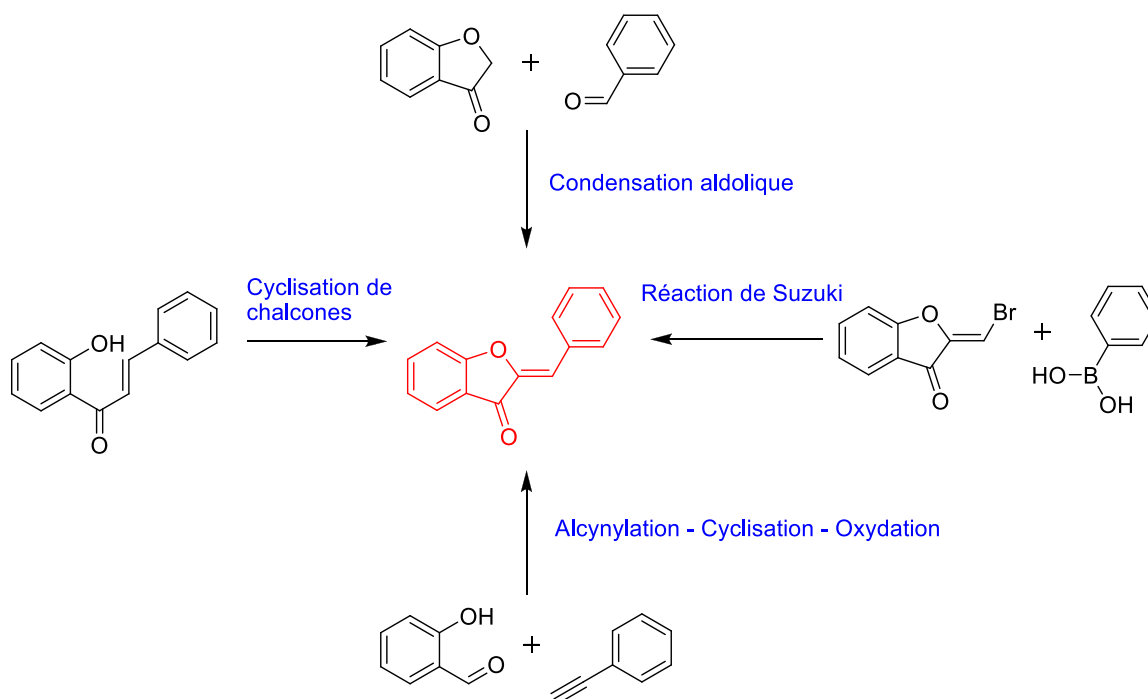


Schéma 24 : Stratégies de synthèse d'aurones

VI.1.3. Activités biologiques des aurones

Les aurones naturelles ainsi que leurs dérivés synthétiques possèdent une large gamme d'activités biologiques, à savoir, anti-cancéreuse, antimicrobienne, antivirale, antihormonale, anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-obésité, etc.^[175] La recherche en chimie médicinale autour des aurones et de leurs dérivés synthétiques est très active ces dernières années. Seules les découvertes les plus récentes autour de cette structure sont résumées dans cette section.

En 2017, Sutton *et al.* ont publié des résultats sur l'activité antifongique des aurones contre les trois espèces de *Candida*. Le meilleur composé possède une valeur de CI_{50} à $16 \mu M$. De plus, celui-ci est capable d'inhiber la formation de biofilm d'une manière comparable à un traitement avec l'amphotéricine B.^[184]

Toujours en 2017, une autre étude décrit la synthèse des 3-thioaurones à partir des aurones correspondantes pour évaluer l'impact de cette modification structurale sur l'activité inhibitrice contre deux enzymes : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Ce travail a révélé que les meilleurs inhibiteurs sont des aurones alors que leurs analogues soufrés n'expriment pas d'activité inhibitrice.^[185]

En 2016, l'équipe de Priyadarshani *et al.* ont généré des dérivés d'aurones plus originaux en combinant des éléments pharmacophoriques. Cette approche a permis d'obtenir les 2-arylidèneimidazo[1,2-*a*]pyridinones, des antitumoraux agissant *via* l'inhibition de la topoisomérase II α et plus efficaces qu'un anticancéreux connu – l'étoposide. Leurs structures sont présentées dans la **Figure 66**.^[186]

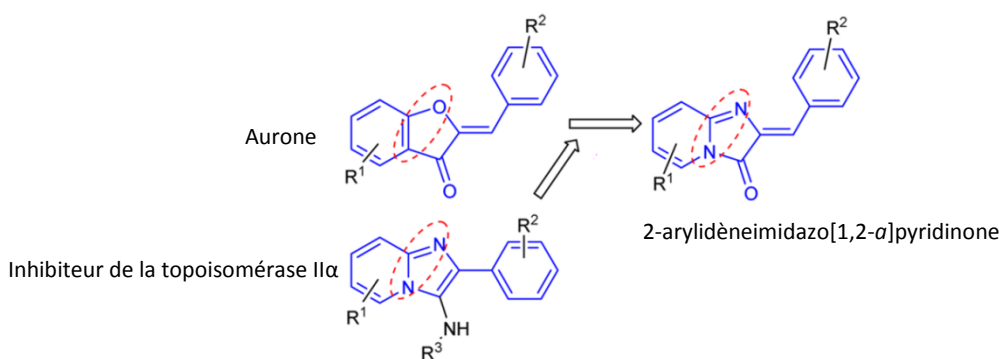


Figure 66 : Structure des 2-arylidèneimidazo[1,2-*a*]pyridinones ^[186]

D'autre part, une étude récente mise en œuvre par Lunven *et al.* a montré que les aurones polyhydroxylées, synthétisées au sein de notre laboratoire peuvent interagir voire inhiber presque complètement la fibrillation de la protéine Tau dans un modèle *in vitro*. La formation d'agrégats de cette protéine est décrite dans plusieurs maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer. Ce travail a révélé une application prometteuse des aurones en traitement ainsi qu'en diagnostic de cette maladie.^[187]

Comme les enzymes tyrosinases sont impliquées dans la production de la mélanine, leurs inhibiteurs peuvent devenir des candidats médicaments utilisés dans le traitement du

mélanome. En fonction des substituants sur le cycle B, les aurones peuvent agir comme inhibiteurs, activateurs ou substrats des tyrosinases.^[180] Dans ce contexte, Haudecœur *et al.* ont développé récemment des dérivés d'aurones agissant comme inhibiteurs de la tyrosinase humaine. Il s'agit des composés les plus actifs vis-à-vis de cette enzyme décrits à ce jour. La modification de la structure des aurones a consisté à remplacer le cycle B par un motif de 2-hydroxypyridine-*N*-oxide (HOPNO), dont le mode d'inhibition de l'enzyme sur son site actif avait été montré au niveau moléculaire.^[188]

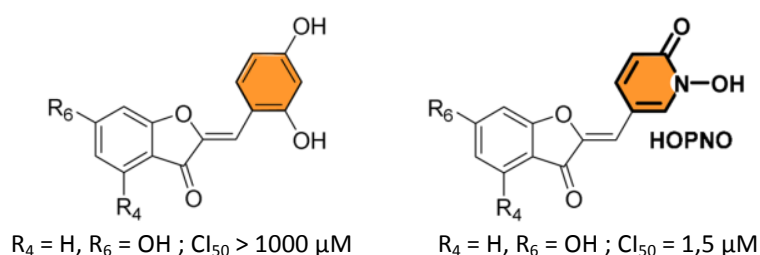


Figure 67 : Structures des aurones et HOPNO-aurones, inhibiteurs d'une tyrosinase humaine ^[188]

Par ailleurs, il a été montré par notre laboratoire que les aurones dont le cycle B est remplacé par un motif indolique (les 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2*H*)-ones) sont des inhibiteurs allostériques de l'ARN polymérase ARN-dépendant du virus d'hépatite C.^[189]

Les aurones sont également capables de moduler l'activité des transporteurs ABC, notamment ABCG2 et ABCB1.^[190,191]

A travers ces résultats, il apparaît que, non seulement les aurones sont elles-mêmes des molécules bioactives, mais elles servent aussi de squelette de base pour créer de nouvelles structures grâce à l'imagination des chimistes.

VI.2. Synthèse des 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2H)-ones

Grâce au criblage à haut débit des chimiothèques, nous avons identifié la famille des molécules la plus prometteuse – les 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones. Par la suite, dans un premier temps, nous avons décidé de modifier uniquement le cycle indole en conservant le motif 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one. Cette stratégie nous permet d'évaluer l'impact de la nature et de la position de substituants au niveau du cycle indole sur l'activité inhibitrice des analogues résultats. Dans un deuxième temps, nous avons mis en œuvre la pharmacomodulation au niveau de la benzofuran-3(2H)-one, en remplaçant les groupements hydroxyyles par d'autres substituants. Enfin, quelques dérivés dimériques ont été également préparés.

VI.2.1. Synthèse des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones

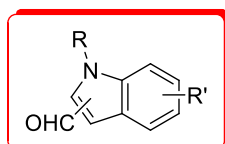
VI.2.1.1. Synthèse de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one

En fonction des substituants, différentes approches sont utilisées pour synthétiser les benzofuran-3(2H)-ones substituées. La 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one a été préparée en deux étapes (**Schéma 25**). La première étape consiste en une réaction de Houben-Hoesch à partir du phloroglucinol et du chloroacétonitrile en présence d'acide chlorhydrique et de chlorure de zinc(II) dans l'éther. En deuxième lieu, l'iminium formé est hydrolysé et cyclisé dans l'eau à reflux pendant 5 heures pour donner le produit attendu avec un rendement de 84% pour ces deux étapes.^[183]

VI.2.1.2. Synthèse des dérivés d'indole carboxaldéhydes N-substitués

La *N*-alkylation a été effectuée en présence d'hydrure de sodium dans le diméthylformamide à température ambiante pour préparer les dérivés d'indole carboxaldéhyde *N*-substitués (**Schéma 25**).^[189] Les halogénoalcanes et les indolcarboxaldéhydes ont été sélectionnés délibérément parmi les composés commercialement disponibles afin d'étudier l'impact de différents paramètres sur l'activité des aurones résultantes : la position d'ancrage sur la benzofuranone (c'est-à-dire la position du groupement aldéhyde de l'indole carboxaldéhyde) ; la nature et la taille du substituant sur l'azote (chaîne linéaire, chaîne ramifiée, cycle non-aromatique ou cycle aromatique) ; la nature et la position des substituants sur l'indole. Les produits ont été obtenus avec des rendements variant de 42 à 100% après avoir été purifiés par

chromatographie sur colonne. Les composés **52y** et **52z** ont été exceptionnellement utilisés sans purification. La structure et le rendement des produits synthétisés sont regroupés dans le **Tableau 10**. Les produits **52a-g** et **52t-z** ont été synthétisés au cours de ma thèse. Les autres dérivés (**52h-52s**) ont été préparés et caractérisés par les anciens doctorants et stagiaires du DPM.



Composé	Indole	Rdt (%)	Composé	Indole	Rdt (%)
52a		44	52j		52
52b		93	52k		83
52c		68	52l		99
52d		81	52m		61
52e		85	52n		80
52f		93	52o		69
52g		65	52p		75
52h		93	52q		59
52i		42	52r		92

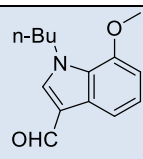
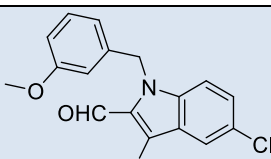
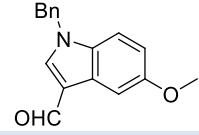
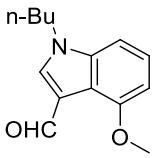
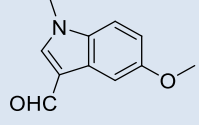
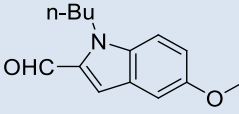
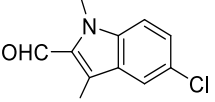
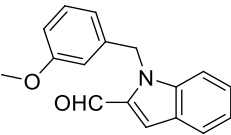
Composé	Indole	Rdt (%)	Composé	Indole	Rdt (%)
52s		69	52w		58
52t		81	52x		86
52u		Quantitatif	52y		Sans purification
52v		60	52z		Sans purification

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des structures synthétisées en précisant le rendement de la substitution nucléophile (après purification). Le rendement des composés **52h-s** se trouve dans la référence ^[189].

VI.2.1.3. Synthèse des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones

Les 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2H)-ones sont synthétisés de la même manière que les aurones, à savoir par une condensation aldolique. Pour ce faire, la benzofuranone **51** a été condensée avec les dérivés d'indole carboxaldéhyde *N*-substitués **52a-z** dans une solution eau-éthanol de KOH concentré, chauffée à reflux (**Schéma 25**).^[189] Les produits ont été obtenus avec des rendements variant de 24 à 96% après avoir été purifiés par chromatographie sur colonne, suivie d'une recristallisation dans l'acétonitrile.

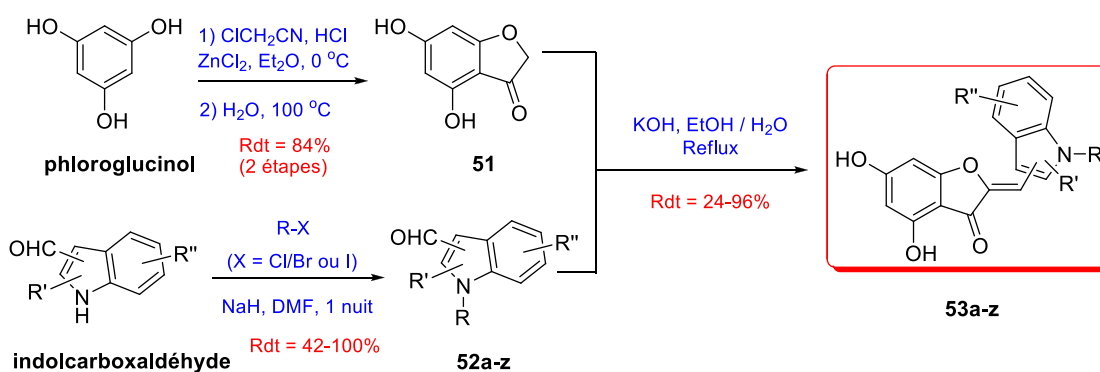
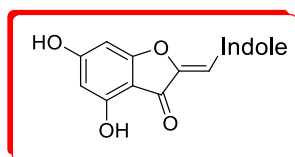


Schéma 25 : Synthèse des composés **53a-z**

La structure et le rendement des produits synthétisés sont regroupés dans le **Tableau 11**. Les produits **53a-g** et **53t-z** ont été synthétisés au cours de ma thèse. Les autres dérivés (**53h-53s**) sont disponibles dans la chimiothèque du DPM.



Composé	Indole	Rdt (%)	Composé	Indole	Rdt (%)
53a		47	53k		80
53b		24	53l		73
53c		32	53m		62
53d		41	53n		72
53e		33	53o		61
53f		96	53p		81
53g		56	53q		56
53h		66	53r		85
53i		54	53s		78
53j		87	53t		26

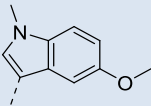
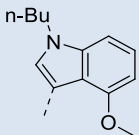
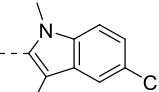
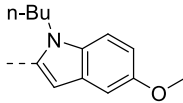
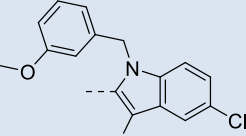
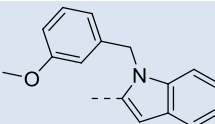
Composé	Indole	Rdt (%)	Composé	Indole	Rdt (%)
53u		38	53x		59
53v		31	53y		60
53w		71	53z		44

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des structures synthétisées en précisant le rendement de la condensation aldolique (après purification). Le rendement des composés **53h-s** se trouve dans la référence.^[189]

VI.3. Activité inhibitrice des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones vis-à-vis du transporteur ABCC2

Dans ce paragraphe, nous allons présenter les résultats biologiques de tous les 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones évalués, incluant ceux qui étaient déjà disponibles dans notre chimiothèque (**53h-s**), ainsi que ceux qui ont été synthétisés au cours de mes travaux de thèse (**53a-g**). Certains composés (**53t-z**) sont à ce jour en attente de résultat biologique.

Comme indiqué dans la **Figure 64**, ces analogues d'aurone, testés à 5 μM , sont beaucoup plus efficaces que la molécule de référence (la cyclosporine A) à 25 μM . Les valeurs de CI_{50} , calculées et rapportées dans le **Tableau 12**, varient de 4 μM pour les meilleurs inhibiteurs à 20 μM pour les moins actifs, alors que la cyclosporine A présente une activité inhibitrice inférieure, avec une valeur de CI_{50} autour de 26 μM . (Pour calculer la valeur de CI_{50} d'un inhibiteur, un composé est testé à plusieurs concentrations afin d'établir une courbe d'inhibition, à partir de laquelle la valeur de CI_{50} est déterminée : ici il s'agit de la concentration minimum qui inhibe 50% de l'efflux de la calcéine).

Afin de confirmer l'efficacité de ces inhibiteurs, nous les avons testés à nouveau dans un système cellulaire autre que les cellules MDCKII : les cellules Flp-InTM-293 transfectées avec un gène codant pour le transporteur ABCC2. Le résultat sur ces dernières est en phase avec celui obtenu sur les cellules MDCKII. La **Figure 68** compare l'activité inhibitrice des composés, exprimée en pourcentage d'inhibition, sur les deux lignées cellulaires (MDCKII-ABCC2 et Flp-InTM-293-ABCC2). Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{ABC}_{\text{S+I}} - \text{ABC}_{\text{S}}}{\text{Contrôle}_{\text{S+I}} - \text{ABC}_{\text{S}}} \times 100$$

où $\text{ABC}_{\text{S+I}}$ représente la fluorescence intracellulaire des cellules transfectées en présence du substrat (la calcéine) et d'un inhibiteur ; ABC_{S} est la fluorescence intracellulaire des cellules transfectées avec seulement le substrat ; $\text{Contrôle}_{\text{S+I}}$ correspond à la fluorescence intracellulaire des cellules témoins en présence du substrat et d'un inhibiteur.

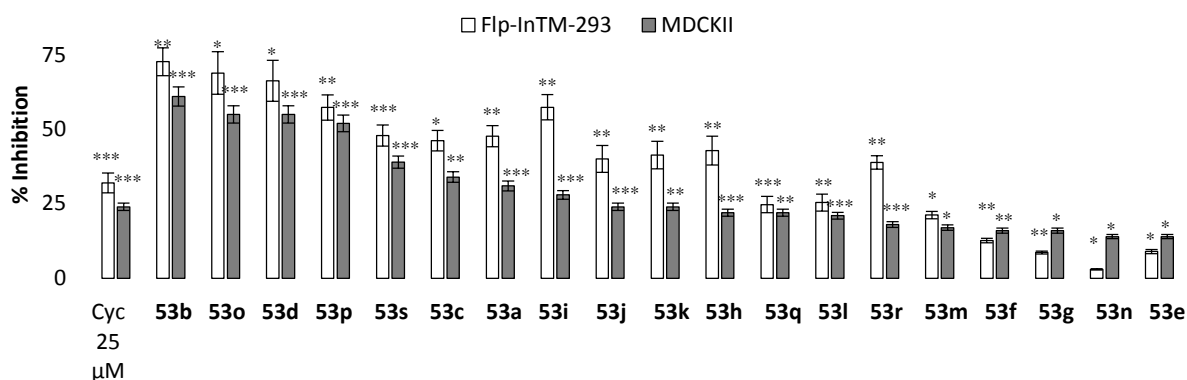
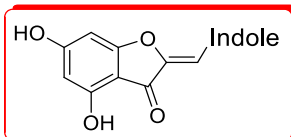


Figure 68 : Inhibition du transport de la calcéine *via* ABCC2 (%) par les composés à 5 μ M. ABCC2 est exprimé dans les cellules Flp-InTM-293 (barres blanches) et MDCKII (barres grises).

A partir de l'ensemble des résultats biologiques disponibles, nous pouvons dégager quelques remarques préliminaires sur les relations structure-activité de ces dérivés d'aurones. Comme abordé dans la section V.2, le cycle indole semble indispensable pour l'activité inhibitrice sur ABCC2, puisque les aurones et les azaaurones sont inactives. En ce qui concerne la substitution sur l'azote du cycle indole, les substituants tolérés sont très variés (acyclique ou cyclique, aromatique ou non-aromatique). Par exemple, les composés **53j** (*N*-cyclohexylméthyle), **53k** (*N*-prényle) et **53l** (*N*-benzyle) présentent la même efficacité. D'autre part et de manière générale, une substitution par des chaînes alkyles courtes ou un cyclohexane semble plus favorable qu'avec des groupements aryles, puisque les composés *N*-butylés, *N*-méthylés et *N*-cyclohexylméthylés font partie des meilleurs inhibiteurs (**53b**, **53o**, **53d**, **53p** et **53s**). Néanmoins, il faut noter que l'influence de la substitution sur l'azote dépend de celle sur le cycle indole (**53o**, **53p**, **53s** vs **53r**, **53f**) et inversement (**53d** à **53g**). En outre, il semble légèrement plus avantageux que le cycle indole soit lié à la benzofuranone au niveau du C-3 plutôt qu'au niveau du C-2 (**53o**, **53p** vs **53i**, **53a**). Enfin, une substitution en C-7 du cycle indole est plus favorable qu'une substitution en C-5 (**53s** vs **53r**). Il est à noter que ces dérivés d'aurones ne présentent aucune toxicité pour les cellules MDCKII lors du test de cytotoxicité. La valeur de CI_{50} des meilleurs inhibiteurs (**53b**, **53d**, **53p** et **53o**) est supérieure à

50

mM.



Composé	Indole	CI ₅₀ (μM)	Composé	Indole	CI ₅₀ (μM)
53a		8,2 ± 0,9	53k		11 ± 1
53b		4,1 ± 0,8	53l		12 ± 1
53c		7,3 ± 0,7	53m		14 ± 1
53d		4,5 ± 0,6	53n		18 ± 2
53e		18 ± 2	53o		4,5 ± 0,9
53f		15 ± 2	53p		4,8 ± 0,6
53g		16 ± 2	53q		11,4 ± 0,7
53h		11,1 ± 0,7	53r		14 ± 2
53i		9 ± 2	53s		6,3 ± 0,2
53j		11 ± 1	Cyclosporine A		26 ± 1

Tableau 12 : Bilan des résultats biologiques des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones. CI₅₀ = valeur moyenne de concentration nécessaire à inhiber 50% de l'efflux de la calcéine *via* ABCC2.

VI.4. Sélectivité des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones vis-à-vis du transporteur ABCC2

Trouver un inhibiteur sélectif est extrêmement difficile quand il s'agit des transporteurs ABC car ils partagent plusieurs substrats et inhibiteurs. Dans le cas d'ABCC2, même la cyclosporine A, son meilleur inhibiteur, n'est pas du tout sélective. D'ailleurs, elle inhibe beaucoup plus efficacement l'efflux de la calcéine *via* ABCB1 et ABCC1.

Dans ce contexte, nous avons testé l'activité inhibitrice des 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2H)-ones vis-à-vis d'ABCB1 et d'ABCC1. Parmi les inhibiteurs d'ABCC2 les plus efficaces, **53b**, **53o**, **53d** et **53p** ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis d'ABCC2 bien meilleure que la cyclosporine A. En particulier, le composé **53d** est le plus sélectif sur ABCC2, alors que **53b**, **53o** et **53p** inhibent les trois transporteurs avec une efficacité égale. Trois autres composés, **53a**, **53i** et **53f**, démontrent une sélectivité plus élevée vis-à-vis d'ABCC2, bien qu'ils soient moins efficaces comme inhibiteurs (**Figure 69**).

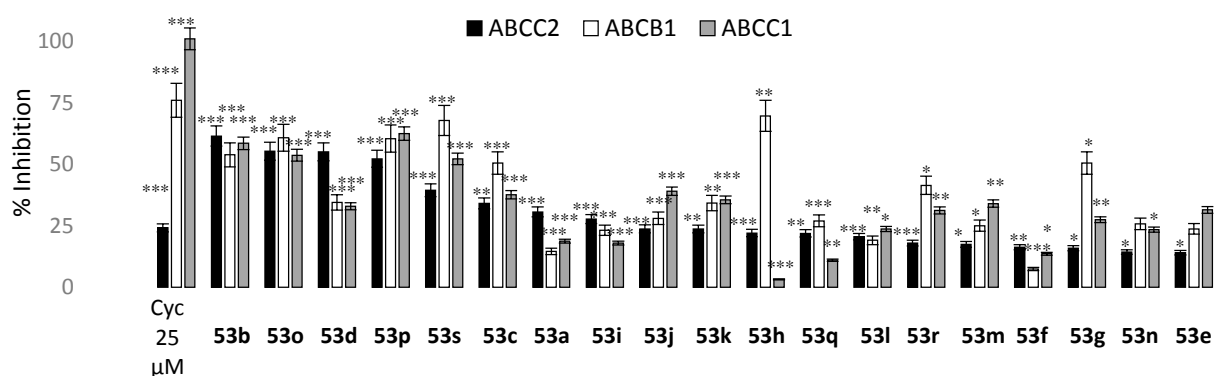


Figure 69 : Inhibition du transport de la calcéine *via* les transporteurs humains ABCC2, ABCB1 et ABCC1 par des 2-indolylméthylène-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones. Les composés ont été testés à 5 μ M sur des cellules exprimant chacun des transporteurs : MDCKII-ABCC2 (barres noires), NIH3T3-ABCB1 (barres blanches), BHK21-ABCC1 (barres grises). La cyclosporine A (Cyc) a été utilisée à 25 μ M pour ABCC2 et ABCC1 et 2,5 μ M pour ABCB1 (***) $p < 0,001$; $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

À ce stade, il n'est pas encore possible d'établir des relations structure-activité claires pour expliquer ces différences au niveau de la sélectivité entre les structures. Pour ce faire, il faudra une étude plus complète en se procurant les résultats d'un grand nombre d'analogues dont les substituants devraient être plus divers.

VI.5. Synthèse des dérivés 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2H)-ones en modifiant la substitution au niveau de la benzofuran-3(2H)-one

D'après les résultats d'évaluation des dérivés 4,6-dihydroxylés, nous avons sélectionné deux meilleurs composés pour effectuer la pharmacomodulation : le composé **53b**, le plus actif sur le plan d'inhibition d'ABCC2 et le composé **53d**, le plus sélectif parmi les meilleurs inhibiteurs d'ABCC2. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'importance et l'implication des deux groupements hydroxyles dans l'interaction avec la protéine ABCC2. Nous avons ainsi préparé les analogues non-hydroxylés, mono-hydroxylés ou méthoxylés de **53b** et **53d**. La synthèse de ces analogues a été mise en œuvre avec l'aide de Somayeh GHAZI, doctorante iranienne présente au DPM 6 mois.

La benzofuran-3(2H)-one et son dérivé 6-hydroxylé, sont commerciaux. Le dérivé 4-hydroxylé a été préparé en trois étapes à partir de 2',6'-dihydroxyacétophénone *via* une réaction d'acétylation des groupements hydroxyles, suivie par une bromation en α du carbonyle en présence de tribromure de triméthylphénylammonium (PTT) et une cyclisation en milieu basique (**Schéma 26**).^[183]

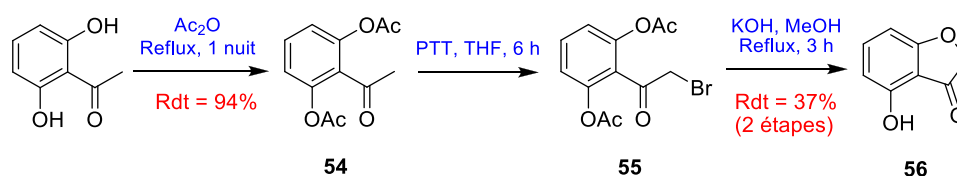


Schéma 26 : Synthèse de 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one

Les dérivés méthoxylés de benzofuran-3(2H)-one ont été préparés à partir des dérivés hydroxylés en utilisant le sulfate de diméthyle en présence de carbonate de potassium dans le diméthoxyéthane (DME) (**Schéma 27**).^[183]

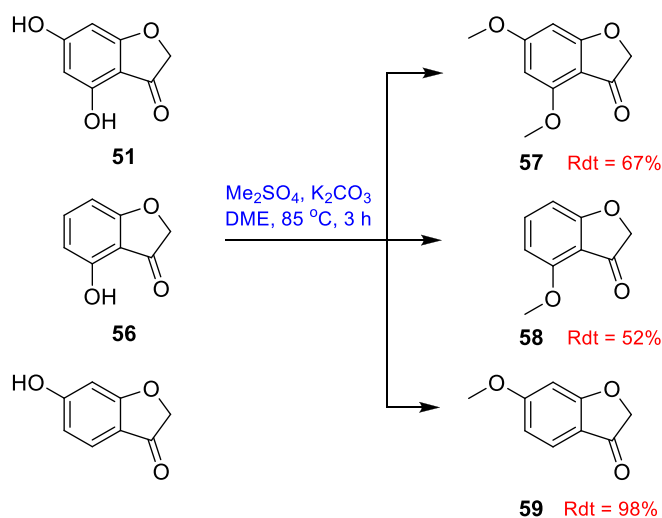
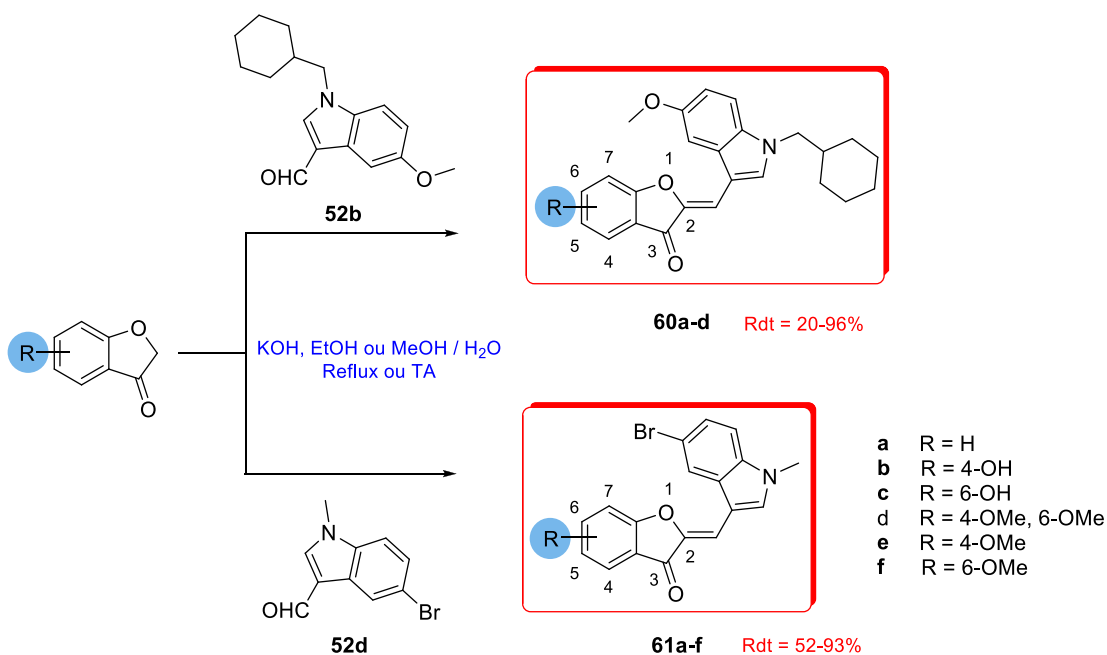
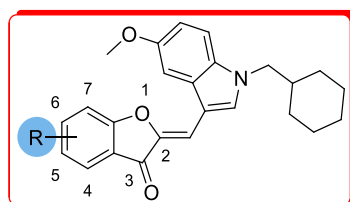


Schéma 27 : Synthèse des benzofuran-3(2H)-ones méthoxylées

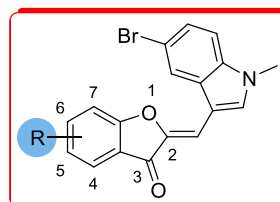
En pratique, la synthèse des dérivés de **53b** et **53d** a consisté également en une condensation aldolique en milieu basique (KOH dans MeOH, à reflux ou à TA) entre un dérivé de benzofuran-3(2H)-one avec le carboxaldéhyde **52b** ou **52d** (Schéma 28).

Schéma 28 : Synthèse des composés **60a-d** et **61a-f**

La structure et le rendement des produits synthétisés sont regroupés dans le **Tableau 13**. A ce jour, ces composés n'ont pas encore été testés.



Composé	R	Rdt (%)
60a	H	87
60b	4-OH	20
60c	6-OH	96
60d	4-OMe, 6-OMe	91



Composé	Indole	Rdt (%)
61a	H	93
61b	4-OH	52
61c	6-OH	77
61d	4-OMe, 6-OMe	91
61e	4-OMe	52
61f	6-OMe	63

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des structures synthétisées (**60a-d** et **61a-f**) en précisant le rendement de la condensation aldolique

VI.6. Synthèse des dérivés dimériques des 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2H)-ones

Comme la protéine ABCC2 est un homodimère, il est possible qu'un ligand dimérique puisse se fixer sur les deux sous-unités, entraînant une amélioration de son affinité vis-à-vis de la protéine. Effectivement, quelques études précédentes ont montré la validité de cette hypothèse sur d'autres protéines ABC, à savoir la protéine ABCB1^[192-194] ou la protéine ABCC1.^[195]

Chan *et al.* ont mis en place la dimérisation d'apigénine, un flavonoïde naturel connu comme inhibiteur de ABCB1.^[194] Les deux monomères sont reliés par une chaîne PEG de 1 à 9 unité d'éthylène glycol ($n = 0-8$). Le meilleur composé (**Figure 70**, $n = 3$) a augmenté l'accumulation des médicaments anticancéreux (paclitaxel, doxorubicine, daunomycine, vincristine et vinblastine) dans des cellules résistantes en réinstaurant de leur effet cytotoxique, qui se traduit par une réduction de CI_{50} de 5 à 50 fois.

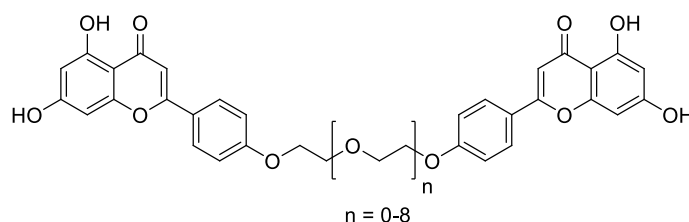


Figure 70 : Structure des dimères d'apigénine.^[194]

Dans une étude sur les inhibiteurs bivalents du transporteur ABCC1, un dérivé dimérique de flavonoïdes (**Figure 71**, $n = 4$, $R^1, R^3 = H$, $R^2 = Me$) a pu restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses résistantes à la doxorubicine et à l'étoposide. L'activité de ce dimère est bien meilleure que les inhibiteurs connus de ABCC1 (vérapamil, probénécide).^[195]

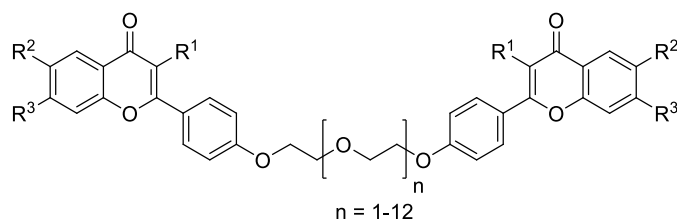


Figure 71 : Structure des dimères de flavonoïdes.^[195]

Nous nous sommes donc investis dans la préparation des inhibiteurs dimériques grâce aux travaux de la doctorante Somayeh Ghazi. La dimérisation a été effectuée sur trois 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2*H*)-ones ayant la substitution sur le cycle indole identique à **53b** et **53d**. Ces monomères possèdent un groupement hydroxyle soit en position 6 (**60c** et **61c**) soit en position 6' (**62**). Ce dernier a été préparé par une déméthylation du composé **60a** par l'action du tribromure de bore (**Schéma 29**).

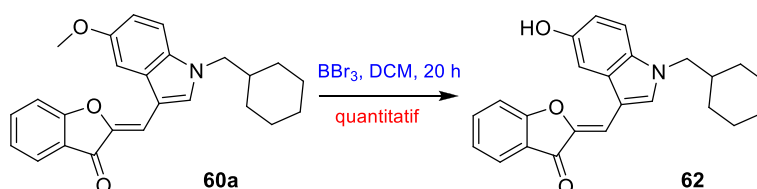


Schéma 29 : Synthèse du composé **62** par une déméthylation

Comme bras espaceur, nous avons choisi les chaînes PEG de différentes longueurs, qui ont été tosylées et ont pu réagir avec le groupement hydroxyle des dérivés indoliques d'aurones par une *O*-alkylation en milieu basique (carbonate de potassium) dans le DMF chauffé à 150 °C (**Schéma 30**).^[195] L'utilisation des chaînes PEG a également pour but d'améliorer la solubilité de produits, puisque des bras espaceurs hydrocarbonés mènent à des produits dimériques insolubles dans tous les solvants.

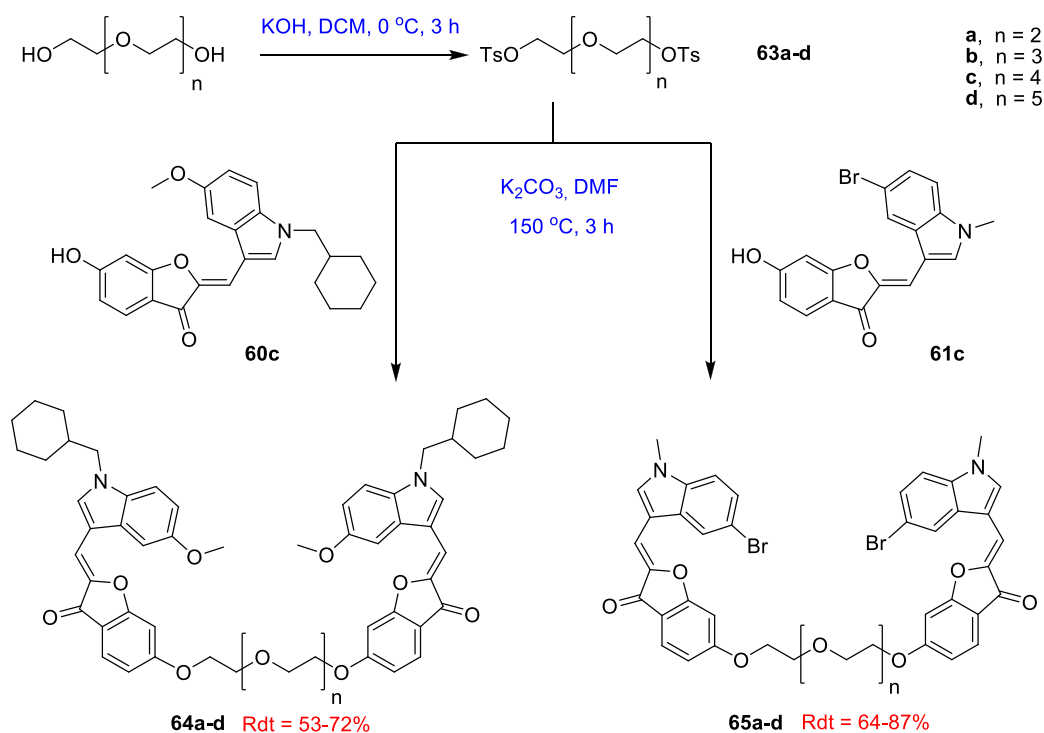
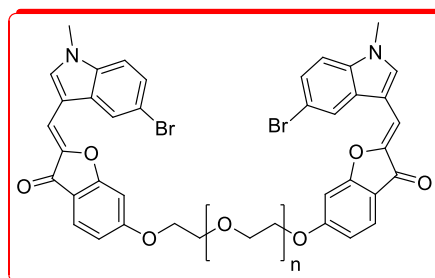
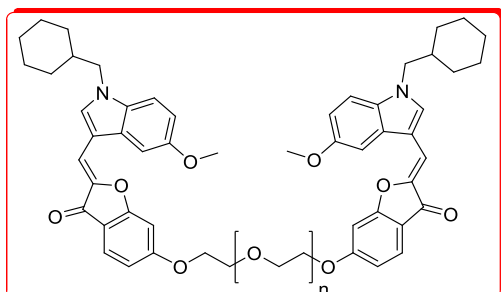


Schéma 30 : Synthèse des dérivés dimériques à partir des composés **60c** et **61c**

La structure et le rendement des dimères synthétisés sont regroupés dans le **Tableau 14**.



Composé	n	Rdt (%)
64a	2	58
64b	3	72
64c	4	53
64d	5	63

Composé	n	Rdt (%)
65a	2	87
65b	3	64
65c	4	77
65d	5	75

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des dimères synthétisés (**64a-d**, **65a-d**) en précisant le rendement de la dimérisation

En utilisant la même condition d'*O*-alkylation, les dimères du composé **62** n'ont pas été obtenus. La déprotonation du groupement hydroxyle en cette position est difficile à cause de la mésomérie du cycle indole. Le remplacement de K_2CO_3 par une base plus forte comme le

KOH n'a pas abouti à une dimérisation. Finalement, nous sommes parvenus à obtenir un dimère du composé **62** en utilisant le NaH à TA pendant 3 jours (**Schéma 31**).

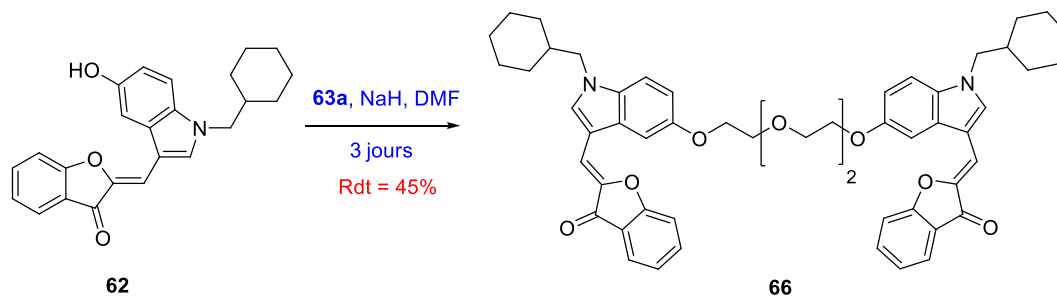


Schéma 31 : Synthèse d'un dimère du composé **62**

Les composés **60a-d**, **61a-f** et les dimères **64a-d**, **65a-d** et **66** sont à ce jour en attente de résultats biologiques.

Conclusion du chapitre 3

Nous avons criblé des chimiothèques qui regroupent plus de 500 composés de structures très diverses. Ce robuste essai *in cellulo* d'inhibition de l'efflux de la calcéine par ABCC2 a permis d'identifier une famille de composés inhibiteurs potentiels d'ABCC2. Ces composés, les 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2*H*)-ones, sont en effet les analogues des aurones naturelles, les 2-benzylidènebenzofurane-3-(2*H*)-ones.

Il est à noter qu'il n'existe aucun obstacle à la préparation de ces dérivés d'aurones, puisque la chimie des aurones est bien maîtrisée par notre laboratoire. Ainsi la pharmacomodulation est facilitée : la synthèse des analogues, l'évaluation biologique puis l'interprétation des résultats peut se faire de façon itérative.

Parmi les composés évalués, membres de cette famille, les composés **53b**, **53d**, **53o** et **53p** sont les meilleurs inhibiteurs d'ABCC2 ($CI_{50} \sim 4 \mu M$), ils sont 5 fois plus actifs que l'inhibiteur de référence, la cyclosporine A. En particulier, le composé **53d** inhibe de manière plus sélective ABCC2 qu'ABCC1 et ABCB1. L'innocuité de ces composés leur assure des perspectives de développement ultérieur comme outils moléculaires dans les études sur ABCC2.

Les résultats obtenus à ce jour sont encourageants non seulement au niveau de l'activité et de la sélectivité mais aussi en terme de cytotoxicité. Ces inhibiteurs pourraient également être utilisés pour mieux comprendre les fonctions du transporteur ABCC2, notamment son implication dans la pharmacocinétique des médicaments et les interactions médicamenteuses.

Conclusion générale et perspectives

Les PMs occupent une grande proportion du protéome car elles interviennent dans plusieurs processus biologiques majeurs. Paradoxalement, la structure de la plupart des PMs reste encore dans l'ombre à cause de la difficulté rencontrée lors de l'extraction, la purification et la cristallisation. La perte de la structure native des PMs, voire leur agrégation dès que les PMs sont forcées à quitter la membrane lipidique, entrave la formation des cristaux et la résolution de leur structure 3D en état fonctionnel. L'utilité de détergents est de remplacer les lipides et maintenir les PMs solubles en milieu aqueux. Or, ces agents ne peuvent pas mimer entièrement les lipides membranaires, par conséquent, ils peuvent également provoquer la perte de l'activité des PMs.

Dans ce contexte, l'axe principal de cette thèse a porté sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'une nouvelle famille de détergents qui serviront d'outils pour les biologistes dans les études fonctionnelles et structurales de PMs.

La structure de cette nouvelle famille de détergents intègre deux groupements carboxylates, qui sont chargés négativement et peuvent interagir avec les résidus d'acide aminé chargés positivement. Ainsi, les interactions PM-détergents pourraient être renforcées, en évitant l'agrégation de la protéine lors des étapes d'extraction, de purification et de cristallisation.

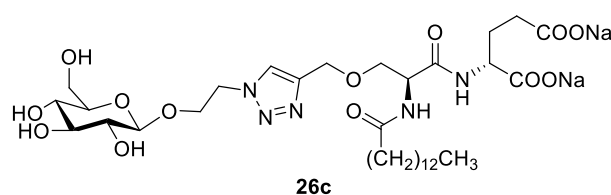
Dans le but ultime d'obtenir les détergents de meilleure capacité extractante et stabilisante, qui permettent également aux PMs de former des cristaux organisés, le projet a consisté à :

- concevoir et réaliser la synthèse de différents détergents en intégrant les fonctions carboxylates, la queue hydrophobe et la tête polaire, a priori les glycosides par une chimie performante et convergente, notamment grâce à la synthèse peptidique et la chimie « click ».
- caractériser les intermédiaires et les produits finaux (température de fusion, RMN, MS)
- étudier leurs propriétés physico-chimiques (CMC, diamètre hydrodynamique, absorption UV et capacité de chélation avec le Mg^{2+})

- évaluer leur capacité d'extraction des PMs (BmrA et AcrB) et leur influence sur l'activité ATPasique de BmrA après l'extraction.
- mesurer la stabilité à long terme de BmrA purifiée en ajoutant le détergent **26c** ou **43a** et la thermostabilité de BmrA et A_{2A}R en présence du détergent **26c**.
- réaliser des essais de cristallisation de BmrA en présence des détergents synthétisés.

