



HAL
open science

Conception de composés amphiphiles modulateurs du canal SK3

Alicia Bauduin

► **To cite this version:**

Alicia Bauduin. Conception de composés amphiphiles modulateurs du canal SK3. Chimie organique. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2020. Français. NNT : 2020BRES0057 . tel-03551872

HAL Id: tel-03551872

<https://theses.hal.science/tel-03551872>

Submitted on 2 Feb 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : Chimie Moléculaire et Macromoléculaire

Par

Alicia BAUDUIN

Conception de composés amphiphiles modulateurs du canal SK3

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 5 novembre 2020

Unité de recherche : UMR 6521 CNRS – UBO – Laboratoire CEMCA – Equipe COSM

Rapporteurs avant soutenance :

Florence DJEDAÏNI-PILARD Professeur, Laboratoire LG2A, Université de Picardie
Jean-Maurice MALLET Directeur de recherche, Laboratoire LBM, ENS Paris

Composition du Jury :

Président : Christophe VANDIER Professeur, Laboratoire N2C, Université de Tours
Examineurs : Florence DJEDAÏNI-PILARD Professeur, Laboratoire LG2A, Université de Picardie
Jean-Maurice MALLET Directeur de recherche, Laboratoire LBM, ENS Paris
Dir. de thèse : Hélène COUTHON Maître de Conférences HDR, Université de Bretagne Occidentale, Brest
Co-dir. de thèse : Paul-Alain JAFFRES Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest

Invité(s)

Laure DESCHAMPS Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale, Brest

Remerciements

Mes premiers remerciements ainsi que toute ma reconnaissance vont sans aucun doute à mes directeurs de thèse, le Pr. Paul-Alain Jaffrès et le Dr. Hélène Couthon, pour la confiance qu'ils m'ont donnée et ce, depuis mon stage de Master II. Je les remercie également pour tous leurs judicieux conseils de qualités, leur patience et leur disponibilité à mon égard ! Enfin, merci d'avoir eu une oreille attentive lorsque cela a été nécessaire.

Je remercie ensuite chaleureusement mes deux rapporteurs, le Pr. Florence Djedaïni-Pilard et le Dr. Jean-Maurice Mallet, pour avoir accepté d'évaluer ce travail mais aussi pour leur lecture attentive du sujet ce qui a permis des remarques / conseils précieux pour la bonne évolution du projet. Je leur adresse ma profonde sympathie.

Merci à Laure pour avoir acceptée de faire partie de mon jury mais aussi pour tous tes conseils sur les analogues fluo, pour m'avoir accueillie à Quimper pour réaliser les études de fluorescence.

Ce projet ne serait pas ce qu'il est sans des collaborations solides, je tiens à remercier particulièrement le Pr. Christophe Vandier, pour avoir accepté de faire partie de mon jury mais aussi pour avoir pris le temps de m'accueillir à Tours le temps d'une semaine ! Merci pour ton accueil, ta bonne humeur, ton enthousiasme et ta gentillesse sans faille. Je tiens également à remercier le Dr. Aurélie Chantôme, qui a dû fournir un travail considérable avec nos composés, je te remercie aussi d'avoir pris le temps de t'occuper de moi pendant cette fameuse semaine d'observation !

Je remercie très chaleureusement le Dr. José Requejo-Isidro et le Dr. Ana Bouchet pour m'avoir accueilli à Madrid mais aussi pour leur gentillesse, leur bonne humeur et pour les nouvelles compétences qu'ils m'ont permis d'acquérir !

Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l'équipe PLV avec une mention spéciale pour Wilfried, merci de ta patience et de ton calme inébranlable et inégalable ainsi que pour tout le soutien moral que tu as pu m'apporter. Nos pauses café vont me manquer.

Dorsaf, Montassar, futurs PhD de l'équipe, merci d'avoir partagé le bureau avec moi, je vous souhaite le meilleur pour la suite, et surtout ne lâchez rien ! Merci à Amal également, même si tu es maintenant en Belgique, je ne t'oublie pas.

Nadège, ma très chère copine de couloir, nos discussions (allant parfois jusqu'à très tard le soir) vont me manquer. Je te souhaite vraiment tout le meilleur du monde, tu es l'une des plus belles personnes que j'ai pu rencontrer à Brest et j'espère très sincèrement que tu obtiendras ce que tu souhaites.

Aux membres du deuxième étage (Dany, Mathieu, Carlos, Noémie, Nicolas, Laurianne, Antony, Nolwenn...) avec qui j'ai partagé je ne sais combien de repas le midi, repas qui ont permis pour certains d'entre eux de devenir plus que des collègues de travail, merci pour ces bons moments de détente et pour les nombreuses dégustations de tous ces « bons » gâteaux réalisés (avec une mention spéciale pour le flan pistache qui ressemblait à tout sauf à un flan, je vais longtemps le garder en mémoire celui là =D).

Un grand merci à Nelly pour ton optimisme, ta positive attitude et ta joie de vivre et ce, quoi qu'il arrive ! C'est toujours un réel plaisir de discuter avec toi ! Tu illumines les couloirs à chaque fois que tu y passes ! (PS : Merci aussi pour mes spectres de masse ☺).

Merci à Stéphane et Gaëlle du pôle RMN, pour tous les échanges constructifs que nous avons pu avoir au cours de ces 3 ans ½ !

Merci également aux membres du 3^{ème} étage et particulièrement à Cédric, Nicolas, Catherine et Émeline. Merci pour vos bons conseils, votre bonne humeur et pour votre présence tout simplement.

On dit toujours que l'on n'a rien sans rien, eh bien ! personnellement, je ne serais rien sans ma famille. Maman, Papa, Baptise, MERCI ! sans vous, je n'aurais jamais pu arriver jusqu'ici.

Charlotte, Flo, Mélissa, Will que dire.. à part que je suis plus que ravie de vous compter dans mon cercle d'amis proches. Merci pour tous ses moments d'échanges, ces soirées jeux, Halloween ou même tout simplement pour ces soirées organisées à la bonne franquette juste pour discuter et rigoler ! Il n'y a que ça de vrai. C'est un crève-cœur de savoir que l'on va se retrouver loin de tout ça et de vous d'ici peu de temps. Néanmoins, la route ne sera pas un frein et j'espère vous revoir très rapidement (en chair et en os cette fois-ci et pas qu'au travers nos échanges en visio !).

Enfin, je remercie Dany, mon chéri, mon meilleur ami et futur mari, merci de ton soutien indescriptible, d'avoir toujours trouvé les bons mots pour me pousser à aller de l'avant et merci de ta présence dans les bons comme dans les mauvais moments.