Sur le plan de la synthèse chimique, les éléments nécessaires ont été construits autour de la sérine : une queue hydrophobe, une tête polaire et deux groupements carboxylates. Le point critique est la conjugaison avec des saccharides ou une chaîne PEG, qui a été menée à bien grâce aux réactions « click ». Nous avons alors préparé une série non glycosylée et non peguylée, une série glycosylée *via* la réaction de thiol-ène, une série glycosylée *via* la réaction de Huisgen ainsi que les « clips » peguylés et un « clip » dimérique. L'avantage de la stratégie de synthèse est sa flexibilité qui permet d'intégrer aisément les différents éléments polaires et hydrophobes souhaités.

Sur le plan de l'extraction et de la stabilisation, les deux composés les plus prometteurs sont le **26c** (glucosylé par CuAAC, n = 12) et le **43a** (peguylé, n = 12). Leur plus grand avantage est leur capacité de maintenir la stabilité de la PM étudiée, le transporteur BmrA pendant une très longue durée (40 jours), à une température relativement élevée pour les PMs (18 °C). De plus, l'efficacité du composé **26c** a été confirmée lors du test de la thermostabilité de BmrA et d'A_{2A}R natif. Ces résultats sont comparables voire meilleurs que les détergents commerciaux les plus utilisés, à savoir, le DDM, le LMNG ou le FA3.



Les résultats des études de diffraction aux rayons X, réalisées sur les cristaux de BmrA, sont également prometteurs. Particulièrement, avec les composés **31b** (glucosylé par CuAAC, n = 11x2) ou **31c** (glucosylé par CuAAC, cyclohexylé), les cristaux de BmrA formés ont donné de relativement bonnes résolutions en diffraction aux rayons X, jusqu'à 3,99 Å.

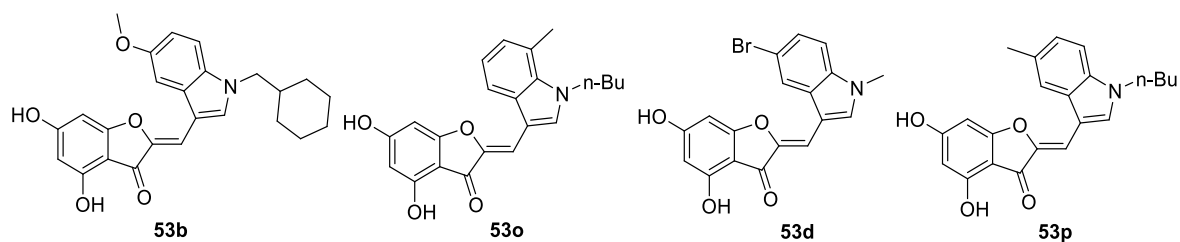
Les molécules synthétisées dans le cadre de ce projet ont été brevetées. Les détergents glycosylés (**26a-26f** et **31a-31c**) ont fait l'objet d'une communication (en préparation).

Les résultats des études de cristallisation en cours pourraient prochainement permettre d'analyser l'interaction protéine-détergents pour mieux comprendre leur mécanisme de stabilisation. Une compréhension plus profonde au niveau atomique contribuerait à rationaliser l'optimisation de la structure des détergents et améliorer éventuellement la qualité des cristaux. D'autres PMs devraient être étudiées pour assurer une large application de ces molécules dans le domaine. Les études en cryo-ME seront à réaliser, vu l'utilisation de plus en plus fréquente de cette technique dans ce domaine.

D'un point de vue synthétique, il faudrait optimiser les étapes de synthèse pour adapter à une échelle plus grande. Vu la chimie utilisée et la disponibilité des produits de départ, cette tâche est tout à fait envisageable. En parallèle, pour élargir la famille de détergents, nous pourrions suivre quelques pistes pour la modification structurale : l'utilisation d'une chaîne fluorocarbonée, d'un motif stéroïdien ou d'autre structure cyclique pour limiter les contacts dénaturants à l'interface protéine-détergents. Concernant la tête polaire, il nous reste à tenter les saccharides ramifiés et à élargir la série de détergents peguylés en variant la longueur de la chaîne PEG. Il nous faudrait porter également plus d'attention sur la synthèse de détergents dimériques, pour trouver un bon équilibre hydrophobie-hydrophilie et une longueur du linker optimale. Dans une perspective à plus long terme, nous pourrions imaginer d'autres design originaux, en se basant toujours sur le concept de ponts salins protéine-détergents *via* leurs fonctions carboxylates.

Un deuxième axe de mes travaux de thèse a consisté à réaliser la pharmacomodulation sur les 2-indolylméthylènebenzofuran-3(2*H*)-ones. Cette étude a pour objectif de trouver les inhibiteurs efficaces du transporteur ABCC2, qui joue un rôle important dans la pharmacocinétique des médicaments, les interactions médicamenteuses, et la résistance aux médicaments de certaines tumeurs.

Les dérivés indoliques d'aurones ont été précédemment identifiés comme d'intéressants inhibiteurs d'ABCC2 par un criblage de plus de 500 molécules de structures variées. A partir de ces informations, plusieurs analogues ont été synthétisés. Les modifications structurales ont été effectuées au niveau du cycle indole. Les meilleurs composés identifiés à ce jour sont **53b**, **53o**, **53d** et **53p** (CI₅₀ ~ 4 μM). Par la suite, les analogues des composés **53b** et **53d** ont été préparés en modifiant cette fois-ci la substitution sur la benzofuranone. Enfin, nous avons réussi à dimériser quelques dérivés *via* leur groupement hydroxyle.



Les résultats de sélectivité sont encourageants, notamment le composé **53d**, qui inhibe de manière plus sélective ABCC2 qu'ABCC1 et ABCB1. Toutefois, la ressemblance structurale des transporteurs ABC et leur polyspécificité pour des substrats rendent difficile à atteindre une sélectivité totale. Les éléments structuraux contribuant à la sélectivité relative de ces composés sont encore inconnus. De plus, d'autres transporteurs devraient être pris en compte dans les prochaines études.

Ces molécules peuvent servir d'outils dans les tests *in vitro* sur ABCC2, notamment pour évaluer l'interaction de candidats de médicament avec ce transporteur, ou dans les criblages à la recherche de meilleurs inhibiteurs.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont été valorisés par une publication dans le journal *European Journal of Medicinal Chemistry*.

D'autres analogues restent à synthétiser afin de pouvoir obtenir une vision plus complète sur la relation structure-activité. Pour ce faire, les résultats d'évaluation des dernières séries en attente sont indispensables pour pouvoir orienter les futures études.

Partie expérimentale

I. Material and methods

Solvents and reagents were purchased and used without further purification.

Chromatography

Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using commercial silica gel 60 F₂₅₄ coated plates from Macherey-Nagel. Visualization were carried out under UV light at 254 and 365 nm and/or heating with a solution of sulfuric acid/acetic acid/water or phosphomolybdic acid/cerium sulfate/sulfuric acid/water or ninhydrin stain or iodine vapor.

Purifications were performed by gravity column chromatography using silica gel 60 (230-400 mesh) from Macherey-Nagel or by automatic Reveleris® X2 flash chromatography system.

Microwave-assisted reactions were performed using a CEM Microwave Synthesizer.

Reactions under UV irradiation in this work were performed using a 500 W mercury lamp (Oriental Instruments®).

Melting points (M.p.) were measured by a Büchi B540 melting point apparatus and are uncorrected.

Mass spectra (MS)

Electrospray ionization (ESI) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 Plus Bruker Daltonis instrument with a nanospray inlet. Accurate mass measurements (HRMS) were carried out on an ESI/QTOF with the Waters Xevo G2-S QToF device. Analyses were performed by the analytical service of Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at room temperature in deuterated solvents on Bruker Avance spectrometers at 400 or 500 MHz for ¹H and 100 or 125 MHz for ¹³C NMR respectively. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the solvent [¹H: $\delta(\text{acetone-}d_6) = 2.05$ ppm, $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 2.50$ ppm,

$\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.31$ ppm, $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ppm; ^{13}C : $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 39.52$ ppm, $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.00$ ppm, $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$ ppm, $\delta(\text{acetone-}d_6) = 206.26$ ppm]. Multiplicity of signals is reported as followed: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), qt (quintet), st (septet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), dt (doublet of triplet) ddt (doublet of doublet of triplet) and m (multiplet). Coupling constants (J) are given in Hertz (Hz). When direct signal assignments were difficult, additional spectra were acquired (J-mod, COSY, HMQC or HMBC).

II. Synthesis and evaluation of detergents

II.1. Synthesis of detergents

II.1.1. General procedures

General procedure A: peptide coupling ^[196]

To a solution of a carboxylic acid (1 equiv) in anhydrous DMF (15 mL/mmol) were successively added an amine (2 equiv), TBTU (1.2 equiv) and DIPEA (5 equiv). The mixture was stirred at room temperature (rt) under N₂ atmosphere for 3 h. After completion of reaction, water (15 mL/mmol) was added and the mixture was extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over MgSO₄. After removing the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography.

General procedure B: Fmoc deprotection

To a solution of Fmoc-protected amine (1 equiv) in anhydrous DCM (20 mL/mmol) was added diethylamine (20 equiv). The reaction mixture was stirred at rt under N₂ atmosphere overnight. The volatiles were removed under reduced pressure. To eliminate the residual diethylamine, the crude product was diluted in DCM, washed with a saturated NaHCO₃ solution, dried over K₂CO₃, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure C: amide formation

The crude *N*-deprotected product (1 equiv) was dissolved in anhydrous DCM (30 mL/mmol). An acyl chloride derivative was added (2 equiv), together with DMAP (0.5 equiv) and pyridine (34 equiv). The reaction mixture was stirred at rt under N₂ atmosphere overnight. The reaction mixture was acidified to pH = 3 with an aqueous solution of HCl 10% and extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine and dried over

MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.

General procedure D: catalytic hydrogenolysis

To a degassed solution of a benzyl ester (1 equiv) in MeOH (100 mL/mmol) was added Pd/C 10% (200 mg/mmol). The reaction mixture was stirred at rt under H₂ atmosphere from 4 h to overnight. After filtration over Celite® to remove the catalyst, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was used directly for the next step or washed with cyclohexane and/or DCM to obtain the pure product.

General procedure E: *t*-Bu deprotection ^[197]

To a solution of *t*-Bu-intermediate (1 equiv) in anhydrous DCM (12 mL/mmol) at 0 °C was added dropwise TFA (4 mL/mmol). The reaction mixture was stirred at rt under N₂ atmosphere overnight. The volatiles were removed under reduced pressure and the residue was dissolved in DCM. A solution of NaOH (2 M) was added to pH = 11-12. The aqueous layer was washed with EtOAc before being acidified to pH 1-2 with concentrated HCl and extracted 3 times with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with DCM to obtain the pure product.

General procedure F: Boc deprotection

To a solution of Boc-intermediate (1 equiv) in anhydrous DCM (5 mL/g) at 0 °C was added dropwise TFA (2.5 mL/g). The reaction mixture was stirred at rt for 4-5 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in DCM. A solution of NaOH 2 M was added to pH = 11-12. The aqueous layer was washed with EtOAc before being acidified to pH 1-2, washed with DCM and extracted 3 times with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure G: acyl chlorides synthesis

A round-bottom flask containing a carboxylic acid was purged with argon. Thionyl chloride (0.56 mL/mmol) was added and the mixture was stirred and heated under reflux under argon

atmosphere for 2h. After evaporation of the volatiles under reduced pressure, the product was used immediately for the next reaction.

General procedure H: thiol-ene coupling ^[198]

An allyl-intermediate (1 equiv), acetylated 1-thio-saccharide (1.2 equiv) and DMPA (0.2 equiv) were dissolved in THF (15 mL/mmol). After being purged with N₂, the reaction mixture was stirred and irradiated with UV light at rt for 2 h. After the completion of the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.

General procedure I: CuAAC ^[129]

A propargylated intermediate (1 equiv), together with an azido-saccharide or azido-PEG (1.0-1.5 equiv), CuSO₄·5H₂O (0.1 equiv) and sodium ascorbate (0.2 equiv) were dissolved in DMF (6 mL/mmol). Some drops of water were added and the reaction mixture was stirred under microwave irradiation at 140 °C for 30 min to 1 h. After the completion of the reaction, water was added into the reaction mixture which was then extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.

General procedure J: Zemplén deacetylation ^[88]

To a solution of an acetyl protected intermediate (1 equiv) in MeOH (16.7 mL/mmol) was added NaOMe (0.2 equiv). The reaction mixture was stirred overnight at rt. The proton exchange resin (Dowex-H⁺) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min before being filtered off. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the crude product which was used for the next step without further purification.

General procedure K: deprotection of methyl esters

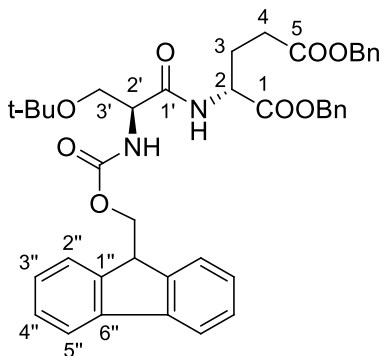
The crude product of deacetylation reaction (1 equiv) was dissolved in THF (10.4 mL/mmol) and a solution of LiOH (5 equiv) in water (10.4 mL/mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. The reaction mixture was acidified to pH = 1-2 with H₃PO₄ 5% and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. If the protonated product

precipitated, it was then filtered off and washed with cold water. The crude product was purified by reversed phase column chromatography (water and MeOH).

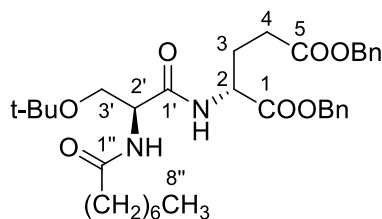
General procedure L: transformation into carboxylates (Na, K)

The product (1 equiv) was dissolved in a minimum amount of MeOH. MeONa or MeOK (1 equiv per carboxylic acid function) was added. The mixture was agitated for 5 min and the solvent was evaporated under reduce pressure.

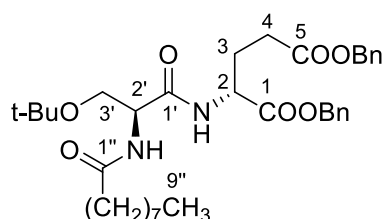
II.1.2. Synthesis of detergents without saccharides



Dibenzylyl (R)-2-[(S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)amino)-3-tert-butoxypropanamido]glutarate (1). The crude product was prepared according to the general procedure A starting from commercially available Fmoc-L-Ser(*t*-Bu)-OH (3.50 g, 9.12 mmol) and H-D-Glu(OBn)-OBn-*p*-tosylate (9.00 g, 18.24 mmol). The product precipitated after adding water into the reaction mixture, was filtered and recrystallized in DCM/Et₂O to obtain the pure product (5.14 g, 7.42 mmol, 81%) as a white solid. $R_f = 0.50$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 126-128 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 1.19 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.99-2.11 (m, 1H, H3a), 2.22-2.35 (m, 1H, H3b), 2.32-2.55 (m, 2H, H4), 3.41 (dd, $J = 8.3, 8.3$ Hz, 1H, H3'a), 3.75-3.87 (m, 1H, H3'b), 4.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, -CH_{Fmoc}), 4.24-4.33 (m, 1H, H2'), 4.40 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, -CH_{2Fmoc}), 4.68-4.76 (m, 1H, H2), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.17 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.78 (bs, 1H, C2'-NH), 7.21-7.46 (m, 15H, C2-NH, H3'', H4'', CH_{Ar}), 7.61 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H2''), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H5''). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 27.4 (-C(CH₃)₃), 27.5 (C3), 30.0 (C4), 47.1 (C2'), 51.8 (C2), 54.6 (-CH_{Fmoc}), 61.7 (C3'), 66.5 (C5-OCH₂Ph), 67.2 (-CH_{2Fmoc}), 67.4 (C1-OCH₂Ph), 74.3 (-C(CH₃)₃), 120.0 (2xC5''), 125.1 (2xC2''), 127.1 (2xC3''), 127.7 (2xC4''), 128.2-128.7 (10xCH_{Ar}), 135.1, 135.7 (2xC^{IV}_{Ar}), 141.3 (2xC1''), 143.7 (2xC6''), 156.1 (CO_{Fmoc}), 170.1 (C5), 171.2 (C1), 172.3 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 426 (100), 570 (3), 715 (1) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₄₁H₄₅N₂O₈ 693.3176 [M+H]⁺, found 693.3156.

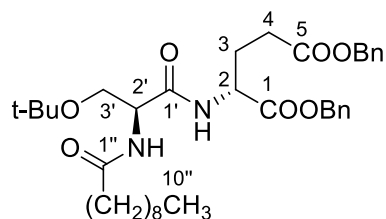


Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(octanamido)propanamido]glutarate (2a). The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1** (195 mg, 0.28 mmol) and commercially available octanoyl chloride (92 mg, 0.56 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (67 mg, 0.11 mmol, 39%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.35$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 86 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{H8}''$), 1.17 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.23-1.38 (m, 8H, $\text{H4}''$ - $\text{H7}''$), 1.57-1.72 (m, 2H, $\text{H3}''$), 1.98-2.11 (m, 1H, H3a), 2.19-2.35 (m, 3H, $\text{H2}''$, H3b), 2.35-2.53 (m, 2H, H4), 3.38 (dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.78 (dd, $J = 8.6, 4.2$ Hz, 1H, H3'b), 4.53-4.60 (m, 1H, $\text{H2}'$), 4.67-4.75 (m, 1H, H2), 5.10 (s, 2H, $\text{C5-OCH}_2\text{Ph}$), 5.15 (s, 2H, $\text{C1-OCH}_2\text{Ph}$), 6.66 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, $\text{C2}'\text{-NH}$), 7.27-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, C2-NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 ($\text{C8}''$), 22.6 ($\text{C7}''$), 25.6 ($\text{C3}''$), 27.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.5 (C3), 29.0-30.0 (C3 , $\text{C4}''$, $\text{C5}''$, C4), 31.7 ($\text{C6}''$), 36.6 ($\text{C2}''$), 51.8 (C2), 53.0 ($\text{C2}'$), 61.3 ($\text{C3}'$), 66.5 ($\text{C5-OCH}_2\text{Ph}$), 67.4 ($\text{C1-OCH}_2\text{Ph}$), 74.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.3-128.7 ($10 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 135.1, 135.8 ($2 \times \text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 170.4 (C5), 171.2 (C1), 172.3 ($\text{C1}''$), 173.3 ($\text{C1}'$). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 597 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_7$ 597.3540 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 597.3538.

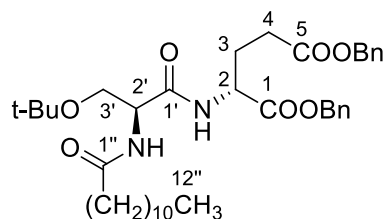


Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(nonanamido)propanamido]glutarate (2b). The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1** (195 mg, 0.28 mmol) and commercially available nonanoyl chloride (99 mg, 0.56 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (69 mg, 0.11 mmol, 39%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.38$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 91 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{H9}''$), 1.17 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.22-1.38 (m, 10H, $\text{H4}''$ - $\text{H8}''$), 1.56-1.70 (m, 2H, $\text{H3}''$), 1.98-2.10 (m, 1H, H3a), 2.18-2.34 (m, 3H, $\text{H2}''$, H3b), 2.36-2.53 (m, 2H, H4), 3.41 (dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.76 (dd, $J = 8.6, 4.1$ Hz, 1H, H3'b), 4.57-4.64 (m, 1H, $\text{H2}'$), 4.68-4.76 (m, 1H, H2), 5.09 (s, 2H, $\text{C5-OCH}_2\text{Ph}$), 5.14 (s, 2H, $\text{C1-OCH}_2\text{Ph}$), 6.75 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, $\text{C2}'\text{-NH}$), 7.26-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.53 (d, $J = 7.9$ Hz, C2-NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 ($\text{C9}''$), 22.8 ($\text{C8}''$), 25.6 ($\text{C3}''$), 27.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.7 (C3), 29.3-30.1

(4C, C4''-C6'', C4), 32.0 (C7''), 36.7 (C2''), 51.9 (C2), 53.1 (C2'), 61.4 (C3'), 66.7 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 74.5 (-C(CH₃)₃), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.9 (2xC^{IV}_{Ar}), 170.5 (C5), 171.3 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 633 (100) [M+H]⁺. **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C₃₅H₅₁N₂O₇ 611.3696 [M+H]⁺, found 611.3681.

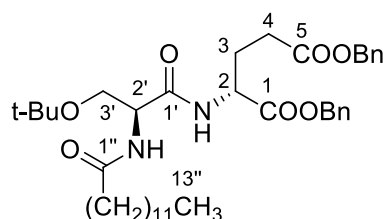


Dibenzy (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(decanamido)propanamido]glutarate (2c). The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1** (500 mg, 0.70 mmol) and commercially available decanoyl chloride (267 mg, 1.40 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (195 mg, 0.31 mmol, 45%) was obtained as a white solid. **R_f** = 0.18 (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 82-85 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H10''), 1.16 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.19-1.35 (m, 12H, H4''-H9''), 1.55-1.66 (m, 2H, H3''), 1.96-2.07 (m, 1H, H3a), 2.21 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H2''), 2.21-2.30 (m, 1H, H3b), 2.32-2.50 (m, 2H, H4), 3.31 (dd, *J* = 8.7, 8.7 Hz, 1H, H3'a), 3.80 (dd, *J* = 8.7, 4.2 Hz, 1H, H3'b), 4.44-4.50 (m, 1H, H2'), 4.65-4.72 (m, 1H, H2), 5.08 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.40 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, C2'-NH), 7.27-7.36 (m, 11H, CH_{Ar}, C2-NH). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 14.1 (C10''), 22.7 (C9''), 25.6 (C3''), 27.4 (-C(CH₃)₃), 27.5 (C3), 29.3-29.4 (4C, C4''-C7''), 30.0 (C4), 31.9 (C8''), 36.6 (C2''), 51.8 (C2), 53.0 (C2'), 61.3 (C3'), 66.5 (C5-OCH₂Ph), 67.3 (C1-OCH₂Ph), 74.3 (-C(CH₃)₃), 128.3-128.7 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 170.4 (C5), 171.2 (C1), 172.3 (C1''), 173.3 (C1'). **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 626 (30) [M+H]⁺, 648 [M+Na]⁺ (100). **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C₃₆H₅₃N₂O₇ 625.3853 [M+H]⁺, found 625.3846.



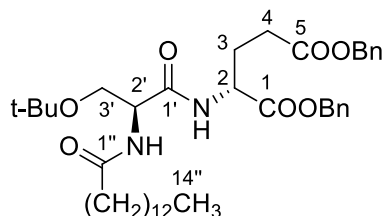
Dibenzy (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(dodecanamido)propanamido]glutarate (2d). The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1** (400 mg, 0.58 mmol) and commercially available dodecanoyl chloride (252 mg, 1.15 mmol). After

purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (182 mg, 0.28 mmol, 48%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.12$ (8:2 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 67-69 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H12''), 1.17 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.19-1.35 (m, 16H, H4''-H11''), 1.56-1.67 (m, 2H, H3''), 1.96-2.08 (m, 1H, H3a), 2.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H2''), 2.21-2.32 (m, 1H, H3b), 2.32-2.50 (m, 2H, H4), 3.30 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz, 1H, H3'a), 3.81 (dd, $J = 8.7, 4.2$ Hz, 1H, H3'b), 4.42-4.49 (m, 1H, H2'), 4.64-4.72 (m, 1H, H2), 5.09 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.16 (s, 2H, C1- OCH_2Ph), 6.38 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.23-7.39 (m, 11H, CH_{Ar} , C2-NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C12''), 22.8 (C11''), 25.6 (C3''), 27.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.6 (C3), 29.4-29.7 (6C, C4''-C9''), 30.0 (C4), 32.0 (C10''), 36.7 (C2''), 51.9 (C2), 53.1 (C2'), 61.4 (C3'), 66.6 (C5- OCH_2Ph), 67.5 (C1- OCH_2Ph), 74.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.4-128.8 (10x CH_{Ar}), 135.2, 135.9 (2x $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 170.4 (C5), 171.3 (C1), 172.4 (C1''), 173.4 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 131 (30), 199 (40), 654 (50) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 677 (100), 699 (20). **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_7$ 653.4166 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 653.4158.

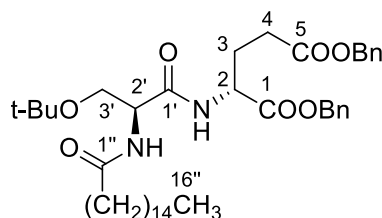


Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(tridecanamido)propanamido]glutarate (2e) The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1** (500 mg, 0.70 mmol) and commercially available tridecanoyl chloride (326 mg, 1.40 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (233 mg, 0.35 mmol, 50%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.24$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 68-71 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H13''), 1.17 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.20-1.36 (m, 18H, H4''-H12''), 1.55-1.67 (m, 2H, H3''), 1.96-2.08 (m, 1H, H3a), 2.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H2''), 2.21-2.32 (m, 1H, H3b), 2.32-2.50 (m, 2H, H4), 3.31 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz, 1H, H3'a), 3.80 (dd, $J = 8.7, 4.2$ Hz, 1H, H3'b), 4.44-4.50 (m, 1H, H2'), 4.63-4.73 (m, 1H, H2), 5.08 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.15 (s, 2H, C1- OCH_2Ph), 6.41 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.25-7.37 (m, 11H, CH_{Ar} , C2-NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C13''), 22.7 (C12''), 25.5 (C3''), 27.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.5 (C3), 29.3-29.7 (7C, C4''-C10''), 29.9 (C4), 31.9 (C11''), 36.5 (C2''), 51.8 (C2), 53.0 (C2'), 61.3 (C3'), 66.5 (C5- OCH_2Ph), 67.3 (C1- OCH_2Ph), 74.2 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.3-128.6 (10x CH_{Ar}), 135.2, 135.8

($2 \times C_{Ar}^{IV}$), 170.4 (C5), 171.2 (C1), 172.3 (C1''), 173.3 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 668 (20) $[M+H]^+$, 690 (100) $[M+Na]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{39}H_{59}N_2O_7$ 667.4322 $[M+H]^+$, found 667.4334.

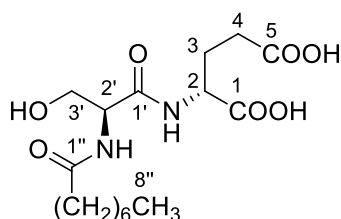


Dibenzy (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(tetradecanamido)propanamido]glutarate (2f). The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1** (400 mg, 0.58 mmol) and commercially available tetradecanoyl chloride (285 mg, 1.15 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (187 mg, 0.27 mmol, 48%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.07$ (8:2 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 71-73 °C. **1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)** δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.17 (s, 9H, $-C(CH_3)_3$), 1.20-1.36 (m, 20H, H4''-H13''), 1.56-1.67 (m, 2H, H3''), 1.97-2.08 (m, 1H, H3a), 2.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H2''), 2.23-2.50 (m, 3H, H3b, H4), 3.29 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz, 1H, H3'a), 3.80 (dd, $J = 8.7, 4.2$ Hz, 1H, H3'b), 4.41-4.49 (m, 1H, H2'), 4.63-4.72 (m, 1H, H2), 5.09 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.14 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 5.18 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 6.39 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.25-7.39 (m, 11H, CH_{Ar} , C2-NH). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)** δ ppm 14.2 (C14''), 22.8 (C13''), 25.6 (C3''), 27.5 ($-C(CH_3)_3$), 27.6 (C3), 29.4-29.8 (8C, C4''-C11''), 30.0 (C4), 32.0 (C12''), 36.7 (C2''), 51.9 (C2), 53.1 (C2'), 61.4 (C3'), 66.6 (C5- OCH_2Ph), 67.5 (C1- OCH_2Ph), 74.4 ($-C(CH_3)_3$), 128.4-128.8 ($10 \times CH_{Ar}$), 135.2, 135.8 ($2 \times C_{Ar}^{IV}$), 170.5 (C5), 171.3 (C1), 172.4 (C1''), 173.4 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 131 (65), 199 (100), 682 (60) $[M+H]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{40}H_{61}N_2O_7$ 681.4479 $[M+H]^+$, found 681.4447.

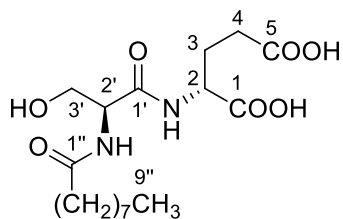


Dibenzy (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(hexadecanamido)propanamido]glutarate (2g). The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1** (300 mg, 0.43 mmol) and commercially available hexadecanoyl chloride (238 mg, 0.87 mmol).

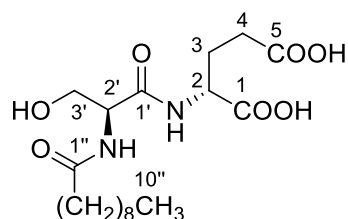
After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2), the pure product (93 mg, 0.13 mmol, 30%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.11$ (8:2 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 69-71 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H16''), 1.17 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.20-1.37 (m, 24H, H4''-H15''), 1.55-1.68 (m, 2H, H3''), 1.97-2.09 (m, 1H, H3a), 2.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H2''), 2.16-2.51 (m, 3H, H3b, H4), 3.29 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz, 1H, H3'a), 3.81 (dd, $J = 8.7, 4.2$ Hz, 1H, H3'b), 4.39-4.49 (m, 1H, H2'), 4.62-4.72 (m, 1H, H2), 5.09 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.14 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 5.18 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 6.36 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.20-7.40 (m, 11H, CH_{Ar} , C2-NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.3 (C16''), 22.8 (C15''), 25.7 (C3''), 27.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.6 (C3), 29.4-29.8 (10C, C4''-C13''), 30.1 (C4), 32.1 (C14''), 36.7 (C2''), 51.9 (C2), 53.1 (C2'), 61.4 (C3'), 66.6 (C5- OCH_2Ph), 67.5 (C1- OCH_2Ph), 74.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.4-128.8 (10 $\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 135.2, 135.9 (2 $\times\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 170.5 (C5), 171.3 (C1), 172.4 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 199 (15), 710 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 732 (15) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_7$ 709.4792 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 709.4805.



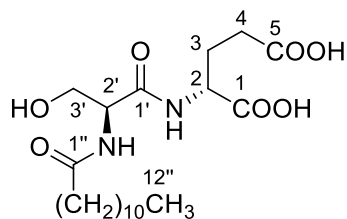
(R)-2-[(S)-2-(Octanamido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (3a). The pure product (colorless solid, 27 mg, 0.07 mmol, quantitative) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2a** (42 mg, 0.07 mmol). **m.p.** 39-40 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H8''), 1.23-1.39 (m, 8H, H4''-H7''), 1.57-1.67 (m, 2H, H3''), 1.90-2.02 (m, 1H, H3a), 2.16-2.32 (m, 3H, H3b, H2''), 2.40 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 2H, H4), 3.72-3.84 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.42-4.50 (m, 2H, H3'b, H2). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.4 (C8''), 23.6 (C7''), 26.8 (C3''), 27.9 (C3), 30.1-31.1 (3C, C4'', C5'', C4), 32.8 (C6''), 36.9 (C2''), 53.3 (C2), 56.7 (C2'), 63.0 (C3'), 172.6 (C5), 175.0 (C1), 176.5 (C1''), 176.6 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 360 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_7$ 359.1818 $[\text{M}-\text{H}]^-$, found 359.1803.



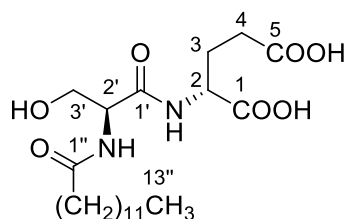
(R)-2-[(S)-2-(Nonanamido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (3b). The pure product (colorless solid, 31 mg, 0.08 mmol, quantitative) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2b** (49 mg, 0.08 mmol). **m.p.** 46 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H9''), 1.22-1.40 (m, 10H, H4''-H8''), 1.56-1.68 (m, 2H, H3''), 1.90-2.02 (m, 1H, H3a), 2.15-2.32 (m, 3H, H3b, H2''), 2.40 (dd, $J = 7.7, 7.7$ Hz, 2H, H4), 3.73-3.83 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.43-4.50 (m, 2H, H3'b, H2). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C9''), 23.7 (C8''), 26.8 (C3''), 27.9 (C3), 30.2-31.1 (4C, C4''-C6''), C4), 33.0 (C8''), 36.9 (C2''), 53.3 (C2), 56.7 (C2'), 63.0 (C3'), 172.6 (C5), 175.1 (C1), 176.5 (C1''), 176.6 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 373 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₁₇H₂₉N₂O₇ 373.1975 [M-H]⁻, found 373.1992.



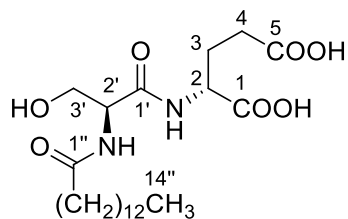
(R)-2-[(S)-2-(Decanamido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (3c). The pure product (white solid, 182 mg, 0.47 mmol, 94%) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2c** (310 mg, 0.50 mmol). **m.p.** 53-57 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.89 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H10''), 1.22-1.38 (m, 12H, H4''-H9''), 1.56-1.69 (m, 2H, H3''), 1.90-2.03 (m, 1H, H3a), 2.14-2.26 (m, 1H, H3b), 2.29 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2''), 2.36-2.43 (m, 2H, H4), 3.73-3.84 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.42-4.52 (m, 2H, H3'b, H2). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C10''), 23.7 (C9''), 26.8 (C3''), 27.9 (C3), 30.3-30.5 (4C, C4''-C7''), C4), 31.1 (C4), 33.0 (C8''), 36.9 (C2''), 53.3 (C2), 56.6 (C2'), 63.1 (C3'), 172.5 (C5), 174.9 (C1), 176.5 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 387 (100) [M-H]⁻, 404 (20). **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₁₈H₃₁N₂O₇ 387.2131 [M-H]⁻, found 387.2140.



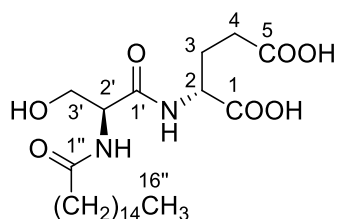
(R)-2-[(S)-2-(Dodecanamido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (3d). The pure product (white solid, 1.683 g, 4.04 mmol, 70%) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2d** (3.758 g, 5.80 mmol). **m.p.** 100-102 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H12''), 1.22-1.38 (m, 16H, H4''-H11''), 1.57-1.67 (m, 2H, H3''), 1.91-2.01 (m, 1H, H3a), 2.15-2.26 (m, 1H, H3b), 2.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H2''), 2.37-2.44 (m, 2H, H4), 3.72-3.81 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.43-4.51 (m, 2H, H3'b, H2). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C12''), 23.7 (C11''), 26.8 (C3''), 27.9 (C3), 30.4-30.7 (6C, C4''-C9''), 31.0 (C4), 33.1 (C10''), 36.9 (C2''), 53.1 (C2), 56.6 (C2'), 63.1 (C3'), 172.6 (C5), 174.6 (C1), 176.4 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 157 (40), 199 (30), 387 (80), 415 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₂₀H₃₅N₂O₇ 415.2444 [M-H]⁻, found 415.2447.



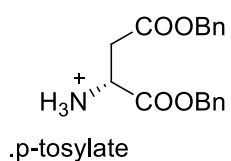
(R)-2-[(S)-2-(Tridecanamido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (3e). The pure product (white solid, 115 mg, 0.27 mmol, 89%) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2e** (198 mg, 0.30 mmol). **m.p.** 58-63 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H13''), 1.21-1.41 (m, 18H, H4''-H12''), 1.54-1.68 (m, 2H, H3''), 1.90-2.04 (m, 1H, H3a), 2.14-2.27 (m, 1H, H3b), 2.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H2''), 2.36-2.48 (m, 2H, H4), 3.71-3.83 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.43-4.53 (m, 2H, H3'b, H2). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C13''), 23.7 (C12''), 26.8 (C3''), 27.8 (C3), 30.3-30.9 (7C, C4''-C10''), 31.0 (C4), 33.0 (C11''), 36.9 (C2''), 53.1 (C2), 56.6 (C2'), 63.1 (C3'), 172.6 (C5), 174.6 (C1), 176.4 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 429 (100) [M-H]⁻, 446 (30). **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₂₁H₃₇N₂O₇ 429.2601 [M-H]⁻, found 429.2599.



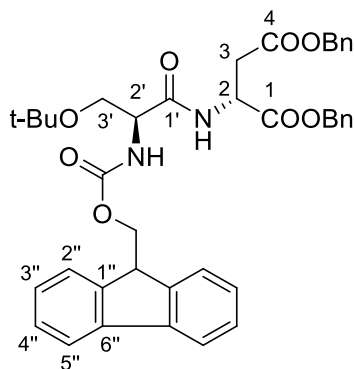
(R)-2-[(S)-2-(Tetradecanamido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (3f). The pure product (white solid, 57 mg, 0.13 mmol, quantitative) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2f** (87 mg, 0.13 mmol). **m.p.** 109-112 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H14''), 1.19-1.39 (m, 20H, H4''-H13''), 1.57-1.67 (m, 2H, H3''), 1.90-2.02 (m, 1H, H3a), 2.16-2.26 (m, 1H, H3b), 2.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2''), 2.36-2.45 (m, 2H, H4), 3.71-3.84 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.43-4.52 (m, 2H, H3'b, H2). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C14''), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 27.9 (C3), 30.4-30.9 (8C, C4''-C11''), 31.1 (C4), 33.0 (C12''), 36.9 (C2''), 53.3 (C2), 56.6 (C2'), 63.1 (C3'), 172.6 (C5), 174.9 (C1), 176.5 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-) *m/z* (%)** 443 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-) *m/z* calc.** for C₂₂H₃₉N₂O₇ 443.2757 [M-H]⁻, found 443.2754.



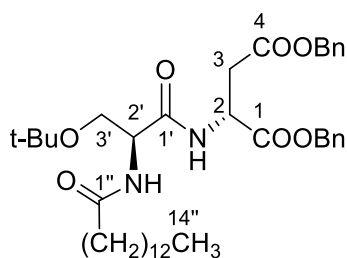
(R)-2-[(S)-2-(Hexadecanamido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (3g). The pure product (white solid, 36 mg, 0.08 mmol, 65%) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2g** (83 mg, 0.18 mmol). **m.p.** 111-113 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H16''), 1.19-1.37 (m, 24H, H4''-H15''), 1.55-1.68 (m, 2H, H3''), 1.90-2.03 (m, 1H, H3a), 2.15-2.26 (m, 1H, H3b), 2.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H2''), 2.36-2.44 (m, 2H, H4), 3.72-3.82 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.43-4.52 (m, 2H, H3'b, H2). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C16''), 23.7 (C15''), 26.8 (C3''), 27.9 (C3), 30.4-30.8 (10C, C4''-C13''), 31.1 (C4), 33.1 (C14''), 36.9 (C2''), 53.2 (C2), 56.6 (C2'), 63.1 (C3'), 172.6 (C5), 174.7 (C1), 176.5 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-) *m/z* (%)** 471 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-) *m/z* calc.** for C₂₄H₄₃N₂O₇ 471.3070, found 471.3057.



H-D-Asp(OBn)-OBn.p-tosylate. D-aspartic acid (3.00 g, 23 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous toluene (80 mL). Acid *p*-tosylic.H₂O (5.15 g, 27 mmol, 1.2 equiv) and benzyl alcohol (30.03 g, 28 mmol, 12.3 equiv) were added. The solution was heated under reflux for 23h using Dean-Stark apparatus. Half of the solvent was evaporated under reduced pressure before adding 200 mL of Et₂O. The mixture was stirred at 0 °C for 2 h. The precipitated product was filtered and washed with cold Et₂O. The crude product (9.39 g) was obtained as a white solid and used directly in the next step.

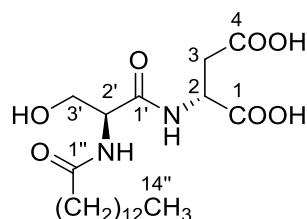


Dibenzy (R)-2-[(S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)amino)-3-tert-butoxypropanamido]succinate (5). The crude product was prepared according to the general procedure A starting from commercially available Fmoc-L-Ser(*t*-Bu)-OH (2.00 g, 5.22 mmol) and H-D-Asp(OBn)-OBn-*p*-tosylate (5.07 g, 10.43 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (2.95 g, 4.34 mmol, 83%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.32$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 115-117 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.15 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.82-2.96 (m, 1H, H3a), 3.06 (dd, $J = 17.1, 4.6$ Hz, 1H, H3b), 3.38 (dd, $J = 8.3, 8.3$ Hz, 1H, H3'a), 3.74-3.77 (m, 1H, H3'b), 4.19-4.26 (m, 2H, H2', $-\text{CH}_{\text{Fmoc}}$), 4.35-4.37 (m, 2H, $-\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 4.88-4.93 (m, 1H, H2), 5.01 (s, 2H, C4- OCH_2Ph), 5.12 (s, 2H, C1- OCH_2Ph), 5.74 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.25-7.34 (m, 12H, H3'', CH_{Ar}), 7.38 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 2H, H4''), 7.59-7.61 (m, 2H, H2''), 7.65 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, C2-NH), 7.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H5''). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 27.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 36.6 (C3), 47.3 (C2'), 49.0 (C2), 54.8 ($-\text{CH}_{\text{Fmoc}}$), 61.7 (C3'), 66.9 (C4- OCH_2Ph), 67.3 ($-\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 67.7 (C1- OCH_2Ph), 74.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 120.1 (2x $\text{C}5''$), 125.3 (2x $\text{C}2''$), 127.3 (2x $\text{C}3''$), 127.9 (2x $\text{C}4''$), 128.4-128.7 (10x CH_{Ar}), 135.3, 135.5 (2x $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 141.5 (2x $\text{C}1''$), 143.9 (2x $\text{C}6''$), 156.2 (CO_{Fmoc}), 170.3 (C1, C4), 170.6 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 426 (100), 701 (60) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_8$ 679.3019 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 679.3013.

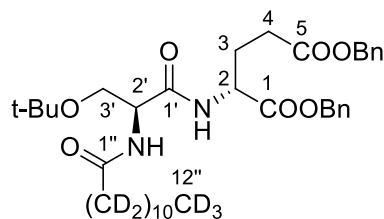


Dibenzy (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(tetradecanamido)propanamido]succinate (6). The crude product was prepared according to the general procedure B and C starting from **1b** (400

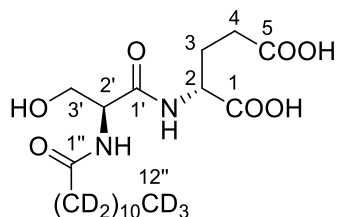
mg, 0.59 mmol) and commercially available tetradecanoyl chloride (291 mg, 1.18 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (105 mg, 0.16 mmol, 27%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.30$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 59-61 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, C14''), 1.16 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.18-1.36 (m, 20H, H4''-H13''), 1.56-1.67 (m, 2H, H3''), 2.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H2''), 2.89 (dd, $J = 17.1, 4.7$ Hz, 1H, H3a), 3.07 (dd, $J = 17.1, 4.7$ Hz, 1H, H3b), 3.27 (dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.79 (dd, $J = 8.6, 4.1$ Hz, 1H, H3'b), 4.43-4.50 (m, 1H, H2'), 4.87-4.93 (m, 1H, H2), 5.06 (s, 2H, C4-OCH₂Ph), 5.13 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.36 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.26-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.60 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, C2-NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C14''), 22.8 (C13''), 25.6 (C3''), 27.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.4-29.8 (8C, C4''-C11''), 32.0 (C12''), 36.5 (C3), 36.7 (C2''), 48.9 (C2), 53.1 (C2'), 61.3 (C3'), 66.9 (C4-OCH₂Ph), 67.6 (C1-OCH₂Ph), 74.3 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.5-128.8 (10xCH_{Ar}), 135.3, 135.5 (2xC^{IV}_{Ar}), 170.3 (C4), 170.6 (C1), 170.6 (C1''), 173.4 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 690 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₉H₅₉N₂O₇ 667.4322 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 667.4318.



(R)-2-[(S)-3-Hydroxy-2-(tetradecanamido)propanamido]succinic acid (7). The pure product (white solid, 55 mg, 0.13 mmol, 98%) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2h** (85 mg, 0.13 mmol). **m.p.** 125-135 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.90 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H, H14''), 1.19-1.42 (m, 20H, H4''-H13''), 1.54-1.71 (m, 2H, H3''), 2.23-2.33 (m, 2H, H2''), 2.76-2.93 (m, 2H, H3), 3.71-3.83 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.47 (dd, $J = 5.4, 5.4$ Hz, 1H, H3'b), 4.74 (dd, $J = 5.4, 5.4$ Hz, 1H, H2). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.4 (C14''), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 30.4-30.9 (8C, C4''-C11''), 33.1 (C12''), 36.9 (C3), 37.0 (C2''), 50.3 (C2), 56.7 (C2'), 63.0 (C3'), 172.2 (C4), 174.3 (C1), 176.5 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 429 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₂₁H₃₇N₂O₇ 429.2601 $[\text{M}-\text{H}]^-$, found 429.2591.



Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-tert-butoxy-2-(dodecan- d_{23} -amido)propanamido]glutarate (9). The crude product was prepared according to the general procedure B and A starting from **1a** (400 mg, 0.58 mmol) and commercially available dodecanoic- d_{23} acid (65 mg, 0.29 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (162 mg, 0.24 mmol, 83%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.28$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 70-72 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.15 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.94-2.06 (m, 1H, H3a), 2.17-2.29 (m, 1H, H3b), 2.29-2.48 (m, 2H, H4), 3.29 (dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.78 (dd, $J = 8.6, 4.1$ Hz, 1H, H3'b), 4.39-4.48 (m, 1H, H2'), 4.60-4.71 (m, 1H, H2), 5.06 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.13 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.36 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.22-7.35 (m, 11H, CH_{Ar}, C2-NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.1 (st, $J_{\text{C,D}} = 18.6$ Hz, C12''), 21.4 (qt, $J_{\text{C,D}} = 18.4$ Hz, C11''), 24.5 (qt, $J_{\text{C,D}} = 19.2$ Hz, C3''), 27.4 (-C(CH₃)₃), 27.5 (C3), 27.2-28.8 (6C, C4''-C9''), 30.0 (C4), 30.5 (qt, $J = 18.7$ Hz, C10''), 35.7 (qt, $J = 19.5$ Hz, C2''), 51.8 (C2), 53.0 (C2'), 61.4 (C3'), 66.5 (C5-OCH₂Ph), 67.4 (C1-OCH₂Ph), 74.3 (-C(CH₃)₃), 128.3-128.7 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 170.4 (C5), 171.2 (C1), 172.3 (C1''), 173.4 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 199 (40), 265 (100), 677 (80) [M+H]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₈H₃₄D₂₃N₂O₇ 676.5610 [M+H]⁺, found 676.5610.

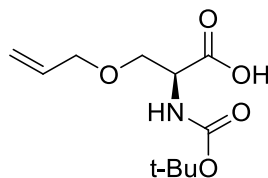


(R)-2-[(S)-2-(Dodecan- d_{23} -amido)-3-hydroxypropanamido]glutaric acid (10). The pure product (white solid, 33 mg, 0.08 mmol, 75%) was prepared according to the general procedure D and E starting from **2i** (68 mg, 0.15 mmol). **m.p.** > 80 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 1.90-2.03 (m, 1H, H3a), 2.14-2.27 (m, 1H, H3b), 2.33-2.48 (m, 2H, H4), 3.72-3.84 (m, 2H, H3'a, H2'), 4.41-4.54 (m, 2H, H3'b, H2). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 13.3 (st, $J_{\text{C,D}} = 19.8$ Hz, C12''), 22.4 (qt, $J_{\text{C,D}} = 19.6$ Hz, C11''), 25.7 (qt, $J_{\text{C,D}} = 20.2$ Hz, C3''), 27.9 (C3), 28.6-29.9 (6C, C4''-C9''), 31.1 (C4), 31.7 (qt, $J_{\text{C,D}} =$

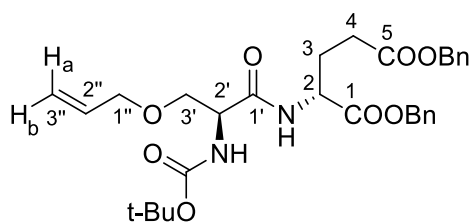
16.9 Hz, C10''), 36.1 (qt, $J_{C,D} = 21.1$ Hz, C2''), 53.2 (C2), 56.6 (C2'), 63.1 (C3'), 172.6 (C5), 174.8 (C1), 176.5 (C1''), 176.6 (C1'). **LRMS (ESI-) m/z (%)** 438 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-) m/z calc.** for C₂₀H₁₂D₂₃N₂O₇ 438.3888 [M-H]⁻, found 438.3889.

II.1.3. Synthesis of sugar-based detergents

II.1.3.1. Synthesis of sugar-based detergents via thiol-ene coupling

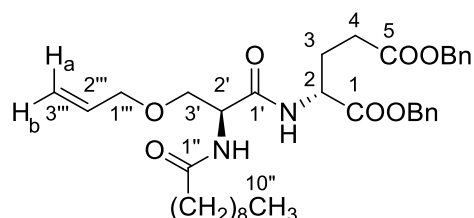


(S)-3-allyloxy-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propanoic acid (13). L-Boc-Serine (1.00 g, 4.87 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous DMF (15 mL) and the solution was cooled to 0 °C. NaH (60% in mineral oil, 487 mg, 12.2 mmol, 2.2 equiv) was added and the suspension was stirred for 30 min at 0 °C. Allyl bromide (6.09 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and at rt overnight. The reaction was quenched with H₂O (5 mL) and acidified to pH = 1 by a HCl solution 10% and extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with water, brine and dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was obtained as a colorless oil and used directly for the next step.

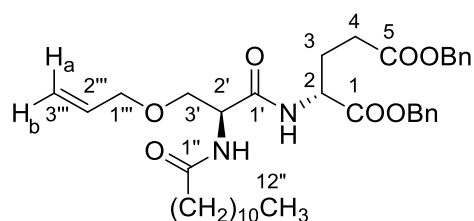


Dibenzylyl (R)-2-[(S)-3-allyloxy-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propanamido]glutarate (14). The crude product was prepared according to the general procedure A starting from **13** (500 mg, 2.04 mmol) and H-D-Glu(OBn)-OBn-*p*-tosylate (2.037 g, 4.08 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (569 mg, 1.03 mmol, 50%) was obtained as a colorless oil. $R_f = 0.40$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 50-57 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 1.44 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.95-2.07 (m, 1H, H3a), 2.21-2.32 (m, 1H, H3b), 2.30-2.48 (m, 2H, H4), 3.51 (dd, $J = 9.3, 6.4$ Hz, 1H, H3'a), 3.80 (dd, $J = 9.3, 3.5$ Hz, 1H, H3'b), 3.92-4.03 (m, 2H, H1''), 4.27 (m, 1H, H2'), 4.66-4.73 (m, 1H, H2), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (ddd, $J = 10.4, 3.0, 1.6$ Hz, 1H, H3''a), 5.16 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.23 (ddd, $J = 17.2, 3.0, 1.6$ Hz, 1H, H3''b), 5.37 (bs, 1H, C2'-NH), 5.83 (ddt, $J = 17.2, 10.4, 5.9$ Hz, 1H, H2''), 7.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.27-7.40 (m, 10H, CH_{Ar}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 27.5 (C3), 28.4 (-C(CH₃)₃), 30.0 (C4), 51.8 (C2), 54.2 (C2'), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.5

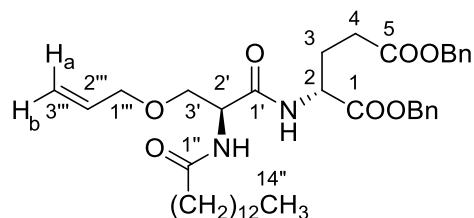
(C3'), 72.3 (C1''), 80.4 (-C(CH₃)₃), 117.8 (C3''), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 134.0 (C2''), 135.3, 135.9 (2xC^{VI}_{Ar}), 155.6 (CO_{Boc}), 170.3 (C5), 171.4 (C1), 172.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 455 (30), 499 (40), 555 (100) [M+H]⁺, 577 (15) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C₃₀H₃₉N₂O₈ 555.2706 [M+H]⁺, found 555.2711.



Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-allyloxy-2-(decanamido)propanamido]glutarate (15a). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **14** (943 mg, 1.70 mmol) and commercially available decanoyl chloride (648 mg, 3.40 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (562 mg, 0.92 mmol, 54%) was obtained as a white solid. *R_f* = 0.21 (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 96-97 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H10''), 1.17-1.36 (m, 12H, H4''-H9''), 1.56-1.67 (m, 2H, H3''), 1.95-2.08 (m, 1H, H3a), 2.15-2.30 (m, 3H, H3b, H2''), 2.30-2.48 (m, 2H, H4), 3.46 (dd, *J* = 9.3, 7.1 Hz, 1H, H3'a), 3.82 (dd, *J* = 9.4, 4.1 Hz, 1H, H3'b), 3.92-4.05 (m, 2H, H1'''), 4.54-4.62 (m, 1H, H2), 4.63-4.71 (m, 1H, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.11-5.18 (m, 3H, C1-OCH₂Ph, H3''a), 5.23 (ddd, *J* = 17.3, 3.1, 1.6 Hz, 1H, H3''b), 5.80 (ddt, *J* = 17.3, 10.4, 5.7 Hz, 1H, H2'''), 6.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, C2'-NH), 7.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, C2-NH), 7.29-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 14.2 (C10''), 22.8 (C9''), 25.6 (C3''), 27.3 (C3), 29.4-29.5 (4C, C4''-C7''), 30.0 (C4), 32.0 (C8''), 36.7 (C2''), 51.9 (C2), 52.5 (C2'), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.2 (C3'), 72.4 (C1'''), 117.9 (C3'''), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 134.0 (C2'''), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 170.1 (C5), 171.3 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 495 (30), 610 (10) [M+H]⁺, 632 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C₃₅H₄₉N₂O₇ 609.3540 [M+H]⁺, found 609.3536.

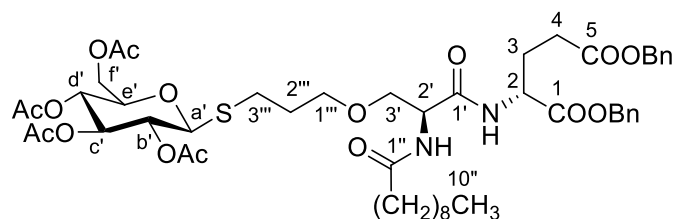


Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-allyloxy-2-(dodecanamido)propanamido]glutarate (15b). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **14** (800 mg, 1.44 mmol) and commercially available dodecanoyl chloride (630 mg, 2.88 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (801 mg, 1.26 mmol, 87%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.28$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 101-102 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H12''), 1.15-1.35 (m, 16H, H4''-H11''), 1.55-1.68 (m, 2H, H3''), 1.95-2.08 (m, 1H, H3a), 2.15-2.30 (m, 3H, H3b, H2''), 2.30-2.48 (m, 2H, H4), 3.46 (dd, $J = 9.3, 7.1$ Hz, 1H, H3'a), 3.82 (dd, $J = 9.4, 4.1$ Hz, 1H, H3'b), 3.92-4.05 (m, 2H, H1'''), 4.55-4.62 (m, 1H, H2), 4.64-4.71 (m, 1H, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.12-5.18 (m, 3H, C1-OCH₂Ph, H3'''a), 5.23 (ddd, $J = 17.3, 3.1, 1.5$ Hz, 1H, H3'''b), 5.83 (ddt, $J = 17.3, 10.4, 5.7$ Hz, 1H, H2'''), 6.35 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.10 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.28-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C12''), 22.8 (C11''), 25.7 (C3''), 27.3 (C3), 29.4-29.7 (6C, C4''-C9''), 30.0 (C4), 32.0 (C10''), 36.7 (C2''), 51.9 (C2), 52.5 (C2'), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.2 (C3'), 72.4 (C1'''), 117.9 (C3'''), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 134.0 (C2'''), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 170.1 (C5), 171.3 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 307 (13), 638 (10) [M+H]⁺, 660 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₇H₅₃N₂O₇ 637.3853 [M+H]⁺, found 637.3837.



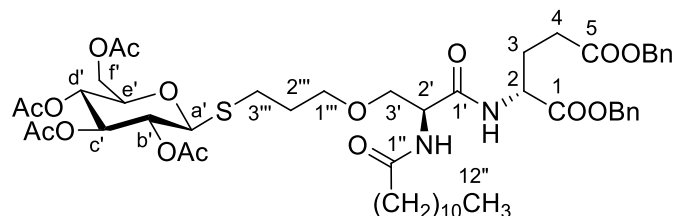
Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-allyloxy-2-(tetradecanamido)propanamido]glutarate (15c). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **14** (231 mg, 0.42 mmol) and commercially available tetradecanoyl chloride (205 mg, 0.83 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (208 mg, 0.31 mmol, 75%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.22$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 90-92 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.16-1.37 (m, 20H, H4''-H13''), 1.54-1.68 (m, 2H, H3''), 1.95-2.08 (m, 1H, H3a), 2.21 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, H2''), 2.19-2.31 (m, 1H, H3b), 2.31-2.49 (m, 2H, H4), 3.48 (dd, $J = 9.3, 7.0$ Hz, 1H, H3'a), 3.80 (dd, $J = 9.3, 4.1$ Hz, 1H, H3'b), 3.91-4.04 (m, 2H, H1'''), 4.58-4.72 (m, 2H, H2, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.10-5.18 (m, 3H, C1-OCH₂Ph,

H3''')a), 5.22 (ddd, $J = 17.2, 3.1, 1.5$ Hz, 1H, H3''')b), 5.82 (ddt, $J = 17.2, 10.5, 5.7$ Hz, 1H, H2'''), 6.47 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.27-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.2 (C14''), 22.7 (C13''), 25.6 (C3''), 27.2 (C3), 29.3-29.7 (8C, C4''-C11''), 30.0 (C4), 32.0 (C12''), 36.5 (C2''), 51.9 (C2), 52.4 (C2'), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.4 (C1-OCH₂Ph), 69.2 (C3'), 72.3 (C1'''), 117.8 (C3'''), 128.3-128.7 (10xCH_{Ar}), 133.9 (C2'''), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 170.2 (C5), 171.2 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 131 (70), 199 (100), 666 (98) [M+H]⁺, 688 (30) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₉H₅₇N₂O₇ 665.4166 [M+H]⁺, found 665.4174.

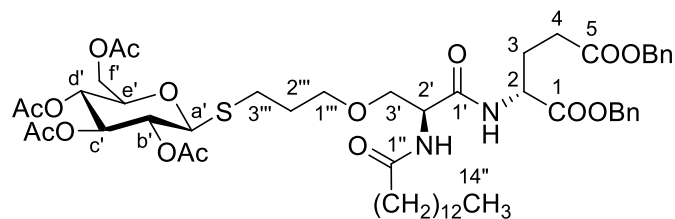


Dibenzyl (R)-2-((S)-2-decanamido-3-[3-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)sulfanyl)propoxy]propanamido}glutarate (16a). The crude product was prepared according to the general procedure H starting from **15a** (400 mg, 0.66 mmol) and commercially available 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose (287 mg, 0.79 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3 to 5:5), the pure product (468 mg, 0.48 mmol, 73%) was obtained as a colorless oil. $R_f = 0.21$ (5:5 cyclohexane/EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.83 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H10''), 1.14-1.32 (m, 12H, H4''-H9''), 1.51-1.64 (m, 2H, H3''), 1.70-1.86 (m, 2H, H2'''), 1.95, 1.96, 1.99, 2.01 (s, 12H, 4xCH_{3Ac}), 1.95-2.05 (m, 1H, H3a), 2.14-2.27 (m, 3H, H3b, H2''), 2.28-2.45 (m, 2H, H4), 2.61-2.75 (m, 2H, H3'''), 3.43 (dd, $J = 9.4, 6.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.48 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H1'''), 3.70 (ddd, $J = 9.3, 4.9, 2.4$ Hz, 1H, He'), 3.76 (dd, $J = 9.4, 4.0$ Hz, 1H, H3'b), 4.09 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H, Hf'a), 4.21 (dd, $J = 12.3, 4.9$ Hz, 1H, Hf'b), 4.47 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, Ha'), 4.51-4.58 (m, 1H, H2'), 4.59-4.67 (m, 1H, H2), 5.00 (dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz, 1H, Hb'), 5.05 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H, Hd'), 5.05 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.11 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.21 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H, Hc'), 6.46 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.17 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.23-7.35 (m, 10H, CH_{Ar}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.0 (C10''), 20.5-20.7 (4xCH_{3Ac}), 22.6 (C9''), 25.5 (C3''), 26.7 (C3'''), 27.1 (C3), 29.2-29.5 (4C, C4''-C7''), 29.5 (C2'''), 29.9 (C4), 31.8 (C8''), 36.4 (C2''), 51.7 (C2), 52.4 (C2'), 62.1 (Cf'), 66.4 (C5-OCH₂Ph), 67.3 (C1-OCH₂Ph), 68.4 (Cd'), 69.5 (C1'''), 69.8 (C3'), 69.8 (Cb'), 73.8 (Cc'), 75.7 (Ce'), 83.6 (Ca'), 128.2-128.6 (10xCH_{Ar}), 135.1, 135.7 (2xC^{IV}_{Ar}), 169.3 (2C, C5,

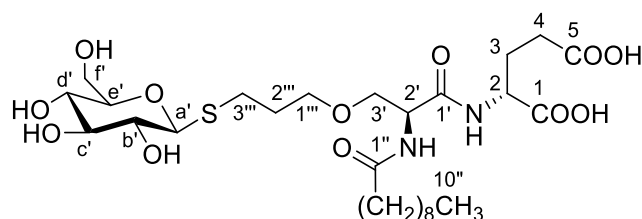
C^{IV}_{Ac}), 170.0 ($2xC^{IV}_{Ac}$), 170.6 (C^{IV}_{Ac}), 171.2 (C1), 172.4 (C1''), 173.4 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 996 (100) $[M+Na]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{49}H_{69}N_2O_{16}S$ 973.4368 $[M+H]^+$, found 973.4379.



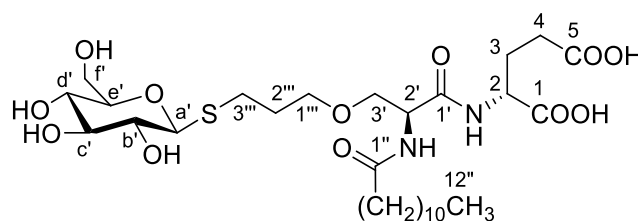
Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-dodecanamido-3-[3-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)sulfanyl)propoxy]propanamido]glutarate (16b). The crude product was prepared according to the general procedure H starting from **15b** (600 mg, 0.94 mmol) and commercially available 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (412 mg, 1.13 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3 to 5:5), the pure product (791 mg, 0.79 mmol, 71%) was obtained as a colorless oil. $R_f = 0.18$ (5:5 cyclohexane/EtOAc). **1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)** δ ppm 0.85 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H12''), 1.14-1.34 (m, 16H, H4''-H11''), 1.52-1.65 (m, 2H, H3''), 1.71-1.90 (m, 2H, H2''), 1.97, 1.98, 2.01, 2.03 (s, 12H, $4xCH_3Ac$), 1.95-2.05 (m, 1H, H3a), 2.14-2.29 (m, 3H, H3b, H2''), 2.29-2.47 (m, 2H, H4), 2.62-2.77 (m, 2H, H3'''), 3.44 (dd, $J = 9.4, 7.2$ Hz, 1H, H3'a), 3.50 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H1'''), 3.72 (ddd, $J = 10.1, 4.9, 2.4$ Hz, 1H, He'), 3.79 (dd, $J = 9.4, 4.0$ Hz, 1H, H3'b), 4.11 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H, Hf'a), 4.23 (dd, $J = 12.3, 4.9$ Hz, 1H, Hf'b), 4.48 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, Ha'), 4.51-4.58 (m, 1H, H2'), 4.59-4.68 (m, 1H, H2), 5.02 (dd, $J = 10.0, 9.4$ Hz, 1H, Hb'), 5.07 (dd, $J = 10.1, 9.4$ Hz, 1H, Hd'), 5.07 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.14 (s, 2H, C1- OCH_2Ph), 5.22 (dd, $J = 9.4, 9.4$ Hz, 1H, Hc'), 6.41 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.25-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)** δ ppm 14.1 (C12''), 20.6-20.8 ($4xCH_3Ac$), 22.7 (C11''), 25.6 (C3''), 26.8 (C3'''), 27.2 (C3), 29.3-29.6 (7C, C4''-C9'', C2'''), 30.0 (C4), 31.9 (C10''), 36.5 (C2''), 51.8 (C2), 52.5 (C2'), 62.2 (Cf'), 66.5 (C5- OCH_2Ph), 67.4 (C1- OCH_2Ph), 68.4 (Cd'), 69.6 (C1'''), 69.8 (C3'), 69.8 (Cb'), 73.9 (Cc'), 75.8 (Ce'), 83.7 (Ca'), 128.3-128.7 ($10xCH_{Ar}$), 135.2, 135.8 ($2xC^{IV}_{Ar}$), 169.4 (2C, C5, C^{IV}_{Ac}), 170.1 ($2xC^{IV}_{Ac}$), 170.7 (C^{IV}_{Ac}), 171.3 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 1002 (20) $[M+H]^+$, 1024 (100) $[M+Na]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{51}H_{73}N_2O_{16}S$ 1001.4681 $[M+H]^+$, found 1001.4655.



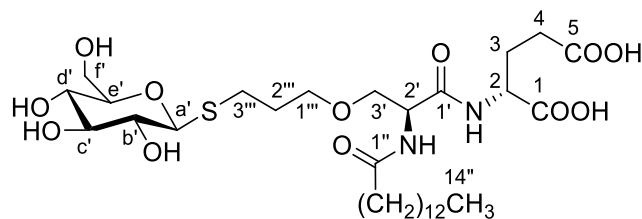
Dibenzylyl (R)-2-((S)-2-tetradecanamido-3-[3-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)sulfanyl)propoxy]propanamido)glutarate (16c). The crude product was prepared according to the general procedure H starting from **15c** (176 mg, 0.27 mmol) and commercially available 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose (116 mg, 0.32 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3 to 6:4), the pure product (192 mg, 0.19 mmol, 70%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.13$ (5:5 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 48-50 °C. **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)** δ ppm 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H14''), 1.15-1.34 (m, 20H, H4''-H13''), 1.54-1.67 (m, 2H, H3''), 1.74-1.89 (m, 2H, H2''), 1.97, 1.99, 2.02, 2.04 (s, 12H, 4xCH₃Ac), 1.95-2.09 (m, 1H, H3a), 2.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H2''), 2.14-2.29 (m, 1H, H3b), 2.30-2.47 (m, 2H, H4), 2.63-2.77 (m, 2H, H3'''), 3.44 (dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, 1H, H3'a), 3.51 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H1'''), 3.72 (ddd, $J = 10.0, 4.8, 2.3$ Hz, 1H, He'), 3.80 (dd, $J = 9.2, 3.9$ Hz, 1H, H3'b), 4.12 (dd, $J = 12.3, 2.3$ Hz, 1H, Hf'a), 4.23 (dd, $J = 12.3, 4.8$ Hz, 1H, Hf'b), 4.49 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, Ha'), 4.52-4.58 (m, 1H, H2'), 4.61-4.68 (m, 1H, H2), 5.02 (dd, $J = 10.0, 9.3$ Hz, 1H, Hb'), 5.07 (dd, $J = 10.0, 9.3$ Hz, 1H, Hd'), 5.08 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.23 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H, Hc'), 6.42 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.27-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}). **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)** δ ppm 14.2 (C14''), 20.6-20.8 (4xCH₃Ac), 22.7 (C13''), 25.6 (C3''), 26.8 (C3'''), 27.2 (C3), 29.4-29.7 (9C, C4''-C11'', C2'''), 30.0 (C4), 32.0 (C12''), 36.5 (C2''), 51.9 (C2), 52.5 (C2'), 62.2 (Cf'), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.4 (C1-OCH₂Ph), 68.5 (Cd'), 69.6 (C1'''), 69.8 (C3'), 69.9 (Cb'), 73.9 (Cc'), 75.9 (Ce'), 83.7 (Ca'), 128.3-128.7 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 169.5 (C5), 169.5, 170.1, 170.2, 170.7 (4xC^{IV}_{Ac}), 171.3 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 131 (25), 199 (30), 1030 (100) [M+H]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₅₃H₇₇N₂O₁₆S 1029.4994 [M+H]⁺, found 1029.5011.



(R)-2-[(S)-2-Decanamido-3-[3-((β-D-glucopyranosyl)sulfanyl)propoxy]propanamido] glutaric acid (17a). The pure product (white solid, 193 mg, 0.31 mmol, 64%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **16a** (465 mg, 0.48 mmol). **m.p.** 63-70 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H10''), 1.22-1.41 (m, 12H, H4''-H9''), 1.55-1.68 (m, 2H, H3''), 1.82-2.01 (m, 3H, H3a, H2'''), 2.15-2.26 (m, 1H, H3b), 2.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H2''), 2.35-2.45 (m, 2H, H4), 2.69-2.87 (m, 2H, H3'''), 3.20 (dd, *J* = 9.6, 8.6 Hz, 1H, Hb'), 3.26-3.41 (m, 3H, He', Hc', Hd'), 3.53-3.75 (m, 5H, H1''', H3', Hf'a), 3.86 (dd, *J* = 12.0, 1.0 Hz, 1H, Hf'b), 4.36 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, Ha'), 4.44-4.52 (m, 1H, H2), 4.56-4.64 (m, 1H, H2'). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C10''), 23.7 (C9''), 26.8 (C3''), 27.6 (C3'''), 27.9 (C3), 30.3-30.5 (4C, C4''-C7'''), 30.9 (2C, C4, C2'''), 33.0 (C8''), 36.8 (C2''), 52.9 (C2), 54.5 (C2'), 62.9 (Cf'), 70.7 (Cd'), 71.3 (C3'), 71.4 (C1'''), 74.3 (Cb'), 79.5 (Cc'), 81.8 (Ce'), 87.1 (Ca'), 172.2 (C5), 174.5 (C1), 176.4 (2C, C1', C1''). **LRMS (ESI-) *m/z* (%)** 623 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-) *m/z* calc.** for C₂₇H₄₇N₂O₁₂S 623.2850 [M-H]⁻, found 623.2833.

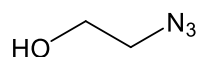


(R)-2-[(S)-2-Dodecanamido-3-[3-((β-D-glucopyranosyl)sulfanyl)propoxy]propanamido] glutaric acid (17b). The pure product (white solid, 150 mg, 0.23 mmol, 37%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **16b** (618 mg, 0.62 mmol). **m.p.** 97-102 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H12''), 1.22-1.39 (m, 16H, H4''-H11''), 1.55-1.66 (m, 2H, H3''), 1.83-2.01 (m, 3H, H3a, H2'''), 2.14-2.25 (m, 1H, H3b), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H2''), 2.35-2.43 (m, 2H, H4), 2.69-2.86 (m, 2H, H3'''), 3.21 (dd, *J* = 9.7, 8.7 Hz, 1H, Hb'), 3.27-3.40 (m, 3H, He', Hc', Hd'), 3.52-3.73 (m, 5H, H1''', H3', Hf'a), 3.86 (dd, *J* = 11.9, 1.0 Hz, 1H, Hf'b), 4.36 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, Ha'), 4.44-4.51 (m, 1H, H2), 4.56-4.64 (m, 1H, H2'). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C12''), 23.7 (C11''), 26.8 (C3''), 27.7 (C3'''), 27.9 (C3), 30.3-30.7 (6C, C4''-C9'''), 31.0 (2C, C4, C2'''), 33.0 (C10''), 36.8 (C2''), 53.0 (C2), 54.5 (C2'), 62.9 (Cf'), 70.7 (Cd'), 71.3 (C3'), 71.4 (C1'''), 74.3 (Cb'), 79.5 (Cc'), 81.8 (Ce'), 87.1 (Ca'), 172.2 (C5), 174.5 (C1), 176.4 (2C, C1', C1''). **LRMS (ESI-) *m/z* (%)** 651 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-) *m/z* calc.** for C₂₉H₅₁N₂O₁₂S 651.3163 [M-H]⁻, found 651.3187.

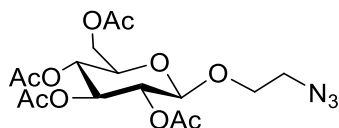


(R)-2-((S)-2-Tetradecanamido-3-[(β-D-glucopyranosyl)sulfanyl]propoxy)propanamido}glutaric acid (17c). The pure product (white solid, 712 mg, 1.05 mmol, 62%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **16c** (1.749 g, 1.70 mmol). **m.p.** 104-106 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H14''), 1.23-1.38 (m, 20H, H4''-H13''), 1.57-1.68 (m, 2H, H3''), 1.83-2.01 (m, 3H, H3a, H2'''), 2.15-2.25 (m, 1H, H3b), 2.29 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H2''), 2.37-2.44 (m, 2H, H4), 2.70-2.86 (m, 2H, H3'''), 3.21 (dd, $J = 9.7, 9.1$ Hz, 1H, Hb'), 3.26-3.40 (m, 3H, He', Hc', Hd'), 3.53-3.74 (m, 5H, H1''', H3', Hf'a), 3.87 (dd, $J = 11.9, 1.0$ Hz, 1H, Hf'b), 4.36 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, Ha'), 4.45-4.52 (m, 1H, H2), 4.56-4.64 (m, 1H, H2'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.4 (C14''), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 27.7 (C3'''), 28.0 (C3), 30.3-30.8 (8C, C4''-C11''), 31.0 (C4, C2'''), 33.0 (C12''), 36.8 (C2''), 53.0 (C2), 54.5 (C2'), 63.0 (Cf'), 70.7 (Cd'), 71.3 (C3'), 71.5 (C1'''), 74.3 (Cb'), 79.5 (Cc'), 81.9 (Ce'), 87.2 (Ca'), 172.2 (C5), 174.5 (C1), 176.4 (2C, C1', C1''). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 517 (15), 679 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$, 701 (15). **HRMS (ESI-)** m/z calc. for $\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}$ 679.3476 $[\text{M}-\text{H}]^-$, found 679.3497.

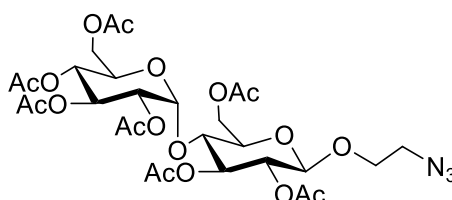
II.1.3.2. Synthesis of sugar-based detergents via CuAAC



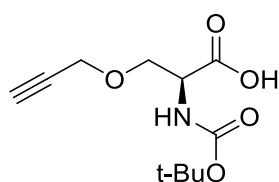
Azido ethanol (19). To a solution of NaOH (0.75 g) and NaN_3 (20.24 g, 0.31 mol) in water (80 mL) was added chloroethanol (15.12 g, 0.19 mol). The reaction mixture was stirred at 20 °C for 48 h then extracted with Et_2O (3x100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the pure product as a colorless oil (15.21 g, 0.17 mol, 93%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.85 (bs, 1H, OH), 3.44 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{N}_3\text{-CH}_2$), 3.78 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, HO-CH_2). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 53.7 ($\text{N}_3\text{-CH}_2$), 61.7 (HO-CH_2).



(2-Azidoethyl) 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (20a). To a solution of **11** (1.07 g, 10.24 mmol) in anhydrous DCM (20 mL) was added commercially available β -D-glucose pentaacetate (2.00 g, 5.12 mmol). The solution was cooled down to 0 °C in an ice bath before adding dropwise $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3.63 g, 25.6 mmol) under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at rt for 24 h then diluted with DCM (25 mL). The solution was washed with water (25 mL) and a saturated solution of NaHCO_3 (25 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (864 mg, 2.07 mmol, 40%) was obtained as a white solid. NMR spectra were in accordance with the literature.^[199]

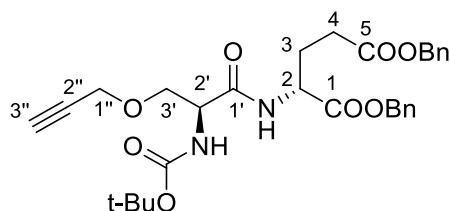


(2-Azidoethyl) 4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (20b). The crude product was prepared according to the synthesis procedure of **12a** starting from **11** (3.85 g, 44.20 mmol) and commercially available β -D-maltose octaacetate (20.00 g, 29.50 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 6:4), the pure product (10.59 g, 15.00 mmol, 51%) was obtained as a white solid. NMR spectra were in accordance with the literature.^[199]

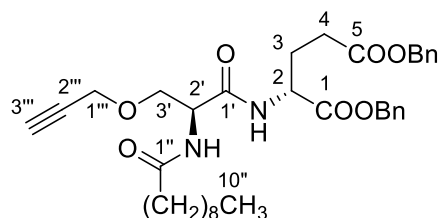


(S)-2-(tert-butoxycarbonyl)amino-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanoic acid (21). Commercially available L-Boc-Serine (1.50 g, 7.30 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous DMF (15 mL) and the solution was cooled to 0 °C. NaH (60% in mineral oil, 643 mg, 16.00 mmol, 2.2 equiv) was added and the suspension was stirred for 30 min at 0 °C. Propargyl bromide (80% in toluene, 1.20 g, 8.00 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and at rt overnight. The reaction was quenched with H_2O (30 mL) and acidified to pH = 1 by a HCl solution 10% and extracted with EtOAc (3 x 50 mL).

The combined organic layers were washed with water, brine and dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was obtained as a yellowish oil and used directly for the next step.

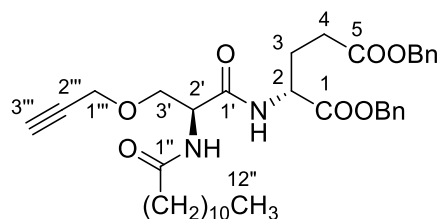


Dibenzylyl (R)-2-[(S)-2-(tert-butoxycarbonyl)amino-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanamido]glutarate (22). The crude product was prepared according to the general procedure A starting from **21** (1.096 g, 4.51 mmol) and commercially available H-D-Glu(OBn)-OBn-*p*-tosylate (4.503 g, 9.01 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (1.91 g, 3.45 mmol, 77%) was obtained as a yellowish oil. $R_f = 0.33$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.44 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.95-2.08 (m, 1H, H3a), 2.22-2.32 (m, 1H, H3b), 2.32-2.53 (m, 3H, H4, H3''), 3.66 (dd, $J = 9.3, 6.1$ Hz, 1H, H3'a), 3.87 (dd, $J = 9.3, 4.0$ Hz, 1H, H3'b), 4.08 (dd, $J = 15.9, 2.4$ Hz, 1H, H1''a), 4.15 (dd, $J = 15.9, 2.4$ Hz, 1H, H1''b), 4.25-4.38 (m, 1H, H2), 4.66-4.74 (m, 1H, H2'), 5.08 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.15 (s, 2H, C1- OCH_2Ph), 5.38 (bs, 1H, C2'-NH), 6.98 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, C2-NH), 7.26-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 27.4 (C3), 28.3 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.0 (C4), 51.7 (C2), 54.0 (C2'), 58.6 (C1''), 66.5 (C5- OCH_2Ph), 67.4 (C1- OCH_2Ph), 69.3 (C3'), 75.4 (C3''), 79.0 (C2''), 80.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.3-128.7 (10x CH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2x $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 155.6 (CO_{Boc}), 170.0 (C5), 171.4 (C1), 172.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 453 (40), 497 (37), 553 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_8$ 553.2550 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 553.2528.



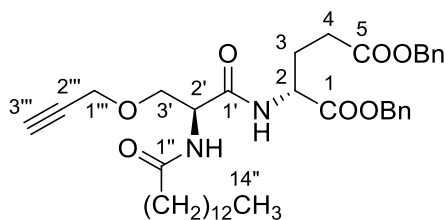
Dibenzylyl (R)-2-[(S)-2-(decanamido)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanamido]glutarate (23a). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **22** (1.105 g, 2.00 mmol) and commercially available decanoyl chloride (763 mg, 4.00 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3), the pure

product (813 mg, 1.34 mmol, 67%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.13$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 93-94°C. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H10''), 1.19-1.35 (m, 12H, H4''-H9''), 1.56-1.67 (m, 2H, H3''), 1.97-2.10 (m, 1H, H3a), 2.16-2.32 (m, 3H, H3b, H2''), 2.32-2.51 (m, 3H, H4, H3'''), 3.62 (dd, $J = 9.2, 6.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.88 (dd, $J = 9.2, 4.0$ Hz, 1H, H3'b), 4.10 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, H1''a), 4.18 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, H1''b), 4.58-4.72 (m, 2H, H2, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, C2'-NH), 7.02 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.28-7.40 (m, 10H, CH_{Ar}). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C10''), 22.8 (C9''), 25.6 (C3''), 27.3 (C3), 29.4-29.5 (4C, C4''-C7''), 30.1 (C4), 32.0 (C8''), 36.7 (C2''), 52.0 (C2), 52.4 (C2'), 58.7 (C1'''), 66.7 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C3'), 75.5 (C3'''), 79.0 (C2'''), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.9 (2xC^{IV}_{Ar}), 169.8 (C5), 171.3 (C1), 172.6 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS** (ESI+) m/z (%) 491 (100), 608 (20) [M+H]⁺, 630 (95) [M+Na]⁺. **HRMS** (ESI+) m/z calc. for C₃₅H₄₇N₂O₇ 607.3383 [M+H]⁺, found 607.3373.

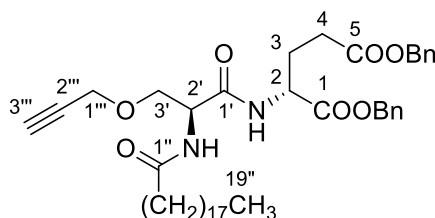


Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-(dodecanamido)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanamido]glutarate (23b). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **22** (738 mg, 1.33 mmol) and commercially available dodecanoyl chloride (584 mg, 2.67 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (651 mg, 1.03 mmol, 77%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.16$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 99-100 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H12''), 1.19-1.35 (m, 16H, H4''-H11''), 1.56-1.67 (m, 2H, H3''), 1.96-2.09 (m, 1H, H3a), 2.16-2.31 (m, 3H, H3b, H2''), 2.32-2.50 (m, 3H, H4, H3'''), 3.62 (dd, $J = 9.2, 6.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.89 (dd, $J = 9.2, 4.0$ Hz, 1H, H3'b), 4.10 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, H1''a), 4.18 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, H1''b), 4.59-4.72 (m, 2H, H2, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NH), 7.02 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 7.27-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C12''), 22.8 (C11''), 25.6 (C3''), 27.3 (C3), 29.4-29.7 (6C, C4''-C9''), 30.1 (C4), 32.0 (C10''), 36.7 (C2''), 52.0 (C2), 52.4 (C2'), 58.7 (C1'''), 66.7 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C3'), 75.5 (C3'''), 79.0 (C2'''), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.9 (2xC^{IV}_{Ar}), 169.8 (C5),

171.3 (C1), 172.6 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 636 (25) [M+H]⁺, 658 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₇H₅₁N₂O₇ 635.3696 [M+H]⁺, found 635.3697.

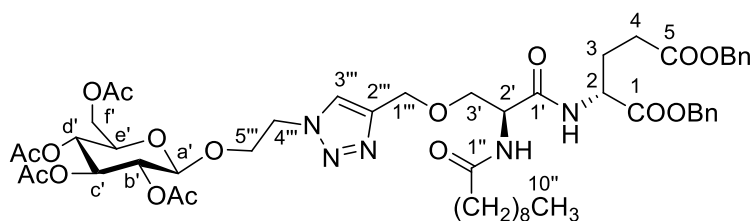


Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)-2-(tetradecanamido)propanamido]glutarate (23c). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **22** (1.073 g, 1.94 mmol) and commercially available tetradecanoyl chloride (959 mg, 3.88 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (1.085 g, 1.64 mmol, 84%) was obtained as a white solid. R_f = 0.21 (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 101-103 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H14''), 1.17-1.37 (m, 20H, H4''-H13''), 1.56-1.66 (m, 2H, H3''), 1.97-2.08 (m, 1H, H3'a), 2.14-2.32 (m, 3H, H3'b, H2''), 2.32-2.50 (m, 3H, H4, H3'''), 3.62 (dd, J = 9.2, 6.6 Hz, 1H, H3'a), 3.89 (dd, J = 9.2, 4.1 Hz, 1H, H3'b), 4.10 (dd, J = 16.0, 2.4 Hz, 1H, H1''a), 4.17 (dd, J = 16.0, 2.4 Hz, 1H, H1''b), 4.62-4.72 (m, 2H, H2, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.39 (d, J = 7.1 Hz, 1H, C2'-NH), 7.10 (d, J = 7.9 Hz, 1H, C2-NH), 7.28-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 14.2 (C14''), 22.8 (C13''), 25.6 (C3''), 27.2 (C3), 29.4-29.8 (8C, C4''-C11''), 30.1 (C4), 32.0 (C12''), 36.6 (C2''), 51.9 (C2), 52.4 (C2'), 58.7 (C1'''), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C3'), 75.5 (C3'''), 79.0 (C2'''), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 169.8 (C5), 171.3 (C1), 172.6 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 199 (15), 664 (100) [M+H]⁺, 686 (20) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₉H₅₅N₂O₇ 663.4009 [M+H]⁺, found 663.4006.



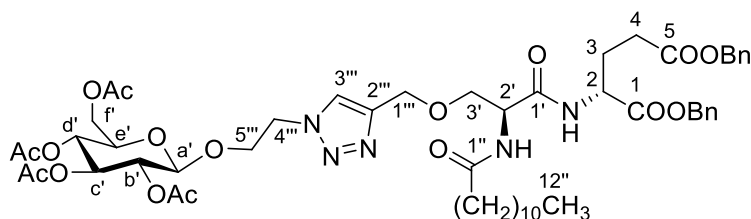
Dibenzyl (R)-2-[(S)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)-2-(nonadecanamido)propanamido]glutarate (23d). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **22** (747 mg, 1.35 mmol) and nonadecanoyl chloride (856 mg, 2.70 mmol). After

purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (467 mg, 0.64 mmol, 47%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.18$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 105-108 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H19''), 1.18-1.36 (m, 30H, H4''-H18''), 1.56-1.68 (m, 2H, H3''), 1.96-2.09 (m, 1H, H3a), 2.15-2.32 (m, 3H, H3b, H2''), 2.33-2.50 (m, 3H, H4, H3'''), 3.62 (dd, $J = 9.2, 6.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.89 (dd, $J = 9.2, 4.0$ Hz, 1H, H3'b), 4.10 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, H1''a), 4.17 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, H1''b), 4.60-4.72 (m, 2H, H2, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NH), 7.05 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 7.29-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C19''), 22.8 (C18''), 25.6 (C3''), 27.2 (C3), 29.4-29.8 (13C, C4''-C16''), 30.1 (C4), 32.0 (C17''), 36.6 (C2''), 52.0 (C2), 52.4 (C2'), 58.7 (C1'''), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C3'), 75.5 (C3'''), 79.0 (C2'''), 128.4-128.8 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 169.8 (C5), 171.3 (C1), 172.6 (C1''), 173.6 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 734 (55) [M+H]⁺, 756 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₄₄H₆₄N₂O₇Na 755.4611 [M+Na]⁺, found 755.4612.



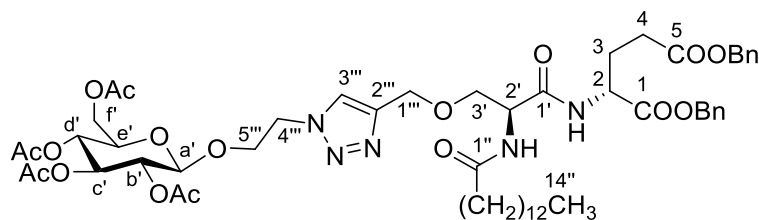
Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-decanamido-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)oxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutarate (24a). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23a** (450 mg, 0.74 mmol) and **20a** (461 mg, 1.10 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 8:2 to 4:6), the pure product (541 mg, 0.53 mmol, 71%) was obtained as a yellowish oil. $R_f = 0.07$ (5:5 DCM/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H10''), 1.20-1.36 (m, 12H, H4''-H9''), 1.54-1.65 (m, 2H, H3''), 1.91, 1.93, 1.99, 2.02 (s, 12H, 4xCH_{3Ac}), 1.96-2.09 (m, 1H, H3a), 2.15-2.30 (m, 1H, H3b), 2.26 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H2''), 2.34-2.48 (m, 2H, H4), 3.68 (dd, $J = 9.5, 5.4$ Hz, 1H, H3'a), 3.77 (dd, $J = 9.5, 5.1$ Hz, 1H, H3'b), 3.85 (ddd, $J = 9.6, 4.7, 1.8$ Hz, 1H, He'), 3.90-3.99 (m, 1H, H5''a), 4.12 (dd, $J = 12.5, 1.8$ Hz, 1H, Hf'a), 4.12-4.20 (m, 1H, H5''b), 4.26 (dd, $J = 12.5, 4.7$ Hz, 1H, Hf'b), 4.45-4.69 (m, 6H, H2, H2', H1''', H4'''), 4.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ha'), 4.90 (dd, $J = 9.5, 8.0$ Hz, 1H, Hb'), 5.01 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H, Hd'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.12 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.17 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.23 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H,

Hc'), 7.24-7.40 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.83 (s, 1H, H3'''). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 14.5 (C10''), 20.6-20.7 (4xCH_{3Ac}), 23.7 (C9''), 26.8 (C3''), 27.6 (C3), 30.3, 30.4, 30.5, 30.6 (4C, C4''-C7''), 31.0 (C4), 33.0 (C8''), 36.8 (C2''), 51.3 (C4'''), 53.1 (C2), 54.5 (C2'), 63.0 (Cf'), 65.2 (C1'''), 67.4 (C5-OCH₂Ph), 68.0 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C5'''), 69.7 (Cd'), 70.9 (C3'), 72.5 (Cb'), 72.9 (Ce'), 74.0 (Cc'), 101.6 (Ca'), 125.8 (C3'''), 129.2-129.6 (10xCH_{Ar}), 137.1, 137.5 (2xC^{IV}_{Ar}), 145.4 (C2'''), 171.1 (2C, C5, C^{IV}_{Ac}), 171.5 (C^{IV}_{Ac}), 172.2 (2xC^{IV}_{Ac}), 172.6 (C1), 174.0 (C1''), 176.2 (C1'). **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 1047 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** *m/z* calc. for C₅₁H₇₀N₅O₁₇ 1024.4767 [M+H]⁺, found 1024.4777.

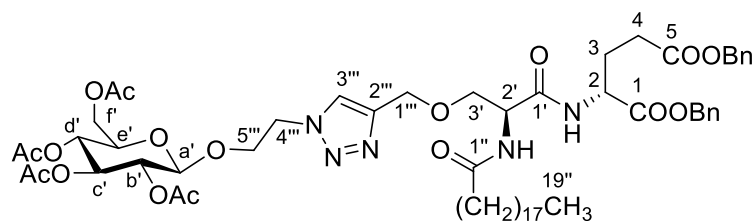


Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-dodecanamido-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutarate (24b). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23b** (150 mg, 0.24 mmol) and **20a** (148 mg, 0.35 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 8:2 to 5:5), the pure product (181 mg, 0.17 mmol, 72%) was obtained as a yellowish oil. *R_f* = 0.11 (5:5 DCM/EtOAc). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H12''), 1.20-1.36 (m, 16H, H4''-H11''), 1.54-1.65 (m, 2H, H3''), 1.91, 1.93, 1.99, 2.02 (s, 12H, 4xCH_{3Ac}), 1.94-2.06 (m, 1H, H3a), 2.15-2.31 (m, 3H, H3b, H2''), 2.36-2.44 (m, 2H, H4), 3.65-3.73 (m, 1H, H3'a), 3.73-3.81 (m, 1H, H3'b), 3.85 (ddd, *J* = 10.1, 4.7, 2.4 Hz, 1H, He'), 3.91-3.99 (m, 1H, H5''a), 4.12 (dd, *J* = 12.4, 2.4 Hz, 1H, Hf'a), 4.14-4.20 (m, 1H, H5''b), 4.26 (dd, *J* = 12.4, 4.7 Hz, 1H, Hf'b), 4.48-4.64 (m, 6H, H2, H2', H1'', H4'''), 4.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ha'), 4.89 (dd, *J* = 9.7, 8.0 Hz, 1H, Hb'), 5.01 (dd, *J* = 10.1, 9.7 Hz, 1H, Hd'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.12, 5.17 (d, *J* = 12.4 Hz, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.23 (dd, *J* = 9.7, 9.7 Hz, 1H, Hc'), 7.26-7.37 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.83 (s, 1H, H3'''). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 14.5 (C12''), 20.6-20.7 (4xCH_{3Ac}), 23.7 (C11''), 26.8 (C3''), 27.6 (C3), 30.3-30.7 (6C, C4''-C9''), 31.0 (C4), 33.0 (C10''), 36.8 (C2''), 51.2 (C4'''), 53.2 (C2), 54.5 (C2'), 63.0 (Cf'), 65.2 (C1'''), 67.4 (C5-OCH₂Ph), 68.0 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C5'''), 69.7 (Cd'), 70.9 (C3'), 72.5 (Cb'), 72.9 (Ce'), 74.0 (Cc'), 101.6 (Ca'), 125.8 (C3'''), 129.2-129.6 (10xCH_{Ar}), 137.1, 137.5 (2xC^{IV}_{Ar}), 145.3 (C2'''), 171.1, 171.2, 171.5, 172.2 (4xC^{IV}_{Ac}), 172.3 (C5), 172.6 (C1), 174.0 (C1''), 176.2 (C1'). **LRMS (ESI+)** *m/z* (%) 1075

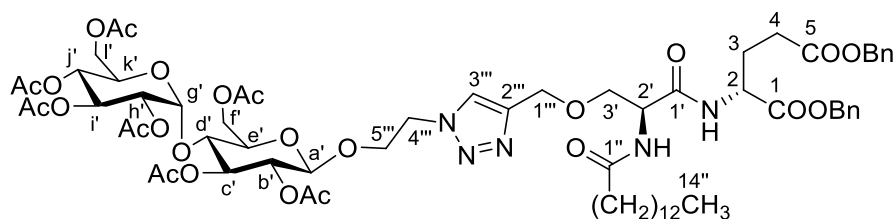
(100) $[M+Na]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{53}H_{74}N_5O_{17}$ 1052.5080 $[M+H]^+$, found 1052.5117.



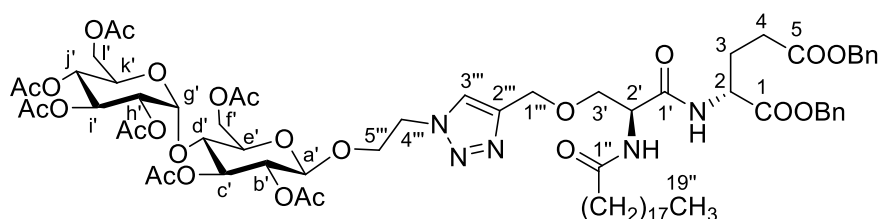
Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-tetradecanamido-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido}glutarate (24c). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23c** (450 mg, 0.68 mmol) and **20a** (425 mg, 1.02 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 8:2 to 5:5), the pure product (568 mg, 0.53 mmol, 77%) was obtained as a yellowish oil. $R_f = 0.08$ (5:5 DCM/EtOAc). **1H NMR (400 MHz, CD_3OD)** δ ppm 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.21-1.34 (m, 20H, H4''-H13''), 1.53-1.65 (m, 2H, H3''), 1.91, 1.93, 1.99, 2.02 (s, 12H, 4x CH_3Ac), 1.86-1.99 (m, 1H, H3a), 2.15-2.31 (m, 3H, H3b, H2''), 2.34-2.48 (m, 2H, H4), 3.69 (dd, $J = 9.6, 5.4$ Hz, 1H, H3'a), 3.77 (dd, $J = 9.6, 5.1$ Hz, 1H, H3'b), 3.85 (ddd, $J = 10.1, 4.7, 2.4$ Hz, 1H, He'), 3.92-3.99 (m, 1H, H5''a), 4.12 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H, Hf'a), 4.13-4.20 (m, 1H, H5''b), 4.26 (dd, $J = 12.3, 4.7$ Hz, 1H, Hf'b), 4.47-4.64 (m, 6H, H2, H2', H1''', H4'''), 4.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ha'), 4.88 (dd, $J = 9.5, 7.9$ Hz, 1H, Hb'), 5.01 (dd, $J = 10.1, 9.5$ Hz, 1H, Hd'), 5.10 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.11-5.20 (m, 2H, C1- OCH_2Ph), 5.23 (dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, 1H, Hc'), 7.27-7.37 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.84 (s, 1H, H3'''). **^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD)** δ ppm 14.5 (C14''), 20.6-20.9 (4x CH_3Ac), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 27.6 (C3), 30.4-30.8 (8C, C4''-C11''), 31.0 (C4), 33.1 (C12''), 36.8 (C2''), 51.3 (C4'''), 53.2 (C2), 54.6 (C2'), 61.5 (Cf'), 65.2 (C1'''), 67.4 (C5- OCH_2Ph), 68.0 (C1- OCH_2Ph), 69.0 (C5'''), 69.7 (Cd'), 70.9 (C3'), 72.6 (Cb'), 72.9 (Ce'), 74.0 (Cc'), 101.6 (Ca'), 125.8 (C3'''), 129.2-129.6 (10x CH_{Ar}), 137.2, 137.5 (2x C_{Ar}^{IV}), 145.4 (C2'''), 171.1, 171.2, 171.5, 172.3 (4x C_{Ac}^{IV}), 172.6 (C5), 173.0 (C1), 174.1 (C1''), 176.3 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 130 (35), 199 (40), 1081 (100) $[M+H]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{55}H_{78}N_5O_{17}$ 1080.5393 $[M+H]^+$, found 1080.5375.



Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-nonadecanamido-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido}glutarate (24d). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23d** (120 mg, 0.16 mmol) and **20a** (89 mg, 0.21 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 8:2 to 6:4), the pure product (160 mg, 0.14 mmol, 87%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.09$ (5:5 DCM/EtOAc). **m.p.** 58-60 °C. **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)** δ ppm 0.83 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H19''), 1.08-1.30 (m, 30H, H4''-H18''), 1.49-1.64 (m, 2H, H3''), 1.87, 1.93, 1.96, 2.02 (s, 12H, 4x CH_3Ac), 1.86-1.99 (m, 1H, H3a), 2.11-2.85 (m, 3H, H3b, H2''), 2.26-2.45 (m, 2H, H4), 3.51-3.60 (m, 1H, H3'a), 3.66 (ddd, $J = 10.1, 4.7, 1.9$ Hz, 1H, He'), 3.78-3.97 (m, 2H, H5'''a, H3'b), 4.08 (dd, $J = 12.4, 1.9$ Hz, 1H, Hf'a), 4.11-4.18 (m, 1H, H5'''b), 4.21 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1H, Hf'b), 4.33-4.69 (m, 6H, H2, H2', H1'', H4''), 4.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ha'), 4.95 (dd, $J = 9.5, 8.0$ Hz, 1H, Hb'), 5.03 (dd, $J = 10.1, 9.5$ Hz, 1H, Hd'), 5.03 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.10 (s, 2H, C1- OCH_2Ph), 5.13 (dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, 1H, Hc'), 6.80 (bs, 1H, C2'-NH), 7.18-7.35 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.39 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, C2-NH), 7.58 (s, 1H, H3'''). **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)** δ ppm 14.1 (C19''), 20.5-20.6 (4x CH_3Ac), 22.6 (C18''), 25.5 (C3''), 26.9 (C3), 29.3-29.6 (13C, C4''-C16''), 30.0 (C4), 31.8 (C17''), 36.3 (C2''), 49.9 (C4'''), 51.8 (C2), 52.5 (C2'), 61.7 (Cf'), 64.6 (C1'''), 66.4 (C5- OCH_2Ph), 67.1 (C1- OCH_2Ph), 67.7 (C5'''), 68.1 (Cd'), 69.7 (C3'), 70.9 (Cb'), 71.9 (Ce'), 72.4 (Cc'), 100.4 (Ca'), 124.0 (C3'''), 128.1-128.5 (10x CH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2x $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 144.1 (C2'''), 169.3, 169.5, 170.0, 170.5 (4x $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ac}}$), 170.0 (C5), 171.2 (C1), 172.4 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 1151 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{60}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{17}$ 1150.6175 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 1150.6163.

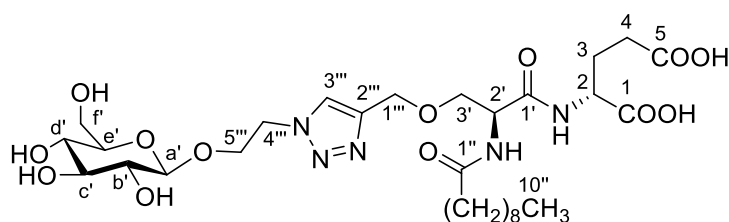


Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-tetradecanamido-3-[(1-(2-(4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido}glutarate (24e). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23e** (200 mg, 0.30 mmol) and **20b** (319 mg, 0.45 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 7:3 to 3:7), the pure product (302 mg, 0.22 mmol, 74%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.06$ (5:5 DCM/EtOAc). **m.p.** 78-80 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.22-1.37 (m, 20H, H4''-H13''), 1.54-1.65 (m, 2H, H3''), 1.89, 1.96, 1.98, 2.00, 2.01, 2.05, 2.09 (s, 21H, 7xCH_{3Ac}), 1.91-2.03 (m, 1H, H3a), 2.15-2.29 (m, 3H, H3b, H2''), 2.39-2.42 (m, 2H, H4), 3.68 (dd, $J = 9.6, 5.5$ Hz, 1H, H3'a), 3.76 (dd, $J = 9.6, 5.1$ Hz, 1H, H3'b), 3.79-3.83 (m, 1H, He'), 3.92-4.00 (m, 2H, H5''''a, Hd'), 4.03-4.07 (m, 1H, Hk'), 4.12 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H, Hl'a), 4.14-4.17 (m, 1H, H5''''b), 4.20-4.28 (m, 2H, Hl'b, Hf'a), 4.48-4.63 (m, 7H, H2, H2', H1''', H4''', Hf'b), 4.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ha'), 4.76 (dd, $J = 9.1, 7.9$ Hz, 1H, Hb'), 4.81-4.85 (m, 1H, Hh'), 5.04 (dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz, 1H, Hj'), 5.10 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.11-5.20 (m, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.27 (dd, $J = 9.1, 9.1$ Hz, 1H, Hc'), 5.33-5.38 (m, 2H, Hi', Hg'), 7.26-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.83 (s, 1H, H3'''). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.5 (C14''), 20.5-21.2 (7xCH_{3Ac}), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 27.6 (C3), 30.3-30.8 (8C, C4''-C11''), 31.0 (C4), 33.1 (C12''), 36.8 (C2''), 51.3 (C4'''), 53.1 (C2), 54.5 (C2'), 63.0 (C1'), 64.1 (Cf'), 65.2 (C1'''), 67.4 (C5-OCH₂Ph), 68.0 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C5'''), 69.6 (Ck'), 69.8 (Cj'), 70.7 (Ci'), 70.9 (C3'), 71.6 (Ch'), 73.3 (Ce'), 73.5 (Cb'), 74.7 (Cd'), 76.3 (Cc'), 97.1 (Cg'), 101.4 (Ca'), 125.8 (C3'''), 129.2-129.6 (10xCH_{Ar}), 145.5 (C2'''), 137.2, 137.6 (2xCH_{Ar}^{IV}), 171.1-172.2 (7xCH_{Ac}^{IV}), 172.2 (C5), 172.6 (C1), 174.1 (C1''), 176.3 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 1369 (100) [M+H]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₆₇H₉₄N₅O₂₅ 1368.6238 [M+H]⁺, found 1368.6237.



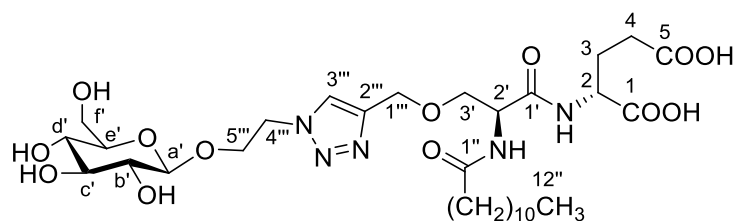
Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-nonadecanamido-3-[(1-(2-(4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido}glutarate (24f). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23f** (120 mg, 0.16 mmol) and **20b** (148 mg, 0.21 mmol). After purification by

column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 8:2 to 6:4), the pure product (192 mg, 0.13 mmol, 83%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.10$ (4:6 DCM/EtOAc). **m.p.** 90-94 °C. **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)** δ ppm 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H19''), 1.14-1.31 (m, 30H, H4''-H18''), 1.52-1.62 (m, 2H, H3''), 1.87, 1.94, 1.96, 1.98, 1.99, 2.05, 2.09 (s, 21H, 7xCH_{3Ac}), 1.91-2.03 (m, 1H, H3a), 2.13-2.26 (m, 3H, H3b, H2''), 2.26-2.43 (m, 2H, H4), 3.50-3.59 (m, 1H, H3'a), 3.60-3.66 (m, 1H, He'), 3.80-3.99 (m, 4H, H3'b, H5'''a, Hd', Hk'), 4.02 (dd, $J = 12.4, 2.2$ Hz, 1H, Hl'a), 4.09-4.25 (m, 3H, H5'''b, Hl'b, Hf'a), 4.33-4.70 (m, 7H, H2, H2', H1''', H4''', Hf'b), 4.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ha'), 4.75-4.85 (m, 2H, Hb', Hh'), 5.02 (dd, $J = 9.8, 9.8$ Hz, 1H, Hj'), 5.04 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.09 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.13 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.19 (dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, 1H, Hc'), 5.32 (dd, $J = 10.3, 9.8$ Hz, 1H, Hi'), 5.36 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, Hg'), 6.70 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 7.23-7.37 (m, 11H, NH, CH_{Ar}), 7.55 (s, 1H, H3'''). **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)** δ ppm 14.1 (C19''), 20.5-20.8 (7xCH_{3Ac}), 22.7 (C18''), 25.5 (C3''), 27.0 (C3), 29.3-29.7 (13C, C4''-C16''), 30.0 (C4), 31.9 (C17''), 36.4 (C2''), 49.9 (C4'''), 51.9 (C2), 52.5 (C2'), 61.5 (C1'), 62.5 (Cf'), 64.6 (C1'''), 66.4 (C5-OCH₂Ph), 67.2 (C1-OCH₂Ph), 67.8 (C5'''), 68.0 (Ck'), 68.5 (Cj'), 69.3 (Ci'), 69.6 (C3'), 70.0 (Ch'), 71.8 (Ce'), 72.4 (Cb'), 72.5 (Cd'), 75.0 (Cc'), 95.6 (Cg'), 100.2 (Ca'), 123.9 (C3'''), 128.1-128.6 (10xCH_{Ar}), 135.3, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 144.3 (C2'''), 169.4-170.5 (7xC^{IV}_{Ac}), 170.0 (C5), 171.2 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 1439 (100) [M+H]⁺; **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₇₂H₁₀₄N₅O₂₅ 1438.7020 [M+H]⁺, found 1438.7031.



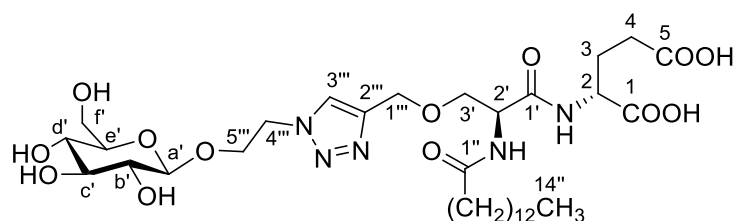
(R)-2-[(S)-2-Decanamido-3-[(1-(2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutaric acid (25a). The pure product (white solid, 81 mg, 0.12 mmol, 70%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **24a** (165 mg, 0.17 mmol). **m.p.** 72-75 °C. **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD)** δ ppm 0.89 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H, H10''), 1.20-1.38 (m, 12H, H4''-H9''), 1.54-1.67 (m, 2H, H3''), 1.86-1.99 (m, 1H, H3a), 2.10-2.24 (m, 1H, H3b), 2.24-2.40 (m, 4H, H2'', H4), 3.21 (dd, $J = 8.9, 8.0$ Hz, 1H, Hb'), 3.25-3.41 (m, 3H, He', Hc', Hd'), 3.62-3.75 (m, 2H, Hf'a, H3'a), 3.80 (dd, $J = 9.6, 5.2$ Hz, 1H, H3'b), 3.87 (dd, $J = 11.8, 1.3$ Hz, 1H, Hf'b), 3.94-4.06 (m, 1H, H5'''a), 4.20-4.29 (m, 1H, H5'''b), 4.32

(d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ha'), 4.45 (dd, $J = 8.7, 4.6$ Hz, 1H, H2), 4.57-4.71 (m, 5H, H2', H1''', H4'''), 8.14 (s, 1H, H3'''). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.4 (C10''), 23.7 (C9''), 26.8 (C3''), 27.8 (C3), 30.3, 30.4, 30.4, 30.5 (4C, C4''-C7''), 30.9 (C4), 33.0 (C8''), 36.8 (C2''), 51.6 (C4'''), 53.0 (C2), 54.5 (C2'), 62.6 (Cf'), 65.0 (C1'''), 69.0 (C5'''), 70.8 (C3'), 71.5 (Cd'), 74.9 (Cb'), 77.9 (Cc'), 77.9 (Ce'), 104.4 (Ca'), 126.2 (C3'''), 145.2 (C2'''), 172.1 (C5), 174.5 (C1), 176.4 (C1''), 176.4 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 674 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_{13}$ 676.3405 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 676.3409.

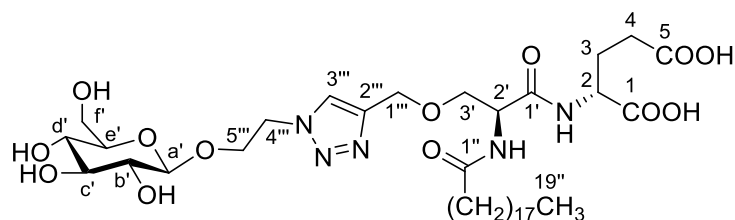


(R)-2-((S)-2-Dodecanamido-3-[(1-(2-(β -D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido)glutaric acid (25b). The pure product (white solid, 108 mg, 0.15 mmol, 93%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **24b** (174 mg, 0.17 mmol).

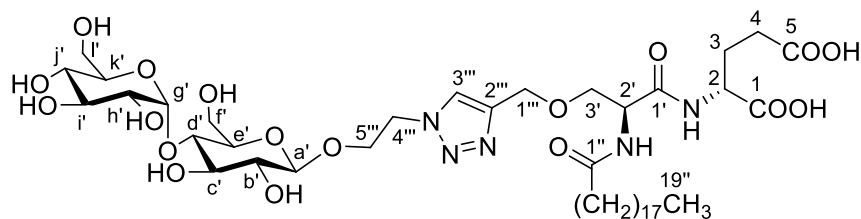
m.p. 118-120 °C. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.89 (t, $J = 5.9$ Hz, 3H, H12''), 1.16-1.38 (m, 16H, H4''-H11''), 1.52-1.67 (m, 2H, H3''), 1.85-2.00 (m, 1H, H3a), 2.10-2.25 (m, 1H, H3b), 2.22-2.42 (m, 4H, H2'', H4), 3.21 (dd, $J = 8.4, 7.8$ Hz, 1H, Hb'), 3.23-3.42 (m, 3H, He', Hc', Hd'), 3.63-3.74 (m, 2H, Hf'a, H3'a), 3.79 (dd, $J = 9.6, 5.2$ Hz, 1H, H3'b), 3.87 (dd, $J = 11.8, 1.3$ Hz, 1H, Hf'b), 3.94-4.06 (m, 1H, H5'''a), 4.17-4.28 (m, 1H, H5'''b), 4.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ha'), 4.46 (dd, $J = 8.8, 4.6$ Hz, 1H, H2), 4.55-4.70 (m, 5H, H2', H1''', H4'''), 8.10 (s, 1H, H3'''). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.4 (C12''), 23.7 (C11''), 26.8 (C3''), 27.9 (C3), 30.3-30.7 (6C, C4''-C9''), 31.0 (C4), 33.0 (C10''), 36.8 (C2''), 51.6 (C4'''), 53.2 (C2), 54.5 (C2'), 62.6 (Cf'), 65.0 (C1'''), 69.0 (C5'''), 70.8 (C3'), 71.4 (Cd'), 74.9 (Cb'), 77.8 (Cc'), 77.9 (Ce'), 104.4 (Ca'), 126.2 (C3'''), 145.2 (C2'''), 172.0 (C5), 174.8 (C1), 176.4 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 702 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_{13}$ 704.3718 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 704.3703.



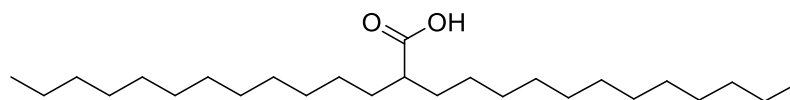
(R)-2-[(S)-2-Tetradecanamido-3-[(1-(2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutaric acid (25c). The pure product (white solid, 358 mg, 0.49 mmol, 75%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **24c** (702 mg, 0.65 mmol). **m.p.** 154-156 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H14''), 1.21-1.37 (m, 20H, H4'''-H13''), 1.54-1.67 (m, 2H, H3''), 1.86-1.99 (m, 1H, H3a), 2.13-2.25 (m, 1H, H3b), 2.25-2.31 (m, 2H, H2''), 2.31-2.38 (m, 2H, H4), 3.19 (dd, *J* = 9.7, 7.8 Hz, 1H, Hb'), 3.24-3.38 (m, 3H, He', Hc', Hd'), 3.62-3.68 (m, 1H, Hf'a), 3.71 (dd, *J* = 9.5, 5.4 Hz, 1H, H3'a), 3.78 (dd, *J* = 9.5, 5.4 Hz, 1H, H3'b), 3.87 (dd, *J* = 11.8, 1.5 Hz, 1H, Hf'b), 3.96-4.03 (m, 1H, H5'''a), 4.21-4.28 (m, 1H, H5'''b), 4.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ha'), 4.47 (dd, *J* = 9.1, 4.7 Hz, 1H, H2), 4.58-4.67 (m, 5H, H2', H1''', H4'''), 8.09 (s, 1H, H3'''). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C14''), 23.7 (C13''), 26.9 (C3''), 27.9 (C3), 30.4-30.8 (8C, C4'''-C11'''), 31.0 (C4), 33.1 (C12''), 36.8 (C2''), 51.6 (C4'''), 53.1 (C2), 54.5 (C2'), 62.7 (Cf'), 65.1 (C1'''), 69.1 (C5'''), 70.8 (C3'), 71.5 (Cd'), 74.9 (Cb'), 77.9 (Cc'), 78.1 (Ce'), 104.5 (Ca'), 126.2 (C3'''), 145.3 (C2'''), 172.1 (C5), 174.5 (C1), 176.4 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI-) *m/z* (%)** 365 (30) [M-2H]²⁻, 550 (20), 730 (100) [M-H]⁻, 752 (20). **HRMS (ESI-) *m/z* calc.** for C₃₃H₅₆N₅O₁₃ 730.3875 [M-H]⁻, found 730.3886.



(R)-2-[(S)-2-Nonadecanamido-3-[(1-(2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutaric acid (25d). The pure product (white solid, 74 mg, 0.09 mmol, 77%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **24d** (138 mg, 0.12 mmol), in 1,4-dioxane/H₂O. **m.p.** 175-185 °C. **¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)** δ ppm 0.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, H19''), 1.11-1.32 (m, 30H, H4'''-H18''), 1.39-1.51 (m, 2H, H3''), 1.68-1.83 (m, 1H, H3a), 1.90-2.04 (m, 1H, H3b), 2.07-2.16 (m, 2H, H2''), 2.18-2.29 (m, 2H, H4), 2.96 (dd, *J* = 8.3, 8.3 Hz, 1H, Hb'), 3.03 (dd, *J* = 8.8, 8.8 Hz, 1H, He'), 3.08-3.17 (m, 2H, Hc', Hd'), 3.34-3.46 (m, 1H, H3'a), 3.51-3.60 (m, 2H, H3'b, Hf'a), 3.64-3.70 (m, 1H, Hf'b), 3.85-3.93 (m, 1H, H5'''a), 4.03-4.12 (m, 1H, H5'''b), 4.17-4.28 (m, 2H, H2, Ha'), 4.44-4.63 (m, 5H, H2', H1''', H4'''), 7.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 8.09 (s, 1H, H3'''), 8.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)** δ ppm 14.0 (C19''), 22.1 (C18''),

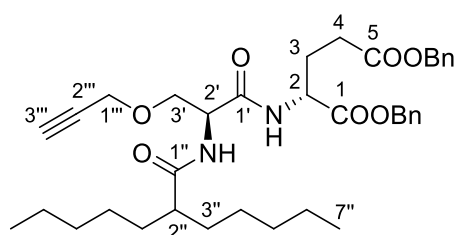


(R)-2-[(S)-2-Nonadecanamido-3-[(1-(2-(4-O-(α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)oxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutaric acid (25f). The pure product (white solid, 101 mg, 0.10 mmol, 92%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **24f** (164 mg, 0.11 mmol), in 1,4-dioxane/H₂O. **m.p.** 214-216 °C. **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H^{19''}), 1.23-1.39 (m, 30H, H^{4''}-H^{18''}), 1.56-1.66 (m, 2H, H^{3''}), 1.88-1.97 (m, 1H, H^{3a}), 2.15-2.24 (m, 1H, H^{3b}), 2.25-2.31 (m, 2H, H^{2''}), 2.31-2.39 (m, 2H, H⁴), 3.22-3.29 (m, 2H, H^{b'}, H^{d'}), 3.39 (ddd, J = 9.4, 4.7, 1.9 Hz, 1H, H^{k'}), 3.44 (dd, J = 9.7, 3.8 Hz, 1H, H^{h'}), 3.53 (dd, J = 9.4, 9.2 Hz, 1H, H^{j'}), 3.57-3.74 (m, 5H, H^{c'}, H^{e'}, H^{f'a}, H^{i'}, H^{3'a}), 3.75-3.85 (m, 3H, H^{3'b}, H^{l'a}, H^{l'b}), 3.89 (dd, J = 12.1, 1.9 Hz, 1H, H^{f'b}), 3.96-4.03 (m, 1H, H^{5'''a}), 4.21-4.27 (m, 1H, H^{5'''b}), 4.33 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H^{a'}), 4.47 (dd, J = 9.1, 4.7 Hz, 1H, H²), 4.57-4.69 (m, 5H, H^{2'}, H^{1'''}, H^{4'''}), 5.16 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H^{g'}), 8.09 (s, 1H, H^{3'''}). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.4 (C^{19''}), 23.7 (C^{18''}), 26.9 (C^{3''}), 27.9 (C³), 30.4-30.8 (13C, C^{4''}-C^{16''}), 31.0 (C⁴), 33.1 (C^{17''}), 36.8 (C^{2''}), 51.6 (C^{4'''}), 53.1 (C²), 54.5 (C^{2'}), 62.1 (C^{1'}), 62.8 (C^{3'}), 65.1 (C^{1'''}), 69.2 (C^{5'''}), 70.9 (C^{f'}), 71.5 (C^{d'}), 74.2 (C^{h'}), 74.5 (C^{b'}), 74.8 (C^{i'}), 75.1 (C^{c'}), 76.7 (C^{k'}), 77.7 (C^{e'}), 81.2 (C^{j'}), 102.9 (C^{a'}), 104.5 (C^{g'}), 126.2 (C^{3'''}), 145.3 (C^{2'''}), 172.2 (C⁵), 174.5 (C¹), 176.4 (C^{1''}), 176.5 (C^{1'}). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 481 (55) [M-2H]²⁻, 963 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₄₄H₇₆N₅O₁₈ 962.5185 [M-H]⁻, found 962.5211.



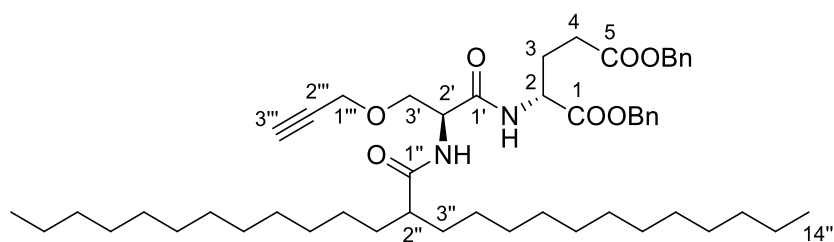
2-*n*-Dodecyltetradecanoic acid (27) was prepared according to ref. ^[133]. To a suspension of NaH 60% in mineral oil (0.23 g, 5.78 mmol) in anhydrous THF (4.5 mL) at 0 °C was slowly added a solution of myristic acid (1.20 g, 5.25 mmol) in anhydrous THF (5.5 mL). After 10 min, a solution of LDA 2 M in THF/heptane/ethylbenzene (3.4 mL, 6.83 mmol) was added. After stirring at rt for 30 min, iodododecane (1.95 mL, 7.88 mmol) was added. The reaction mixture was heated under reflux at 45 °C for one night. After being cooled down to rt, the reaction mixture was acidified to pH 1-2 by HCl 1 N and extracted with ether. The combined

organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography (cyclohexane to cyclohexane/EtOAc 13:1), the pure product (908 mg, 2.29 mmol, 44%) was obtained as white solid. $R_f = 0.37$ (13:1 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 62-64 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1.15-1.38 (m, 40H, $20\times\text{CH}_2$), 1.38-1.54 (m, 2H, $-\text{CHCH}_2$), 1.54-1.69 (m, 2H, $-\text{CHCH}_2$), 2.30-2.40 (m, 1H, CH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.3 ($2\times\text{CH}_3$), 22.8 ($2\times\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 27.5 ($2\times\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29.5-29.8 ($16\times\text{CH}_2$), 32.1 ($-\text{CHCH}_2$), 32.4 ($-\text{CHCH}_2$), 45.4 (CH), 180.9 (CO).

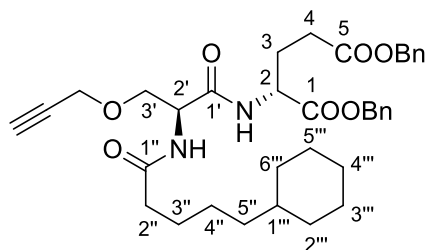


Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-(2-*n*-pentylheptanamido)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanamido] glutarate (28a). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **22** (276 mg, 0.50 mmol) and 2-*n*-pentylheptanoyl chloride (219 mg, 1.00 mmol) (2-*n*-pentylheptanoyl chloride was prepared according to the general procedure G starting from commercially available 2-*n*-pentylheptanoic acid). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 8:2), the pure product (206 mg, 0.32 mmol, 65%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.38$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 87-90 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, $\text{H}7''\text{'a}$), 0.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{H}7''\text{'b}$), 1.15-1.32 (m, 12H, $\text{H}4''\text{'-H}6''\text{'}$), 1.32-1.46 (m, 2H, $\text{H}3''\text{'a}$), 1.51-1.67 (m, 2H, $\text{H}3''\text{'b}$), 1.94-2.14 (m, 2H, $\text{H}3\text{a}$, $\text{H}2''$), 2.37 (dd, $J = 2.4, 2.4$ Hz, 1H, $\text{H}3''\text{'}$), 2.21-2.50 (m, 3H, $\text{H}4$, $\text{H}3\text{b}$), 3.63 (dd, $J = 9.2, 6.3$ Hz, 1H, $\text{H}3'\text{a}$), 3.89 (dd, $J = 9.2, 4.7$ Hz, 1H, $\text{H}3'\text{b}$), 4.09 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, $\text{H}1''\text{'a}$), 4.14 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, $\text{H}1''\text{'b}$), 4.65-4.77 (m, 2H, $\text{H}2$, $\text{H}2'$), 5.08 (s, 2H, $\text{C}5\text{-OCH}_2\text{Ph}$), 5.11 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, $\text{C}1\text{-OCH}_2\text{Ph}$), 5.15 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, $\text{C}1\text{-OCH}_2\text{Ph}$), 6.44 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, NH), 7.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.24-7.37 (m, 10H, CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.0, 14.0 ($2\times\text{C}7''$), 22.4, 22.5 ($2\times\text{C}6''$), 27.2, 27.2 ($2\times\text{C}3''$), 27.4 (C3), 29.9 (C4), 31.8, 31.9 ($2\times\text{C}4''$), 32.8, 32.9 ($2\times\text{C}5''$), 47.7 (C2''), 51.6 (C2), 52.2 (C2'), 58.5 (C1'''), 66.4 (C5-OCH₂Ph), 67.3 (C1-OCH₂Ph), 69.1 (C3'), 75.4 (C3'''), 78.9 (C2'''), 128.2-128.6 ($10\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 135.1, 135.8 ($2\times\text{C}_{\text{Ar}}^{\text{IV}}$), 169.6 (C5), 171.1 (C1), 172.3 (C1''), 176.3 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 413 (30), 635 (40) [$\text{M}+\text{H}$]⁺,

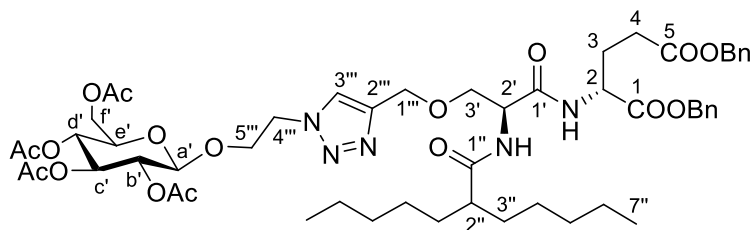
657 (100) $[M+Na]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{37}H_{50}N_2O_7Na$ 657.3516 $[M+Na]^+$, found 657.3532.



Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-(2-*n*-dodecyltetradecanamido)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanamido]glutarate (28b). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **22** (600 mg, 1.09 mmol) and 2-*n*-dodecyltetradecanoyl chloride (905 mg, 2.18 mmol) (2-*n*-dodecyltetradecanoyl chloride was prepared according to the general procedure G starting from **27**). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 8:2), the pure product (361 mg, 0.43 mmol, 40%) was obtained as a white solid. R_f = 0.52 (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 91-93 °C. **1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)** δ ppm 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H14''a), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H14''b), 1.11-1.33 (m, 40H, H4''-H13''), 1.35-1.47 (m, 2H, H3''a), 1.50-1.65 (m, 2H, H3''b), 1.94-2.14 (m, 2H, H3a, H2''), 2.37 (dd, J = 2.4, 2.4 Hz, 1H, H3'''), 2.21-2.50 (m, 3H, H4, H3b), 3.62 (dd, J = 9.2, 6.6 Hz, 1H, H3'a), 3.90 (dd, J = 9.2, 4.0 Hz, 1H, H3'b), 4.10 (dd, J = 16.0, 2.4 Hz, 1H, H1''a), 4.18 (dd, J = 16.0, 2.4 Hz, 1H, H1''b), 4.62-4.75 (m, 2H, H2, H2'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.34 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH), 7.01 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.26-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)** δ ppm 14.2 (2xC14''), 22.8 (2xC13''), 27.5 (C3), 27.7 (2xC3''), 29.5-30.0 (16C, C4''-C11''), 32.0 (C4), 32.9, 33.1 (2xC12''), 47.9 (C2''), 51.8 (C2), 52.2 (C2'), 58.6 (C1'''), 66.6 (C5-OCH₂Ph), 67.5 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C3'), 75.5 (C3'''), 79.0 (C2'''), 128.4-128.7 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2xC_{Ar}^{IV}), 169.6 (C5), 171.2 (C1), 172.4 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 853 (100) $[M+Na]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{51}H_{78}N_2O_7Na$ 853.5707 $[M+Na]^+$, found 853.5693.

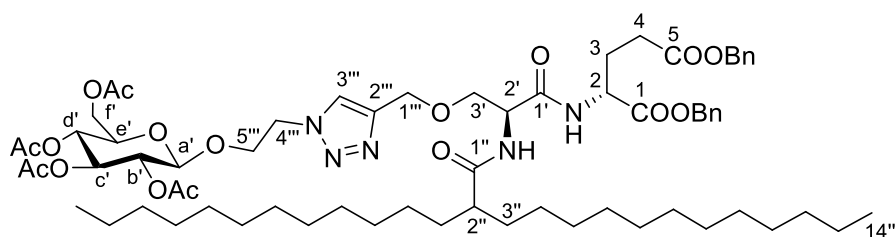


Dibenzy (R)-2-[(S)-2-(5-cyclohexylpentanamido)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanamido] glutarate (28c). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **22** (459 mg, 0.83 mmol) and 5-cyclohexylpentanoyl chloride (337 mg, 1.66 mmol) (5-cyclohexylpentanoyl chloride was prepared according to the general procedure G starting from commercially available 5-cyclohexylpentanoic acid). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (337 mg, 0.54 mmol, 66%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.13$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 100-102 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.76-0.91 (m, 2H, $\text{H}2''''\text{a}$, $\text{H}6''''\text{a}$), 1.05-1.24 (m, 6H, $\text{H}1''''$, $\text{H}3''''\text{a}$, $\text{H}4''''\text{a}$, $\text{H}5''''\text{a}$, $\text{H}5''''$), 1.23-1.35 (m, 2H, $\text{H}4''$), 1.53-1.73 (m, 7H, $\text{H}3''$, $\text{H}2''''\text{b}$, $\text{H}3''''\text{b}$, $\text{H}4''''\text{b}$, $\text{H}5''''\text{b}$, $\text{H}6''''\text{b}$), 1.94-2.08 (m, 1H, $\text{H}3\text{a}$), 2.13-2.31 (m, 3H, $\text{H}3\text{b}$, $\text{H}2''$), 2.31-2.52 (m, 3H, $\text{H}4$, $\text{CH}_{\text{alkyne}}$), 3.62 (dd, $J = 9.2, 6.5$ Hz, 1H, $\text{H}3'\text{a}$), 3.89 (dd, $J = 9.2, 4.1$ Hz, 1H, $\text{H}3'\text{b}$), 4.09 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, $\text{C}3'\text{-OCH}_2$), 4.16 (dd, $J = 16.0, 2.4$ Hz, 1H, $\text{C}3'\text{-OCH}_2$), 4.61-4.72 (m, 2H, $\text{H}2$, $\text{H}2'$), 5.09 (s, 2H, $\text{C}5\text{-OCH}_2\text{Ph}$), 5.13 (s, 2H, $\text{C}1\text{-OCH}_2\text{Ph}$), 6.38 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, NH), 7.11 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 7.28-7.39 (m, 10H, CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.9, 26.5, 26.5, 26.6, 26.8, ($\text{C}3''$, $\text{C}4''$, $\text{C}3''''$, $\text{C}4''''$, $\text{C}5''''$), 27.2 ($\text{C}3$), 30.1 ($\text{C}4$), 33.4 ($\text{C}2''''$, $\text{C}6''''$), 36.6 ($\text{C}2''$), 37.2, 37.5 ($\text{C}1''''$, $\text{C}5''$), 51.9 ($\text{C}2$), 52.3 ($\text{C}2'$), 58.6 ($\text{C}3'\text{-OCH}_2$), 66.6, 67.4 ($2\times\text{OCH}_2\text{Ph}$), 69.0 ($\text{C}3'$), 75.4 ($\text{CH}_{\text{alkyne}}$), 79.0 ($\text{C}^{\text{IV}}_{\text{alkyne}}$), 128.3-128.7 ($10\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 135.2, 135.8 ($2\times\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 169.8 ($\text{C}5$), 171.2 ($\text{C}1$), 172.6 ($\text{C}1''$), 173.5 ($\text{C}1'$). **LRMS (ESI+)** m/z . (%) 619 (60) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 641 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ 641.3203 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 641.3199.



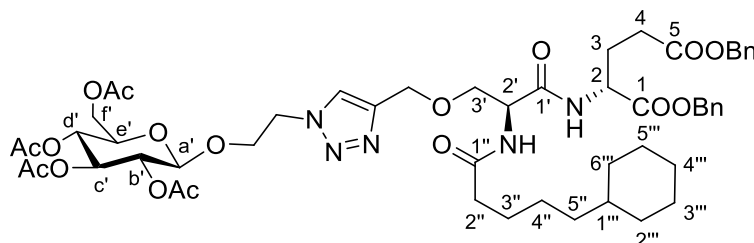
Dibenzy (R)-2-[(S)-2-(2-*n*-pentylheptanamido)-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido] glutarate (29a). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **28a** (183 mg, 0.29

mmol) and **20a** (180 mg, 0.43 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 8:2 to 6:4), the pure product (115 mg, 0.11 mmol, 38%) was obtained as a yellowish wax. $R_f = 0.40$ (5:5 DCM/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.84 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H7''a), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H7''b), 1.15-1.39 (m, 12H, H4''-H6''), 1.31-1.44 (m, 2H, H3''a), 1.47-1.63 (m, 2H, H3''b), 1.91, 1.93, 1.99, 2.02 (s, 12H, 4xCH_{3Ac}), 1.89-2.05 (m, 1H, H3a), 2.14-2.25 (m, 1H, H3b), 2.26-2.35 (m, 1H, H2''), 2.34-2.46 (m, 2H, H4), 3.68 (dd, $J = 9.6, 5.7$ Hz, 1H, H3'a), 3.76 (dd, $J = 9.6, 5.3$ Hz, 1H, H3'b), 3.85 (ddd, $J = 9.7, 4.7, 2.4$ Hz, 1H, He'), 3.90-3.99 (m, 1H, H5''a), 4.12 (dd, $J = 12.4, 2.4$ Hz, 1H, Hf'a), 4.13-4.20 (m, 1H, H5''b), 4.26 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1H, Hf'b), 4.49-4.62 (m, 6H, H2, H2', H1'', H4''), 4.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ha'), 4.89 (dd, $J = 9.7, 8.0$ Hz, 1H, Hb'), 5.02 (dd, $J = 9.7, 9.5$ Hz, 1H, Hd'), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.13 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.17 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.23 (dd, $J = 9.7, 9.5$ Hz, 1H, Hc'), 7.27-7.37 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.83 (s, 1H, H3'''), 8.12 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 8.13 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.4, 14.5 (2xC7''), 20.6, 20.6, 20.7, 20.7 (4xCH_{3Ac}), 23.5, 23.6 (2xC6''), 27.9 (C3), 28.2, 28.3 (2xC3''), 30.9 (C4), 32.9, 33.0 (2xC4''), 34.0, 34.1 (2xC5''), 47.9 (C2''), 51.3 (C4'''), 53.0 (C2), 54.2 (C2'), 63.0 (Cf'), 65.2 (C1'''), 67.4 (C5-OCH₂Ph), 68.0 (C1-OCH₂Ph), 69.0 (C5'''), 69.7 (Cd'), 71.0 (C3'), 72.5 (Cb'), 72.9 (Ce'), 74.0 (Cc'), 101.6 (Ca'), 125.8 (C3'''), 129.2-129.6 (10xCH_{Ar}), 137.1, 137.5 (2xC^{IV}_{Ar}), 145.4 (C2'''), 171.1, 171.2, 171.5, 172.0 (4xC^{IV}_{Ac}), 172.2 (C5), 172.5 (C1), 173.8 (C1''), 179.0 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 1075 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₅₃H₇₃N₅O₁₇Na 1074.4899 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 1074.4904.



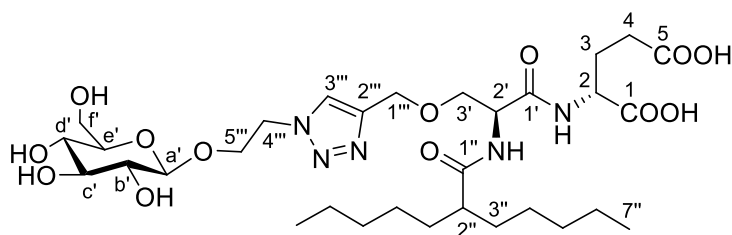
Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-(2-*n*-dodecyltetradecanamido)-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutarate (29b). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **28b** (140 mg, 0.17 mmol) and **20a** (91 mg, 0.22 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 9:1 to 6:4), the pure product (190 mg, 0.15 mmol, 90%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.40$ (5:5 DCM/EtOAc). **m.p.** 74-76 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''a), 0.85 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''b), 1.13-1.31 (m, 40H, H4''-

H13''), 1.33-1.44 (m, 2H, H3''a), 1.48-1.63 (m, 2H, H3''b), 1.90, 1.95, 1.99, 2.04 (s, 12H, 4xCH_{3Ac}), 1.93-2.03 (m, 1H, H3a), 2.06-2.15 (m, 1H, H3b), 2.16-2.45 (m, 3H, H2'', H4), 3.50-3.60 (m, 1H, H3'a), 3.67 (ddd, $J = 9.7, 4.7, 2.2$ Hz, 1H, He'), 3.81-3.90 (m, 1H, H3'b), 3.90-3.99 (m, 1H, H5''a), 4.10 (dd, $J = 12.3, 2.2$ Hz, 1H, Hf'a), 4.14-4.20 (m, 1H, H5''b), 4.23 (dd, $J = 12.3, 4.7$ Hz, 1H, Hf'b), 4.35-4.71 (m, 6H, H2, H2', H1''', H4'''), 4.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ha'), 4.97 (dd, $J = 9.7, 7.9$ Hz, 1H, Hb'), 5.05 (dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, 1H, Hd'), 5.05 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.13 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.15 (dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, 1H, Hc'), 6.69 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 7.23-7.40 (m, 11H, CH_{Ar}, NH), 7.57 (s, 1H, H3'''). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (2xC14''), 20.5, 20.6, 20.6, 20.7 (4xCH_{3Ac}), 22.7 (2xC13''), 27.3 (C3), 27.7 (2xC3''), 29.4-30.3 (16C, C4''-C11''), 31.9 (C4), 32.9, 33.0 (2xC12''), 47.7 (C2''), 50.0 (C4'''), 51.8 (C2), 52.4 (C2'), 61.8 (Cf'), 64.6 (C1'''), 66.4 (C5-OCH₂Ph), 67.2 (C1-OCH₂Ph), 67.7 (C5'''), 68.3 (Cd'), 69.8 (C3'), 71.0 (Cb'), 72.0 (Ce'), 72.5 (Cc'), 100.6 (Ca'), 124.0 (C3'''), 128.2-128.6 (10xCH_{Ar}), 135.3, 135.9 (2xC^{IV}_{Ar}), 144.4 (C2'''), 169.4, 169.5, 170.0, 170.6 (4xC^{IV}_{Ac}), 170.0 (C5), 171.2 (C1), 172.3 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 1271 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₆₇H₁₀₁N₅O₁₇Na 1270.7090 [M+Na]⁺, found 1270.7128.