Liste des Abréviations

2-LCP : 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine

A

AA: Acides Aminés

Ach: acetylcholine

ADN: Acide désoxyribo nucléique

AELs: Alkyl-éthers-lipides

AGPI: Acide Gras Poly Insaturé

AGPLs: alkyl-glycérophospholipides

AKGs: Alkylglycérols

APC: Alkylphosphocholine

APLs: Alkylphospholipides

B

BKCa: Big Conductance Activated Potassium Channel

BLI: Imagerie de bioluminescence

Bn: Benzyle

BODIPY®: Borre-dipyrrrométhène

C

CAM : Calmoduline

CCM: Chromatographie sur couche mince

CMAC: Complexe d'Adhésion Cellule-Matrice

Chol: cholestérol

D

DAGs: Diacylglycérols

DISC: Death-inducing signaling complex

DMF: dimethylformamide

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DTM: Domaine transmembranaire

E

Edelfosine: 1-O-octadécyl-2-O-méthyl- rac-glycéro-3-phosphocholine

EL: Éther Lipide

G

GYG: Glycine – Tyrosine -Glycine

I

IKCa: Intermediate Conductance Activated Potassium Channel

IR: Infra-rouge

K

KCa: Calcium activated potassium channel

M

MALDI TOF: Matrix assisted laser desorption / ionization Time-of-flight

MDA-MB-453s: Cellules cancéreuses mammaires hautement métastasiantes

MEC: Matrice Extra-Cellulaire

MLCK: Myosin light Chain Kinase

mM: Millimolaire

MP: Membrane Plasmique

MPs: Metalloprotéinases

MP: Membrane Plasmique

MS: mass spectrometry

N

nAChR: Récepteur nicotinique de l'AcétylCholine

NBD: N-4-NitroBenzo-2-oxa-1,3-Diazole

nM: Nanomolaire

Ohmline: 1-*O*-hexadécyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3- β - lactose

P

PAF: Platelet- activating factor (1-*O*-hexadécyl-2-*O*-acétyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine)

POPC: Phosphatidylcholine

pS: picoseconde

PL: Phospholipides

R

RE: Réticulum Endoplasmique

Rf : rapport frontal

RMN: résonance magnétique nucléaire

S

SKCa: Small Conductance Activated Potassium Channel

SK1: Small Conductance Activated Potassium Channel de type 1

SK2: Small Conductance Activated Potassium Channel de type 2

SK3: Small Conductance Activated Potassium Channel de type 3

SK4: Small Conductance Activated Potassium Channel de type 4

SM: Sphingomyéline

Sn : stereochemical number

SNC: Système Nerveux Central

T

TEA: Tetraéthylammonium

THF: tétrahydrofurane

U

UV: Ultra-violet

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Contexte de l'étude.....	7
I. Généralités	9
I.1. Propriétés d'une cellule tumorale.....	9
I.1.1. Le cycle cellulaire	10
I.1.2. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse	11
I.1.3. Les métastases.....	12
I.1.3.1. Le processus de progression métastatique	12
I.1.3.2. La migration cellulaire	14
II. Rôle du calcium dans le développement des cancers.....	16
II.1. Importance des ions Ca^{2+}	16
II.2. Les canaux ioniques.....	17
II.2.1. Généralités.....	17
II.2.2. Les canaux potassiques.....	18
II.2.3. Les canaux SKCa	19
II.2.3.1. Généralités.....	19
II.2.3.2. Structure des canaux SKCa	21
II.2.3.3. Isoformes des canaux SKCa	21
II.2.3.4. Implication des canaux SKCa dans la migration cellulaire : cas du canal SK3	21
III. Modulations des canaux SKCa	22
III.1. Modulation par un effet allostérique.....	22
III.2. Modulation <i>via</i> un « effet bouchon »	22
III.3. Modulation par une modification de la sensibilité aux ions Ca^{2+}	22
III.4. Les éthers-lipides.....	22
III.4.1. Généralités.....	22
III.4.2. Les éthers-lipides anticancéreux naturels	30
III.4.3. Les éthers-lipides et lipides anticancéreux synthétiques	33
III.4.4. L'Edelfosine.....	34
III.4.4.1. Activités anti-tumorales et biomédicales.....	35
III.4.4.2. Diversités des mécanismes d'action.....	36
III.4.4.3. Edelfosine et modulation du canal SK3	37

III.4.4.4.	Efficacité et toxicité	39
III.4.4.5.	Études structure-activité de l'Edelfosine.....	40
a)	Analogues dépourvus de squelette glycérol	41
b)	Modulation de la position <i>sn-1</i>	42
c)	Modulation de la position <i>sn-2</i>	43
d)	Modulation de la position <i>sn-3</i>	43
e)	Analogue retenu.....	44
III.4.5.	L'Ohmline.....	45
III.4.5.1.	Effet sur la migration SK3 dépendante.....	45
III.4.5.2.	Modulation du courant ionique	46
III.4.5.3.	Test de viabilité cellulaire	46
III.4.5.4.	Sélectivité vis-à-vis des canaux SK3.....	47
III.4.5.5.	Effet de la stéréochimie de l'Ohmline.....	48
III.4.5.6.	Études in vivo.....	49
III.4.5.7.	Hypothèse de mécanisme d'action	50
III.4.6.	Étude de dynamisme moléculaire et RMN ² H	52
III.4.6.1.	Étude par RMN ² H.....	53
III.4.6.2.	Étude de dynamique moléculaire.....	56
	Objectif du projet de thèse.....	59
	Chapitre II : Analogues fluorescents de l'Ohmline : synthèses, évaluations biologiques et études biophysiques	61
I.	Généralités	63
I.1.	Localisation de la sonde fluorescente	65
I.2.	Les sondes fluorescentes.....	68
I.2.1.	Analogues d'alkyl-phosphocholines fluorescents	71
I.2.2.	Caractéristiques et applications du pyrène	73
II.	Synthèses des analogues fluorescents de l'Ohmline	75
II.1.	Synthèse du bloc aglycone	76
	Voie A : Synthèse à partir du pyrène méthanol.....	76
	Voie B : avec la sonde pyrène	77
II.2.	Activation du bloc glycone	80
II.2.1.	Réaction de glycosylation – Généralités.....	81
II.2.1.1.	Quelques méthodes de glycosylation connues	81
II.2.1.1.1.	La méthode Fisher.....	81
II.2.1.1.2.	La méthode Knoenigs et Knorr.....	82

II.2.1.1.3. La méthode des trichloroacétimidates	84
II.2.2. Activation du lactose par la méthode du trichloroacétimide	86
II.2.3. Réaction de glycosylation	87
III. Évaluations biologiques de OP1, OP2, OP3 et II.20	89
III.1. Études des composés sur l'inhibition du canal SK3.....	90
III.2. Étude des composés sur l'inhibition de la migration cellulaire.....	92
IV. Études de fluorescences des composés OP1, OP2 et OP3	94
IV.1. Étude en milieu aqueux.....	94
IV.2. Étude dans un environnement lipidique.....	95
IV.2.1. Protocole de pré- et post-insertion	95
IV.2.1.1. Cas du composé OP2	96
IV.2.1.2. Cas du composé OP3	98
IV.2.1.3. Cas du composé OP1	100
V. Études de microscopie.....	101
VI. Test de la protéinase K	104
VII. Conclusion	105
Experimental section	107
Chapitre 3 : Modulation de la position sn-1 de l'Ohmline par un motif bis(phényl)diazène.....	135
I. Généralités	135
I.1. Utilité de l'utilisation d'un motif azobenzène en pharmacologie – exemples.....	136
I.2. Propriété photochimique de l'azobenzène	138
I.3. Modification de la polarité induite par l'isomérisation.....	140
I.4. Mécanisme de la photo-isomérisation de l'azobenzène	141
I.5. Spectre d'absorption de l'azobenzène.....	143
I.6. Objectifs	144
II. Synthèse des amphiphiles comportant le motif azobenzène	146
III. Étude du composé III.9 sur l'inhibition du canal SK3	150
IV. Modification de la position du motif azobenzène – synthèse de nouveaux analogues	153
IV.1. Études des composés III.18a-c sur l'inhibition du canal SK3.....	155
IV.2. Études RMN du composé III.18c et quantification du pourcentage d'isomères Z/E	157
IV.2.1. RMN ¹ H du dérivé III.18c.....	157
IV.2.2. Quantification du pourcentage Z/E	159
IV.2.3. Spectre RMN Jmod du composé III.18c.....	161
V. Étude de la photo-isomérisation du composé III.18c.....	162
V.1. Étude du temps d'isomérisation minimale pour une conversion <i>cis</i> maximale	162