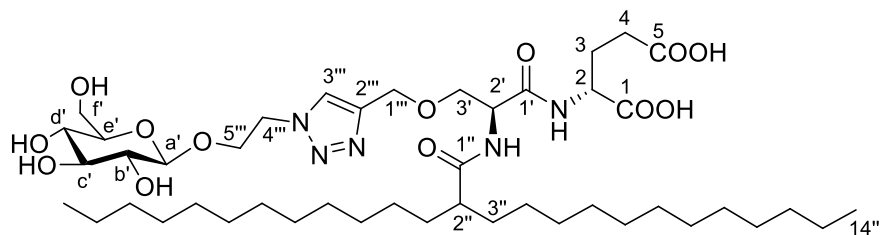


Dibenzyl (R)-2-[(S)-2-(5-cyclohexylpentanamido)-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutarate (29c). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **28c** (150 mg, 0.24 mmol) and **20a** (152 mg, 0.36 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 99:1), the pure product (200 mg, 0.19 mmol, 80%) was obtained as a yellowish wax. $R_f = 0.16$ (97.5:2.5 DCM/MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 0.77-0.92 (m, 2H, H2''a, H6''a), 1.10-1.25 (m, 6H, H1''', H3''a, H4''a, H5''a, H5''), 1.25-1.37 (m, 2H, H4''), 1.51-1.73 (m, 7H, H3'', H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.91, 1.93, 1.98, 2.02 (s, 12H, 4xCH_{3Ac}), 1.94-2.08 (m, 1H, H3a), 2.14-2.30 (m, 3H, H3b, H2''), 2.34-2.48 (m, 2H, H4), 3.69 (dd, $J = 9.6, 5.5$ Hz, 1H, H3'a), 3.78 (dd, $J = 9.6, 5.2$ Hz, 1H, H3'b), 3.85 (ddd, $J = 9.7, 4.6, 2.1$ Hz, 1H, He'), 3.95 (m, 1H, glucosyl-OCH₂-), 4.12 (dd, $J = 12.4, 2.1$ Hz, 1H, Hf'a), 4.12-4.20 (m, 1H, glucosyl-OCH₂-), 4.26 (dd, $J = 12.4, 4.6$ Hz,

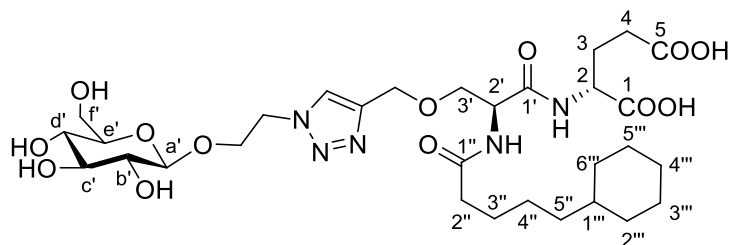
1H, Hf^b), 4.48-4.64 (m, 6H, H₂, H₂['], -CH₂-C_{triazole}, -CH₂-N_{triazole}), 4.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ha[']), 4.89 (dd, *J* = 9.5, 7.9 Hz, 1H, Hb[']), 5.02 (dd, *J* = 9.7, 9.5 Hz, 1H, Hd[']), 5.09 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.12 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.17 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, C1-OCH₂Ph), 5.23 (dd, *J* = 9.5, 9.5 Hz, 1H, Hc[']), 7.25-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.82 (s, 1H, CH_{triazole}). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 20.6, 20.6, 20.7, 20.7 (4xCH₃Ac), 27.0, 27.4, 27.4, 27.5, 27.6 (C3['], C4['], C3[']['], C4[']['], C5['][']), 27.7 (C3), 31.0 (C4), 34.5, 34.5 (C2[']['], C6['][']), 36.8 (C2[']), 38.3 (C5[']), 38.7 (C1['][']), 51.2 (-CH₂-N_{triazole}), 53.1 (C2), 54.4 (C2[']), 63.0 (Cf[']), 65.1 (-CH₂-C_{triazole}), 67.4 (C5-OCH₂Ph), 68.0 (C1-OCH₂Ph), 68.9 (glucosyl-OCH₂-), 69.7 (Cd[']), 70.9 (C3[']), 72.5 (Cb[']), 72.8 (Ce[']), 73.9 (Cc[']), 101.6 (Ca[']), 125.7 (CH_{triazole}), 129.1-129.6 (10xCH_{Ar}), 137.1, 137.5 (2xC^{IV}_{Ar}), 145.3 (C^{IV}_{triazole}), 171.1, 171.1, 171.4, 172.1 (4xC^{IV}_{Ac}), 172.2 (C5), 172.5 (C1), 174.0 (C1['][']), 176.1 (C1[']). LRMS (ESI+) *m/z* (%) 1059 (100) [M+Na]⁺. HRMS (ESI+) *m/z* calc. for C₅₂H₇₀N₅O₁₇ 1036.4767 [M+H]⁺, found 1036.4760.



(R)-2-[(S)-2-(2-*n*-Pentylheptanamido)-3-[(1-(2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutaric acid (30a). The pure product (white solid, 31 mg, 0.04 mmol, 46%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **29a** (101 mg, 0.10 mmol). **m.p.** 100-103 °C. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, 2xH7[']), 1.18-1.36 (m, 12H, H4['][']-H6['][']), 1.33-1.46 (m, 2H, H3['][']a), 1.47-1.68 (m, 2H, H3['][']b), 1.86-1.97 (m, 1H, H3a), 2.13-2.24 (m, 1H, H3b), 2.24-2.40 (m, 3H, H4, H2[']), 3.20 (dd, *J* = 9.0, 7.9 Hz, 1H, Hb[']), 3.31-3.39 (m, 3H, He['], Hc['], Hd[']), 3.62-3.73 (m, 2H, Hf[']a, H3[']a), 3.79 (dd, *J* = 9.5, 5.3 Hz, 1H, H3[']b), 3.87 (dd, *J* = 11.5, 1.3 Hz, 1H, Hf[']b), 3.96-4.04 (m, 1H, H5['][']a), 4.21-4.28 (m, 1H, H5['][']b), 4.32 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ha[']), 4.42 (dd, *J* = 7.8, 4.7 Hz, 1H, H2), 4.59-4.71 (m, 5H, H2['], H1[']['], H4['][']), 8.10 (s, 1H, H3['][']). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 14.4 (2xC7[']), 23.5, 23.6 (2xC6[']), 28.2, 28.3 (2xC3[']), 28.5 (C3), 31.1 (C4), 32.9, 33.1 (2xC4[']), 34.1 (2xC5[']), 48.0 (C2[']), 51.6 (C4['][']), 53.5 (C2), 54.4 (C2[']), 62.7 (Cf[']), 65.1 (C1['][']), 69.0 (C5['][']), 70.9 (C3[']), 71.5 (Cd[']), 74.9 (Cb[']), 77.9 (Cc[']), 78.0 (Ce[']), 104.5 (Ca[']), 126.2 (C3['][']), 145.3 (C2['][']), 171.7 (C5), 175.1 (C1), 176.5 (C1['][']), 179.2 (C1[']). LRMS (ESI-) *m/z* (%) 351 (25) [M-2H]²⁻, 702 (100) [M-H]⁻. HRMS (ESI-) *m/z* calc. for C₃₁H₅₂N₅O₁₃ 702.3562 [M-H]⁻, found 702.3550.

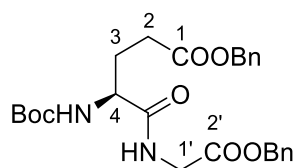


(R)-2-((S)-2-(2-*n*-Dodecyltetradecanamido)-3-[(1-(2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido)glutaric acid (30b). The pure product (white solid, 40 mg, 0.04 mmol, quantitative) was prepared according to the general procedure J and K starting from **29b** (54 mg, 0.04 mmol), in 1,4-dioxane/H₂O 1:1 instead of THF/H₂O. **m.p.** > 160 °C (decomposition). **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, 2xH14''), 1.20-1.36 (m, 40H, H4''-H13''), 1.36-1.47 (m, 2H, H3''a), 1.49-1.65 (m, 2H, H3''b), 1.86-1.97 (m, 1H, H3a), 2.14-2.23 (m, 1H, H3b), 2.26-2.38 (m, 3H, H4, H2''), 3.20 (dd, *J* = 9.1, 7.8 Hz, 1H, Hb'), 3.26-3.30 (m, 2H, Hc', Hd'), 3.33-3.39 (m, 1H, He'), 3.64-3.69 (m, 1H, Hf'a), 3.70 (dd, *J* = 9.7, 5.7 Hz, 1H, H3'a), 3.78 (dd, *J* = 9.7, 5.3 Hz, 1H, H3'b), 3.87 (dd, *J* = 11.5, 1.3 Hz, 1H, Hf'b), 3.97-4.03 (m, 1H, H5'''a), 4.21-4.28 (m, 1H, H5'''b), 4.32 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ha'), 4.44 (dd, *J* = 8.3, 4.9 Hz, 1H, H2), 4.61-4.70 (m, 5H, H2', H1''', H4'''), 8.10 (s, 1H, H3'''). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.5 (2xC14''), 23.7 (2xC13''), 28.5 (2xC3''), 28.6 (C3), 30.5-30.8 (14C, C4''-C10''), 31.1 (C4), 33.1 (2xC11''), 34.0 (2xC12''), 47.9 (C2''), 51.6 (C4'''), 53.5 (C2), 54.4 (C2'), 62.7 (Cf'), 65.1 (C1'''), 69.0 (C5'''), 70.9 (C3'), 71.5 (Cd'), 74.9 (Cb'), 77.9 (Cc'), 78.0 (Ce'), 104.5 (Ca'), 126.1 (C3'''), 145.3 (C2'''), 171.7 (C5), 175.0 (C1), 176.5 (C1''), 179.2 (C1'). **LRMS (ESI-)** *m/z* (%) 449 (40) [M-2H]²⁻, 899 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-)** *m/z* calc. for C₄₅H₈₀N₅O₁₃ 898.5753 [M-H]⁻, found 898.5754.

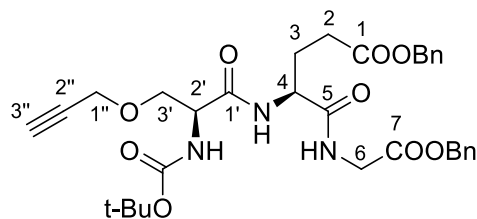


(R)-2-((S)-2-(5-Cyclohexylpentanamido)-3-[(1-(2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido)glutaric acid (30c). The pure product (white solid, 60 mg, 0.09 mmol, 82%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **29c** (110 mg, 0.11 mmol). **m.p.** 114-116 °C. **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.81-0.94 (m, 2H, H2'''a, H6'''a), 1.12-1.28 (m, 6H, H1''', H3'''a, H4'''a, H5'''a, H5'''), 1.28-1.38 (m, 2H,

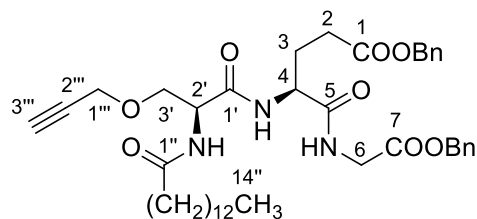
H4''), 1.53-1.76 (m, 7H, H3'', H2''''b, H3''''b, H4''''b, H5''''b, H6''''b), 1.86-1.98 (m, 1H, H3a), 2.13-2.23 (m, 1H, H3b), 2.28 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H2''), 2.31-2.39 (m, 2H, H4), 3.20 (dd, $J = 9.1, 7.8$ Hz, 1H, Hb'), 3.27-3.39 (m, 3H, Hc', Hd', He'), 3.64-3.68 (m, 1H, Hf'a), 3.70 (dd, $J = 9.6, 5.5$ Hz, 1H, H3'a), 3.79 (dd, $J = 9.6, 5.3$ Hz, 1H, H3'b), 3.87 (dd, $J = 11.7, 1.1$ Hz, 1H, Hf'b), 3.96-4.04 (m, 1H, glucosyl-OCH₂), 4.21-4.28 (m, 1H, glucosyl-OCH₂), 4.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ha'), 4.47 (dd, $J = 9.1, 4.7$ Hz, 1H, H2), 4.61-4.69 (m, 5H, H2', -CH₂-C_{triazole}, -CH₂-N_{triazole}), 8.09 (s, 1H, CH_{triazole}). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)** δ ppm 27.1, 27.5, 27.5, 27.5, 27.8 (C3'', C4'', C3''', C4''', C5'''), 27.9 (C3), 31.0 (C4), 34.5, 34.5 (C2''', C6'''), 36.8 (C2''), 38.3 (C5''), 38.8 (C1'''), 51.6 (CH₂-N_{triazole}), 53.0 (C2), 54.5 (C2'), 62.7 (Cf'), 65.0 (-CH₂-C_{triazole}), 69.0 (glucosyl-OCH₂-), 70.8 (C3'), 71.5 (Cd'), 74.9 (Cb'), 77.9 (Cc'), 78.0 (Ce'), 104.5 (Ca'), 126.2 (CH_{triazole}), 145.3 (C^{IV}_{triazole}), 172.1 (C5), 174.5 (C1), 176.4 (C1''), 176.4 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 343 (30) [M-2H]²⁻, 506 (25), 686 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₃₀H₄₈N₅O₁₃ 686.3249 [M-H]⁻, found 686.3229.



Benzyl (S)-4-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-4-[N-(benzyloxycarbonylmethyl)carbamoyl]butanoate (32). The crude product was prepared according to the general procedure A starting from commercially available Boc-L-Glu(OBn)-OH (3.00 g, 8.90 mmol) and H-Gly-OBn-*p*-tosylate (6.00 g, 17.80 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 7:3), the pure product (4.07 g, 8.41 mmol, 94%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.26$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 73-75 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 1.42 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.90-2.02 (m, 1H, H3a), 2.11-2.22 (m, 1H, H3b), 2.42-2.60 (m, 2H, H2), 4.00 (dd, $J = 18.2, 5.4$ Hz, 1H, H1'a), 4.08 (dd, $J = 18.2, 5.6$ Hz, 1H, H1'b), 4.21-4.36 (m, 1H, H4), 5.11 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C2'-OCH₂Ph), 5.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C4-NH), 7.00-7.08 (m, 1H, C1'-NH), 7.25-7.41 (m, 10H, CH_{Ar}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 28.0 (C3), 28.3 (-C(CH₃)₃), 30.4 (C2), 41.3 (C1'), 53.5 (C4), 66.5 (C1-OCH₂Ph), 67.2 (C2'-OCH₂Ph), 80.1 (-C(CH₃)₃), 128.2-128.7 (10xCH_{Ar}), 135.2, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 155.8 (CO_{Boc}), 169.5 (C1), 172.1 (C2'), 173.2 (CO_{amide}). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 385 (50), 485 (70) [M+H]⁺, 507 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₂₆H₃₃N₂O₇ 485.2288 [M+H]⁺, found 485.2287.

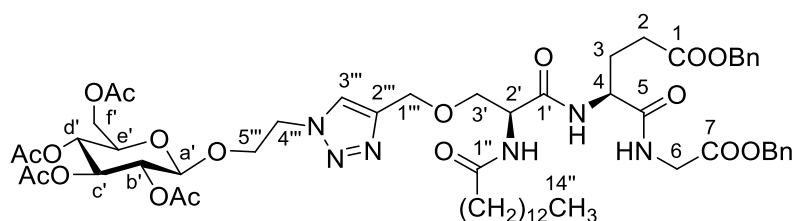


Benzyl (S)-4-[(S)-2-(tert-butoxycarbonyl)amino-3-(prop-2-yn-1-yloxy)propanamido]-4-[N-(benzyloxycarbonylmethyl)carbamoyl]butanoate (33). The crude product was prepared according to the general procedure F and A starting from **21** (2.168 g, 4.47 mmol) and **32** (550 mg, 2.24 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (886 mg, 1.45 mmol, 65%) was obtained as a yellowish oil. $R_f = 0.28$ (5:5 cyclohexane/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.43 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.99-2.13 (m, 1H, H3a), 2.15-2.27 (m, 1H, H3b), 2.39 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H3''), 2.42-2.54 (m, 1H, H2a), 2.54-2.66 (m, 1H, H2b), 3.69 (dd, $J = 9.2, 5.6$ Hz, 1H, H3'a), 3.86 (dd, $J = 9.3, 4.4$ Hz, 1H, H3'b), 3.95 (dd, $J = 17.9, 5.1$ Hz, 1H, H6a), 4.12 (dd, $J = 17.9, 6.0$ Hz, 1H, H6b), 4.09 (dd, $J = 15.8, 2.4$ Hz, 1H, H1''a), 4.14 (dd, $J = 15.8, 2.4$ Hz, 1H, H1''b), 4.22-4.32 (m, 1H, H4), 4.52-4.61 (m, 1H, H2'), 5.11 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 5.12 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, C7- OCH_2Ph), 5.14 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 5.17 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, C7- OCH_2Ph), 5.41 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, NH), 7.15 (bs, 1H, NH), 7.28-7.43 (m, 11H, NH, CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 26.9 (C3), 28.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.5 (C2), 41.4 (C6), 52.9 (C4), 54.7 (C2'), 58.8 (C1''), 66.8 (C1- OCH_2Ph), 67.2 (C7- OCH_2Ph), 69.5 (C3'), 75.6 (C3''), 78.9 (C2''), 80.8 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.4-128.7 (10x CH_{Ar}), 135.4, 135.8 (2x $\text{C}_{\text{Ar}}^{\text{IV}}$), 155.9 (CO_{Boc}), 169.5 (C1), 170.3 (C7), 171.2 (C5), 174.0 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 610 (15) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 632 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_9$ 610.2765 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 610.2764.



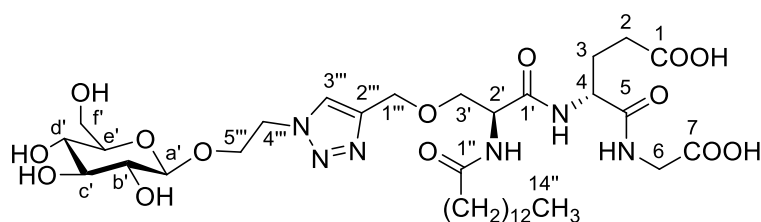
Benzyl (S)-4-[(S)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)-2-(tetradecanamido)propanamido]-4-[N-(benzyloxycarbonylmethyl)carbamoyl]butanoate (34). The crude product was prepared according to the general procedure F and C starting from **33** (589 mg, 0.97 mmol) and commercially available tetradecanoyl chloride (477 mg, 1.93 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3 to 5:5), the pure product (506

mg, 0.70 mmol, 72%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.19$ (5:5 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 122-123 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.15-1.35 (m, 20H, H4''-H13''), 1.54-1.69 (m, 2H, H3''), 2.01-2.29 (m, 4H, H3, H2''), 2.39 (dd, $J = 2.4, 2.4$ Hz, 1H, H3'''), 2.43-2.66 (m, 2H, H2), 3.67 (dd, $J = 9.3, 6.0$ Hz, 1H, H3'a), 3.89 (dd, $J = 9.3, 4.3$ Hz, 1H, H3'b), 3.96 (dd, $J = 17.9, 5.4$ Hz, 1H, H6a), 4.10 (dd, $J = 15.8, 2.4$ Hz, 1H, H1''a), 4.14 (dd, $J = 17.9, 6.2$ Hz, 1H, H6b), 4.15 (dd, $J = 15.8, 2.4$ Hz, 1H, H1''b), 4.54-4.63 (m, 2H, H4, H2'), 5.11 (s, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.12 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, C7-OCH₂Ph), 5.16 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, C7-OCH₂Ph), 6.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, NH), 7.21 (dd, $J = 6.2, 5.4$ Hz, 1H, C5-NH), 7.28-7.38 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.57 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C14''), 22.8 (C13''), 25.6 (C3''), 26.7 (C3), 29.4-29.8 (8C, C4''-C11''), 30.5 (C2), 32.0 (C12''), 36.5 (C2''), 41.4 (C6), 53.0, 53.1 (C4, C2'), 58.8 (C1'''), 66.8 (C1-OCH₂Ph), 67.2 (C7-OCH₂Ph), 69.4 (C3'), 75.6 (C3'''), 78.9 (C2'''), 128.3-128.7 (10xCH_{Ar}), 135.4, 135.7 (2x $\text{C}^{\text{IV}}_{\text{Ar}}$), 169.6 (C1), 170.0 (C7), 171.1 (C1''), 173.9 (C5), 174.2 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 720 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 742 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ 742.4043 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 742.4042.



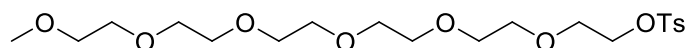
Benzyl (S)-4-((S)-2-tetradecanamido-3-[(1-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido)-4-[N-(benzyloxycarbonylmethyl)carbamoyl]butanoate (35). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **34** (160 mg, 0.22 mmol) and **20a** (139 mg, 0.33 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 99:1), the pure product (153 mg, 0.13 mmol, 61%) was obtained as a yellowish solid. $R_f = 0.21$ (97.5:2.5 DCM/MeOH). **m.p.** 60-63 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.21-1.34 (m, 20H, H4''-H13''), 1.53-1.65 (m, 2H, H3''), 1.92, 1.94, 1.99, 2.02 (s, 12H, 4xCH_{3Ac}), 1.93-2.10 (m, 1H, H3a), 2.15-2.31 (m, 3H, H3b, H2''), 2.42-2.52 (m, 2H, H4), 3.71 (dd, $J = 9.6, 5.2$ Hz, 1H, H3'a), 3.79-3.88 (m, 2H, H3'b, He'), 3.91-4.00 (m, 3H, H5''a, H6), 4.09-4.20 (m, 2H, Hf'a, H5''b), 4.26 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1H, Hf'b), 4.47-4.64 (m, 6H, H2, H2', H1''', H4'''), 4.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ha'), 4.88 (dd, $J = 9.6, 8.0$ Hz, 1H, Hb'), 5.01 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H, Hd'), 5.11 (s, 2H, C5-OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, C7-

OCH₂Ph), 5.23 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H, Hc'), 7.25-7.40 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.84 (s, 1H, H3''').
¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 14.6 (C14''), 20.7, 20.7, 20.8, 20.8 (4xCH_{3Ac}), 23.8 (C13''), 26.8 (C3''), 28.1 (C3), 30.5-30.9 (8C, C4''-C11''), 31.2 (C4), 33.1 (C12''), 36.8 (C2''), 42.2 (C6), 51.3 (C4'''), 53.7 (C2), 55.2 (C2'), 63.1 (Cf'), 65.3 (C1'''), 67.4 (C1-OCH₂Ph), 68.0 (C7-OCH₂Ph), 69.0 (C5'''), 69.8 (Cd'), 70.9 (C3'), 72.6 (Cb'), 73.0 (Ce'), 74.1 (Cc'), 101.7 (Ca'), 125.9 (C3'''), 129.3-129.7 (10xCH_{Ar}), 137.2, 137.7 (2xC^{IV}_{Ar}), 145.3 (C2'''), 171.0, 171.2, 171.3, 171.6 (4xC^{IV}_{Ac}), 172.3 (C5), 172.3 (C7), 173.8 (C1), 174.4 (C1''), 176.9 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 1160 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₅₇H₈₁N₆O₁₈ 1137.5607 [M+H]⁺, found 1137.5610.

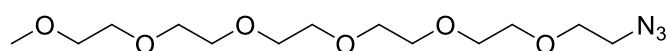


(S)-4-((S)-2-Tetradecanamido-3-([1-(2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl)triazol-4-yl]methoxy)propanamido)-4-[N-(carboxymethyl)carbamoyl]butanoic acid (36). The pure product (white solid, 70 mg, 0.09 mmol, 94%) was prepared according to the general procedure J and K starting from **35** (107 mg, 0.09 mmol). **m.p.** > 170 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H14''), 1.23-1.38 (m, 20H, H4''-H13''), 1.54-1.67 (m, 2H, H3''), 1.86-2.03 (m, 1H, H3a), 2.13-2.43 (m, 5H, H3b, H2'', H2), 3.19 (dd, $J = 8.9, 7.9$ Hz, 1H, Hb'), 3.25-3.38 (m, 3H, He', Hc', Hd'), 3.62-3.69 (m, 1H, Hf'a), 3.72 (dd, $J = 9.7, 4.8$ Hz, 1H, H3'a), 3.82 (dd, $J = 9.7, 5.3$ Hz, 1H, H3'b), 3.84-3.94 (m, 3H, Hf'b, H6), 3.95-4.05 (m, 1H, H5'''a), 4.20-4.28 (m, 1H, H5'''b), 4.31 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ha'), 4.40-4.70 (m, 6H, H4, H2', H1''', H4'''), 8.11 (s, 1H, H3'''). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm 14.4 (C14''), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 28.6 (C3), 30.4-30.8 (8C, C4''-C11''), 32.8 (C2), 33.1 (C12''), 36.8 (C2''), 41.9 (C6), 51.6 (C4'''), 53.2 (C4), 54.9 (C2'), 62.7 (Cf'), 65.1 (C1'''), 69.0 (C5'''), 70.8 (C3'), 71.5 (Cd'), 74.9 (Cb'), 78.0 (Cc'), 78.0 (Ce'), 104.5 (Ca'), 126.3 (C3'''), 145.3 (C2'''), 172.2 (C1), 173.1 (C7), 174.5 (C1''), 175.4 (C5), 176.6 (C1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 393 (100) [M-2H]²⁻, 787 (80) [M-H]⁻. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₅H₆₁N₆O₁₄ 789.4246 [M+H]⁺, found 789.4238.

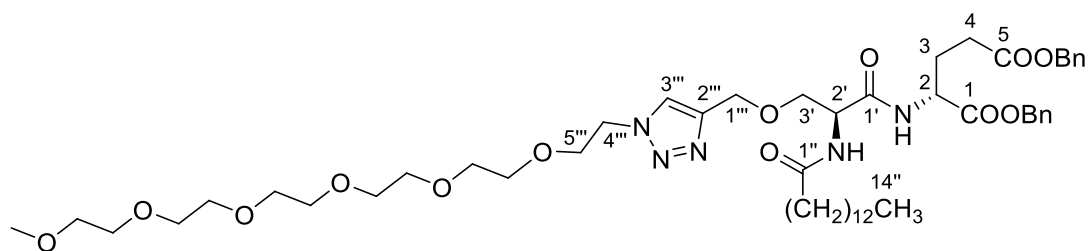
II.1.4. Synthesis of PEGylated detergents



19-*p*-Toluenesulfonyloxy-2,5,8,11,14,17-hexaoxonadecane (38). 3,6,9,12,15,18-hexaoxonadecan-1-ol (714 mg, 2.41 mmol) was dissolved in THF (10,5 mL) and the solution was cooled to 0 °C. NaH (60% in mineral oil, 116 mg, 2.90 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min. After that tosylchloride (551 mg, 2.89 mmol) was added in portions and the mixture was stirred at 0 °C for 2 h. The reaction mixture was quenched with water (4 mL) and extracted with Et₂O (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the crude product as yellowish oil, which was used without further purification.

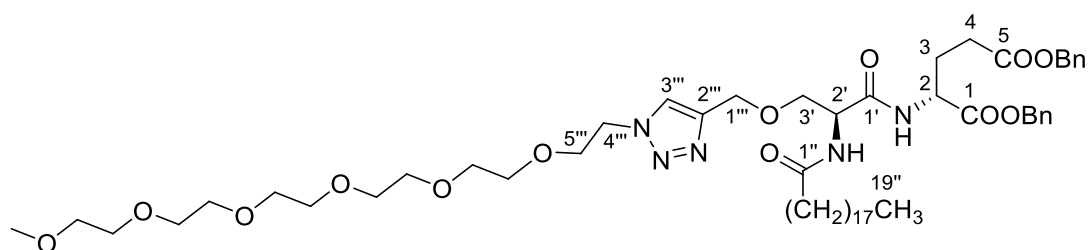


19-Azido-2,5,8,11,14,17-hexaoxonadecane (39). The compound **38** (416 mg, 0.92 mmol) was dissolved in water (0.5 mL, 0.5 mL/mmol) and a saturated solution of NaHCO₃ was added until pH = 8. After adding NaN₃ (130 mg, 2.00 mmol), the solution was stirred and heated at 80 °C for 24 h. The solution was diluted with brine (5 mL) and extracted with Et₂O (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to obtain the pure product as yellow oil (263 mg, 0.82 mmol, 82%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.21 (s, 3H, H1), 3.23 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H19), 3.39-3.40 (m, 2H, H3), 3.43-3.57 (m, 20H, -CH₂OCH₂-). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 50.3 (C19), 58.6 (C1), 69.7 (C3), 70.2-70.3 (9C, C4, C6, C7, C9, C10, C12, C13, C15, C16), 71.6 (C18).



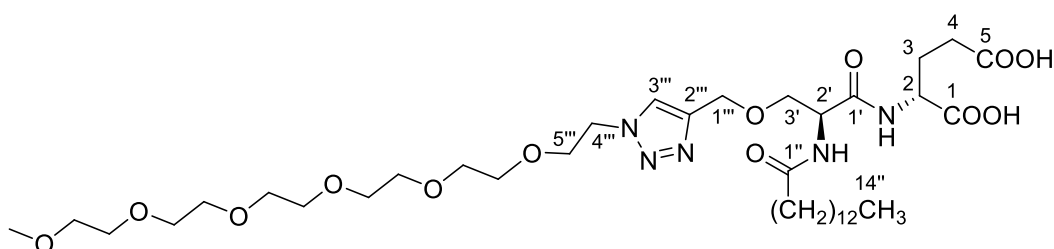
Dibenzylyl (*R*)-2-[(*S*)-2-tetradecanamido-3-[(1-(3,6,9,12,15,18-hexaoxonadecyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutarate (41a). The crude product was prepared according to the

general procedure I starting from **23c** (120 mg, 0.18 mmol) and **39** (54 mg, 0.17 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 99:1 to 97:3), the pure product (207 mg, 0.21 mmol, 85%) was obtained as a white wax. $R_f = 0.18$ (97:3 DCM/MeOH). **m.p.** 50-52 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ ppm 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.22-1.36 (m, 20H, H4''-H13''), 1.53-1.65 (m, 2H, H3''), 1.91-2.01 (m, 1H, H3a), 2.15-2.29 (m, 3H, H3b, H2''), 2.34-2.46 (m, 2H, H4), 3.33 (s, 3H, CH_3PEG), 3.49-3.53 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{PEG}$), 3.54-3.64 (m, 18H, $9\times\text{CH}_2\text{PEG}$), 3.64-3.70 (m, 1H, H3'a), 3.71-3.77 (m, 1H, H3'b), 3.85 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, H5'''), 4.49-4.63 (m, 6H, H2, H2', H1''', H4'''), 5.09 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.12 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 5.16 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 7.25-7.37 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.96 (s, 1H, H3'''). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ ppm 14.5 (C14''), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 27.6 (C3), 30.3-30.8 (8C, C4''-C11''), 31.0 (C4), 33.1 (C12''), 36.8 (C2''), 51.5 (C4'''), 53.1 (C2), 54.5 (C2'), 59.1 (CH_3PEG), 65.1 (C1'''), 67.4 (C5- OCH_2Ph), 68.0 (C1- OCH_2Ph), 70.2 (C3'), 70.8 ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{PEG}$), 71.3-71.5 ($9\times\text{CH}_2\text{PEG}$), 73.0 (C5'''), 125.9 (C3'''), 129.2-129.6 ($10\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 137.1, 137.5 ($2\times\text{C}_{\text{Ar}}^{\text{IV}}$), 145.4 (C2'''), 172.5 (C5), 174.0 (C1, C1''), 176.2 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 985 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1007 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{52}\text{H}_{82}\text{N}_5\text{O}_{13}$ 984.5909 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 984.5892.

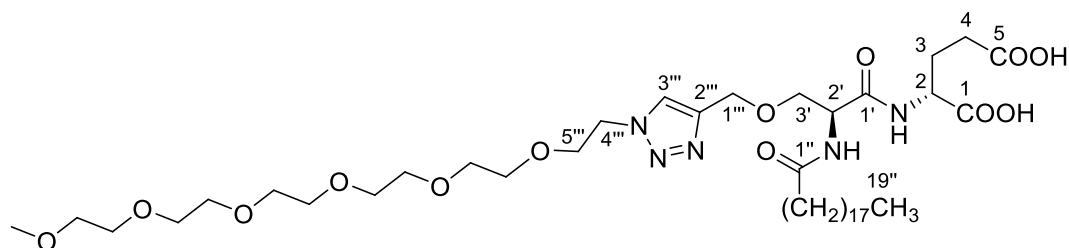


Dibenzy (R)-2-((S)-2-nonadecanamido-3-[(1-(3,6,9,12,15,18-hexaoxonadecyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido)glutarate (41b). The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23d** (72 mg, 0.10 mmol) and **39** (32 mg, 0.10 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 99:1 to 97:3), the pure product (91 mg, 0.09 mmol, 88%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.20$ (97:3 DCM/MeOH). **m.p.** 61-63 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.85 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H19''), 1.17-1.32 (m, 30H, H4''-H18''), 1.53-1.64 (m, 2H, H3''), 1.93-2.04 (m, 1H, H3a), 2.14-2.26 (m, 3H, H3b, H2''), 2.26-2.43 (m, 2H, H4), 3.33 (s, 3H, CH_3PEG), 3.48-3.52 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{PEG}$), 3.52-3.66 (m, 19H, $9\times\text{CH}_2\text{PEG}$, H3'a), 3.81 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, H5'''), 3.88-3.95 (m, 1H, H3'b), 4.46 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, H4'''), 4.53-4.69 (m, 4H, H2, H2', H1'''), 5.05 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.10 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, C1- OCH_2Ph), 5.13 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, C1-

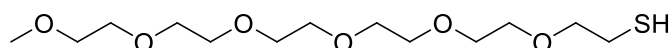
OCH₂Ph), 6.65 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, NH), 7.24-7.35 (m, 10H, CH_{Ar}), 7.42 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH), 7.71 (s, 1H, H3'''). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C19''), 22.7 (C18''), 25.5 (C3''), 26.9 (C3), 29.3-29.7 (13C, C4''-C16''), 30.0 (C4), 31.9 (C17''), 36.4 (C2''), 50.3 (C4'''), 51.9 (C2), 52.5 (C2'), 59.0 (CH₃PEG), 65.1 (C1'''), 66.4 (C5-OCH₂Ph), 67.2 (C1-OCH₂Ph), 70.2 (C3'), 70.8 (CH₃OCH₂PEG), 70.5-70.6 (9xCH₂PEG), 71.9 (C5'''), 123.8 (C3'''), 128.2-128.6 (10xCH_{Ar}), 135.3, 135.8 (2xC^{IV}_{Ar}), 144.1 (C2'''), 170.1 (C5), 171.2 (C1), 172.5 (C1''), 173.6 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 892 (100), 1077 (70) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₅₇H₉₂N₅O₁₃ 1054.6692 [M+H]⁺, found 1054.6696.



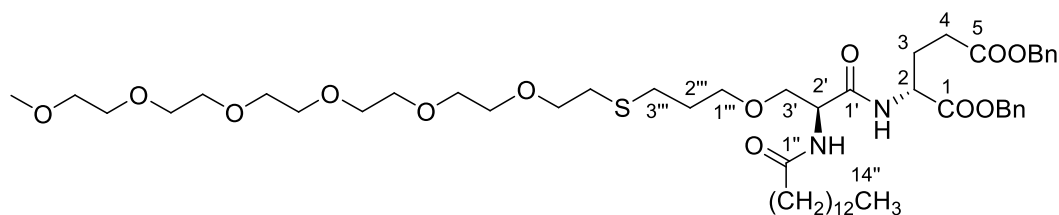
(R)-2-[(S)-2-Tetradecanamido-3-[(1-(3,6,9,12,15,18-hexaoxonadecyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutaric acid (42a). The pure product (white wax, 41 mg, 0.05 mmol, quantitative) was prepared according to the general procedure D starting from **41a** (50 mg, 0.05 mmol). **m.p.** 54-57 °C. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H14''), 1.23-1.37 (m, 20H, H4''-H13''), 1.55-1.66 (m, 2H, H3''), 1.88-1.98 (m, 1H, H3a), 2.13-2.22 (m, 1H, H3b), 2.23-2.39 (m, 4H, H2'', H4), 3.35 (s, 3H, CH₃PEG), 3.51-3.55 (m, 2H, CH₃OCH₂PEG), 3.56-3.66 (m, 18H, 9xCH₂PEG), 3.71 (dd, $J = 9.7, 5.2$ Hz, 1H, H3'a), 3.79 (dd, $J = 9.7, 5.4$ Hz, 1H, H3'b), 3.90 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H5'''), 4.40 (dd, $J = 8.1, 4.7$ Hz, 1H, H2), 4.55-4.67 (m, 5H, H2', H1''', H4'''), 8.03 (s, 1H, H3'''). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm 14.4 (C14''), 23.7 (C13''), 26.8 (C3''), 28.4 (C3), 30.4-30.8 (8C, C4''-C11''), 31.2 (C4), 33.1 (C12''), 36.8 (C2''), 51.4 (C4'''), 53.9 (C2), 54.7 (C2'), 59.1 (CH₃PEG), 65.1 (C1'''), 70.3 (C3'), 70.8 (CH₃OCH₂PEG), 71.1-71.3 (9xCH₂PEG), 72.8 (C5'''), 125.9 (C3'''), 145.5 (C2'''), 171.7 (C5, C1), 176.4 (C1'', C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 827 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₃₈H₇₀N₅O₁₃ 804.4970 [M+H]⁺, found 804.4975.



(R)-2-[(S)-2-Nonadecanamido-3-[(1-(3,6,9,12,15,18-hexaoxonadecyl)triazol-4-yl)methoxy]propanamido]glutaric acid (42b). The pure product (white solid, 58 mg, 0.07 mmol, 89%) was prepared according to the general procedure D starting from **41b** (79 mg, 0.07 mmol). **m.p.** 76-79 °C. **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H19''), 1.23-1.38 (m, 30H, H4''-H18''), 1.56-1.66 (m, 2H, H3''), 1.88-1.98 (m, 1H, H3a), 2.13-2.22 (m, 1H, H3b), 2.23-2.39 (m, 4H, H2'', H4), 3.35 (s, 3H, CH₃PEG), 3.50-3.55 (m, 2H, CH₃OCH₂PEG), 3.56-3.67 (m, 18H, 9xCH₂PEG), 3.71 (dd, $J = 9.6, 5.3$ Hz, 1H, H3'a), 3.79 (dd, $J = 9.6, 5.3$ Hz, 1H, H3'b), 3.90 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H5'''), 4.42 (dd, $J = 8.5, 4.8$ Hz, 1H, H2), 4.55-4.67 (m, 5H, H2', H1''', H4'''), 8.03 (s, 1H, H3'''). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.5 (C19''), 23.7 (C18''), 26.9 (C3''), 28.2 (C3), 30.4-30.9 (13C, C4''-C16''), 31.1 (C4), 33.1 (C17''), 36.8 (C2''), 51.4 (C4'''), 53.6 (C2), 54.6 (C2'), 59.1 (CH₃PEG), 65.1 (C1'''), 70.3 (C3'), 70.9 (CH₃OCH₂PEG), 71.2-71.4 (9xCH₂PEG), 72.9 (C5'''), 125.9 (C3'''), 145.4 (C2'''), 171.8 (C5), 175.1 (C1), 176.4 (C1''), 176.5 (C1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 231 (50), 897 (100) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₄₃H₈₀N₅O₁₃ 874.5753 [M+H]⁺, found 874.5761.

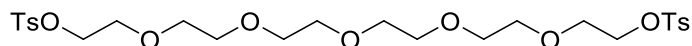


1-Mercapto-3,6,9,12,15,18-hexaoxonadecane (40). To a solution of the compound **38** (1.18 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous acetone (4 mL), was added thiourea (135 mg, 1.5 eq.). The reaction mixture was heated under reflux at 70 °C under argon atmosphere for 5 h. After evaporation, the solid residue was dissolved in water (2.7 mL). Na₂S₂O₅ (314 mg, 1.4 eq.) and DCM (5.5 mL) were added. This mixture was heated under reflux at 70 °C under argon atmosphere for 3 h. After cooling down to rt, 2 mL of brine were added and the reaction mixture was extracted with DCM (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was used directly for the next reaction.

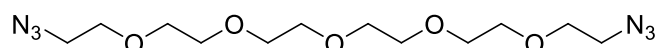


Dibenzy (R)-2-[(S)-2-tetradecanamido-3-[(1-(7,10,13,16,19,22-hexaoxa-4-thiotricosyl)]propanamido]glutarate (44). The crude product was prepared according to the general procedure H starting from **15c** (150 mg, 0.23 mmol) and **40** (160 mg, 0.54 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 99:1 to 98:2), the pure product (152 mg, 0.16 mmol, 68%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.11$ (98:2 DCM/MeOH). **m.p.** 43-45 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H14''), 1.14-1.34 (m, 20H, H4''-H13''), 1.53-1.65 (m, 2H, H3''), 1.74-1.85 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H, H2'''), 1.93-2.08 (m, 1H, H3a), 2.14-2.29 (m, 3H, H3b, H2''), 2.29-2.46 (m, 2H, H4), 2.50-2.62 (m, 2H, H3'''), 2.66 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{PEG}}$), 3.35 (s, 3H, CH_3PEG), 3.44 (dd, $J = 9.4, 6.9$ Hz, 1H, H3'a), 3.48-3.56 (m, 4H, H1''', $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{PEG}$), 3.56-3.66 (m, 20H, $10\times\text{CH}_2\text{PEG}$), 3.79 (dd, $J = 9.4, 4.1$ Hz, 1H, H3'b), 4.50-4.57 (m, 1H, H2), 4.60-4.67 (m, 1H, H2'), 5.07 (s, 2H, C5- OCH_2Ph), 5.13 (d, 2H, C1- OCH_2Ph), 6.36 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, NH), 7.13 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 7.26-7.37 (m, 10H, CH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.2 (C14''), 22.7 (C13''), 25.6 (C3''), 27.2 (C3), 29.2-30.0 (11C, C4''-C12'', C3'''), $\text{CH}_2\text{S}_{\text{PEG}}$, 31.5 (C2'''), 32.0 (C4), 36.6 (C2''), 51.8 (C2), 52.4 (C2'), 59.1 (CH_3PEG), 66.6 (C5- OCH_2Ph), 67.4 (C1- OCH_2Ph), 69.8-70.9 (12C, $11\times\text{CH}_2\text{PEG}$, C1'''), 72.0 (C3'), 128.3-128.7 ($10\times\text{CH}_{\text{Ar}}$), 135.2, 135.8 ($2\times\text{C}_{\text{Ar}}^{\text{IV}}$), 170.1 (C5), 171.2 (C1), 172.5 (C1''), 173.5 (C1').

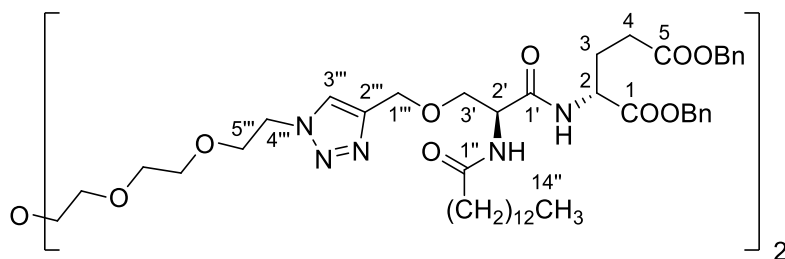
II.1.5. Synthesis of a dimeric detergent



1,17-Bis(*p*-toluenesulfonyloxy)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecane (46). 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecane-1,17-diol (296 mg, 1.05 mmol) was dissolved in THF (10,5 mL) and the solution was cooled to 0 °C. NaH (60% in mineral oil, 92 mg, 2.31 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min. Tosylchloride (440 mg, 2.31 mmol) was then added in portions and the mixture was stirred at 0 °C for 4 h. The reaction mixture was quenched with water (8 mL) and extracted with Et₂O (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the crude product as yellowish oil, which was used without further purification.

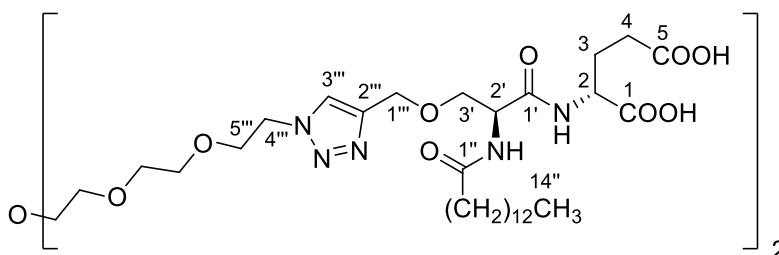


1,17-Diazido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecane (47). The compound **46** (620 mg, 1.05 mmol) was dissolved in water (1.0 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ was added until pH = 8. After adding NaN₃ (273 mg, 4.19 mmol), the solution was stirred and heated at 80 °C for 24 h, then diluted with brine (5 mL) and extracted with Et₂O (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to obtain the pure product as orange oil (261 mg, 0.79 mmol, 75%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.39 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, H1, H17), 3.62-3.71 (m, 20H, H2-H16). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 50.9 (C1, C17), 70.2-70.9 (C2-C16).



Compound 48. The crude product was prepared according to the general procedure I starting from **23c** (303 mg, 0.46 mmol) and **46** (76 mg, 0.23 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 99:1 to 97:3), the pure product (162 mg, 0.10 mmol, 43%) was obtained as a white wax. *R_f* = 0.15 (96:4 DCM/MeOH). ¹H NMR (500

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H, H14''), 1.18-1.34 (m, 40H, H4''-H13''), 1.53-1.67 (m, 4H, H3''), 1.94-2.08 (m, 2H, H3a), 2.13-2.29 (m, 6H, H3b, H2''), 2.29-2.51 (m, 4H, H4), 3.49-3.66 (m, 18H, H3'a, 8xCH₂PEG), 3.79-3.89 (m, 4H, H5'''), 3.87-4.06 (m, 2H, H3'b), 4.39-4.53 (m, 4H, H4'''), 4.53-4.79 (m, 8H, H2, H2', H1'''), 5.07 (s, 4H, C5-OCH₂Ph), 5.12 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H, C1-OCH₂Ph), 5.15 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H, C1-OCH₂Ph), 6.67 (bs, 2H, NH), 7.24-7.39 (m, 20H, CH_{Ar}), 7.45 (s, 2H, H3'''), 7.73 (bs, 2H, NH). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)** δ ppm 14.2 (2xC14''), 22.8 (2xC13''), 25.7 (2xC3''), 27.1 (2xC3), 29.4-29.8 (16C, 2xC4''-C11''), 30.1 (2xC4), 32.0 (2xC12''), 36.6 (2xC2''), 50.5 (2xC4'''), 52.0 (2xC2), 52.6 (2xC2'), 64.5 (2xC1'''), 66.6 (2xC5-OCH₂Ph), 67.3 (2xC1-OCH₂Ph), 69.4 (2xC3'), 69.6 (2xC5'''), 70.6 (8xCH₂PEG), 123.9 (2xC3'''), 128.3-128.7 (20xCH_{Ar}), 135.4, 135.9 (4xC^{IV}_{Ar}), 144.2 (2xC2'''), 170.2 (2xC5), 171.3 (2xC1), 172.6 (2xC1''), 173.7 (2xC1'). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 721 (30), 1072 (100), 1680 (75) [M+Na]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₉₀H₁₃₃N₁₀O₁₉ 1657.9748 [M+H]⁺, found 1657.9785.



Compound 49. The pure product (white solid, 107 mg, 0.08 mmol, 95%) was prepared according to the general procedure D starting from **48** (144 mg, 0.09 mmol). **m.p.** 74-76 °C. **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)** δ ppm 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H, H14''), 1.22-1.37 (m, 40H, H4''-H13''), 1.56-1.66 (m, 4H, H3''), 1.85-2.00 (m, 2H, H3a), 2.13-2.25 (m, 2H, H3b), 2.24-2.32 (m, 4H, H2''), 2.29-2.42 (m, 4H, H4), 3.53-3.66 (m, 16H, 8xCH₂PEG), 3.68-3.75 (m, 2H, H3'a), 3.75-3.83 (m, 2H, H3'b), 3.89 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H, H5'''), 4.37-4.51 (m, 2H, H2), 4.57 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H, H4'''), 4.59-4.69 (m, 6H, H2', H1'''), 8.04 (s, 2H, H3'''). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)** δ ppm 14.5 (2xC14''), 23.7 (2xC13''), 26.8 (2xC3''), 28.1 (2xC3), 29.3-29.7 (16C, 2xC4''-C11''), 31.1 (2xC4), 33.1 (2xC12''), 36.8 (2xC2''), 51.4 (2xC4'''), 52.2 (2xC2), 54.6 (2xC2'), 65.1 (2xC1'''), 70.3 (2xC3'), 70.9 (2xC5'''), 71.4-71.5 (8xCH₂PEG), 126.0 (2xC3'''), 145.4 (2xC2'''), 171.9 (2xC5), 174.9 (2xC1), 176.4 (2xC1''), 176.4 (2xC1'). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 647 (100) [M-2H]²⁻. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₆₂H₁₀₉N₁₀O₁₉ 1297.7870 [M+H]⁺, found 1297.7860.

II.2. Evaluation of synthesized detergents

II.2.1. Measurement of Critical Micellar Concentrations (CMC)

Solutions of detergents in the range from 0.1 μM to 10 mM were prepared in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and neutralized to this pH. Into 80 μL of each solution (in triplicate) was added the same volume of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) 10 μM (Sigma, D208000), which was prepared from a solution at 100 μM in THF by diluting 10 times with water. Above the CMC value, DPH is integrated into hydrophobic core of the micelle, causing an increase in DPH fluorescence.^[136] Fluorescence measurements were performed using a spectrofluorimeter Xenius SAFAS, the excitation wavelength was set at 358 nm and the fluorescence emission was registered at 430 nm.

II.2.2. Measurement of Hydrodynamic Radius (R_h) of Detergent Micelles by Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS was carried out as described in ref. ^[36]. Detergents were diluted to 2-30 mM, to be far above their CMC sonicated for 1 min (10 on/off cycles of 3 sec) and centrifuged for 1 h at 100,000xg prior to determination of the apparent dynamic radius on a Zetasizer NanoS apparatus (Malvern), measurements were repeated six times. The mean size distribution was generated as an intensity distribution then converted to a volume distribution and a number distribution using the DTS software v5.0.

II.2.3. UV-visible absorption measurement

Solutions of detergents were prepared at concentrations indicated in **Figure 46** (page 103), in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and neutralized to this pH. Absorption spectra were recorded from 200 nm to 550 nm using a spectrofluorimeter Xenius SAFAS.

III.2.4. Mg^{2+} chelating assay

Solutions of detergents were prepared at concentrations indicated in **Figure 47** (page 105), in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and neutralized to this pH. A concentrated MgCl_2 solution was then added to 5 mM and 10 mM. The turbidity of resulting solutions at 0, 5 and 10 mM of MgCl_2 was evaluated by measuring absorbance at 600 nm using a spectrofluorimeter Xenius SAFAS.

IV.2.5. Protein extraction assay

E. coli C41DE3 was used as overexpression system for either BmrA or AcrB. The membrane fractions containing BmrA or AcrB were prepared according to previously reported procedures.^[36,142] The proteins were diluted at 2 g/L in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 15% glycerol and antiproteases (Roche, one tablet/100 mL). Detergents were used at 10 g/L (otherwise as indicated). The whole mixture (total, T) was incubated 2 h at 4 °C then centrifugated 1 h at 4 °C at 100000xg to separate the extracted fraction (supernatant, S) from unextracted fraction (pellet, P). The supernatant was loaded on a 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue after migration.

IV.2.6. ATPase activity assays

The membrane fraction containing BmrA was diluted at 2 g/L in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 15% glycerol, added of one tablet of antiproteases (Roche) per 100 mL of solution. Detergents were then added at the indicated concentrations. The whole mixture (total, T) was incubated 2 h at 4 °C then ATPase activity was measured using the coupled-enzymes assay.^[152] The mixture was centrifuged 1 h at 4 °C at 100000xg to separate the extracted fraction (supernatant, S) from the unextracted one. The supernatant was loaded on a 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue after migration.

IV.2.7. BmrA purification and stability of purified BmrA in solution

All the experiments and buffers were carried out and kept at 4 °C. BmrA was overexpressed in the plasma membrane of *E. coli* C41DE3. The membrane fraction containing BmrA was prepared according to previously reported procedure.^[117] Twenty milligrams of this membrane fraction were diluted at 4 °C at 1 g/L in 100 mM NaPi, pH 8.0, 15% glycerol, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM DTT, freshly added of antiproteases (Roche, one tablet/50 mL) and benzonase (Sigma, 30 U/mL). After adding 1% DDM (20 mM), the membrane proteins were extracted during 1 h at 4 °C. The solution was centrifuged 1 h, 4 °C at 100,000xg (Optima XPN-80, 50.2Ti). The supernatant was loaded at 2 mL/min on a 5-mL Ni-NTA column (GE healthcare, HiTrap chelating HP) equilibrated with buffer A – 100 mM NaPi pH 8.0, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.05% DDM (1 mM, 5xCMC). The resin was washed firstly with 25 mL buffer A, then a second time with 25 mL buffer B (=A with 500 mM NaCl and 15 mM imidazole), and finally a third time with 20 mL of buffer A. BmrA was eluted with a 10-mL gradient of buffers A and C – 100 mM NaPi, 10% glycerol, 100 mM

NaCl, 250 mM imidazole, 0.05% DDM (1 mM, 5xCMC). Fractions were collected at 3 mL/min with a volume of 1 mL per fraction. The pool of the peak (3 mL) was dialyzed (cut-off 12-14000 daltons) against 400 mL buffer D (50 mM Hepes-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 0.05% DDM (1 mM, 5xCMC) for 2.5 h and then against 600 mL in the same conditions during 1 night. The protein content (0.8 g/L) was quantified by bicinchoninic acid assay.^[200] The solution was ¼ diluted with buffer A without imidazole and DDM. The final concentration of BmrA was 1.5 µM and that of DDM was 0.3 mM (free) and 0.6 mM (BmrA-bound, taking into account that 400 mol DDM are forming the detergent belt around BmrA binds^[117]). To each aliquot was added 10% of the total amount of DDM (0.09 mM) of either DDM, FA3 or **6c**. Samples were incubated 4 h at 4 °C and then diluted with 300% DDM (2.7 mM, final [DDM] = 2.8 mM). Samples were finally stored at 18 °C for 40 days, withdrawing at the indicated times an aliquot to measure (duplicates) the remaining Vanadate-sensible ATPase activity.^[152]

IV.2.8. Thermostability assay on solubilized MPs

The method is based on ref. ^[201]. Membranes of BmrA (2g/L total protein content) were solubilized with 0.5% (~10 mM) DDM and with or without 1 mM of **8b** (~1xCMC) in a final volume of 2 mL, for 2 h at 4 °C. Then solubilized fractions were clarified by centrifugation at 100,000xg for 1 h at 4 °C. Supernatants were 50-µl aliquoted individually submitted 30 min to a temperature of 25 to 72 °C using a PCR thermal cycler (PeqSTAR 2x gradient; Peqlab). Samples were then centrifuged 40 min at 20,000gx and supernatants were analyzed by SDS-PAGE and Western-blot using anti-His antibody. The relative intensity of the target MP at each temperature was quantified on Western-blot using Image Lab software 4.1 from Bio-Rad. Each condition was performed twice. Intensity was plotted as a function of the temperature and normalized. Data were fitted with a sigmoidal equation (3 parameters) using Sigmaplot v12. For A_{2A}R, the same protocol was applied, using a membrane fraction from Sf9-infected insect cells^[202,203] with exception that DDM concentration was 0.1%, with or without 5 mM Cholesterol hemisuccinate (CHS). A specific A_{2A}R antibody was used instead of anti-His.

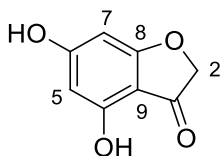
IV.2.9. Crystallogensis of BmrA

The *E. coli* membrane fraction enriched with BmrA was thawed and diluted at 5 g/L with 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 15% glycerol, antiproteases (Roche, one tablet/50 mL) and

4.5% Triton X-100. After incubation of 1.5 h at 4 °C under mild rotation, the solution was centrifuged at 100000xg, for 1 h at 4 °C. The clarified supernatant was loaded at 2 mL/min onto a Ni-NTA 5-mL resin (Generon) previously washed twice with 5 column-volumes of water and the equilibrated with 5 volumes of 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 15% glycerol, 4.5% Triton X-100 and 20 mM imidazole. Once the protein was loaded, the resin was then washed with 10 column volumes with 20 mM Hepes pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.0675% DDM and 0.04% cholate. The protein was eluted by adding 20 mL of 20 mM Hepes pH 8.0, 100 mM NaCl, 200 mM imidazole, 0.0675% DDM and 0.04% cholate. The pool corresponding to the elution peak was 10x diluted in 20 mM Hepes pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.0675% DDM and 0.04% cholate, and then loaded on the same affinity resin. The second pool was then concentrated up to 500 µL on regenerated cellulose filters (Amicon, 50kDa MWCO, 1500xg) and loaded on a Superdex 200 10-300 equilibrated with 25 mL of 20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.03% cholate and 0.035% DDM. Proteins were collected, pooled and then concentrated as described to above 10 mg/mL, and immediately used for crystallogensis. Incubation with ATP-Mg (buffered to pH 7.0) at 5 mM final concentration and BmrA at 10 mg/ml final was carried out on ice for 30 min before setting up drops. Crystallogensis was performed on the crystallogensis facility at IBCP, at 19 °C using a mosquito nanopipettor (TTP Labtech) and the hanging drop method. Protein and crystallization mix were mixed equally (500 nl + 500 nl), the best crystals appearing between 23 to 25% PEG 1000, 0.1 M Tris pH 8.5. DCODs were added as additives, prepared in water at 10xCMC, and added as 10% of the precipitant volume (50 nl). Plates were kept at 19 °C and imaged using a Forumatrix imager; crystals appeared after 3-4 days and continued to grow for a few more days. Crystals were then harvested, cryoprotected in 30% PEG 1000 and flash cooled in liquid nitrogen. Data were collected at SOLEIL synchrotron on beamlines PX1 and PX2. Data were processed with XDS^[204] and Aimless.^[205]

III. Synthesis of 2-indolylmethylenbenzofuran-3(2H)-ones

III.1. Synthesis of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one



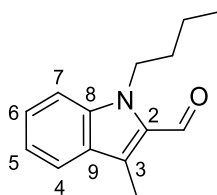
4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (51) was prepared according to ref. ^[189]. To a solution of phloroglucinol (15.0 g, 119 mmol) in diethyl ether (250 mL) at 0 °C were added chloroacetonitrile (7.5 mL, 119 mmol) and dried zinc chloride (1.62 g, 11.9 mmol). The mixture was allowed to react with gaseous hydrochloric acid at 0 °C for 1 h. The resulting suspension was stirred at 0 °C for 1.5 h, and was allowed to react again with gaseous HCl for 30 min. The precipitate was filtered, washed with ether, dried and suspended in water (200 mL). The solution was refluxed for 5 h. After cooling, the crystals were filtered, washed with cold water and dried to afford the desired product (16.6 g, 100 mmol, 84%) as orange crystals, which were analytically pure and used without further purification. NMR spectra were in accordance with ref. ^[189].

III.2. Synthesis of *N*-alkyl-indole carboxaldehydes

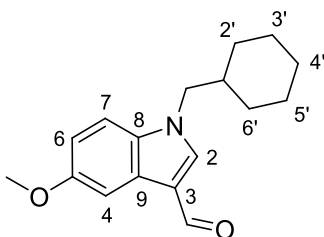
General procedure ^[189]

To a suspension of NaH 60% in oil (2.25 equiv.) in dry DMF (0.8 mL/mmol) was added, at 0 °C and under nitrogen atmosphere, a solution of indole carboxaldehyde (1 equiv.) in dry DMF (2.5 mL/mmol). After stirring for 30 min at rt, alkyl halide (1.0 to 3.0 equiv.) was slowly added. After stirring overnight, the reaction was quenched by addition of water and the product was extracted with diethyl ether. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered

off and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel.

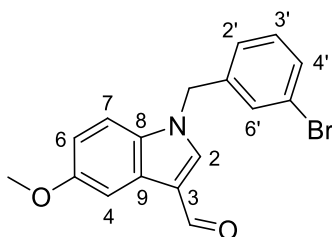


N-Butyl-3-methylindole-2-carboxaldehyde (52a). The crude product was prepared according to the general procedure starting from 3-methylindole-2-carboxaldehyde (199 mg, 1.25 mmol) and bromobutane (377 mg, 2.75 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 98:2 to 96:4), the pure product (120 mg, 0.56 mmol, 44%) was obtained as a yellow oil. $R_f = 0.17$ (95:5 cyclohexane/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.29-1.40 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.67-1.77 (m, 2H, N- CH_2CH_2), 2.62 (s, 3H, C3- CH_3), 4.50 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, N- CH_2), 7.13 (ddd, $J = 8.0, 6.8, 1.1$ Hz, 1H, H5), 7.33 (dd, $J = 8.5, 1.1$ Hz, 1H, H7), 7.39 (ddd, $J = 8.5, 6.8, 1.0$ Hz, 1H, H6), 7.68 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, H4), 10.14 (s, 1H, $\text{CH}=\text{O}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.7 (CH_2CH_3), 14.0 (CH_2CH_3), 20.3 (N- CH_2CH_2), 32.9 (C3- CH_3), 44.6 (N- CH_2), 110.6 (C7), 120.1 (C5), 121.5 (C4), 126.8 (C3), 127.1 (C9), 127.3 (C6), 130.9 (C2), 139.3 (C8), 181.3 ($\text{CH}=\text{O}$). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 216 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}$ 216.1388 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 216.1388.

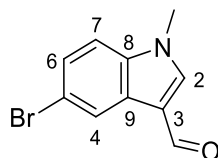


N-(Cyclohexylmethyl)-5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (52b). The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (240 mg, 1.37 mmol) and bromomethylcyclohexane (487 mg, 2.75 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3), the pure product (344 mg, 1.27 mmol, 93%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.39$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 69-71 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.92-1.04 (m, 2H, H2'a, H6'a), 1.10-1.24 (m, 3H, H3'a, H4'a, H5'a), 1.56-1.76 (m, 5H, H2'b, H3'b, H4'b, H5'b, H6'b), 1.78-1.90 (m, 1H, H1'), 3.87 (s, 3H, O- CH_3), 3.92 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, N- CH_2), 6.93 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H,

H6), 7.22 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H7), 7.58 (s, 1H, H2), 7.77 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H4), 9.92 (s, 1H, CH=O). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.8 (C4'), 26.3 (C3', C5'), 31.1 (C2', C6'), 38.6 (C1'), 54.2 (N-CH₂), 56.0 (O-CH₃), 103.5 (C4), 111.4 (C7), 114.6 (C6), 117.8 (C3), 126.3 (C9), 132.6 (C8), 139.2 (C2), 156.8 (C5), 184.6 (CH=O). LRMS (ESI+) m/z (%) 294 (20) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 272 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS (ESI+) m/z calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_2$ 272.1651 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 272.1654.

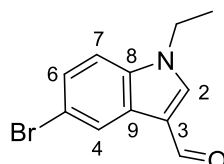


***N*-(3-Bromobenzyl)-5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (52c)**. The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (100 mg, 0.57 mmol) and 3-bromobenzyl bromide (285 mg, 1.14 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3), the pure product (133 mg, 0.39 mmol, 68%) was obtained as a yellow oil. $R_f = 0.32$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.84 (s, 3H, O-CH₃), 5.22 (s, 2H, N-CH₂), 6.89 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H6), 6.99-7.03 (m, 1H, H6'), 7.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H7), 7.15 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 1H, H5'), 7.28 (dd, $J = 1.6, 1.6$ Hz, 1H, H2'), 7.38-7.42 (m, 1H, H4'), 7.61 (s, 1H, H2), 7.78 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H4), 9.91 (s, 1H, CH=O). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 50.5 (O-CH₃), 55.9 (N-CH₂), 103.6 (C4), 111.3 (C7), 114.9 (C6), 118.5 (C3), 123.3 (C1'), 125.7 (C6'), 126.4 (C9), 130.2 (C2'), 130.8 (C5'), 131.6 (C4'), 132.2 (C3'), 137.9 (C2), 138.7 (C8), 156.9 (C5), 184.7 (CH=O). LRMS (ESI+) m/z (%) 346 (100) $[\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}]^+$, 344 (100) $[\text{M}(^{79}\text{Br})+\text{H}]^+$. HRMS (ESI+) m/z calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BrNO}_2$ 344.0286 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 344.0278.

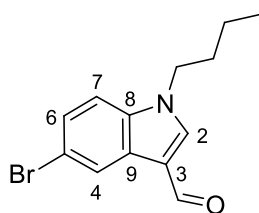


***N*-Methyl-5-bromoindole-3-carboxaldehyde (52d)**. The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-bromoindole-3-carboxaldehyde (100 mg, 0.45 mmol) and iodomethane (127 mg, 0.89 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 6:4 to 5:5), the pure product (86 mg, 0.36 mmol, 81%) was obtained as a yellowish solid. $R_f = 0.31$ (5:5 cyclohexane/EtOAc). **m.p.**

131-134 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.83 (s, 3H, CH_3), 7.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H7), 7.40 (dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, 1H, H6), 7.62 (s, 1H, H2), 8.42 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H4), 9.91 (s, 1H, $\text{CH}=\text{O}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 34.1 (CH_3), 111.5 (C7), 116.9 (C9), 117.7 (C3), 124.9 (C4), 126.9 (C6), 127.2 (C5), 136.7 (C8), 139.8 (C2), 184.3 ($\text{CH}=\text{O}$). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 240 (100) [$\text{M}^{(81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 238 [$\text{M}^{(79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$ (95). **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrNO}$ 237.9868 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, found 237.9862.

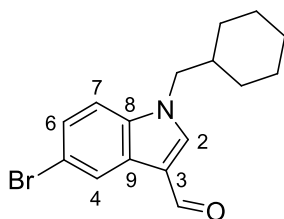


N-Ethyl-5-bromoindole-3-carboxaldehyde (52e). The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-bromoindole-3-carboxaldehyde (100 mg, 0.45 mmol) and bromoethane (97 mg, 0.89 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3), the pure product (96 mg, 0.38 mmol, 85%) was obtained as a yellowish powder. $R_f = 0.13$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 113-115 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.49 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 4.13 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H7), 7.32 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H, H6), 7.64 (s, 1H, H2), 8.37 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H4), 9.84 (s, 1H, $\text{CH}=\text{O}$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.0 (CH_3), 42.2 (CH_2), 111.6 (C7), 116.5 (C9), 117.5 (C3), 124.7 (C4), 126.9 (C6), 126.9 (C5), 135.7 (C8), 138.2 (C2), 184.3 ($\text{CH}=\text{O}$). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 254 (95) [$\text{M}^{(81}\text{Br})+\text{H}$] $^+$, 252 (100) [$\text{M}^{(79}\text{Br})+\text{H}$] $^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrNO}$ 252.0024 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, found 252.0018.

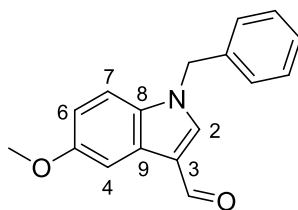


N-Butyl-5-bromoindole-3-carboxaldehyde (52f). The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-bromoindole-3-carboxaldehyde (307 mg, 1.37 mmol) and bromobutane (377 mg, 2.75 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 7:3), the pure product (358 mg, 1.28 mmol, 93%) was obtained as a yellow oil. $R_f = 0.21$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.21-1.38 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.74-1.84 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2$),

4.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, N-CH₂), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H7), 7.31 (dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, 1H, H6), 7.61 (s, 1H, H2), 8.37 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H4), 9.84 (s, 1H, CH=O). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 13.7 (CH₂CH₃), 20.1 (CH₂CH₃), 31.8 (N-CH₂CH₂), 47.3 (N-CH₂), 111.7 (C7), 116.4 (C9), 117.4 (C3), 124.7 (C4), 126.9 (C6), 126.9 (C5), 135.9 (C8), 139.0 (C2), 184.3 (CH=O). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 304 (10), 302 (10), 282 (100) [M(⁸¹Br)+H]⁺, 280 (95) [M(⁷⁹Br)+H]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₁₃H₁₅BrNO 280.0337 [M+H]⁺, found 280.0338.

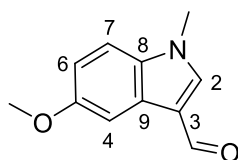


***N*-(Cyclohexylmethyl)-5-bromoindole-3-carboxaldehyde (52g)**. The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-bromoindole-3-carboxaldehyde (200 mg, 0.90 mmol) and bromomethylcyclohexane (316 mg, 1.80 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 8:2), the pure product (186 mg, 0.58 mmol, 65%) was obtained as a yellowish crystal. $R_f = 0.37$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 89-92 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 0.89-1.03 (m, 2H, H2'a, H6'a), 1.05-1.23 (m, 3H, H3'a, H4'a, H5'a), 1.53-1.76 (m, 5H, H2'b, H3'b, H4'b, H5'b, H6'b), 1.76-1.89 (m, 1H, H1'), 3.92 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, N-CH₂), 7.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H7), 7.35 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H, H6), 7.60 (s, 1H, H2), 8.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H4), 9.90 (s, 1H, CH=O). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 25.7 (C3'', C5''), 26.2 (C4''), 31.0 (C2'', C6''), 38.5 (C1''), 54.0 (N-CH₂), 112.0 (C7), 116.5 (C9), 117.3 (C3), 124.8 (C4), 126.9 (C5), 127.0 (C6), 136.3 (C8), 139.6 (C2), 184.4 (CH=O). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 344 (20), 322 (95) [M(⁸¹Br)+H]⁺, 320 (100) [M(⁷⁹Br)+H]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₁₆H₁₉BrNO 320.0650 [M+H]⁺, found 320.0663.

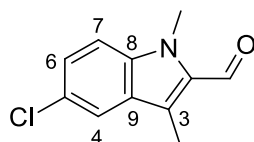


***N*-Benzyl-5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (52t)**. The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (100 mg,

0.57 mmol) and benzyl bromide (195 mg, 1.14 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (123 mg, 0.46 mmol, 81%) was obtained as yellowish oil. $R_f = 0.32$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.85 (s, 3H, O-CH₃), 5.26 (s, 2H, N-CH₂), 6.90 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H₆), 7.11-7.16 (m, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H₇), 7.28-7.35 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}), 7.61 (s, 1H, H₂), 7.80 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H₄), 9.91 (s, 1H, CH=O). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 51.2 (O-CH₃), 55.9 (N-CH₂), 103.6 (C₄), 111.4 (C₇), 114.7 (C₆), 118.4 (C₃), 126.4 (C₉), 127.3 (C_{2'}, C_{6'}), 128.5 (C_{4'}), 129.2 (C_{3'}, C_{5'}), 132.5 (C_{1'}), 135.5 (C₂), 138.8 (C₈), 156.9 (C₅), 184.7 (CH=O). LRMS (ESI+) m/z (%) 266 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS (ESI+) m/z calc. for C₁₇H₁₆NO₂ 266.1181 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 266.1191.

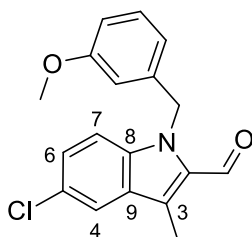


***N*-Methyl-5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (52u).** The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-methoxyindole-3-carboxaldehyde (100 mg, 0.57 mmol) and iodomethane (51 mg, 1.28 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (113 mg, 0.60 mmol, quantitative) was obtained as yellowish oil. $R_f = 0.23$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 130-133 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.75 (s, 3H, N-CH₃), 3.85 (s, 3H, O-CH₃), 6.92 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H₆), 7.17 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H₇), 7.53 (s, 1H, H₂), 7.74 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H₄), 9.85 (s, 1H, CH=O). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 33.9 (N-CH₃), 55.9 (O-CH₃), 103.5 (C₄), 110.9 (C₇), 114.5 (C₆), 117.9 (C₃), 126.1 (C₉), 132.9 (C₈), 139.6 (C₂), 156.8 (C₅), 184.4 (CH=O). LRMS (ESI+) m/z (%) 190 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 212 (30) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI+) m/z calc. for C₁₁H₁₂NO₂ 190.0868 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 190.0873.

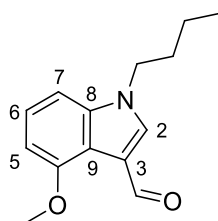


***N*-Methyl-3-methyl-5-chloroindole-2-carboxaldehyde (52v).** The crude product was prepared according to the general procedure starting from 3-methyl-5-chloroindole-2-carboxaldehyde (200 mg, 1.03 mmol) and iodomethane (294 mg, 2.07 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1), the pure product (128 mg, 0.62 mmol, 60%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.41$ (9:1

cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 138-139 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 2.54 (s, 3H, C3- CH_3), 3.97 (s, 3H, N- CH_3), 7.20 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H7), 7.30 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, H6), 7.60 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H4), 10.11 (s, 1H, CH=O). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.6 (C3- CH_3), 31.9 (N- CH_3), 111.5 (C7), 120.6 (C4), 125.4 (C3), 126.0 (C9), 127.8 (C6), 127.8 (C5), 132.1 (C2), 138.1 (C8), 181.7 (CH=O). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 208 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NOCl}$ 208.0529 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 208.0531.

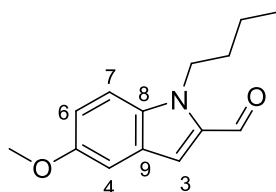


***N*-(3-Methoxybenzyl)-3-methyl-5-chloroindole-2-carboxaldehyde (52w).** The crude product was prepared according to the general procedure starting from 3-methyl-5-chloroindole-2-carboxaldehyde (200 mg, 1.03 mmol) and 3-methoxybenzyl bromide (416 mg, 2.07 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 97:3), the pure product (187 mg, 0.60 mmol, 58%) was obtained as a white solid. $R_f = 0.22$ (97:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 131-134 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 2.61 (s, 3H, C3- CH_3), 3.70 (s, 3H, O- CH_3), 5.73 (s, 2H, N- CH_2), 6.55 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H2'), 6.60 (ddd, $J = 7.9, 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H4'), 6.72 (ddd, $J = 7.9, 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H6'), 7.14 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 1H, H5'), 7.23 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H7), 7.29 (dd, $J = 8.9, 1.9$ Hz, 1H, H6), 7.66 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H4), 10.14 (s, 1H, CH=O). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.8 (C3- CH_3), 48.1 (N- CH_2), 55.4 (O- CH_3), 112.3 (C7), 112.5 (C6'), 112.7 (C2'), 118.9 (C4'), 120.8 (C4), 126.4 (C3), 126.4 (C9), 128.2 (C6), 128.3 (C1'), 129.9 (C5'), 131.7 (C5), 138.0 (C2), 139.6 (C8), 160.1 (C3'), 181.6 (CH=O). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 210 (55), 314 (50) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 336 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 353 (90), 381 (87). **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{Cl}$ 314.0948 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 314.0946.

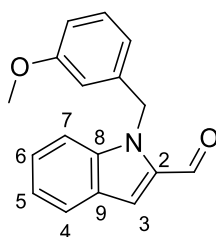


***N*-Butyl-4-methoxyindole-3-carboxaldehyde (52x).** The crude product was prepared according to the general procedure starting from 4-methoxyindole-3-carboxaldehyde (30 mg,

0.17 mmol) and bromobutane (46 mg, 0.34 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 8:2), the pure product (80 mg, 0.35 mmol, 86%) was obtained as a yellow oil. $R_f = 0.34$ (8:2 cyclohexane/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.26-1.37 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.77-1.86 (m, 2H, N- CH_2CH_2), 3.97 (s, 3H, O- CH_3), 4.10 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, N- CH_2), 6.69 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H5), 6.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H7), 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H6), 7.81 (s, 1H, H2), 10.42 (s, 1H, CH=O). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.7 (CH_2CH_3), 20.1 (CH_2CH_3), 31.9 (N- CH_2CH_2), 47.3 (N- CH_2), 55.5 (O- CH_3), 102.5 (C5), 103.9 (C7), 117.1 (C9), 118.2 (C3), 123.8 (C6), 131.4 (C2), 138.3 (C8), 154.9 (C4), 188.1 (CH=O). LRMS (ESI+) m/z (%) 232 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 254 (65) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI+) m/z calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_2$ 232.1338 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 232.1340.



N-Butyl-5-methoxyindole-2-carboxaldehyde (52y). The crude product was prepared according to the general procedure starting from 5-methoxyindole-2-carboxaldehyde (100 mg, 0.57 mmol) and bromobutane (156 mg, 1.14 mmol). After the extraction step, the crude product was used immediately for the synthesis of the corresponding aurone derivative without further purification.

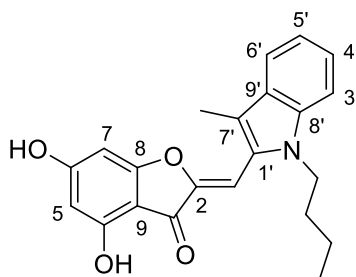


N-(3-Methoxybenzyl)indole-2-carboxaldehyde (52z). The crude product was prepared according to the general procedure starting from indole-2-carboxaldehyde (100 mg, 0.69 mmol) and 3-methoxybenzyl bromide (277 mg, 1.38 mmol). After the extraction step, the crude product was used immediately for the synthesis of the corresponding aurone derivative without further purification.

III.3. Synthesis of 2-indolylmethylene-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-ones

General procedure ^[189]

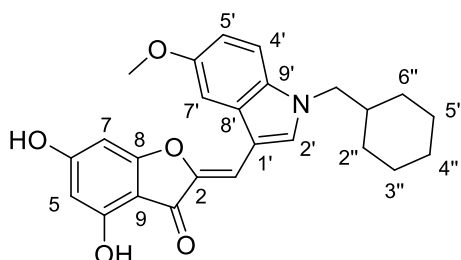
To a solution of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **1** in ethanol (3 mL/mmol) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1.0 to 3.5 equiv.). The solution was refluxed until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 5 hours). After cooling, ethanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water (50 mL/mmol) and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust the pH to 2 – 3. The mixture was then extracted with ethyl acetate or dichloromethane. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered off and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude 2-indolylmethylene-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one derivative.



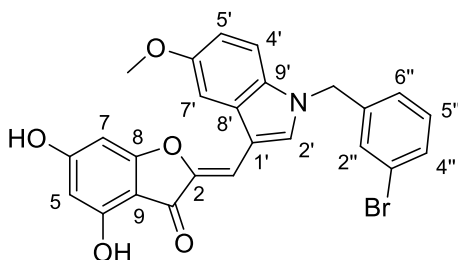
(Z)-2-(N-Butyl-3-methylindol-2-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (**53a**).

The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (60 mg, 0.36 mmol) and aldehyde **52a** (100 mg, 0.46 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 5:5) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (61 mg, 0.17 mmol, 47%) was obtained as a red powder. $R_f = 0.18$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** 197-199 °C. ¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ ppm 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.26-1.38 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.69-1.78 (m, 2H, N-CH₂CH₂), 2.42 (s, 3H, C7'-CH₃), 4.31 (t, $J = 7.3$ Hz, N-CH₂), 6.17 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H7), 6.30 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H5), 6.83 (s, 1H, -CH=), 7.07 (ddd, $J = 8.3, 7.1, 0.7$ Hz, 1H, H5'), 7.23 (ddd, $J = 8.0, 7.1, 1.0$ Hz, 1H, H4'), 7.44 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1H, H6'), 7.60 (dd, $J = 8.0, 0.7$ Hz, 1H, H3'), 9.26 (bs, 1H, OH), 9.88 (bs, 1H, OH). ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-*d*₆) δ ppm 10.7 (CH₂CH₃), 14.1 (CH₂CH₃), 20.8 (N-CH₂CH₂), 33.3 (C7'-CH₃), 44.4 (N-CH₂), 92.1 (C5), 98.7 (C7), 100.1 (-CH=), 104.4 (C9), 110.6 (C6'), 115.5 (C7'), 120.1, 120.1 (C3', C5'), 124.1 (C4'), 129.4, 129.5 (C1', C9'), 139.0 (C8'), 148.4 (C2), 159.0 (C8), 168.4 (C4), 168.6 (C6),

180.7 (C3). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 364 (100) $[M+H]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{22}H_{22}NO_4$ 364.1549 $[M+H]^+$, found 364.1537.

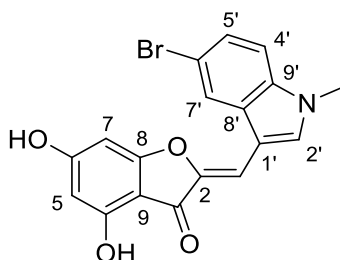


(Z)-2-[N-(Cyclohexylmethyl)-5-methoxyindol-3-ylmethylene]-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53b). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (60 mg, 0.36 mmol) and aldehyde **52b** (125 mg, 0.46 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 4:6) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (36 mg, 0.09 mmol, 24%) was obtained as a red powder. R_f = 0.13 (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** 188-191 °C. 1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 1.02-1.16 (m, 2H, H2''a, H6''a), 1.16-1.26 (m, 3H, H3''a, H4''a, H5''a), 1.58-1.76 (m, 5H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.87-2.02 (m, 1H, H1''), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 4.14 (d, J = 7.3 Hz, 2H, N-CH₂), 6.12 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H7), 6.34 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H5), 6.90 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H, H5'), 7.09 (s, 1H, -CH=), 7.45 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H4'), 7.59 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H7'), 8.07 (s, 1H, H2'), 8.88 (bs, 1H, OH), 9.70 (bs, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 26.4 (C3'', C5''), 27.0 (C4''), 31.4 (C2'', C6''), 39.5 (C1''), 53.8 (N-CH₂), 56.0 (O-CH₃), 91.9 (C5), 98.1 (C7), 101.6 (C7'), 105.0 (-CH=), 105.2 (C9), 108.6 (C8'), 112.4 (C4'), 113.9 (C5'), 129.4 (C1'), 132.8 (C9'), 134.9 (C2'), 146.0 (C2), 156.5 (C6'), 158.5 (C8), 167.2 (C4), 167.7 (C6), 181.2 (C3). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 420 (100) $[M+H]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $C_{25}H_{26}NO_5$ 420.1811 $[M+H]^+$, found 420.1803.



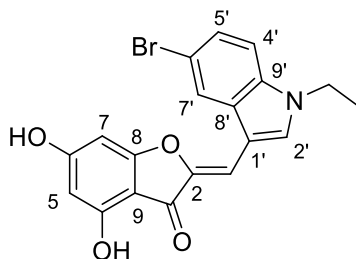
(Z)-2-[N-(3-Bromobenzyl)-5-methoxyindol-3-ylmethylene]-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53c). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (25 mg, 0.15 mmol) and aldehyde **52c** (104 mg, 0.30 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 5:5) and recrystallization in

acetonitrile, the pure product (24 mg, 0.05 mmol, 32%) was obtained as an orange powder. $R_f = 0.16$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 270°C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.83 (s, 3H, O-CH₃), 5.54 (s, 2H, N-CH₂), 6.06 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H7), 6.21 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H5), 6.84 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 7.02 (s, 1H, -CH=), 7.17-7.23 (m, 1H, H6''), 7.29 (dd, $J = 8.1, 8.1$ Hz, 1H, H5''), 7.39 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H4'), 7.45-7.50 (m, 2H, H2'', H4''), 7.56 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H7'), 8.24 (s, 1H, H2'), 10.72 (bs, 1H, OH), 10.72 (bs, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 48.9 (N-CH₂), 55.4 (O-CH₃), 90.3 (C5), 97.5 (C7), 101.1 (C7'), 102.4 (-CH=), 103.7 (C9), 107.9 (C8'), 111.7 (C4'), 112.9 (C5'), 121.8 (C1''), 126.0 (C6''), 128.1 (C1'), 129.7 (C9'), 130.4, 130.8, 130.9 (C2'', C4'', C5''), 133.4 (C2'), 140.4 (C3''), 145.2 (C2), 154.9 (C6'), 157.9 (C8), 166.4 (C4), 166.9 (C6), 178.3 (C3). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 492 (80) [M(^{81}Br)-H]⁻, 490 (70) [M(^{79}Br)-H]⁻, 255 (85), 239 (70), 157 (100). **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₂₅H₁₇BrNO₅ 490.0290 [M-H]⁻, found 490.0294.



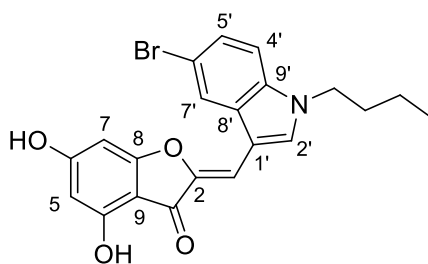
(Z)-2-(N-Methyl-5-bromoindol-3-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one

(53d). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (37 mg, 0.22 mmol) and aldehyde **52d** (105 mg, 0.44 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 5:5) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (35 mg, 0.09 mmol, 41%) was obtained as an orange powder. $R_f = 0.16$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 300°C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 3.99 (s, 3H, N-CH₃), 6.13 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H7), 6.34 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H5), 7.04 (s, 1H, -CH=), 7.41 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 1H, H5'), 7.49 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H4'), 8.14 (s, 1H, H2'), 8.24 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7'), 8.92 (bs, 1H, OH), 9.72 (bs, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 33.8 (N-CH₃), 91.9 (C5), 98.3 (C7), 103.6 (-CH=), 105.1 (C9), 108.5 (C8'), 113.0 (C4'), 114.9 (C6'), 122.7 (C7'), 126.2 (C5'), 130.2 (C1'), 136.1 (C2'), 136.9 (C9'), 146.7 (C2), 158.6 (C8), 167.4, 167.4 (C4, C6), 181.1 (C3). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 386 (95) [M(^{81}Br)-H]⁻, 384 (100) [M(^{79}Br)-H]⁻. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₁₈H₁₁BrNO₄ 383.9871 [M-H]⁻, found 383.9870.



(Z)-2-(N-Ethyl-5-bromoindol-3-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53e).

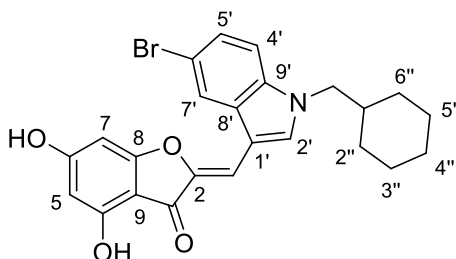
The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (27 mg, 0.16 mmol) and aldehyde **52e** (83 mg, 0.33 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 5:5) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (21 mg, 0.05 mmol, 33%) was obtained as an orange powder. R_f = 0.15 (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 270 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 1.52 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 4.40 (q, J = 7.3 Hz, 2H, N-CH₂), 6.13 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H7), 6.35 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H5), 7.04 (s, 1H, -CH=), 7.40 (dd, J = 8.7, 1.9 Hz, 1H, H5'), 7.54 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H4'), 8.20 (s, 1H, H2), 8.25 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H7'), 8.94 (bs, 1H, OH), 9.74 (bs, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 15.7 (CH₃), 42.5 (N-CH₂), 92.0 (C5), 98.3 (C7), 103.6 (-CH=), 105.1 (C9), 108.7 (C8'), 113.1 (C4'), 114.8 (C6'), 122.9 (C7'), 126.2 (C5'), 130.4 (C1'), 134.6 (C2'), 135.8 (C9'), 146.7 (C2), 158.6 (C8), 167.4 (C4), 167.9 (C6), 181.1 (C3). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 400 (100) [M(^{81}Br)-H]⁻, 398 (90) [M(^{79}Br)-H]⁻, 255 (40), 157 (60). **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₁₉H₁₃BrNO₄ 398.0028 [M-H]⁻, found 398.0028.



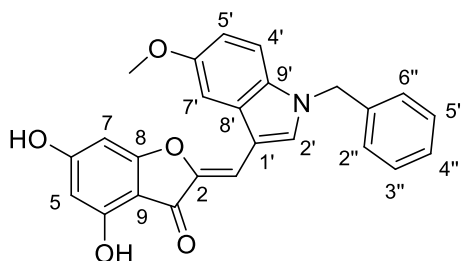
(Z)-2-(N-Butyl-5-bromoindol-3-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53f).

The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (60 mg, 0.36 mmol) and aldehyde **52f** (129 mg, 0.46 mmol). After purification by recrystallization in acetonitrile, the pure product (148 mg, 0.35 mmol, 96%) was obtained as a red powder. R_f = 0.16 (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 260 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.33-1.43 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.85-1.94 (m, 2H, N-CH₂CH₂), 4.36 (t, J = 7.2 Hz, 2H, N-CH₂), 6.14 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H7), 6.34 (d, J = 1.3 Hz,

1H, H5), 7.04 (s, 1H, -CH=), 7.39 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 1H, H5'), 7.55 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H4'), 8.19 (s, 1H, H2'), 8.25 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7'), 8.93 (bs, 1H, OH), 9.76 (bs, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 13.9 (CH₂CH₃), 20.6 (CH₂CH₃), 32.9 (N-CH₂CH₂), 47.4 (N-CH₂), 91.9 (C5), 98.2 (C7), 103.6 (-CH=), 105.1 (C9), 108.6 (C8'), 113.2 (C4'), 114.8 (C6'), 122.8 (C7'), 126.1 (C5'), 130.3 (C1'), 135.1 (C2'), 136.1 (C9'), 146.6 (C2), 158.6 (C8), 167.4, 167.4 (C4, C6), 181.1 (C3). LRMS (ESI+) m/z (%) 430 (50) [M(^{81}Br)+H]⁺, 428 (60) [M(^{79}Br)+H]⁺, 381 (100), 353 (60), 227 (57), 210 (57). HRMS (ESI+) m/z calc. for C₂₁H₁₉BrNO₄ 428.0497 [M+H]⁺, found 428.0495.

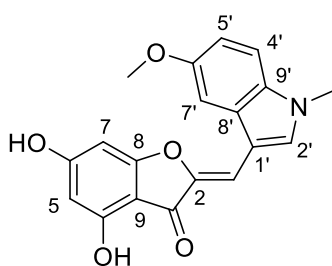


(Z)-2-[N-(Cyclohexylmethyl)-5-bromoindol-3-ylmethylene]-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53g). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (63 mg, 0.38 mmol) and aldehyde **52g** (241 mg, 0.75 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 8:2 to 5:5) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (100 mg, 0.21 mmol, 56%) was obtained as an orange powder. $R_f = 0.20$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 270 °C (decomposition). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.93-1.24 (m, 5H, H2''a, H6''a, H3''a, H4''a, H5''a), 1.43-1.72 (m, 5H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.75-1.90 (m, 1H, H1''), 4.14 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, N-CH₂), 6.06 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7), 6.23 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H5), 6.97 (s, 1H, -CH=), 7.35 (dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, 1H, H5'), 7.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H4'), 8.10 (s, 1H, H2'), 8.25 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H7'), 10.73 (s, 1H, OH), 10.75 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 25.1 (C3'', C5''), 25.8 (C4''), 30.0 (C2'', C6''), 38.2 (C1''), 52.1 (N-CH₂), 90.4 (C5), 97.5 (C7), 101.7 (-CH=), 103.5 (C9), 107.1 (C8'), 113.0 (C4'), 113.4 (C6'), 121.8 (C7'), 124.9 (C5'), 128.7 (C1'), 134.4 (C2'), 135.2 (C9'), 145.5 (C2), 157.9 (C8), 166.5 (C4), 166.9 (C6), 178.2 (C3). LRMS (ESI+) m/z (%) 470 (90) [M(^{81}Br)+H]⁺, 468 (100) [M(^{79}Br)+H]⁺, 381 (65), 353 (70), 331 (33), 210 (50). HRMS (ESI+) m/z calc. for C₂₄H₂₃BrNO₄ 468.0810 [M+H]⁺, found 468.0809.