V.2. Comportement à la lumière naturelle du composé III.18c	163
V.3. Comportement du composé III.18c laissé dans le noir après une nuit d'irradiation	165
V.4. Étude de la cinétique de photo-réversion du composé III.18c	166
VI. Conclusion	168
Experimental section	171
Chapitre 4 : Modulation de la position sn-2 de l'Ohmline.....	195
I. Généralités – Objectifs	197
II. Synthèse de nouveaux analogues de l'Ohmline.....	199
II.1. Synthèse du 1- <i>O</i> -hexadecyl-2- <i>O</i> -ethyl- <i>rac</i> -glycero-3- β -lactose IV.5a et du 1- <i>O</i> -icosyl-2- <i>O</i> -ethyl- <i>rac</i> -glycero-3- β -lactose IV.5b.....	199
II.2. Synthèse 1- <i>O</i> -hexadecyl-2- <i>O</i> -benzyl- <i>rac</i> -glycero-3- β -lactose IV.12 et du 1- <i>O</i> -hexadecyl-2- <i>O</i> -fluorobenzyl- <i>rac</i> -glycero-3- β -lactose IV.16.....	202
II.3. Synthèse du 1- <i>O</i> -hexadecyl-2-azido- <i>rac</i> -glycero-3- β -lactose IV.21, du 1- <i>O</i> -hexadecyl-2-amino- <i>rac</i> -glycero-3- β -lactose IV.22 et du 1- <i>O</i> -hexadecyl-2-acetamido- <i>rac</i> -glycero-3- β -lactose IV.27.....	205
III. Évaluations par patch-clamp des nouveaux analogues.....	209
IV. Conclusion	210
Experimental section	213
Chapitre 5 : Modulation de l'oxygène de la position sn-1 par un motif thioéther, sulfoxyde ou sulfone.....	237
I. Généralités	239
II. Études de l'incorporation de l'Ohmline dans les tissus tumoraux.....	239
II.1. La barrière hémato-encéphalique.....	240
II.2. Canaux SKCa et le SNC.....	241
III. Métabolisation de l'Ohmline.....	243
IV. Résumé de l'article	245
V. Article : Thio-ether functionalized glycolipid amphiphilic compounds reveal a potent activator of SK3 channel with vasorelaxation effect.....	246
Conclusion Générale.....	297
Annexe.....	303

Introduction
Générale

Introduction générale

En 1862, un collectionneur Américain fait l'acquisition d'un des plus anciens papyrus égyptien auquel il donnera son nom « le papyrus d'Edwin Smith ». Ce papyrus daterait d'au moins 1600 ans av. J-C et serait le plus ancien texte connu décrivant des actes médicaux. En effet, pas moins de 48 actes chirurgicaux y sont détaillés. Parmi eux, les cas 39 à 46 correspondraient à la description du cancer du sein telle que nous la connaissons aujourd'hui¹. La maladie était donc déjà observée avant même qu'elle ne porte encore de nom.

Ce n'est que durant l'Antiquité que le médecin et philosophe grecque Hippocrate (460-370 av J.-C) met un terme sur cette maladie, dont la racine provient du latin « *Karkinos* » qui signifie crabe. En effet, il compara le cancer à un crabe par analogie à l'aspect des tumeurs mammaires avec cet animal et explique notamment que « *la tumeur est centrée par une formation arrondie entourée de prolongements en rayons semblables aux pattes d'un crabe* ».

En 2019, la présence d'un ostéosarcome très agressif proche de ceux développés chez l'homme a été mis en évidence sur une tortue fossile (*Pappochelys rosinae*) vivant il y a 237 millions d'années². Plus récemment encore, une équipe de paléontologues de l'Université de Liège a prouvé que les sauropodes, dinosaures herbivores quadrupèdes au long cou, possédaient le même type d'anomalie sur leur fémur³. Les espèces végétales sont également capables de développer des cancers. Ceux-ci sont issus d'une bactérie pathogène et portent le nom de « Crown-Gall » ou galle du collet⁴. Le cancer présente donc un certain caractère universel.

Celui-ci est issu d'un dérèglement génétique d'une cellule qui va obtenir la capacité de proliférer de façon anarchique et incontrôlée en développant des mécanismes de résistances aux processus de mort cellulaire. En 2018, la prévalence totale du nombre de personnes atteintes d'un cancer a poursuivi sa hausse en France métropolitaine, même si

¹ J. H. Breasted, **1930**, 634.

² Y. Haridy, F. Witzmann, P. Asbach, R. R. Schoch, N. Fröbisch, B. M. Rothschild, *JAMA Oncol.* **2019**, *5*, 425.

³ B. Jentgen-Ceschino, K. Stein, V. Fischer, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2020**, *375*, 20190143.

⁴ E. Foëx, *Rev. Bot. Appliquée Agric. Colon.* **1925**, *5*, 97-105.

celle-ci a tendance à se stabiliser grâce au développement de thérapies anti-cancéreuses innovantes qui améliorent le taux de survie des patients.

Chez les hommes, il reste la première cause de mortalité, dont le cancer du poumon suivi du colon et de la prostate sont les plus fréquents, tandis que chez la femme, il est la seconde cause de mortalité devant les maladies cardiovasculaires. Le cancer du sein est le plus fréquent suivi par les cancers pulmonaires et colorectaux⁵.

Le décès chez les patients atteints de cette pathologie est majoritairement dû à la formation et au développement des métastases (cellules cancéreuses issues de la tumeur primaire capables de migrer vers de nouveaux sites) d'où la nécessité de pouvoir endiguer, ou mieux, prévenir leur apparition.

De récentes études ont indiqué que les canaux ioniques, et plus particulièrement les canaux K^+ et Ca^{2+} , sont de nouvelles cibles originales et très encourageantes pour des thérapies ciblées anti-cancéreuses⁶. Le canal SK3, canal potassique de faible conductance activé par de faible concentration intracellulaire en calcium, est impliqué dans les phénomènes de migration cellulaires de cellules cancéreuses à haut pouvoir métastatique⁷.

Fait encore plus intéressant, la présence du canal SK3 n'est mise en évidence que sur les cellules tumorales mammaires et jamais sur les cellules saines⁷.

L'Edelfosine (Figure 1a), molécule amphiphile de type glycéro-phospholipidique possédant une tête polaire phosphocholine déjà connue pour ses propriétés anti-tumorigènes, a montré de bonnes capacités d'inhibition de l'activité du canal SK3 mais sa toxicité révélée à sa concentration biologique active a empêché son exploitation thérapeutique. Pour pallier à cette toxicité, une étude structure-activité a été menée au sein de notre laboratoire dont un des analogues de type glyco-glycéro-éther lipide, baptisé « Ohmline », a montré une toxicité négligeable à la concentration employée. Cette molécule s'est avérée être un analogue efficace dont les propriétés inhibitrices de l'activité du canal SK3 et la migration cellulaire sont conservées (Figure 1b).

⁵ Les cancers en France – Edition 2019 – Institut National du Cancer

⁶ N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 559–621.

⁷ M. Potier, V. Joulin, S. Roger, P. Besson, M.-L. Jourdan, J.-Y. LeGuennec, P. Bougnoux, C. Vandier, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2946–2953.