(Z)-2-(N-Benzyl-5-methoxyindol-3-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one

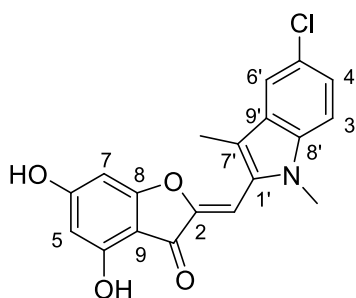
(53t). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (32 mg, 0.19 mmol) and aldehyde **52t** (100 mg, 0.38 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 98:2) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (20 mg, 0.05 mmol, 26%) was obtained as an orange powder. $R_f = 0.24$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 240 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3.83 (s, 3H, O-CH₃), 5.53 (s, 2H, N-CH₂), 6.06 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7), 6.20 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H5), 6.82 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 7.02 (s, 1H, -CH=), 7.20-7.36 (m, 5H, H1''-H6''), 7.38 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H4'), 7.55 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H7'), 8.22 (s, 1H, H2'), 10.69 (bs, 1H, OH), 10.71 (bs, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 49.7 (N-CH₂), 55.4 (O-CH₃), 90.3 (C5), 97.5 (C7), 101.0 (C7'), 102.6 (-CH=), 103.7 (C9), 107.7 (C8'), 111.8 (C4'), 112.8 (C5'), 127.0 (C2'', C6''), 127.5 (C4''), 128.1 (C1'), 128.6 (C3'', C5''), 131.0 (C9'), 133.5 (C2'), 137.5 (C1''), 145.1 (C2), 154.9 (C6'), 157.8 (C8), 166.4 (C4), 166.8 (C6), 178.3 (C3). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 414 (100) [M+H]⁺. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for C₂₅H₂₀NO₅ 414.1341 [M+H]⁺, found 414.1349.



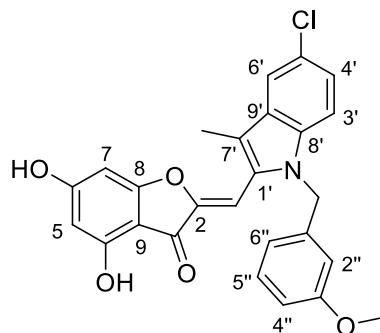
(Z)-2-(N-Methyl-5-methoxyindol-3-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one

(53u). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (48 mg, 0.29 mmol) and aldehyde **52u** (108 mg, 0.57 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 98:2) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (37 mg, 0.11 mmol, 38%) was obtained as an orange powder. $R_f = 0.27$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 290 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3.84 (s, 3H, N-CH₃), 3.87 (s, 3H, O-CH₃), 6.06 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7), 6.22 (d, J

= 1.8 Hz, 1H, H5), 6.88 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 7.00 (s, 1H, -CH=), 7.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H4'), 7.54 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H7'), 8.04 (s, 1H, H2'), 10.69 (bs, 1H, OH), 10.70 (bs, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 33.2 (N-CH₃), 55.4 (O-CH₃), 90.3 (C5), 97.4 (C7), 100.8 (C7'), 102.8 (-CH=), 103.7 (C9), 107.1 (C8'), 111.3 (C4'), 112.6 (C5'), 127.8 (C1'), 131.7 (C9'), 134.1 (C2'), 144.9 (C2), 154.8 (C6'), 157.8 (C8), 166.4 (C4), 166.8 (C6), 178.2 (C3). LRMS (ESI+) m/z (%) 338 (100) [M+H]⁺. HRMS (ESI+) m/z calc. for C₁₉H₁₆NO₅ 338.1028 [M+H]⁺, found 338.1030.

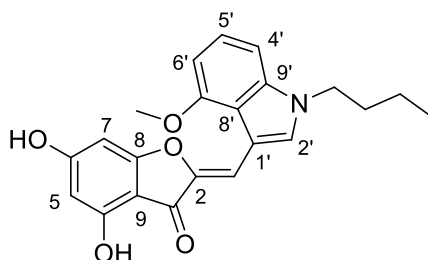


(Z)-2-(N-Methyl-3-methyl-5-chloroindol-2-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53v). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (59 mg, 0.35 mmol) and aldehyde **52v** (117 mg, 0.85 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 98:2) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (39 mg, 0.11 mmol, 31%) was obtained as a red powder. $R_f = 0.33$ (97:3 DCM/MeOH). **m.p.** 274–277 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.30 (s, 3H, C3-CH₃), 3.74 (s, 3H, N-CH₃), 6.09 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7), 6.15 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H5), 6.73 (s, 1H, -CH=), 7.20 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H, H4'), 7.49 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H3'), 7.63 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6'), 10.93 (bs, 1H, OH), 11.01 (bs, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10.1 (C7'-CH₃), 30.9 (N-CH₃), 90.5 (C5), 97.7 (C7, -CH=), 102.7 (C9), 111.4 (C3'), 112.7 (C7'), 118.1 (C4'), 122.7 (C6'), 123.8 (C9'), 128.8 (C5'), 130.9 (C1'), 136.4 (C8'), 148.1 (C2), 158.6 (C8), 167.6 (C4), 167.6 (C6), 178.1 (C3). LRMS (ESI-) m/z (%) 354 (100) [M-H]⁻. HRMS (ESI-) m/z calc. for C₁₉H₁₃NO₄Cl 354.0533 [M-H]⁻, found 354.0545.



(Z)-2-[N-(3-Methoxybenzyl)-3-methyl-5-chloroindol-2-ylmethylene]-4,6-

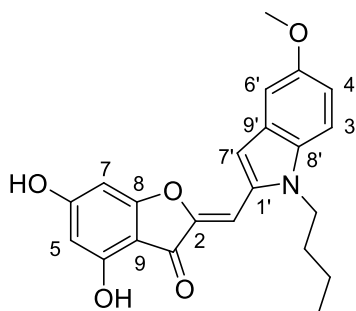
dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53w). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (47 mg, 0.28 mmol) and aldehyde **52w** (179 mg, 0.56 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 98:2) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (91 mg, 0.20 mmol, 71%) was obtained as a red powder. $R_f = 0.26$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** 148-150 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 2.33 (s, 3H, C7'-CH₃), 3.64 (s, 3H, O-CH₃), 5.47 (s, 2H, N-CH₂), 6.07 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7), 6.09 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H5), 6.49 (ddd, $J = 7.6, 2.1, 2.1$ Hz, 1H, H4''), 6.56 (dd, $J = 2.1, 2.1$ Hz, 1H, H2''), 6.67 (s, 1H, -CH=), 6.77 (ddd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1H, H6''), 7.16 (dd, $J = 8.0, 7.6$ Hz, 1H, H5''), 7.18 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H, H4'), 7.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H3'), 7.67 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6'), 10.93 (bs, 1H, OH), 11.01 (bs, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 10.2 (C7'-CH₃), 46.7 (O-CH₃), 54.9 (N-CH₂), 90.5 (C5), 97.5 (-CH=), 97.7 (C7), 102.6 (C9), 111.8 (C3'), 112.1 (C6''), 112.3 (C7'), 113.4 (C2''), 118.2, 118.3 (C4', C4''), 123.0 (C6'), 124.2 (C9'), 129.2 (C1''), 129.7 (C5''), 130.5 (C5'), 136.2 (C1'), 139.6 (C8'), 148.3 (C2), 158.6 (C3''), 159.3 (C8), 167.6 (C4), 167.6 (C6), 177.9 (C3). **LRMS (ESI-)** m/z (%) 460 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-)** m/z calc. for C₂₆H₁₉NO₅Cl 460.0952 [M-H]⁻, found 460.0948.



(Z)-2-(N-Butyl-4-methoxyindol-3-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one

(53x). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (29 mg, 0.17 mmol) and aldehyde **52x** (77 mg, 0.33 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 98:2) and recrystallization in

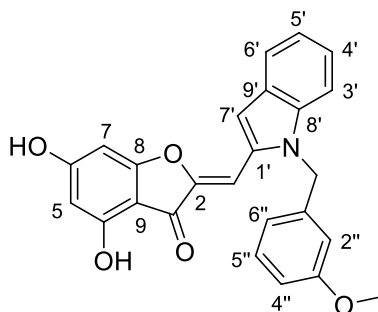
acetonitrile, the pure product (38 mg, 0.10 mmol, 59%) was obtained as a red powder. $R_f = 0.28$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 285 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.33-1.43 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.82-1.94 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2$), 4.02 (s, 3H, O- CH_3), 4.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, N-CH_2), 6.12 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H7), 6.34 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H5), 6.73 (dd, $J = 7.5, 0.7$ Hz, 1H, H6'), 7.15 (dd, $J = 8.3, 0.7$ Hz, 1H, H4'), 7.19 (dd, $J = 7.5, 8.3$, 1H, H5'), 7.69 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 8.14 (s, 1H, H2'), 8.85 (bs, 1H, OH), 9.70 (bs, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 13.9 (CH_2CH_3), 20.7 (CH_2CH_3), 33.0 ($\text{N-CH}_2\text{CH}_2$), 47.4 (N-CH_2), 55.7 (O- CH_3), 92.0 (C5), 98.0 (C7), 102.4 (C6'), 104.6 (C4'), 105.3 (C9), 107.6 ($-\text{CH}=\text{}$), 109.1 (C1'), 117.9 (C8'), 124.5 (C5'), 133.2 (C2'), 138.8 (C9'), 146.1 (C2), 156.0 (C7'), 158.5 (C8), 167.2 (C4), 167.7 (C6), 181.4 (C3). **LRMS (ESI+)** m/z (%) 380 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HRMS (ESI+)** m/z calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_5$ 380.1498 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 380.1504.



(Z)-2-(N-Butyl-5-methoxyindol-2-ylmethylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one

(53y). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (31 mg, 0.19 mmol) and aldehyde **52y** (87 mg, 0.38 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM to DCM/MeOH 98:2), the pure product (43 mg, 0.11 mmol, 60%) was obtained as a red powder. $R_f = 0.24$ (97:3 DCM/MeOH). **m.p.** 233-236 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.30-1.42 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.68-1.82 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{CH}_2$), 3.82 (s, 3H, O- CH_3), 4.39 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, N-CH_2), 6.17 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H7), 6.41 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H5), 6.82 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 6.90 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H, H4'), 7.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H6'), 7.33 (s, 1H, H7'), 7.40 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H3'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ ppm 14.9 (CH_2CH_3), 20.8 (CH_2CH_3), 33.7 ($\text{N-CH}_2\text{CH}_2$), 43.5 (N-CH_2), 55.8 (O- CH_3), 92.2 (C5), 98.8 (C7), 99.3 (C7'), 102.6 ($-\text{CH}=\text{}$), 104.5 (C9), 108.7 (C6'), 111.8 (C3'), 115.6 (C4'), 129.5 (C9'), 132.3 (C1'), 134.5 (C8'), 148.7 (C2), 155.6 (C5'), 158.8 (C8), 168.2 (C4), 168.4 (C6), 180.9 (C3). **LRMS**

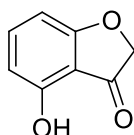
(ESI+) m/z (%) 380 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI-) m/z calc. for $C_{22}H_{20}NO_5$ 378.1341 $[M-H]^-$, found 378.1330.



(Z)-2-[N-(3-Methoxybenzyl)indol-2-ylmethylene]-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (53z). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (49 mg, 0.30 mmol) and aldehyde **52z** (158 mg, 0.60 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 97:3 to 95:5) and recrystallization in acetonitrile, the pure product (54 mg, 0.13 mmol, 44%) was obtained as a red powder. $R_f = 0.36$ (96:4 DCM/MeOH). **m.p.** > 230 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3.67 (s, 3H, O-CH₃), 5.66 (s, 2H, N-CH₂), 6.08 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H7), 6.27 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H5), 6.50 (ddd, $J = 7.9, 1.8, 1.8$ Hz, 1H, H4''), 6.61 (dd, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 1H, H2''), 6.71 (s, 1H, -CH=), 6.79 (ddd, $J = 7.9, 1.8, 1.8$ Hz, 1H, H6''), 7.10 (dd, $J = 8.3, 7.1, 0.6$ Hz, 1H, H5'), 7.18 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 1H, H5''), 7.21 (ddd, $J = 7.9, 7.1, 1.0$ Hz, 1H, H4'), 7.39 (s, 1H, H7'), 7.55 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1H, H6'), 7.69 (dd, $J = 7.9, 0.6$ Hz, 1H, H3'), 10.50-11.46 (m, 2H, 2xOH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 45.5 (N-CH₂), 54.9 (O-CH₃), 90.8 (C5), 97.1 (-CH=), 97.9 (C7), 102.8 (C9), 107.8 (C7'), 110.4 (C6'), 112.2 (C2'', C6''), 118.0 (C4''), 120.4 (C5'), 121.1 (C3'), 123.6 (C4'), 127.7 (C9'), 129.9 (C5''), 131.6 (C1''), 137.9 (C1'), 139.9 (C8'), 148.2 (C2), 158.4 (C3''), 159.4 (C8), 167.4 (C4, C6), 178.2 (C3).

III.4. Synthesis of 2-indolylmethylenbenzofuran-3(2H)-ones with different substitutions on the benzofuran-3(2H)-one

III.4.1 Synthesis of 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and methoxylated benzofuran-3(2H)-ones



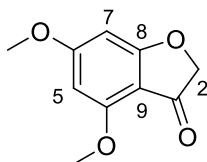
4-Hydroxybenzofuran-3(2H)-one (56) was prepared according to ref. ^[183]. A solution of 2',6'-dihydroxyacetophenone (10.00 g, 65.8 mmol) in acetic anhydride (100 mL) was refluxed overnight. Ice-cold water was then added and the solution was stirred at rt for 1 h. The mixture was then extracted with DCM. The combined organic layers were washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum to afford 2',6'-diacetoxyacetophenone (**54**) (14.5 g, 94%) as a brown oil, which was used without further purification.

To a solution of **54** (8.94 g, 42.00 mmol) in anhydrous THF (52 mL) was added PTT (15.7 g, 42.00 mmol) and the mixture was stirred at rt for 6 hours. Water was then added and the mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford 2',6'-diacetoxy-2-bromoacetophenone (**55**) which was used without further purification.

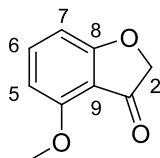
To a solution of **55** in MeOH (100 mL) was added an aqueous solution of KOH 50% (7 mL), and the solution was refluxed for 3 h. After removal of solvents under reduced pressure, the residue was diluted with water and an aqueous solution of HCl (1 N) was added to adjust the pH to 2-3. The resulting mixture was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford an orange oil, which was purified by flash chromatography on silica gel (DCM) to afford **56** (2.32 g, 37% over two steps) as a pure orange solid. NMR spectra were in accordance with ref. ^[183].

General procedure for the preparation of methoxylated benzofuran-3(2H)-ones (**57**, **58**, **59**) according to ref. ^[183] :

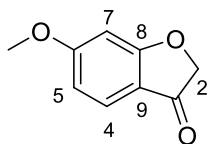
To a solution of a hydroxylated benzofuran-3(2H)-one (**51**, **56** or 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one) in DME (2 mL/mmol) was added K₂CO₃ (1 equiv/1 equiv of hydroxyl group) and dimethyl sulfate (1 equiv/1 equiv of hydroxyl group), and the mixture was refluxed at 85 °C for 3 h. After the removal of solvents, water was added and the mixture was extracted with DCM. The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel.



4,6-Dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (57). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **51** (4.00 g, 24.10 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 6:4), the pure product (3.13 g, 16.11 mmol, 67%) was obtained as orange crystals. NMR data can be found in ref. ^[183].

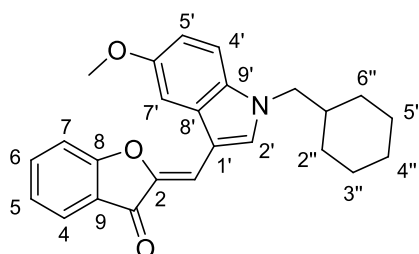


4-Methoxybenzofuran-3(2H)-one (58). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **56** (200 mg, 1.33 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 6:4), the pure product (113 mg, 0.69 mmol, 52%) was obtained as a white powder. $R_f = 2.90$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 151 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.96 (s, 3H, O-CH₃), 4.60 (s, 2H, H₂), 6.47 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H₅), 6.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H₇), 7.53 (dd, $J = 8.3, 8.3$ Hz, 1H, H₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 56.3 (O-CH₃), 74.9 (C₂), 103.3 (C₇), 105.6 (C₅), 110.7 (C₉), 139.6 (C₆), 158.3 (C₈), 175.4 (C₄), 197.4 (C₃).



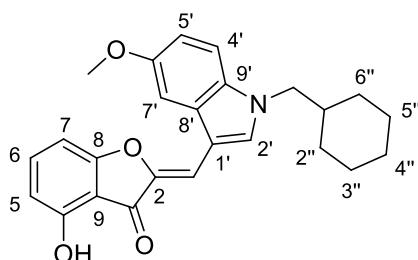
6-Methoxybenzofuran-3(2H)-one (59). The crude product was prepared according to the general procedure starting from commercially available 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (200 mg, 1.33 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 6:4), the pure product (214 mg, 1.30 mmol, 98%) was obtained as a yellowish powder. NMR data can be found in ref. ^[183].

III.4.2. Synthesis of 2-indolylmethylenebenzofuran-3(2H)-ones

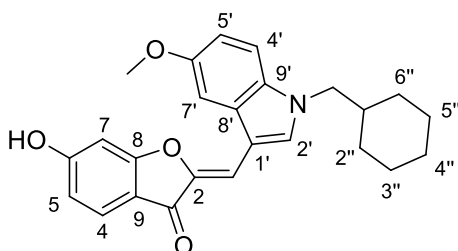


(Z)-2-[(N-(Cyclohexylmethyl)-5-methoxyindol-3-yl)methylene]benzofuran-3(2H)-one (60a). In a methanolic solution (15 mL/mmol, 2.40 mL) of benzofuran-3(2H)-one (22 mg, 0.16 mmol) and aldehyde **52b** (90 mg, 0.32 mmol) was added KOH 50% (1.5 mL/mmol, 0.24 mL). The reaction mixture was heated under reflux at 65 °C for 3 h. After removal of MeOH *in vacuo*, the remaining mixture was extracted with DCM (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was washed with MeOH to afford the pure product (54 mg, 0.14 mmol, 87%) as a yellow powder. $R_f = 0.31$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 174-175 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ ppm 0.98-1.30 (m, 5H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.60-1.80 (m, 5H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.85-2.00 (m, 1H, H1'''), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 4.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, N-CH₂), 6.94 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 7.21 (ddd, $J = 7.6, 7.3, 0.7$ Hz, 1H, H5), 7.27 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H4'), 7.36 (dd, $J = 8.4, 0.7$ Hz, 1H, H7), 7.38 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H7'), 7.40 (s, 1H, -CH=), 7.62 (ddd, $J = 8.4, 7.3, 1.4$ Hz, 1H, H6), 7.84 (dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H, H4), 7.96 (s, 1H, H2'). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ ppm 25.8 (C3'', C5''), 26.3 (C4''), 31.2 (C2'', C6''), 38.8 (C1''), 54.1 (N-CH₂), 56.0 (O-CH₃), 100.8 (C7'), 108.6 (-CH=), 108.5 (C8'), 111.5 (C7),

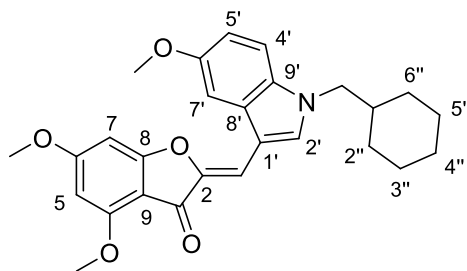
112.8 (C4'), 113.7 (C5'), 123.1 (C9), 123.2 (C5), 124.5 (C6), 128.9 (C1'), 131.9 (C9'), 134.8 (C2'), 135.8 (C4), 144.9 (C2), 155.8 (C6'), 164.8 (C8), 182.9 (C3).



(Z)-2-[N-(Cyclohexylmethyl)-5-methoxyindol-3-ylmethylene]-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (60b). In a methanolic solution (15 mL/mmol, 3.30 mL) of **56** (43 mg, 0.22 mmol) and aldehyde **52b** (90 mg, 0.33 mmol) was added KOH 50% (1.5 mL/mmol, 0.33 mL). The reaction mixture was heated under reflux at 65 °C for 3 h. After removal of MeOH *in vacuo*, the remaining mixture was acidified with HCl 10% to pH = 2-3 and extracted with DCM (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was recrystallized in MeOH to obtain the pure product (18 mg, 0.04 mmol, 20%) as orange oil. $R_f = 0.20$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.97-1.32 (m, 5H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.59-1.81 (m, 5H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.84-1.98 (m, 1H, H1''), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 4.00 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, N-CH₂), 6.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H5), 6.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H7), 6.94 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 7.27 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H4'), 7.31 (s, 1H, -CH=), 7.35 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H7'), 7.47 (dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz, 1H, H6), 7.94 (s, 1H, H2'), 8.04 (bs, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 25.8 (C3''), 26.3 (C4''), 31.2 (C2''), 38.8 (C1''), 54.1 (N-CH₂), 56.0 (O-CH₃), 100.8 (C7'), 103.5 (-CH=), 108.1 (C7), 108.3 (C8'), 109.2 (C5), 111.0 (C9), 111.6 (C4'), 113.6 (C5'), 128.8 (C1'), 131.9 (C9'), 134.9 (C2'), 138.0 (C6), 144.3 (C2), 155.8 (C6'), 156.7 (C8), 163.8 (C4), 183.9 (C3).

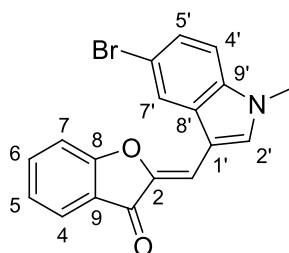


(Z)-2-[N-(Cyclohexylmethyl)-5-methoxyindol-3-ylmethylene]-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (60c). In an ethanolic solution (3 mL/mmol, 1.38 mL) of commercially available 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (69 mg, 0.46 mmol) and aldehyde **52b** (250 mg, 0.92 mmol) was added KOH 50% (5 mL/mmol, 2.3 mL). The reaction mixture was refluxed for 3 h. After removal of EtOH *in vacuo*, the remaining mixture was acidified with HCl 10% to pH = 2-3 and extracted with EtOAc (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was recrystallized in MeOH to obtain the pure product (178 mg, 0.44 mmol, 96%) as a yellow powder. $R_f = 0.26$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** > 300 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.93-1.27 (m, 5H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.43-1.1.72 (m, 5H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.75-1.91 (m, 1H, H1''), 3.84 (s, 3H, O-CH₃), 4.11 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, N-CH₂), 6.70 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H, H5), 6.80 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 6.87 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 7.21 (s, 1H, -CH=), 7.49 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H4'), 7.59 (m, 2H, H4, H7'), 8.12 (s, 1H, H2'). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 25.2 (C3'', C5''), 25.9 (C4''), 30.1 (C2'', C6''), 38.2 (C1''), 52.3 (N-CH₂), 55.5 (O-CH₃), 98.5 (C7), 101.0 (C7'), 105.4 (-CH=), 107.2 (C8'), 111.9 (C4'), 112.6 (C5), 112.8 (C5'), 114.3 (C9), 125.4 (C4), 128.0 (C1'), 131.5 (C9'), 134.6 (C2'), 144.7 (C2), 155.0 (C6'), 165.5 (C8), 166.5 (C6), 180.1 (C3).

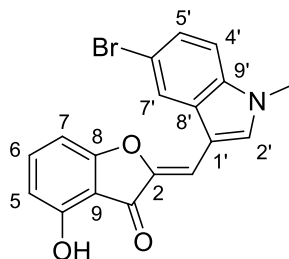


(Z)-2-[N-(Cyclohexylmethyl)-5-methoxyindol-3-ylmethylene]-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (60d). In a methanolic solution (15 mL/mmol, 3.85 mL) of **57** (50 mg, 0.26 mmol) and aldehyde **52b** (70 mg, 0.26 mmol) was added KOH 50% (1.5 mL/mmol, 0.39 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 5 min. The precipitated product was filtered and washed with cold MeOH. After purification by recrystallization in MeOH, the pure product (107 mg, 0.24 mmol, 93%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.29$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 199-200 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.96-1.28 (m, 5H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.57-1.81 (m, 5H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.82-1.98 (m, 1H, H1''), 3.92 (s, 3H, O-CH₃), 3.93 (s, 3H, O-CH₃), 3.97 (s, 3H, O-CH₃), 3.98 (d, $J = 7.2$ Hz,

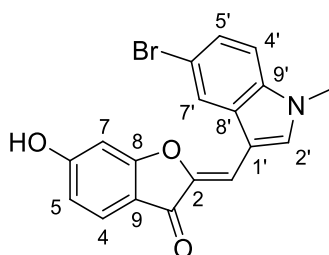
2H, N-CH₂), 6.14 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H7), 6.42 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H5), 6.92 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 7.24 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H4'), 7.25 (s, 1H, -CH=), 7.37 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H7'), 7.86 (s, 1H, H2'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 25.8 (C3'', C5''), 26.4 (C4''), 31.2 (C2'', C6''), 38.9 (C1''), 54.0 (N-CH₂), 56.1, 56.2, 56.3 (3xO-CH₃), 89.3 (C5), 93.8 (C7), 100.8 (C7'), 104.9 (-CH=), 105.4 (C9), 108.3 (C8'), 111.3 (C4'), 113.5 (C5'), 128.9 (C1'), 131.7 (C9'), 133.6 (C2'), 145.8 (C2), 155.5 (C6'), 159.2 (C8), 167.8 (C4), 168.2 (C6), 179.8 (C3).



(Z)-2-(N-Methyl-5-bromoindol-3-ylmethylene)benzofuran-3(2H)-one (61a). In an ethanolic solution (3 mL/mmol, 0.63 mL) of commercially available benzofuran-3(2H)-one (28 mg, 0.21 mmol) and aldehyde **52d** (100 mg, 0.42 mmol) was added KOH 50% (5 mL/mmol, 1.1 mL). The reaction mixture was refluxed for 3 h. After removal of EtOH *in vacuo*, the remaining mixture was extracted with DCM (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1 to 7:3), the pure product (69 mg, 0.19 mmol, 93%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.29$ (7:3 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 195-196 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.89 (s, 3H, CH₃), 7.16-7.24 (m, 3H, H5, H7, -CH=), 7.31 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H4'), 7.38 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H, H5'), 7.61 (ddd, $J = 8.5, 7.4, 1.4$ Hz, 1H, H6), 7.79 (dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H, H4), 7.94 (s, 1H, H2'), 8.03 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 33.8 (CH₃), 106.1 (-CH=), 108.4 (C8'), 111.5 (C7), 112.8 (C4'), 115.1 (C6'), 122.2 (C7'), 122.9 (C9), 123.2 (C5), 124.5 (C6), 126.1 (C5'), 129.5 (C1'), 135.2 (C4), 135.8 (C2'), 136.0 (C9'), 145.4 (C2), 165.0 (C8), 183.3 (C3).

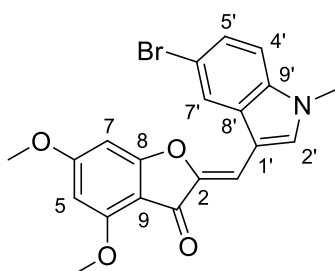


(Z)-2-(N-Methyl-5-bromoindol-3-ylmethylene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (61b). In a methanolic solution (15 mL/mmol, 4.95 mL) of **56** (50 mg, 0.33 mmol) and aldehyde **52d** (119 mg, 0.50 mmol) was added KOH 50% (1.5 mL/mmol, 0.50 mL). The reaction mixture was heated under reflux at 65 °C for 3 h. After removal of MeOH *in vacuo*, the remaining mixture was acidified with HCl 10% to pH = 2-3 and extracted with DCM (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. After purification by recrystallization in MeOH, the pure product (64 mg, 0.17 mmol, 52%) was obtained as an orange powder. R_f = 0.24 (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 204-206 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.91 (s, 3H, N-CH₃), 6.61 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H5), 6.80 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H7), 7.18 (s, 1H, -CH=), 7.24 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H4'), 7.41 (dd, J = 8.6, 1.8 Hz, 1H, H5'), 7.48 (dd, J = 8.2, 8.2 Hz, 1H, H6), 7.96 (bs, 1H, OH), 7.97 (s, 1H, H2'), 8.03 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H7'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 33.9 (N-CH₃), 103.5 (-CH=), 106.3 (C7), 108.2 (C8'), 109.5 (C5), 110.8 (C9), 111.6 (C4'), 115.2 (C6'), 122.2 (C7'), 126.3 (C5'), 129.5 (C1'), 135.5 (C2'), 135.9 (C9'), 138.3 (C6), 144.9 (C2), 156.7 (C8), 164.0 (C4), 184.2 (C3).



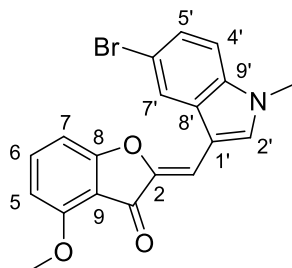
(Z)-2-(N-Methyl-5-bromoindol-3-ylmethylene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (61c). In an ethanolic solution (3 mL/mmol, 3.15 mL) of commercially available 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (158 mg, 1.05 mmol) and aldehyde **52d** (500 mg, 2.10 mmol) was added KOH 50% (5 mL/mmol, 5.25 mL). The reaction mixture was refluxed for 3 h. After removal of EtOH *in vacuo*, the remaining mixture was extracted with DCM (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄,

filtered and concentrated under reduced pressure. After purification by recrystallization in MeOH, the pure product (300 mg, 0.81 mmol, 77%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.24$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 310-311 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.93 (s, 3H, CH₃), 6.69 (dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, 1H, H5), 6.78 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H7), 7.19 (s, 1H, -CH=), 7.40 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 1H, H5'), 7.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H4'), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H4), 8.24 (s, 1H, H2'), 8.30 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 33.4 (CH₃), 98.4 (C7), 104.2 (-CH=), 107.0 (C8'), 112.7 (C5), 112.8 (C4'), 113.8 (C6'), 114.0 (C9), 121.8 (C7'), 125.1 (C4), 125.5 (C5'), 128.9 (C1'), 135.6 (C2'), 135.8 (C9'), 145.3 (C2), 165.9 (C8), 166.7 (C6), 180.2 (C3).

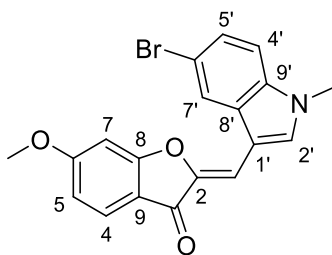


(Z)-2-(N-Methyl-5-bromoindol-3-ylmethylene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one

(61d). In a methanolic solution (15 mL/mmol, 3.85 mL) of **57** (50 mg, 0.26 mmol) and aldehyde **52d** (61 mg, 0.26 mmol) was added KOH 50% (1.5 mL/mmol, 0.39 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The precipitated product was filtered and washed with cold MeOH. After purification by recrystallization in MeOH, the pure product (96 mg, 0.23 mmol, 91%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.27$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 267 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.83 (s, 3H, N-CH₃), 3.91 (s, 3H, O-CH₃), 3.94 (s, 3H, O-CH₃), 6.08 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H7), 6.34 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H5), 7.04 (s, 1H, -CH=), 7.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H4'), 7.34 (dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, 1H, H5'), 7.80 (s, 1H, H2'), 8.00 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 33.7 (N-CH₃), 56.2 (O-CH₃), 56.3 (O-CH₃), 89.1 (C5), 93.9 (C7), 103.7 (-CH=), 106.3 (C9), 108.3 (C8'), 111.3 (C4'), 114.7 (C6'), 122.2 (C7'), 125.8 (C5'), 129.4 (C1'), 134.3 (C2'), 135.6 (C9'), 146.3 (C2), 159.2 (C8), 168.0 (C4), 168.4 (C6), 179.8 (C3).



(Z)-2-[N-Methyl-5-bromoindol-3-ylmethylene]-4-methoxybenzofuran-3(2H)-one (61e). In a methanolic solution (15 mL/mmol, 4.50 mL) of **58** (50 mg, 0.30 mmol) and aldehyde **52d** (73 mg, 0.30 mmol) was added KOH 50% (1.5 mL/mmol, 0.45 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 12 h. The precipitated product was filtered and washed with cold MeOH. After purification by recrystallization in MeOH, the pure product (60 mg, 0.14 mmol, 52%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.22$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** > 250 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.93 (s, 6H, 2xCH₃), 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H5), 7.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H7), 7.23 (s, 1H, -CH=), 7.40 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 1H, H5'), 7.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H4'), 7.69 (dd, $J = 8.2, 8.2$ Hz, 1H, H6), 8.23 (s, 1H, H2'), 8.32 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H6). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 33.4 (N-CH₃), 56.0 (O-CH₃), 104.5 (C7), 104.8 (C5), 105.7 (-CH=), 107.1 (C8'), 110.9 (C9), 112.8 (C4'), 113.9 (C6'), 121.9 (C7'), 125.2 (C5'), 128.8 (C1'), 135.6 (C2'), 135.9 (C9'), 138.2 (C6), 144.3 (C2), 157.8 (C8), 165.2 (C4), 179.4 (C3).



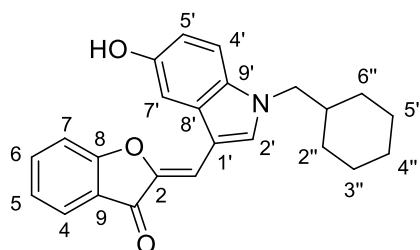
(Z)-2-[(N-methyl-5-bromoindol-3-yl)methylene]-6-methoxybenzofuran-3(2H)-one (61f). In a methanolic solution (15 mL/mmol, 4.50 mL) of **59** (50 mg, 0.30 mmol) and aldehyde **52d** (73 mg, 0.30 mmol) was added KOH 50% (1.5 mL/mmol, 0.45 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. The precipitated product was filtered and washed with cold MeOH. After purification by recrystallization in MeOH, the pure product (73 mg, 0.19 mmol, 63%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.5$ (98:2 DCM/MeOH). **m.p.** > 180 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.93 (s, 6H, 2xCH₃), 6.85 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 1H, H5), 7.07 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H7), 7.28 (s, 1H, -CH=), 7.41 (dd, $J = 8.7, 1.8$

Hz, 1H, H5'), 7.55 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H4'), 7.67 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H4), 8.26 (s, 1H, H2'), 8.31 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7'). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 33.4 (N-CH₃), 56.2 (O-CH₃), 96.8 (C7), 104.9 (-CH=), 107.0 (C8'), 112.2 (C5), 112.7 (C4'), 113.9 (C6'), 115.2 (C9), 121.7 (C7'), 125.1 (C4), 125.2 (C5'), 128.9 (C1'), 135.5 (C2'), 135.9 (C9'), 145.3 (C2), 166.6 (C8), 166.7 (C6), 180.2 (C3).

III.5. Synthesis of dimeric 2-indolylmethylenbenzofuran-3(2H)-ones

General procedure for the tosylation of PEG (63a-d)

A solution of a corresponding PEG chain (1 equiv) and tosylchloride (2 equiv) in DCM was cooled down to 0 °C in an ice bath. KOH (8 equiv) was slowly added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h. After dilution with water, the mixture was extracted with DCM (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the crude product as yellowish oil, which was used without further purification.



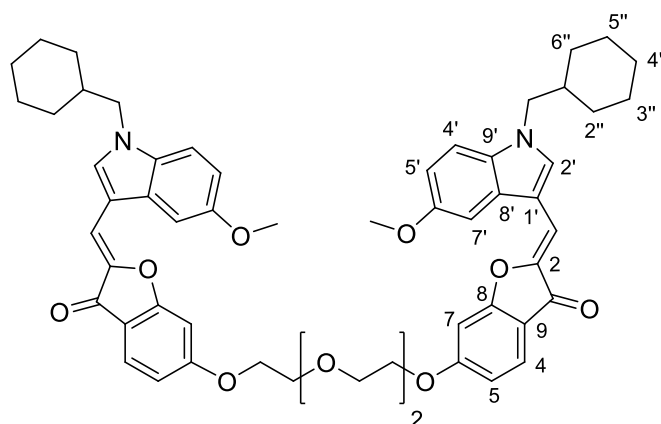
(Z)-2-[(N-(Cyclohexylmethyl)-5-hydroxyindol-3-yl)methylene]benzofuran-3(2H)-one (62).

A solution of **60a** (141 mg, 0.36 mmol) in DCM (10 mL/mmol, 3.63 mL) was cooled down to 0 °C in an ice bath. BBr₃ (7.26 mmol) was slowly added. The reaction mixture was stirred at rt until completion (20 h), then ice-cold water was added. The mixture was extracted with EtOAc (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The pure product (136 mg, 0.36 mmol, quantitative) was obtained as an orange powder. $R_f = 0.31$ (6:4 cyclohexane/EtOAc). **m.p.** 248-249 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.99-1.17 (m, 5H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.51-1.65 (m, 5H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.83-1.87 (m, 1H, H1''), 4.10 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, N-CH₂), 6.79 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H, H5'), 7.17 (s, 1H, -CH=), 7.29 (dd, $J = 7.4, 7.4$ Hz, 1H, H5), 7.34 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H7'), 7.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H4'), 7.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H7), 7.75-7.78 (m, 2H, H4, H6),

8.14 (s, 1H, H2'), 9.15 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 25.1 (C3'', C5''), 25.8 (C4''), 30.1 (C2'', C6''), 38.0 (C1''), 52.4 (N-CH₂), 103.4 (C7'), 106.8 (-CH=), 107.5 (C8'), 111.8 (C7), 112.8 (C4'), 113.1 (C5'), 122.4 (C9), 123.3 (C5), 123.7 (C6), 128.2 (C1'), 131.1 (C9'), 135.6 (C2'), 136.1 (C4), 143.4 (C2), 152.8 (C6'), 163.9 (C8), 181.3 (C3).

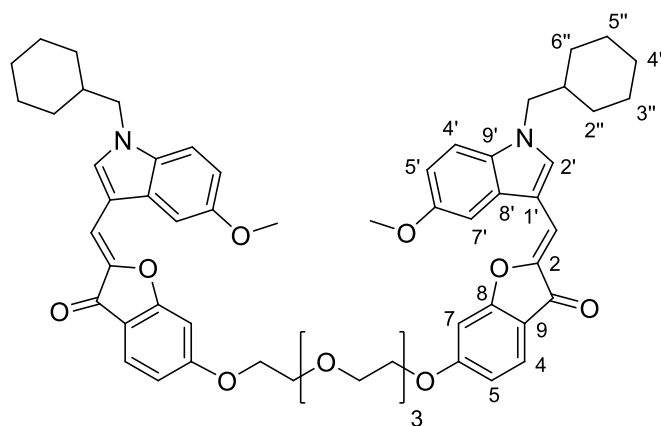
General procedure for the synthesis of dimers 64a-d and 65a-d

To a solution of **60c** or **61c** (1 equiv) in DMF (0.04 mL/mmol) was added a di-tosylated PEG (**63a-d**) (0.5 equiv) and K₂CO₃ (1.25 equiv). The reaction mixture was refluxed at 150 °C for 3h. When TLC indicated the complete consumption of starting material, the reaction mixture was cooled and diluted with water and a small amount of HCl (10%). The mixture was extracted with DCM (3 times). The combined organic layers was washed with water and saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel or by preparative TLC, washed with cyclohexane and/or DCM and/or EtOAc to obtain the pure product.

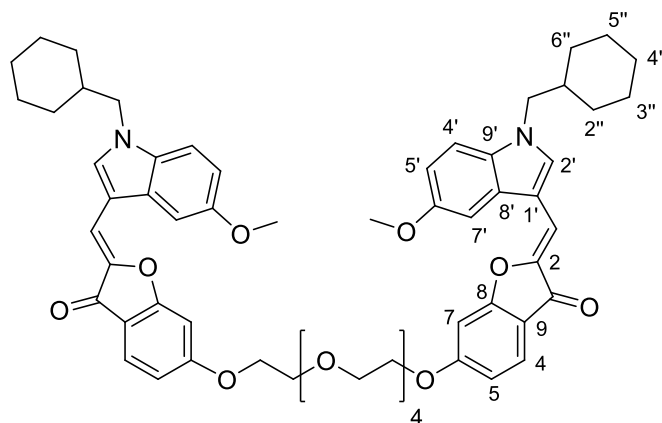


1,10-Bis{(Z)-2'-[(N-cyclohexylmethyl-5-methoxyindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxobenzofuran-6'-yl}-1,4,7,10-tetraoxadecane (64a). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **60c** (50 mg, 0.12 mmol) and **63a** (28 mg, 0.06 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 40:58:2), the pure product (33 mg, 0.04 mmol, 58%) was obtained as a yellow powder. R_f = 0.25 (40:58:2 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** 128 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.93-1.26 (m, 10H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.54-1.81 (m, 10H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.82-1.96 (m, 2H, H1'), 3.79 (s, 4H, 2xO-CH₂), 3.88 (s, 6H, 2xO-CH₃), 3.92 (t, J = 4.7 Hz, 4H, 2xO-CH₂), 3.96 (d, J = 7.2 Hz, 4H, 2xN-CH₂), 4.24 (t, J = 4.7 Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.74-6.80 (m, 4H, H5, H7), 6.92 (dd, J = 8.9,

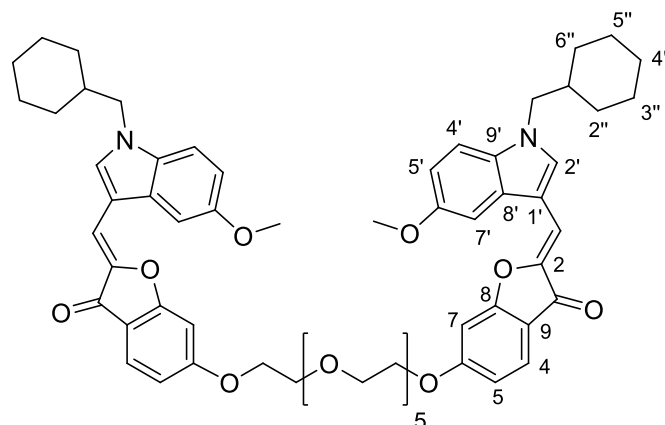
2.4 Hz, 2H, H5'), 7.22-7.25 (m, 4H, -CH=, H4'), 7.29 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H7'), 7.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H4), 7.86 (s, 2H, H2'). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.8 (2x $\text{C}3''$), 26.4 (2x $\text{C}4''$), 31.2 (2x $\text{C}2''$, 2x $\text{C}6''$), 38.8 (2x $\text{C}1''$), 54.0 (2xN- CH_2), 55.9 (2xO- CH_3), 68.3, 69.7, 71.2 (6xO- CH_2), 97.3 (2x $\text{C}7$), 100.7 (2x $\text{C}7'$), 106.6 (2x- $\text{CH}=\text{C}$), 108.3 (2x $\text{C}8'$), 111.4 (2x $\text{C}4'$), 112.2 (2x $\text{C}5$), 113.5 (2x $\text{C}5'$), 116.6 (2x $\text{C}9$), 125.5 (2x $\text{C}4$), 128.8 (2x $\text{C}1'$), 131.8 (2x $\text{C}9'$), 134.1 (2x $\text{C}2'$), 145.7 (2x $\text{C}2$), 155.6 (2x $\text{C}6'$), 165.8 (2x $\text{C}8$), 167.0 (2x $\text{C}6$), 181.7 (2x $\text{C}3$).



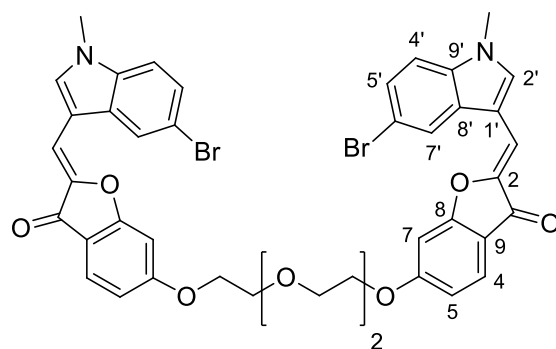
1,13-Bis{(Z)-2'-[(N-cyclohexylmethyl-5-methoxyindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxobenzofuran-6'-yl}-1,4,7,10,13-pentaoxatridecane (64b). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **60c** (50 mg, 0.12 mmol) and **63b** (31 mg, 0.06 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 40:59:1), the pure product (42 mg, 0.04 mmol, 72%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.22$ (40:59:1 DCM/cyclohexane/MeOH). **m.p.** > 100 °C (decomposition). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.92-1.30 (m, 10H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.53-1.80 (m, 10H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.80-1.98 (m, 2H, H1''), 3.65-3.79 (m, 8H, 4xO- CH_2), 3.88 (s, 6H, 2xO- CH_3), 3.90 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H, 2xO- CH_2), 3.96 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H, 2xN- CH_2), 4.16-4.28 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H, 2xO- CH_2), 6.72-6.80 (m, 4H, H5, H7), 6.91 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 2H, H5'), 7.20-7.26 (m, 4H, -CH=, H4'), 7.29 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H7'), 7.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H4), 7.86 (s, 2H, H2'). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.8 (2x $\text{C}3''$, 2x $\text{C}5''$), 26.4 (2x $\text{C}4''$), 31.2 (2x $\text{C}2''$, 2x $\text{C}6''$), 38.8 (2x $\text{C}1''$), 54.0 (2xN- CH_2), 55.9 (2xO- CH_3), 68.3, 69.6, 70.9, 71.1 (8xO- CH_2), 97.3 (2x $\text{C}7$), 100.7 (2x $\text{C}7'$), 106.7 (2x- $\text{CH}=\text{C}$), 108.3 (2x $\text{C}8'$), 111.4 (2x $\text{C}4'$), 112.2 (2x $\text{C}5$), 113.5 (2x $\text{C}5'$), 116.6 (2x $\text{C}9$), 125.5 (2x $\text{C}4$), 128.8 (2x $\text{C}1'$), 131.8 (2x $\text{C}9'$), 134.2 (2x $\text{C}2'$), 145.7 (2x $\text{C}2$), 155.6 (2x $\text{C}6'$), 165.9 (2x $\text{C}8$), 167.0 (2x $\text{C}6$), 181.7 (2x $\text{C}3$).



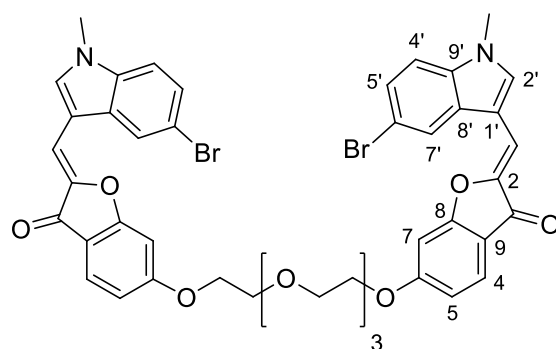
1,19-Bis{(Z)-2'-[(N-cyclohexylmethyl-5-methoxyindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxobenzofuran-6'-yl}-1,4,7,10,13,16-hexaoxonadecane (64c). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **60c** (50 mg, 0.12 mmol) and **63c** (40 mg, 0.06 mmol). After purification by preparative TLC on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 50:47:3), the pure product (35 mg, 0.03 mmol, 53%) was obtained as a brown powder. $R_f = 0.30$ (50:47:3 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** 90 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.97-1.25 (m, 10H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.81-1.59 (m, 10H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.83-2.00 (m, 2H, H1''), 3.65-3.80 (m, 12H, 6xO-CH₂), 3.85-3.95 (m, 10H, 2xO-CH₂, 2xO-CH₃), 3.98 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H, 2xN-CH₂), 4.24 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.74-6.82 (m, 4H, H5, H7), 6.93 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 2H, H5'), 7.22-7.29 (m, 4H, -CH=, H4'), 7.33 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H7'), 7.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H4), 7.88 (s, 2H, H2'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.8 (2xC3'', 2xC5''), 26.3 (2xC4''), 31.1 (2xC2'', 2xC6''), 38.8 (2xC1''), 53.9 (2xN-CH₂), 55.9 (2xO-CH₃), 68.3, 69.5, 70.8, 70.8, 71.1 (10xO-CH₂), 97.3 (2xC7), 100.6 (2xC7'), 106.4 (2x-CH=), 108.2 (2xC8'), 111.4 (2xC4'), 112.1 (2xC5), 113.4 (2xC5'), 116.5 (2xC9), 125.5 (2xC4), 128.7 (2xC1'), 131.7 (2xC9'), 134.0 (2xC2'), 145.8 (2xC2), 155.5 (2xC6'), 165.8 (2xC8), 167.0 (2xC6), 181.8 (2xC3).



1,16-Bis{(Z)-2'-[(N-cyclohexylmethyl-5-methoxyindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxobenzofuran-6'-yl}-1,4,7,10,13,16,19-hepta-oxahexadecane (64d). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **60c** (50 mg, 0.12 mmol) and **63d** (34 mg, 0.06 mmol). After purification by preparative TLC on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 50:47:3), the pure product (40 mg, 0.04 mmol, 63%) was obtained as a brown powder. $R_f = 0.27$ (50:47:3 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** 72 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.94-1.23 (m, 10H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.58-1.78 (m, 10H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.82-1.96 (m, 2H, H1'), 3.63-3.77 (m, 16H, 8xO-CH₂), 3.89 (s, 6H, 2xO-CH₃), 3.89 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 3.96 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H, 2xN-CH₂), 4.22 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.75 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 2H, H5), 6.78 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7), 6.91 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 2H, H5'), 7.23 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H4'), 7.25 (s, 2H, -CH=), 7.32 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H7'), 7.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H4), 7.87 (s, 2H, H2'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.8 (2xC3'', 2xC5''), 26.3 (2xC4''), 31.1 (2xC2'', 2xC6''), 38.8 (2xC1''), 53.9 (2xN-CH₂), 55.9 (2xO-CH₃), 68.3, 69.5, 70.7, 70.8, 71.1 (12xO-CH₂), 97.3 (2xC7), 100.6 (2xC7'), 106.4 (2x-CH=), 108.2 (2xC8'), 111.4 (2xC4'), 112.2 (2xC5), 113.5 (2xC5'), 116.5 (2xC9), 125.5 (2xC4), 128.8 (2xC1'), 131.7 (2xC9'), 134.1 (2xC2'), 145.8 (2xC2), 155.5 (2xC6'), 165.8 (2xC8), 167.0 (2xC6), 181.8 (2xC3).

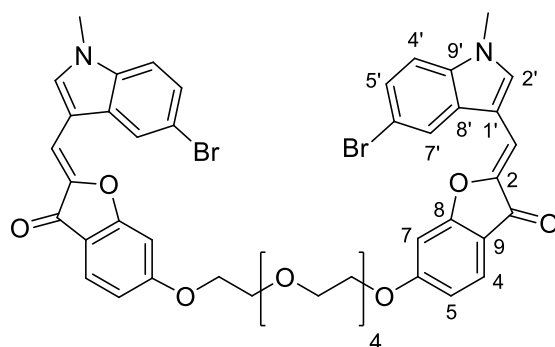


1,10-Bis((Z)-2'-[(N-methyl-5-bromoindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxo benzofuran-6'-yl)-1,4,7,10-tetraoxadecane (65a). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **61c** (50 mg, 0.14 mmol) and **63a** (31 mg, 0.07 mmol), purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 40:57:3) and washed with DCM to afford the pure product (50 mg, 0.06 mmol, 87%) as a yellow powder. $R_f = 0.28$ (40:57:3 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** > 150 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 3.65-3.69 (m, 4H, 2xO-CH₂), 3.83 (t, $J = 4.4$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 3.89 (s, 6H, 2xN-CH₃), 4.27 (t, $J = 4.4$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.82 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 2H, H5), 7.03 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H7), 7.19 (s, 2H, -CH=), 7.38 (dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, 2H, H5'), 7.50 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H4'), 7.62 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H4), 8.16 (s, 2H, H2'), 8.23 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H7'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 33.4 (2xN-CH₃), 68.2, 68.7, 70.0 (6xO-CH₂), 97.2 (2xC7), 104.8 (2x-CH=), 107.0 (2xC8'), 112.5 (2xC5), 112.6 (2xC4'), 113.9 (2xC6'), 115.2 (2xC9), 121.7 (2xC7'), 125.0 (2xC4), 125.1 (2xC5'), 128.8 (2xC1'), 135.5 (2xC2'), 135.8 (2xC9'), 145.2 (2xC2), 165.7 (2xC8), 166.5 (2xC6), 180.1 (2xC3).



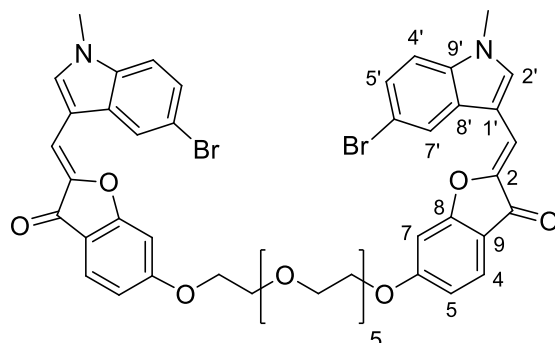
1,13-Bis((Z)-2'-[(N-methyl-5-bromoindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxo benzofuran-6'-yl)-1,4,7,10,13-pentaoxatridecane (65b). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **61c** (50 mg, 0.14 mmol) and **63b** (34 mg,

0.07 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 40:59:1), the pure product (34 mg, 0.04 mmol, 64%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.25$ (40:59:1 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** 133-134 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.69-3.78 (m, 8H, 4xO-CH₂), 3.82 (s, 6H, 2xN-CH₃), 3.90 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 4.16 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.63 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7), 6.73 (dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 2H, H5), 6.99 (s, 2H, -CH=), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H4'), 7.30 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 2H, H5'), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H4), 7.73 (s, 2H, H2'), 7.86 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H7'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 33.8 (2xN-CH₃), 68.4, 69.5, 71.0, 71.1 (8xO-CH₂), 97.1 (2xC7), 105.3 (2x-CH=), 108.2 (2xC8'), 111.4 (2xC5), 112.3 (2xC4'), 114.9 (2xC6'), 116.0 (2xC9), 121.9 (2xC7'), 125.4 (2xC4), 125.9 (2xC5'), 129.3 (2xC1'), 134.9 (2xC2'), 135.6 (2xC9'), 146.0 (2xC2), 166.0 (2xC8), 167.1 (2xC6), 181.4 (2xC3). **LRMS (ESI)** m/z (%) 525 (100), 732 (50), 749 (90), 899 [$\text{M}(^{81}\text{Br})+\text{H}$]⁺ (25), 921 (70); **HRMS (ESI-)** m/z calc. for $\text{C}_{44}\text{H}_{39}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_9$ 897.1022 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, found 897.1012.

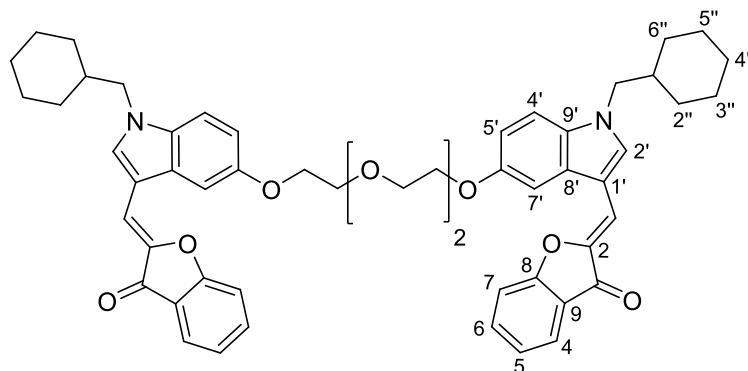


1,16-Bis{(Z)-2'-[(N-methyl-5-bromoindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxo benzofuran-6'-yl}-1,4,7,10,13,16-hexaoxahexadecane (65c). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **61c** (50 mg, 0.14 mmol) and **63c** (37 mg, 0.07 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 50:48:2), the pure product (49 mg, 0.05 mmol, 77%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.21$ (50:48:2 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** 150-152 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.64-3.76 (m, 12H, 6xO-CH₂), 3.78 (s, 6H, 2xN-CH₃), 3.88 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 4.15 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.60 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7), 6.68 (dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 2H, H5), 6.96 (s, 2H, -CH=), 7.08 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H4'), 7.26 (dd, $J = 8.7, 1.8$ Hz, 2H, H5'), 7.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H4), 7.70 (s, 2H, H2'), 7.86 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H7'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 33.7 (2xN-CH₃), 68.3, 69.5, 70.8, 71.1 (10xO-CH₂), 97.1 (2xC7), 104.8 (2x-CH=), 108.1 (2xC8'), 111.4 (2xC5), 112.2 (2xC4'),

114.8 (2xC6'), 116.0 (2xC9), 121.8 (2xC7'), 125.3 (2xC4), 125.8 (2xC5'), 129.3 (2xC1'), 134.8 (2xC2'), 135.6 (2xC9'), 146.1 (2xC2), 166.0 (2xC8), 167.1 (2xC6), 181.6 (2xC3).



1,19-Bis((Z)-2'-[(N-methyl-5-bromoindol-3-yl)methylene]-2',3'-dihydro-3'-oxo benzofuran-6'-yl)-1,4,7,10,13,16,19-heptaioxanonadecane (65d). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **61c** (50 mg, 0.14 mmol) and **63d** (40 mg, 0.07 mmol). After purification by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 40:58:2), the pure product (50 mg, 0.05 mmol, 75%) was obtained as a yellow powder. $R_f = 0.25$ (40:58:2 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** 87 °C. **^1H NMR (500 MHz, CDCl_3)** δ ppm 3.58-3.77 (m, 16H, 8xO-CH₂), 3.81 (s, 6H, 2xN-CH₃), 3.88 ($J = 4.6$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 4.17 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.64 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7), 6.69 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 2H, H5), 7.02 (s, 2H, -CH=), 7.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H4'), 7.29 (dd, $J = 8.6, 1.5$ Hz, 2H, H5'), 7.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H4), 7.76 (s, 2H, H2'), 7.90 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H, H7'). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)** δ ppm 33.8 (2xN-CH₃), 68.3, 69.5, 70.8, 70.8, 70.8, 71.1 (12xO-CH₂), 97.2 (2xC7), 104.9 (2x-CH=), 108.1 (2xC8'), 111.4 (2xC5), 112.3 (2xC4'), 114.8 (2xC6'), 116.1 (2xC9), 121.9 (2xC7'), 125.4 (2xC4), 125.9 (2xC5'), 129.4 (2xC1'), 134.8 (2xC2'), 135.6 (2xC9'), 146.1 (2xC2), 166.0 (2xC8), 167.1 (2xC6), 181.7 (2xC3).



1,10-Bis{(Z)-N-cyclohexylmethyl-3'-[(2,3-dihydro-3-oxobenzofuran-2-yl)methylene]indol-5'-yl}-1,4,7,10-tetraoxadecane (66). The crude product was prepared according to the general procedure starting from **62** (50 mg, 0.13 mmol) and **63a** (31 mg, 0.07 mmol). After purification by preparative TLC on silica gel (cyclohexane/DCM/MeOH 50:48:2), the pure product (26 mg, 0.03 mmol, 45%) was obtained as a brown powder. $R_f = 0.40$ (50:48:2 cyclohexane/DCM/MeOH). **m.p.** 111 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.94-1.24 (m, 10H, H2''a, H3''a, H4''a, H5''a, H6''a), 1.55-1.79 (m, 10H, H2''b, H3''b, H4''b, H5''b, H6''b), 1.81-1.98 (m, 2H, H1''), 3.77-3.88 (m, 4H, 2xO-CH₂), 3.88-4.03 (m, 8H, 2xN-CH₂, 2xO-CH₂), 4.24 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H, 2xO-CH₂), 6.98 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 2H, H5'), 7.19 (ddd, $J = 8.5, 7.6, 0.5$ Hz, 2H, H5), 7.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H4'), 7.31-7.38 (m, 6H, -CH=, H7, H7'), 7.60 (ddd, $J = 8.5, 7.3, 1.4$ Hz, 2H, H6), 7.82 (dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 2H, H4), 7.92 (s, 2H, H2'). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 25.8 (2xC3'', 2xC5''), 26.3 (2xC4''), 31.1 (2xC2'', 2xC6''), 38.8 (2xC1''), 54.0 (2xN-CH₂), 68.3, 70.1, 71.1 (6xO-CH₂), 102.0 (2xC7'), 108.1 (2x-CH=), 108.5 (2xC8'), 111.4 (2xC7), 112.8 (2xC4'), 114.2 (2xC5'), 123.0 (2xC9), 123.2 (2xC5), 124.4 (2xC6), 128.8 (2xC1'), 132.0 (2xC9'), 134.7 (2xC2'), 135.7 (2xC4), 144.9 (2xC2), 154.9 (2xC6'), 164.8 (2xC8), 182.9 (2xC3).

Bibliographie

- [1] E. Wallin, G. von Heijne, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1029–38.
- [2] J. P. Overington, B. Al-lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 993–996.
- [3] “Membrane proteins of known 3D structure.,” can be found under <http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc>, accessed 17/04/2017.
- [4] “Protein data bank.,” can be found under <http://www.rcsb.org>, accessed 17/04/2017.
- [5] D. U. Silverthorn, *Human Physiology - An Integrated Approach*, Pearson Benjamin Cummings, **2010**.
- [6] B. E. Gorter, F. Grendel, *J. Exp. Med.* **1925**, *41*, 439–443.
- [7] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *L'essentiel de La Biologie Cellulaire*, Lavoisier, **2012**.
- [8] G. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, The American Society For Microbiology, **2000**.
- [9] A. Oberai, Y. Ihm, S. Kim, J. U. Bowie, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1723–34.
- [10] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720–31.
- [11] S. Mukherjee, F. R. Maxfield, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, *20*, 839–866.
- [12] D. Lingwood, K. Simons, *Science* **2010**, *327*, 46–50.
- [13] A. P. Russ, S. Lampel, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1607–1610.
- [14] M. B. Ulmschneider, M. S. P. Sansom, A. Di Nola, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *59*, 252–265.
- [15] G. von Heijne, *EMBO J.* **1986**, *5*, 3021–3027.
- [16] J. Nilsson, B. Persson, G. von Heijne, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *60*, 606–616.
- [17] S. G. F. Rasmussen, B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, et al., *Nature* **2011**, *477*, 549–555.
- [18] M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter, K. Zeth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15370–15375.
- [19] L. Fagerberg, K. Jonasson, G. Von Heijne, M. Uhlén, L. Berglund, *Proteomics* **2010**, *10*, 1141–1149.
- [20] J. Koehler Leman, M. B. Ulmschneider, J. J. Gray, *Proteins* **2015**, *83*, 1–24.
- [21] D. E. Warschawski, A. A. Arnold, M. Beaugrand, A. Gravel, É. Chartrand, I. Marcotte, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**, *1808*, 1957–1974.
- [22] S. J. Opella, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *6*, 305–328.

- [23] Editorial, *Nat. Methods* **2015**, *13*, 1–1.
- [24] H. Stahlberg, N. Biyani, A. Engel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *581*, 68–77.
- [25] F. Liu, Z. Zhang, L. Csanády, D. C. Gadsby, J. Chen, *Cell* **2017**, *169*, 85–95.e8.
- [26] C. E. Paulsen, J. Armache, Y. Gao, Y. Cheng, D. Julius, *Nature* **2015**, *520*, 511–517.
- [27] Z. E. R. Newby, J. D. O’Connell, F. Gruswitz, F. A. Hays, W. E. C. Harries, I. M. Harwood, J. D. Ho, J. K. Lee, D. F. Savage, L. J. W. Miercke, et al., *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 619–37.
- [28] W. A. Hendrickson, *Nat Struct Mol Biol* **2016**, *23*, 464–467.
- [29] E. M. Landau, J. P. Rosenbusch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14532–14535.
- [30] F. Junge, B. Schneider, S. Reckel, D. Schwarz, V. Dötsch, F. Bernhard, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1729–1755.
- [31] A. Moeller, S. C. Lee, H. Tao, J. A. Speir, G. Chang, I. L. Urbatsch, C. S. Potter, B. Carragher, Q. Zhang, *Structure* **2015**, *23*, 450–460.
- [32] R. M. Bill, P. J. F. Henderson, S. Iwata, E. R. S. Kunji, H. Michel, R. Neutze, S. Newstead, B. Poolman, C. G. Tate, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 335–340.
- [33] M. Zoonens, J. Comer, S. Masscheleyn, E. Pebay-Peyroula, C. Chipot, B. Miroux, F. Dehez, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15174–15182.
- [34] E. E. Matthews, M. Zoonens, D. M. Engelman, *Cell* **2006**, *127*, 447–450.
- [35] V. Lounnas, T. Ritschel, J. Kelder, R. McGuire, R. P. Bywater, N. Foloppe, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**, *5*, 1–14.
- [36] R. Matar-Merheb, M. Rhimi, A. Leydier, F. Huché, C. Galián, E. Desuzinges-Mandon, D. Ficheux, D. Flot, N. Aghajari, R. Kahn, et al., *PLoS One* **2011**, *6*, 1–10.
- [37] J. Shonberg, R. C. Kling, P. Gmeiner, S. Löber, *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23*, 3880–3906.
- [38] F. Bernaudat, A. Frelet-Barrand, N. Pochon, S. Dementin, P. Hivin, S. Boutigny, J.-B. Rioux, D. Salvi, D. Seigneurin-Berny, P. Richaud, et al., *PLoS One* **2011**, *6*, e29191.
- [39] S. Schlegel, M. Klepsch, D. Gialama, D. Wickström, D. J. Slotboom, J.-W. de Gier, *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 403–11.
- [40] R. Sachse, S. K. Dondapati, S. F. Fenz, T. Schmidt, S. Kubick, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 2774–2781.
- [41] M.-L. Fogeron, V. Jirasko, S. Penzel, D. Paul, R. Montserret, C. Danis, D. Lacabanne, A. Badillo, J. Gouttenoire, D. Moradpour, et al., *J. Biomol. NMR* **2016**, *65*, 87–98.
- [42] X. Zheng, S. Dong, J. Zheng, D. Li, F. Li, Z. Luo, *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 564–574.
- [43] D. J. Scott, L. Kummer, D. Tremmel, A. Plückthun, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 427–435.

- [44] J. A. Coleman, E. M. Green, E. Gouaux, *Nature* **2016**, 532, 334–339.
- [45] L. Esser, F. Zhou, K. M. Pluchino, J. Shiloach, J. Ma, W.-K. Tang, C. Gutierrez, A. Zhang, S. Shukla, J. P. Madigan, et al., *J. Biol. Chem.* **2016**, 292, 446–461.
- [46] T. Hino, S. Iwata, T. Murata, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, 23, 563–568.
- [47] G. G. Privé, G. E. Verner, C. Weitzman, K. H. Zen, D. Eisenberg, H. R. Kaback, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1994**, 50, 375–379.
- [48] C. K. Engel, L. Chen, G. G. Privé, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2002**, 1564, 38–46.
- [49] E. Chun, A. A. Thompson, W. Liu, C. B. Roth, M. T. Griffith, V. Katritch, J. Kunken, F. Xu, V. Cherezov, M. A. Hanson, et al., *Structure* **2012**, 20, 967–976.
- [50] J. L. Rigaud, D. Lévy, *Methods Enzymol.* **2003**, 372, 65–86.
- [51] P. Simeonov, S. Werner, C. Haupt, M. Tanabe, K. Bacia, *Biophys. Chem.* **2013**, 184, 37–43.
- [52] E. R. Geertsma, N. a B. Nik Mahmood, G. K. Schuurman-Wolters, B. Poolman, *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 256–266.
- [53] S. Velamakanni, Y. Yao, D. A. P. Gutmann, H. W. Van Veen, *Biochemistry* **2008**, 47, 9300–9308.
- [54] R. Ujwal, J. U. Bowie, *Methods* **2011**, 55, 337–341.
- [55] C. R. Sanders, G. C. Landis, *Biochemistry* **1995**, 34, 4030–4040.
- [56] C. R. Sanders, B. J. Hare, K. P. Howard, J. H. Prestegard, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 421–444.
- [57] S. Faham, J. U. Bowie, *J. Mol. Biol.* **2002**, 316, 1–6.
- [58] R. Ujwal, D. Cascio, J.-P. Colletier, S. Faham, J. Zhang, L. Toro, P. Ping, J. Abramson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 17742–7.
- [59] S. G. F. Rasmussen, H.-J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. P. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, et al., *Nature* **2007**, 450, 383–387.
- [60] P. J. Loll, *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.* **2014**, 70, 1576–1583.
- [61] A. Nath, W. M. Atkins, S. G. Sligar, *Biochemistry* **2007**, 46, 2059–2069.
- [62] T. H. Bayburt, S. G. Sligar, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 1721–1727.
- [63] I. G. Denisov, S. G. Sligar, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 4669–4713.
- [64] F. Hagn, M. Etzkorn, T. Raschle, G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1919–1925.
- [65] J. M. Dörr, S. Scheidelaar, M. C. Koorengel, J. J. Dominguez, M. Schäfer, C. A. van Walree, J. A. Killian, *Eur. Biophys. J.* **2016**, 45, 3–21.

- [66] T. Kolter, K. Sandhoff, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1700–1712.
- [67] K. Popovic, J. Holyoake, R. Pomès, G. G. Privé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 2908–12.
- [68] J. Frauenfeld, R. Löving, J.-P. Armache, A. F.-P. Sonnen, F. Guettou, P. Moberg, L. Zhu, C. Jegerschöld, A. Flayhan, J. A. G. Briggs, et al., *Nat. Methods* **2016**, *13*, 345–51.
- [69] C. Tribet, R. Audebert, J. L. Popot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 15047–15050.
- [70] J. L. Popot, T. Althoff, D. Bagnard, J. L. Baneres, P. Bazzacco, E. Billon-Denis, L. J. Catoire, P. Champeil, D. Charvolin, M. J. Cocco, et al., *Annu Rev Biophys* **2011**, *40*, 379–408.
- [71] J. L. Popot, E. A. Berry, D. Charvolin, C. Creuzenet, C. Ebel, D. M. Engelman, M. Flötenmeyer, F. Giusti, Y. Gohon, P. Hervé, et al., *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 1559–1574.
- [72] M. Zoonens, L. J. Catoire, F. Giusti, J.-L. Popot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8893–8.
- [73] K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, et al., *Nature* **2012**, *482*, 547–551.
- [74] G. Fenalti, P. M. Giguere, V. Katritch, X.-P. Huang, A. a Thompson, V. Cherezov, B. L. Roth, R. C. Stevens, *Nature* **2014**, *506*, 191–196.
- [75] D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, F. M. Goñi, *Biophys. J.* **2013**, *105*, 289–299.
- [76] C. R. Sanders, K. Hoffmann, D. N. Gray, M. H. Keyes, C. D. Ellis, **2004**, *43537*, 423–426.
- [77] M. J. Rosen, J. T. Kunjappu, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley & Sons, Inc, **2012**.
- [78] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry for Life Science*, W.H. Freeman And Company, **2006**.
- [79] P. V. Escribá, *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 34–43.
- [80] G. G. Privé, *Methods* **2007**, *41*, 388–397.
- [81] A. Arouri, O. G. Mouritsen, *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 130–140.
- [82] D. A. Kallick., M. R. Tessmer., C. R. Watts., C. Y. Li., *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *109*, 60–65.
- [83] C. Klammt, F. Löhr, B. Schäfer, W. Haase, V. Dötsch, H. Rüterjans, C. Glaubitz, F. Bernhard, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 568–580.
- [84] Y. He, K. Wang, N. Yan, *Protein Cell* **2014**, *5*, 658–672.
- [85] C. Baron, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *382*, 276–285.
- [86] T. Vanaken, S. Foxall-Vanaken, S. Castleman, S. Ferguson-Miller, *Methods Enzymol.*

1986, 125, 27–35.

- [87] H. Tao, Y. Fu, A. Thompson, S. C. Lee, N. Mahoney, R. C. Stevens, Q. Zhang, *Langmuir* **2012**, 28, 11173–11181.
- [88] P. S. Chae, S. G. F. Rasmussen, R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, M. A. Goren, A. C. Kruse, S. Nurva, C. J. Loland, Y. Pierre, et al., *Nat. Methods* **2011**, 7, 1003–1008.
- [89] K. H. Cho, M. Husri, A. Amin, K. Gotfryd, H. J. Lee, J. Go, J. W. Kim, C. J. Loland, L. Guan, B. Byrne, et al., *Analyst* **2015**, 140, 3157–3163.
- [90] P. S. Chae, R. R. Rana, K. Gotfryd, S. G. F. Rasmussen, A. C. Kruse, K. H. Cho, S. Capaldi, E. Carlsson, B. Kobilka, C. J. Loland, et al., *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2261–2372.
- [91] D. T. McQuade, M. A. Quinn, S. M. Yu, A. S. Polans, M. P. Krebs, S. H. Gellman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 758–761.
- [92] A. Sadaf, K. H. Cho, B. Byrne, P. S. Chae, *Methods Enzymol.* **2015**, 557, 57–94.
- [93] Q. Zhang, X. Ma, A. Ward, W. X. Hong, V. P. Jaakola, R. C. Stevens, M. G. Finn, G. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7023–7025.
- [94] S. C. Lee, B. C. Bennett, W.-X. Hong, Y. Fu, K. a Baker, J. Marcoux, C. V Robinson, A. B. Ward, J. R. Halpert, R. C. Stevens, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, E1203-11.
- [95] Q. Zhang, H. Tao, W.-X. Hong, *Methods* **2011**, 55, 318–323.
- [96] G. G. Privé, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 379–385.
- [97] H. Tao, S. C. Lee, A. Moeller, R. S. Roy, F. Yiu, R. C. Stevens, C. S. Potter, B. Carragher, Q. Zhang, C. Biology, et al., *Nat. Methods* **2013**, 10, 759–761.
- [98] X. Zhao, Y. Nagai, P. J. Reeves, P. Kiley, H. G. Khorana, S. Zhang, J. M. Buchanan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 17707–17712.
- [99] J. I. Yeh, S. Du, A. Tortajada, J. Paulo, S. Zhang, *Biochemistry* **2005**, 44, 16912–16919.
- [100] M. Abla, G. Durand, B. Pucci, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 8142–8153.
- [101] I. Mus-Veteau, P. Demange, F. Zito, *Membrane Protein Production for Structural Analysis*, **2014**.
- [102] R. Zana, *Dynamics of Surfactant Self-Assemblies*, **2005**.
- [103] V. Shevchenko, I. Gushchin, V. Polovinkin, E. Round, V. Borshchevskiy, P. Utrobin, A. Popov, T. Balandin, G. Büldt, V. Gordeliy, *PLoS One* **2014**, 9, e112873.
- [104] R. M. Garavito, S. Ferguson-Miller, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 32403–32406.
- [105] S. Lee, A. Mao, S. Bhattacharya, N. Robertson, R. Grisshammer, C. G. Tate, N. Vaidehi, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 15425–15433.
- [106] W. X. Hong, K. A. Baker, X. Ma, R. C. Stevens, M. Yeager, Q. Zhang, *Langmuir*

2010, 26, 8690–8696.

- [107] P. S. Chae, H. E. Bae, M. Das, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12300–12303.
- [108] M. Das, Y. Du, O. Ribeiro, P. Hariharan, J. S. Mortensen, D. Patra, G. Skiniotis, C. J. Loland, L. Guan, B. K. Kobilka, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 3072–3081.
- [109] A. Sadaf, J. S. Mortensen, S. Capaldi, E. Tikhonova, P. Hariharan, O. de Castro Ribeiro, C. J. Loland, L. Guan, B. Byrne, P. S. Chae, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 1933–1939.
- [110] H. Hussain, Y. Du, N. J. Scull, J. S. Mortensen, J. Tarrasch, H. E. Bae, C. J. Loland, B. Byrne, B. K. Kobilka, P. S. Chae, *Chem. - A Eur. J.* **2016**, 22, 7068–7073.
- [111] M. Ehsan, Y. Du, N. J. Scull, E. Tikhonova, J. Tarrasch, J. S. Mortensen, C. J. Loland, G. Skiniotis, L. Guan, B. Byrne, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 3789–3796.
- [112] P. S. Chae, M. J. Wander, K. H. Cho, P. D. Laible, S. H. Gellman, *Mol. BioSyst.* **2013**, 9, 626–629.
- [113] K. H. Cho, Y. Du, N. J. Scull, P. Hariharan, K. Gotfryd, C. J. Loland, L. Guan, B. Byrne, B. K. Kobilka, P. S. Chae, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21, 10008–10013.
- [114] K. Suwinska, O. Shkurenko, C. Mbemba, A. Leydier, S. Jebors, A. W. Coleman, R. Matar, P. Falson, *New J. Chem.* **2008**, 32, 1988.
- [115] R. Burt, M. Thomas, R. L. Street, *Ep 2 307 724 b1 (12)*, **2012**.
- [116] G. von Heijne, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 909–918.
- [117] V. Chaptal, F. Delolme, A. Kilburg, S. Magnard, C. Montigny, M. Picard, C. Prier, L. Monticelli, O. Bornert, M. Agez, et al., *Sci. Rep.* **2017**, 7, 41751.
- [118] Amel MEGUELLATI, *Synthèse de Biomolécules Agissant Comme Inhibiteurs de l'ARN Polymérase ARN-Dépendante Du Virus de L'hépatite C et Développement de Nouveaux Surfactants Comme Stabilisants Des Protéines Membranaires Par Réseaux de Ponts Salins*. Th : Chimie-Biologie ; Grenoble ; 2015 ; 206 p.
- [119] P. Sjölin, S. K. George, K.-E. Bergquist, S. Roy, A. Svensson, J. Kihlberg, V. H. Engelhard, H. M. Grey, A. Sette, S. Buus, et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 57, 1731–1742.
- [120] P. Sjölin, J. Kihlberg, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2957–2965.
- [121] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.
- [122] P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 4905–4979.
- [123] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 1128–1137.
- [124] M. Goodman, W. J. McGahren, *Tetrahedron* **1967**, 23, 2031–2050.
- [125] M. Goodman, L. Levine, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2918–2922.
- [126] M. Goodman, K. C. Stueben, *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3409–3416.
- [127] A. Ohta, N. Ozawa, S. Nakashima, T. Asakawa, S. Miyagishi, *Colloid Polym. Sci.*

- 2003**, *281*, 363–369.
- [128] M. P. Glenn, L. K. Pattenden, R. C. Reid, D. P. Tyssen, J. D. A. Tyndall, A. Christopher J. Birch, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 371–381.
- [129] M. Munteanu, S. Choi, H. Ritter, *Macromolecules* **2008**, *41*, 9619–9623.
- [130] C. Shao, X. Wang, Q. Zhang, S. Luo, J. Zhao, Y. Hu, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6832–6836.
- [131] C. Shao, X. Wang, J. Xu, J. Zhao, Q. Zhang, Y. Hu, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7002–7005.
- [132] J. A. F. Joosten, N. T. H. Tholen, F. Ait El Maate, A. J. Brouwer, G. W. van Esse, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, R. J. Pieters, *European J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 3182–3185.
- [133] H. Yamamoto, M. Oda, M. Nakano, N. Watanabe, K. Yabiku, M. Shibutani, M. Inoue, H. Imagawa, M. Nagahama, S. Himeno, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 381–385.
- [134] J. Oudar, *Catal. Rev.* **1980**, *22*, 171–195.
- [135] K. P. Ananthapadmanabhan, E. D. Goddard, N. J. Turro, P. L. Kuo, *Langmuir* **1985**, *1*, 352–355.
- [136] A. Chattopadhyay, E. London, *Anal. Biochem.* **1984**, *139*, 408–412.
- [137] E. Steinfels, C. Orelle, J. R. Fantino, O. Dalmas, J. L. Rigaud, F. Denizot, A. Di Pietro, J. M. Jault, *Biochemistry* **2004**, *43*, 7491–7502.
- [138] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessières, A. Bolotin, S. Borchert, et al., *Nature* **1997**, *390*, 249–256.
- [139] M. Chami, E. Steinfels, C. Orelle, J.-M. Jault, A. Di Pietro, J.-L. Rigaud, S. Marco, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 1075–1085.
- [140] S. Ravaud, M.-A. Do Cao, M. Jidenko, C. Ebel, M. Le Maire, J.-M. Jault, A. Di Pietro, R. Haser, N. Aghajari, *Biochem. J.* **2006**, *395*, 345–53.
- [141] K. J. Linton, C. F. Higgins, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2007**, *453*, 555–567.
- [142] M. A. Seeger, A. Schiefner, T. Eicher, F. Verrey, K. Diederichs, K. M. Pos, *Science* **2006**, *313*, 1295–1298.
- [143] M. de Lera Ruiz, Y.-H. Lim, J. Zheng, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3623–3650.
- [144] A. S. Doré, N. Robertson, J. C. Errey, I. Ng, K. Hollenstein, B. Tehan, E. Hurrell, K. Bennett, M. Congreve, F. Magnani, et al., *Structure* **2011**, *19*, 1283–1293.
- [145] V.-P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. T. Chien, J. R. Lane, A. P. IJzerman, R. C. Stevens, *Science* **2008**, *322*, 1211–1217.
- [146] Y. Ashok, R. T. Nanekar, V.-P. Jaakola, *Methods Enzymol.* **2013**, *520*, 175–198.
- [147] B. Sun, P. Bachhawat, M. L.-H. Chu, M. Wood, T. Ceska, Z. A. Sands, J. Mercier, F. Lebon, T. S. Kobilka, B. K. Kobilka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 2066–

2071.

- [148] F. Xu, H. Wu, V. Katritch, G. W. Han, K. A. Jacobson, Z.-G. Gao, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Science* (80-.). **2011**, 332, 322–327.
- [149] E. Steinfelds, C. Orelle, O. Dalmas, F. Penin, B. Miroux, A. Di Pietro, J.-M. Jault, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1565, 1–5.
- [150] S. Wagner, M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Högbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 14371–14376.
- [151] G. Psakis, J. Polaczek, L.-O. Essen, *J. Struct. Biol.* **2009**, 166, 107–111.
- [152] F. Centeno, S. Deschamps, A.-M. Lompré, M. Anger, M.-J. Moutin, Y. Dupont, M. G. Palmgren, J. M. Villalba, J. V. Møller, P. Falson, et al., *FEBS Lett.* **1994**, 354, 117–122.
- [153] I. E. Valverde, F. Lecaille, G. Lalmanach, V. Aucagne, A. F. Delmas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 718–722.
- [154] R. Mancusso, N. K. Karpowich, B. K. Czyzewski, D.-N. Wang, *Methods* **2011**, 55, 324–9.
- [155] D. C. Rees, A. D. Robertson, *Protein Sci.* **2001**, 10, 1187–1194.
- [156] G. Lebon, T. Warne, P. C. Edwards, K. Bennett, C. J. Langmead, A. G. W. Leslie, C. G. Tate, *Nature* **2011**, 474, 521–525.
- [157] R. Allikmets, B. Gerrard, A. Hutchinson, M. Dean, *Hum. Mol. Genet.* **1996**, 5, 1649–1655.
- [158] E. Baiceanu, G. Crisan, F. Loghin, P. Falson, *Future Med. Chem.* **2015**, 7, 2041–2063.
- [159] K. Jemnitz, K. Heredi-Szabo, J. Janossy, E. Ioja, L. Vereczkey, P. Krajcsi, *Drug Metab. Rev.* **2010**, 42, 402–436.
- [160] I. N. Dubin, F. B. Johnson, *Medicine (Baltimore)*. **1954**, 33, 155–97.
- [161] J. Rengelshausen, C. Göggelmann, J. Burhenne, K.-D. Riedel, J. Ludwig, J. Weiss, G. Mikus, I. Walter-Sack, W. E. Haefeli, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, 56, 32–8.
- [162] P. K. Smitherman, A. J. Townsend, T. E. Kute, C. S. Morrow, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 308, 260–267.
- [163] J.-S. Hulot, E. Villard, A. Maguy, V. Morel, L. Mir, I. Tostivint, D. William-Faltaos, C. Fernandez, S. Hatem, G. Deray, et al., *Pharmacogenet. Genomics* **2005**, 15, 277–85.
- [164] F. Tang, K. Horie, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **2002**, 19, 765–772.
- [165] R. K. Vadlapatla, A. D. Vadlapudi, D. Kwatra, D. Pal, A. K. Mitra, *Int. J. Pharm.* **2011**, 420, 26–33.
- [166] H. M. Wortelboer, M. Usta, A. E. Van Der Velde, M. G. Boersma, B. Spenkelink, J. J. Van Zanden, I. M. C. M. Rietjens, P. J. Van Bladeren, N. H. P. Cnubben, *Chem. Res.*

- Toxicol.* **2003**, *16*, 1642–1651.
- [167] S.-M. Huang, J. M. Strong, L. Zhang, K. S. Reynolds, S. Nallani, R. Temple, S. Abraham, S. Al Habet, R. K. Baweja, G. J. Burckart, et al., *J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *48*, 662–670.
- [168] “EMA Guideline on the investigation of drug interactions,” can be found under http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf, **2012**.
- [169] K. M. Giacomini, S.-M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. R. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 215–236.
- [170] A. Boumendjel, S. Macalou, G. Valdameri, A. Pozza, C. Gauthier, O. Arnaud, E. Nicolle, S. Magnard, P. Falson, R. Terreux, et al., *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3387–3401.
- [171] G. Valdameri, E. Genoux-Bastide, B. Peres, C. Gauthier, J. Guitton, R. Terreux, S. M. B. Winnischofer, M. E. M. Rocha, A. Boumendjel, A. Di Pietro, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 966–970.
- [172] E. Winter, P. Devantier Neuenfeldt, L. D. Chiaradia-Delatorre, C. Gauthier, R. A. Yunes, R. J. Nunes, T. B. Creczynski-Pasa, A. Di Pietro, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2930–2941.
- [173] O. Arnaud, A. Koubeissi, L. Ettouati, R. Terreux, G. Alamé, C. Grenot, C. Dumontet, A. Di Pietro, J. Paris, P. Falson, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6720–6729.
- [174] M. L. Falcone Ferreyra, S. P. Rius, P. Casati, *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 222.
- [175] R. Haudecoeur, A. Boumendjel, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2012**, *19*, 2861–2875.
- [176] H. Sekizaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 1407–1409.
- [177] N. N. Agrawal, P. A. Soni, *Indian J. Chem.* **2006**, *45B*, 1301–1303.
- [178] H. Harkat, Aurélien Blanc, J.-M. Weibel, P. Pale, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1620–1623.
- [179] G. A. Kraus, V. Gupta, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5278–5280.
- [180] S. Okombi, D. Rival, S. Bonnet, A. M. Mariotte, E. Perrier, A. Boumendjel, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 329–333.
- [181] T. A. Geissman, J. B. Harborne, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4622–4624.
- [182] R. S. Varma, M. Varma, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5937–5940.
- [183] Romain HAUDECOEUR, *Pharmacochimie Des Aurones Pour La Modulation D’enzymes*. Th : Chimie-Biologie ; Grenoble ; 2011, 293 p.
- [184] C. L. Sutton, Z. E. Taylor, M. B. Farone, S. T. Handy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 901–903.

- [185] E. U. Mughal, A. Sadiq, S. Murtaza, H. Rafique, M. N. Zafar, T. Riaz, B. A. Khan, A. Hameed, K. M. Khan, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 100–106.
- [186] G. Priyadarshani, A. Nayak, S. M. Amrutkar, S. Das, S. K. Guchhait, C. N. Kundu, U. C. Banerjee, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, acsmedchemlett.6b00242.
- [187] L. Lunven, H. Bonnet, S. Yahiaoui, W. Yi, M. Peuchmaur, S. Chierici, *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 995–1003.
- [188] R. Haudecoeur, M. Carotti, A. Gouron, M. Maresca, E. Buitrago, R. Hardré, E. Bergantino, H. Jamet, C. Belle, M. Réglier, et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *8*, 55–60.
- [189] A. Meguellati, A. Ahmed-Belkacem, W. Yi, R. Haudecoeur, M. Crouillère, R. Brillet, J. M. Pawlotsky, A. Boumendjel, M. Peuchmaur, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 579–592.
- [190] H. M. Sim, K. Y. Loh, W. K. Yeo, C. Y. Lee, M. L. Go, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 713–724.
- [191] H.-M. Sim, C.-P. Wu, S. V. Ambudkar, M.-L. Go, *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1562–1571.
- [192] K. F. Chan, I. L. K. Wong, J. W. Y. Kan, C. S. W. Yan, L. M. C. Chow, T. H. Chan, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1999–2014.
- [193] Z. E. Sauna, M. B. Andrus, T. M. Turner, S. V. Ambudkar, *Biochemistry* **2004**, *43*, 2262–2271.
- [194] K. F. Chan, Y. Zhao, B. A. Burkett, I. L. K. Wong, L. M. C. Chow, T. H. Chan, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6742–6759.
- [195] I. L. K. Wong, K. F. Chan, H. T. Ka, Y. L. Chi, Y. Zhao, H. C. Tak, L. M. C. Chow, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5311–5322.
- [196] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14640–14648.
- [197] M. Pittelkow, J. B. Christensen, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1295–1298.
- [198] C. Boyère, G. Broze, C. Blecker, C. Jérôme, A. Debuigne, *Carbohydr. Res.* **2013**, *380*, 29–36.
- [199] G. Milkereit, V. Vill, *J. Carbohydr. Chem.* **2006**, *25*, 615–632.
- [200] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- [201] Y. Ashok, R. Nanekar, V.-P. Jaakola, *Protein Eng. Des. Sel.* **2015**, *28*, 539–542.
- [202] E. Desuzinges Mandon, M. Agez, R. Pellegrin, S. Igonet, A. Jawhari, *Anal. Biochem.* **2017**, *517*, 40–49.
- [203] S. Igonet, et al, (*submitted*).

[204] W. Kabsch, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.

[205] P. R. Evans, G. N. Murshudov, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 1204–1214.

KIM ANH NGUYEN^a

SYNTHÈSE DE NOUVEAUX DÉTERGENTS EXTRACTANTS ET STABILISANTS DES
PROTÉINES MEMBRANAIRES ET SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS D'AURONES COMME
INHIBITEURS D'ABCC2

Résumé : L'obtention de la structure tridimensionnelle des protéines membranaires (PMs) est cruciale pour la chimie médicinale et la biochimie. Afin de maintenir les PMs en solution, et donc d'éviter leur agrégation, pour les études structurales et fonctionnelles, l'utilisation de détergents est indispensable. Cependant, la conformation des PMs en complexe avec les détergents pourrait être très différente de celle dans la membrane. Afin de proposer des détergents capables de maintenir les PMs dans leur état fonctionnel après extraction, nous avons conçu et synthétisé une nouvelle famille de détergents, dans lesquels des carboxylates incorporés et qui pourraient générer un réseau de ponts salins avec les acides aminés basiques des PMs, entraînant des interactions plus étroites qui pourraient préserver leur structure native. Les détergents dans lesquels la glycoconjugation a été réalisée par la réaction de cycloaddition d'azide-alkyne (CuAAC) catalysée par le Cu (I) ont montré une capacité remarquable à extraire, stabiliser et cristalliser les PMs étudiées. D'autre part, de nouveaux inhibiteurs efficaces d'ABCC2, une PM non cristallisée à ce jour, ont été identifiés par criblage : les 2-indolylméthylènebenzofuranones. Une étude de pharmacomodulation sur cette famille de composés a été effectuée. De tels composés pourraient être considérés comme des outils pour étudier le rôle d'ABCC2 dans la pharmacocinétique des médicaments.

Mots clé : détergents, protéines membranaires, aurones, ABCC2, inhibiteurs.

SYNTHESIS OF NOVEL DETERGENTS FOR EXTRACTION AND STABILIZATION OF
MEMBRANE PROTEINS AND SYNTHESIS OF AURONE DERIVATIVES AS ABCC2 INHIBITORS

Abstract: Understanding of tridimensional structure of membrane proteins (MPs) is crucial in medicinal chemistry and biochemistry. To maintain them in solution and consequently to prevent them from aggregation for structural and functional studies, utilization of detergents is indispensable. However, the conformation of MPs in complex with detergents could be very different from its membrane-embedded one. In the aim to propose detergents being able to maintain the PMs in their functional state after extraction, we conceived and synthesized new family of detergents, in which the incorporated carboxylates could generate a network of salt-bridges with basic-residue-enriched region of MPs, confer tighter interactions which could preserve their structural integrity. The detergents in which the glycoconjugation was achieved by Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction showed remarkable capacity to extract, stabilize and crystallize studied PMs. On the other hand, novel inhibitors of ABCC2, a non-crystallized MP to date, were identified by screening: the 2-indolylmethylenebenzofuranones. A pharmacomodulation study of this family of compounds has been conducted. Such compounds could be considered as useful tools to further investigate the role of ABCC2 in the pharmacokinetics of drugs.

Key words: detergents, membrane proteins, aurones, ABCC2, inhibitors.

^a Equipe MedChem, Département de Pharmacochimie Moléculaire (CNRS-UMR 5063)
470 rue de la chimie, BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France