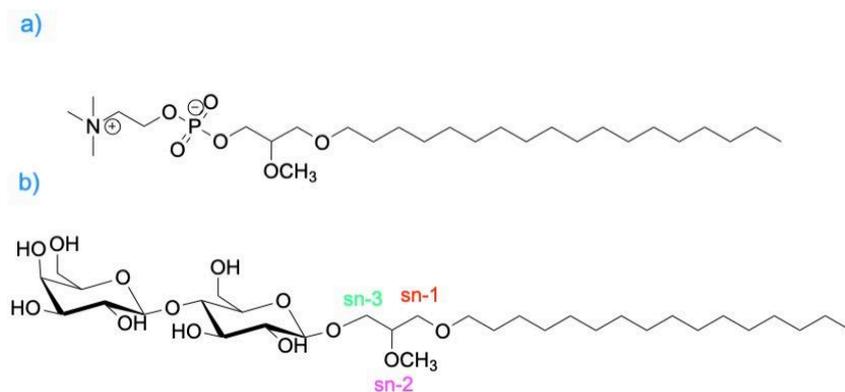


Figure 1: a) Structure de l'Edelfosine. b) Structure de l'Ohmlin.

Des études *in vivo* sur un modèle murin (xénogreffe de cellules cancéreuses mammaires humaines conduisant à la formation de métastases osseuses) ont montré l'inhibition du développement des métastases osseuses sans impact sur la tumeur primaire⁸. C'est pourquoi la protéine SK3 apparaît comme une nouvelle cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouvelles molécules à visées anti-cancéreuses dirigées contre le développement des métastases osseuses issues d'un cancer primaire du sein.

Ce manuscrit sera axé autour de 5 grands chapitres. Le chapitre I, à caractère bibliographique, s'agence en 3 parties. La première tentera d'apporter des informations sur les phénomènes responsables du processus de cancérisation et le développement des métastases. La seconde montrera l'importance du calcium, des protéines et plus particulièrement des canaux ioniques dans l'exacerbation de ce phénomène. Enfin, la dernière partie portera sur les composés élaborés pour moduler plus ou moins efficacement et sélectivement les canaux potassiques appartenant à la famille des canaux SKCa en abordant leur mécanisme d'action respectif.

Le second chapitre portera sur la synthèse d'analogues fluorescents de l'Ohmlin dont l'objectif est de mieux comprendre le mode d'action de cette molécule et sa localisation à l'échelle cellulaire. Les résultats biologiques ainsi que les études biophysiques seront également présentées.

⁸ A. Girault, J.-P. Haelters, M. Potier-Cartereau, A. Chantome, M. Pinault, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, G. Simon, H. Couthon-Gourves, P.-A. Jaffres, B. Corbel, P. Bougnoux, V. Joulin and C. Vandier, *Curr. Cancer Drug Targets*, **2011**, 11, 1111–1125.

Les chapitres III et IV porteront respectivement sur la synthèse de nouveaux analogues de l'Ohmlin dont les positions *sn-2* et *sn-1* ont été modulées. La modulation de la position *sn-2* par différentes fonctions chimiques (benzyle, amide, amine etc.) permettra, entre autres, de poursuivre les études structure-activité de cette molécule tandis que la modulation de la position *sn-1*, quant à elle, consistera en l'insertion d'un motif photo-isomérisable de type azobenzène, motif capable de s'isomériser ($E \leftrightarrow Z$) au contact d'une lumière à une longueur d'onde appropriée. La synthèse de ces analogues a pour but l'obtention des premières molécules « photoswitchables » capables de moduler efficacement et sélectivement les canaux SKCa, et dont le motif photo-isomérisable jouerait le rôle d'interrupteur « on-off » modulateur de canaux ioniques.

Pour terminer, le cinquième et dernier chapitre de ce manuscrit portera sur l'élaboration de nouveaux analogues de l'Ohmlin, dont la fonction éther présente en position *sn-1* a été substituée par une fonction thioéther, sulfoxyde ou bien sulfone. Les travaux effectués sont présentés sous la forme d'un article, soumis sous la référence : « *Thio-ether functionalized glycolipid amphiphilic compounds reveal a potent activator of SK3 channel with vasorelaxation effect* » C. M. Sevrain, D. Fontaine, A. Bauduin, M. Guéguinou, B. L. Zhang, A. Chantôme, K. Mahéo, C. Pasqualin, V. Maupoil, H. Couthon, C. Vandier, P.A. Jaffrès.

Chapitre 1 :
Contexte de l'étude

Chapitre I : Contexte de l'étude

I - Généralités

Les cancers sont la conséquence de multiples défaillances mécanistiques qui régissent la croissance, la prolifération et la mort cellulaire. Il ne résulte pas d'une origine unique mais de plusieurs mutations génétiques complexes et son incidence peut être exacerbée par de multiples facteurs « favorisants » tels que les facteurs : environnementaux (alcool, alimentation etc.), chimiques (traitements hormonaux - tabac etc.), physiques (rayonnement UV, radiation ionisante etc.) ou encore biologiques (prédisposition familiale – virus etc.). C'est donc un phénomène multiparamétrique. Cependant, la véritable malignité de cette maladie revient, dans 90% des cas, à la formation et au développement de métastases⁹. C'est pourquoi la mise au point de stratégies thérapeutiques visant à contrôler ou mieux inhiber leur formation et leur diffusion est l'un des défis majeurs de la recherche en oncologie.

I.1 Propriétés d'une cellule tumorale

Avant qu'une tumeur possède des propriétés métastasiantes, il peut se passer des mois, voire des années. Les caractéristiques principales d'une métastase sont, d'une part, sa capacité à proliférer de façon anarchique et incontrôlée et, d'autre part, sa faculté à se propager dans plusieurs tissus situés à distance de la tumeur mère. Pour obtenir ces caractéristiques, la cellule doit passer par une multitude d'étapes. Le processus d'oncogenèse, qui est constitué de 3 phases¹⁰ (l'initiation, la promotion et la progression) débute dans le cycle cellulaire de la cellule, qui possède une action essentielle dans la croissance et le développement des êtres vivants¹¹.

⁹ P. Mehlen, A. Puisieux, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 449–458.

¹⁰ H. Hennings, A. B. Glick, D. A. Greenhalgh, D. L. Morgan, J. E. Strickland, T. Tennenbaum, S. H. Yuspa, *Exp. Biol. Med.* **1993**, 202, 1–8.

¹¹ P. Nurse, *Cell* **2000**, 100, 71–78.

I.1.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire correspond à un processus dans lequel une cellule unique appelée cellule mère, par le biais de l'intervention d'un grand nombre d'intermédiaires, va donner naissance à deux cellules filles identiques. Il est constitué de 4 phases : G1 → S → G2 → M (Figure I. 1). Chacune d'entre elle suit un cheminement précis, soumis à plusieurs points de contrôles programmés¹² qui ont la charge de s'assurer que la machinerie proliférative fonctionne normalement¹³.

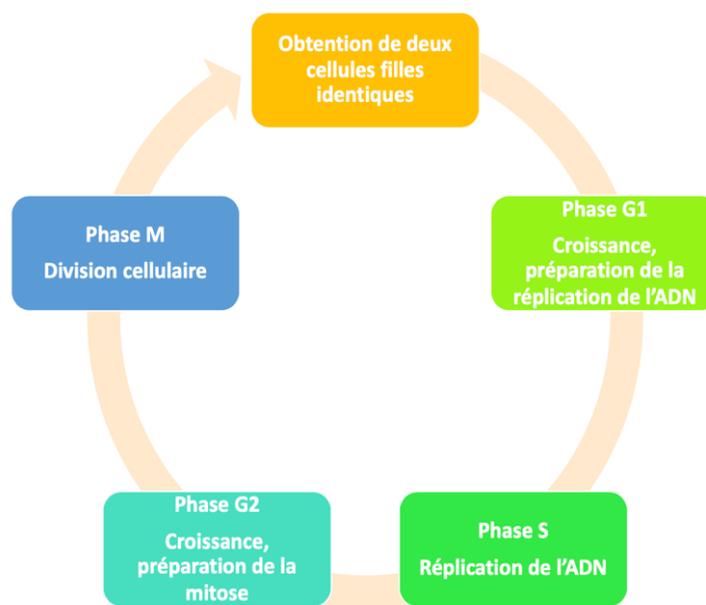


Figure I. 1 : Phases qui constituent le cycle cellulaire.

Néanmoins, des anomalies peuvent être détectées (mutations génétiques^{14a, b} de type translocations¹⁵, délétions¹², gain ou perte de chromosomes¹², altérations épigénétiques^{16a, b} etc.), engendrant dans certains cas, leur correction^{17a, b, c} ou, si le nombre de cellules altérées est faible, la programmation de la mort cellulaire (apoptose). Cependant, il arrive que certaines altérations ne puissent être réparées et finissent par s'accumuler au fil des divisions cellulaires. Ces accumulations peuvent prendre plusieurs années et seraient le

¹² Y. Pommier, K. W. Kohn, *médecine/sciences* **2003**, 19, 173–186.

¹³ L. Meijer, *Oncologie*, **2003**, 16, 5 : 311-326.

¹⁴ a) W. Burkart, T. Jung, G. Frasch, *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie* **1999**, 322, 89–101. b) P. Nowell, *Science* **1976**, 194, 23–28.

¹⁵ J. Zheng, *Oncol. Rep.* **2013**, 30, 2011–2019.

¹⁶ a) A. P. Feinberg, B. Tycko, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 143–153. b) S. Laget, P.-A. Defossez, *médecine/sciences* **2008**, 24, 725–730.

¹⁷ a) I.-C. Lopez-Meija, S. Lagarrigue, L. Fajas, *Obésité* **2014**, 9, 177–181. b) J. H. Houtgraaf, J. Versmissen, W. J. van der Giessen, *Cardiovasc. Revasc. Med.* **2006**, 7, 165–172. c) D. Brnzei, M. Foiani, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 297–308.

point de départ du phénomène de cancérisation. L'accumulation de ces altérations permet à la cellule cancéreuse d'acquérir des caractéristiques propres.

I.1.2 Caractéristiques d'une cellule cancéreuse

La cellule cancéreuse a subi une multitude de changements qui ont modifié ses propriétés fondamentales et lui ont permis d'acquérir plusieurs nouvelles propriétés^{18a, b} qui lui conféreront, à terme, la capacité de se propager et de se multiplier en détournant les ressources de l'organisme (tel que le métabolisme énergétique^{19a, b} par exemple) affaiblissant en parallèle les cellules saines. Ces caractéristiques sont présentées dans la Figure I. 2.

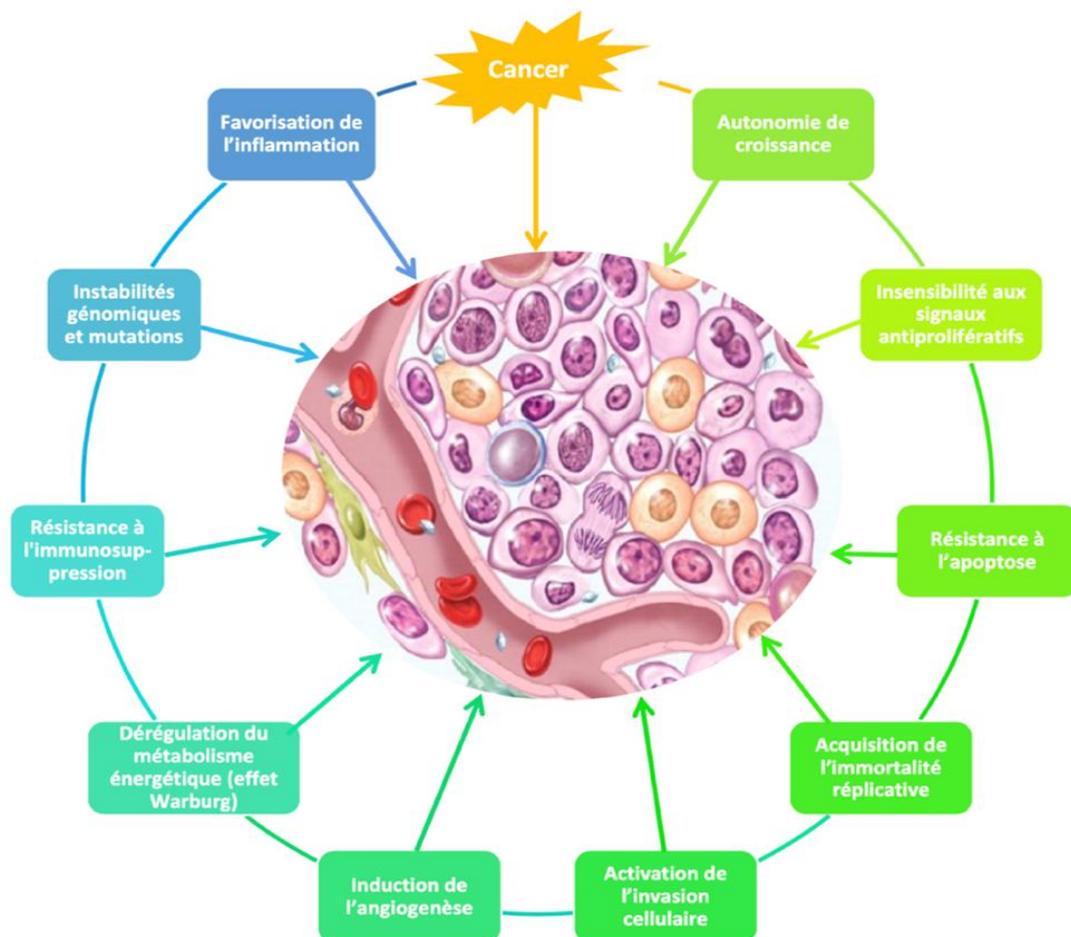


Figure I. 2: Principales caractéristiques d'une cellule cancéreuse - Adaptées de Hanahan. et al^{18a, b}.

¹⁸ a) D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70. b) D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.

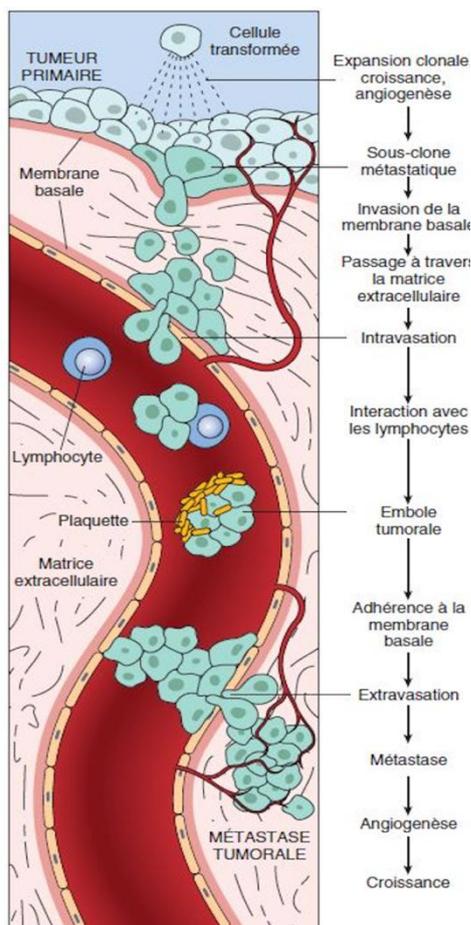
¹⁹ a) O. Warburg, *Science* **1956**, *123*, 309–314. b) M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, et al. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033.

L'obtention de ces nouvelles caractéristiques reflètent une machinerie très complexe du développement tumoral et débouche sur la formation et la propagation des métastases.

I.1.3 Les métastases

Comme énoncé plus haut, la vie des patients atteints d'un cancer métastatique est souvent soumise à un pronostic sombre car la majorité des décès est due à leur formation. Néanmoins, le chemin est encore long pour qu'une cellule devienne métastasiante. La cellule cancéreuse doit, une fois de plus, subir une longue série de modifications et respecter plusieurs critères pour lui permettre de métastaser.

I.1.3.1. Le processus de progression métastatique



Le processus métastatique peut être décrit de la façon suivante (Figure I. 3) : La première étape du phénomène est appelée délamination et est initiée par une perte d'adhésion (issue par exemple, d'une diminution de l'expression de la ϵ -cadhérine²⁰) des cellules cancéreuses de leur tumeur originelle, suivi de l'envahissement de la Matrice Extra Cellulaire (MEC). Pour ce faire, les cellules vont utiliser des protéases dont les Métalloprotéinases (MPs) jouent un rôle majeur. Elles sont notamment impliquées dans plusieurs processus physiologiques cruciaux pour l'invasivité des cellules tumorales, leur pouvoir métastatique et l'angiogénèse²¹. En effet, les MPs sont généralement surexprimées dans les cellules cancéreuses et ont pour rôle de dégrader les protéines constituant la lame basale, ce qui permet aux cellules d'envahir plus facilement les tissus

Figure I. 3 : Le processus métastatique *

²⁰ B. P. L. Wijnhoven, W. N. M. Dinjens, M. Pignatelli, *Br. J. Surg.* **2000**, *87*, 992–1005.

²¹ C. Gialeli, A. D. Theocharis, N. K. Karamanos, *FEBS J.* **2011**, *278*, 16–27.

* http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_9/site/html/cours.pdf.

environnants tels que les vaisseaux sanguins (voie hématogène) ou les tissus lymphatiques.

L'envahissement des tissus est rendu plus facile grâce à une augmentation de la perméabilité vasculaire. En effet, dans un contexte sain, la face interne de la paroi vasculaire est constituée par une fine couche de cellules endothéliales reliées entre elles par de multiples jonctions cellulaires. Cette fine couche contrôle les échanges entre le tissu sanguin et les tissus environnants. Ces échanges sont réalisés lors du mécanisme d'ouverture / fermeture des jonctions cellule-cellule. Dans un contexte pathologique, les jonctions cellulaires sont dénaturées (liée notamment à la diminution de le ϵ -cadhérine), ce qui provoque un dysfonctionnement de la couche endothéliale et engendre une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les cellules malignes pourront ainsi plus facilement infiltrer les tissus environnants et se propager²².

Cet envahissement des tissus constitue l'étape d'intravasation et correspond au début de l'invasion. Les cellules tumorales, à travers leur « voyage » dans les réseaux sanguins et lymphatiques pourront se loger dans les micro-vaisseaux situés à distance de la tumeur mère et envahir le parenchyme d'un nouveau tissu pour former des micro-métastases, c'est l'extravasation. Lors de ces deux étapes, la présence de molécules du système immunitaire (lymphocytes par exemple) ou encore des forces de cisaillement liés au flux sanguin rendent les chances de survie d'une cellule cancéreuse très minces. Ces étapes sont dites limitantes dans le processus de migration. Pour pallier à ce problème, les cellules cancéreuses mobilisent les plaquettes du système sanguin qui, en formant un agrégat plaquettaire, leur confère protection. Cette dernière leur permet de s'extraire des vaisseaux. L'environnement devra ensuite être propice pour leur implantation et leur développement grâce à la mise en place d'une niche protectrice ou niche métastatique. En effet, plusieurs études ont prouvé l'importance du microenvironnement tumoral dans l'implantation, la propagation et la diffusion des métastases^{23a, b, c}. En 1889, le Dr. Stephen Paget a été le premier à évoquer l'existence d'un lien entre les cellules cancéreuses (la graine) et l'environnement tumorale (le sol)²⁴. Sa théorie rapporte que les cellules cancéreuses ne peuvent métastaser que sur les tissus où le microenvironnement est à la fois compatible et favorable. Cela expliquerait

²² S. Azzi, J. Gavard, *médecine/sciences* **2014**, 30, 408–414.

²³ a) G. L. Nicolson, *CANCER METASTASIS Rev.* **1988**, 7, 143–188. b) J. A. Joyce, J. W. Pollard, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 239–252. c) D. Ghosh, M. R. Dawson, in *Biomech. Oncol.* (Eds.: C. Dong, N. Zahir, K. Konstantopoulos), Springer International Publishing, Cham, **2018**, pp. 69–90.

²⁴ S. Paget, *Cancer Metastasis Rev.* **1989**, 8, 98-101.

pourquoi les métastases se développent de façon préférentielle dans un organe plutôt qu'un autre et que le processus métastatique est loin d'être un phénomène aléatoire. Ainsi, le développement des métastases correspond à une succession d'évènements irréversibles appelée « cascade métastatique », où les échanges entre les cellules tumorales et leur environnement sont cruciaux pour l'évolution de la tumeur et l'acquisition d'un phénotype métastatique, dont les caractéristiques principales sont la protéolyse et la capacité des cellules à migrer.

I.1.3.2. La migration cellulaire

La migration cellulaire est un phénomène central du développement et joue un rôle fondamental tant dans les processus physiologiques que pathologiques. On la retrouve dès l'embryogenèse, lors de la formation des tissus et organes vitaux nécessaires à la naissance d'un nouveau-né, lors du maintien de l'immunité, dans les processus de cicatrisation etc. Concernant les processus pathologiques et plus particulièrement chez les patients atteints d'un cancer, la migration est responsable de la dissémination métastatique. Plusieurs types de migration existent, elles tiennent compte de la morphologie des cellules et de leurs paramètres moléculaires. On distingue la migration amiboïde, caractérisée par une forme arrondie des cellules dont la migration ne possède que très peu d'interactions avec la MEC, de la migration mésenchymateuse qui est la plus commune. Cette dernière dépend fortement des interactions entre la MEC et les intégrines. Pour un modèle en 2 dimensions, c'est un processus cyclique qui peut être décrit en 4 étapes et qui joue un rôle crucial dans l'invasion des cellules cancéreuses ([Figure I. 4](#))²⁵.

²⁵ P. K. Mattila, P. Lappalainen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 446–454.

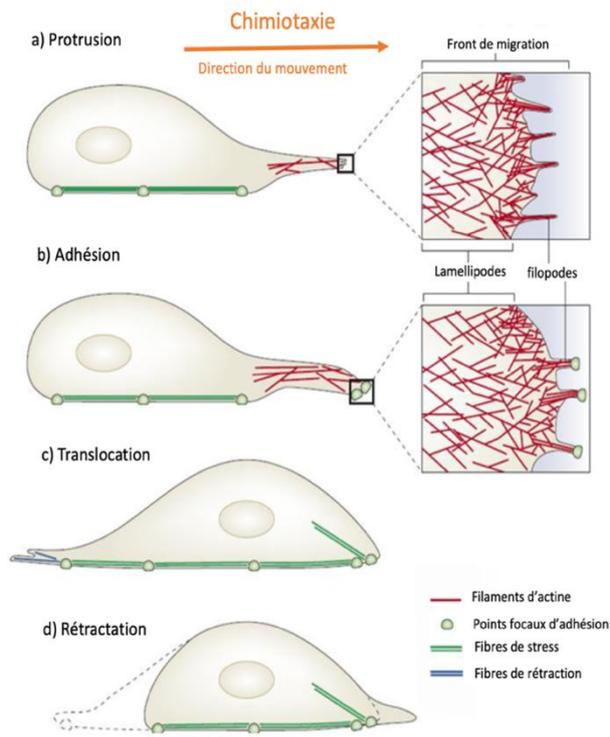


Figure 1. 4 : Étape de la migration cellulaire mésenchymateuse (surface en 2D). Adaptée de Mattila *et al.* (2008)²⁵.

Le mouvement d'une cellule est généralement initié en réponse à un gradient de molécules que l'on appelle la chimiotaxie. Cette réponse va engendrer une déformation de la membrane plasmique des cellules au front de migration, ce qui, grâce à un réseau d'actine, va générer une protrusion appelée le lamellipode (pour une surface en 2D) ou pseudopode (pour une surface en 3D). D'autres extensions membranaires peuvent être formées telles que les filopodes, fines protubérances en forme de doigt riche en actine qui jouent le rôle « d'antennes » permettant aux cellules de sonder leur environnement. Ils jouent

également un rôle d'adhésion entre les cellules²⁵. Dans un second temps, des points focaux d'adhésion (tels que les complexes d'adhésion cellule – matrice (CMAC)²⁶) vont se développer au front de migration entre la cellule et la MEC afin de maintenir le lamellipode nouvellement formé sur le substrat. Le corps de la cellule peut ainsi, par translocation, se mouvoir vers l'avant en utilisant ces nouveaux points d'ancrages. Cela est rendu possible grâce à la contractilité du cytosquelette actine-myosine et des fibres de stress. Pour terminer, les points focaux d'adhésion situés à l'arrière vont se désassembler de la MEC permettant au cytosquelette de se rétracter et de se déplacer vers l'avant.

Ce mouvement migratoire est issu d'une multitude de processus biologiques, chimiques et physiques, dont le calcium joue un rôle important de médiateur dans leur voie de signalisation²⁷.

²⁶ J. G. Lock, B. Wehrle-Haller, S. Strömblad, *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18*, 65–76.

²⁷ T. Stossel, *Science* **1993**, *260*, 1086–1094.

II - Rôle du calcium dans le développement des cancers

II.1 Importance des ions Ca^{2+}

Les ions calcium font partis des ions divalents ubiquitaires les plus abondants du corps humain. Dans les phénomènes physiologiques, ils déclenchent les processus biologiques en activant ou en inhibant des voies de signalisation ou des protéines. Dans les processus sains, ils exercent différents rôles allant de la contraction musculaire, la coagulation sanguine, la transmission synaptique etc. à la prolifération cellulaire et l'apoptose²⁸. Dans les processus pathologiques tels que les cancers, ils interviennent dans le développement des métastases²⁹, l'invasion³⁰, l'angiogenèse³¹ mais aussi dans la migration cellulaire. En effet, la signalisation calcique joue un rôle clé dans le remodelage des point focaux d'adhésion des cellules sur leur substrat *via* des intégrines par exemple³² ou encore *via* la calpaïne, protéase dépendante du calcium qui provoque le désassemblage des points focaux d'adhésion de la cellule et permet son mouvement. Elle est aussi impliquée dans la prolifération cellulaire et l'apoptose³³.

Les ions Ca^{2+} permettent également la contraction du cytosquelette de l'actomyosine responsable des processus de traction-rétraction de la partie basale de la cellule^{34a} grâce à l'activation de la protéine Kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) dépendante du complexe CaM / Ca^{2+} ^{34b}. Par ailleurs, Hahn *et al.* ont mis en évidence l'existence d'un gradient de concentration de calcium chez les cellules se préparant à la migration lors du processus de cicatrisation. Le gradient de concentration calcique polarise la cellule et génère un front de migration provoquant son détachement du substrat et favorise son mouvement

²⁸ E. Carafoli, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.*, **1994**, *8*, 993–1002.

²⁹ N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, *Nat. Rev. cancer*, **2011**, *11*, 609-618.

³⁰ E. C. Kohn, L. A. Liotta, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1856-1862.

³¹ E. C. Kohn, R. Alessandro, J. Spoonster, R. P. Wersto, L. A. Liotta, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 1307–1311.

³² M. D. Sjaastad, W. J. Nelson, *BioEssays* **1997**, *19*, 47–55.

³³ S. J. Franco, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3829–3838.

³⁴ a) R. Strohmeier, J. Bereiter-Hahn, *Exp. Cell Res.* **1984**, *154*, 412–420. b) D. Y. Kim, D. M. Helfman, *Oncogene*, **2016**, *35*, 4495-4508.

migratoire³⁵. La concentration en ions calcium est donc un médiateur important de la migration cellulaire.

La migration cellulaire est un phénomène très complexe dont l'un de ses facteurs favorisant est un déséquilibre homéostatique intracellulaire de la concentration calcique. En temps normal, la concentration cytosolique en calcium est très faible et elle est maintenue à une concentration allant de 10 à 100 nanomolaires (nM), c'est pourquoi il est souvent rejeté dans le milieu extracellulaire ou bien stocké dans les organites de la cellule telles que les vacuoles du Réticulum Endoplasmique (RE), les mitochondries etc. La concentration calcique du milieu extracellulaire est, quant à elle, beaucoup plus élevée de l'ordre de 1.2 millimolaire (mM)³⁶ et pouvant aller jusqu'à 10 à 20 mM dans le milieu extracellulaire osseux³⁷. Les cellules possèdent donc un gradient de concentration, stabilisé entre chaque compartiment intra- et extracellulaire qui lors d'un stress, peut-être rompu et générer diverses pathologies. La régulation de l'homéostasie calcique à l'échelle cellulaire devient donc une stratégie thérapeutique envisageable et les acteurs principaux responsables de son maintien sont les protéines membranaires, appelées aussi canaux ioniques.

II.2 Les canaux ioniques

II.2.1 Généralités

Les canaux ioniques sont des protéines qui permettent le passage plus ou moins sélectif d'ions à travers les membranes. Ils permettent aux molécules polaires et/ou chargées de diffuser dans le sens de leur gradient électrochimique (transport dit facilité) de part et d'autre des membranes. À l'inverse, il existe des transports actifs qui nécessitent de l'énergie pour transporter un soluté. On distingue les transports actifs I^{aire}, II^{aire} et III^{aire}. Le transport actif consiste au passage d'un soluté au travers une membrane plasmique contre

³⁵ K. Hahn, R. DeBiasio, D. L. Taylor, *Nature*, **1992**, 359, 739-738.

³⁶ E. Carafoli, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 395-433.

³⁷ M. Peacock, *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* **1980**, 2, 143-150.

son gradient électrochimique. Ils sont majoritairement responsables du transport d'un grand nombre de soluté tels que les sucres, les AA *etc.*³⁸.

Les canaux peuvent être strictement perméables à un seul ion tels que Na⁺, K⁺, Ca²⁺ *etc.* ou bien à plusieurs comme c'est le cas pour les canaux nAChR, récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, qui sont perméables à plusieurs cations³⁹. Ces canaux exercent 2 rôles cruciaux à savoir, le maintien de l'excitabilité cellulaire et le transport d'ions. Ce dernier peut être enclenché ou désactivé en réponse à des stimulus environnementaux spécifiques (ions, ligands, pH, voltage *etc.*) ce qui leur confère un rôle clé dans la régulation des processus tant physiologiques que pathologiques⁴⁰. C'est pourquoi les canaux ioniques font partie des cibles thérapeutiques de choix en médecine aujourd'hui⁴¹.

II.2.2 Les canaux potassiques

Parmi eux, les canaux potassiques font partie des plus nombreux et des plus diversifiés du corps humain et sont présents de façon ubiquitaire dans notre organisme. Ils sont strictement imperméables aux atomes et molécules chargées. Dans le milieu intracellulaire, la concentration potassique est environ 40 fois supérieure à celle du milieu extracellulaire (150 mM vs 3,5 mM). Cette différence considérable génère, lors de l'ouverture des canaux, un gradient électrochimique favorable à la sortie des ions ce qui a une influence sur l'excitabilité membranaire (hyperpolarisation de la MP) et sur le potentiel de repos de la cellule. Ils jouent donc un rôle majeur dans les cellules excitables (cellules neuronales, musculaires *etc.*), pour la libération synaptique de neurotransmetteurs, pour la régulation du rythme cardiaque ou encore pour la contraction musculaire *etc.*³². *A contrario*, dans les cellules non excitables (cellules épithéliales, hématies *etc.*), les canaux potassiques sont connus pour contrôler le volume cellulaire, l'apoptose, la prolifération et la migration cellulaire^{7, 42, 43}.

³⁸ E. Shechter, *Biochimie* **1986**, 68, 357–365.

³⁹ P. B. Sergent, *Annu. Rev. Neurosci.* **1993**, 16, 403-3.

⁴⁰ S. Hatta., J. Sakamoto, *Med Electron Microsc.* **2002**, 35, 117-126.

⁴¹ A. Arcangeli, O. Crociani, *Current Med Chem*, **2009**, 16, 66-93.

⁴² C. Shieh, M. Coghlan, J. P. Sullivan, *Pharmacol rev*, **2000**, 52, 557-594.

⁴³ ED. Burg, CV. Remillard, *J Membr Biol*, **2006**, 209, 3-20.

Il existe une très grande variété de canaux potassiques codés par pas moins de 70 gènes^{44a, b}. Chacun d'entre eux va posséder ses propres propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques justifiant le nombre élevé des fonctions qu'ils régulent mais aussi leur implication dans plusieurs processus pathologiques. Il n'est en effet pas rare qu'une mutation génétique, une sous-expression ou bien une surexpression de ces canaux exacerbe certaines maladies y compris les cancers.

Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes intéressés aux canaux SKCa (Small Conductance Activated Potassium Channel) connus pour être des médiateurs de certaines pathologies sévères telles que la fibrillation auriculaire⁴⁵, la schizophrénie⁴⁶ ou encore le cancer du sein⁷. C'est pourquoi la suite de ce chapitre leur sera consacrée.

II.2.3 Les canaux SKCa

II.2.3.1. Généralités

Les canaux SKCa appartiennent à la famille des canaux KCa (Calcium activated potassium channel). Ce sont des canaux potassiques de faible conductance activés par de faibles concentrations cytosoliques en calcium (<1 μ M). La famille KCa est en particulier impliquée dans la régulation du potentiel de la membrane à la fois dans les cellules excitables et non excitables.

Il existe d'autres canaux dépendants des ions calcium, classés en fonction de leur valeur de conductance unitaire : les canaux BKCa (100-200) pS, IKCa (20 - 100) pS et SKCa (2 - 20) pS. Les canaux BKCa sont les seuls dont l'ouverture dépend à la fois du potentiel de membrane et de la concentration intracellulaire en ions calcium. Tandis que l'activation des canaux IKCa et SKCa ne dépend que de la concentration calcique intracellulaire.

C'est en 1979 que les canaux SKCa ont été mis en évidence lors d'études visant à caractériser la phase d'hyperpolarisation des potentiels d'actions sur des cellules de neuroblastome

⁴⁴ a) GA. Gutman, KG Chandy, JP. Adelman, *Pharmacol Rev*, **2003**, 55, 583-586. b) G. Moulton, TK. Attwood, *Receptor Channel*, **2003**, 9, 363-377.

⁴⁵ JG. Diness, *Circ Arrhythm Electrophysio*, **2010**, 3, 380-390.

⁴⁶ S. Grube, MF. Gerchen, *EMBO Mol Med*, **2011**, 3, 309-319.

provenant de souris⁴⁷. En 1996, ils ont été clonés puis caractérisés⁴⁸ et leur structure moléculaire a été déterminée en 1997 par l'équipe du Dr John Adelman⁴⁹.

II.2.3.2. Structure des canaux SKCa

Les canaux SKCa sont constitués de sous-unités principales appelées sous-unités α . Chacune d'entre elle est formée par 6 domaines transmembranaires (DTM) et un domaine pore (P). Ce dernier contient la séquence signature des canaux K^+ et forme également leur filtre de sélectivité. Cette séquence est hautement conservée au travers différentes espèces et elle est constituée de 3 AA : GYG⁵⁰. Un canal fonctionnel de type SKCa résulte de l'association de quatre sous-unités α en un tétramère (Figure I. 5)⁵¹.

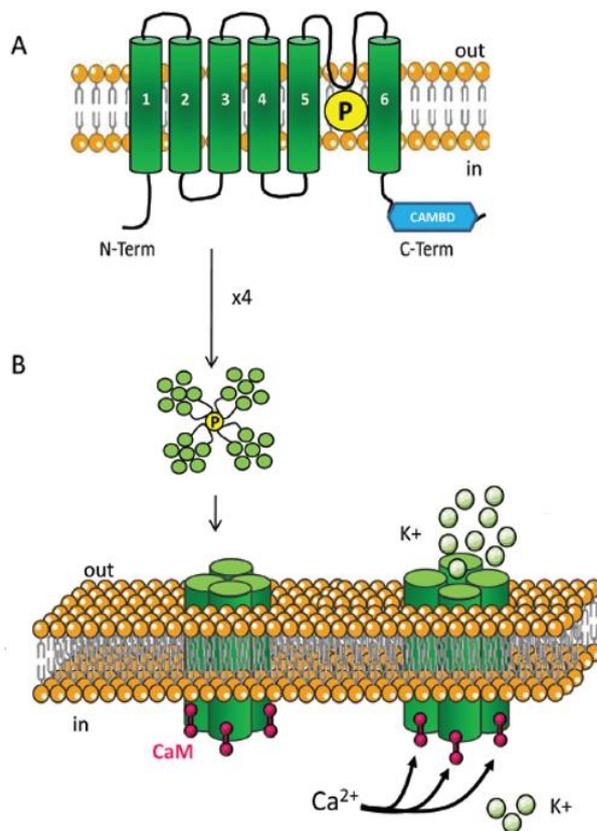


Figure I. 5 : A) Structure d'une sous-unité α des canaux SKCa et IKCa. B) Structure d'un canal potassique SKCa fonctionnel en forme de tétramère. Repris de A. Girault *et al*⁵¹.

Chacune des sous-unités α possède des extrémités en C- et N-terminales intracellulaires dont la partie C-terminale dispose d'un domaine de liaison à la Calmoduline (CaM), appelé « Calmodulin binding domain » (CaMBD)⁵². Ce dernier n'est présent que sur les canaux SKCa⁵². Leur sensibilité aux ions Ca^{2+} est médiée par la Calmoduline.

Il s'agit d'une protéine ubiquitaire de 148 AA constituée de deux extrémités globulaires qui contiennent chacune 2 sites « EF Band », motifs protéiques constitués de 2 hélices α liées par

⁴⁷ W. H. Moolenaar, I. Spector, *J. Physiol.* **1979**, 292, 297–306.

⁴⁸ M. Kohler, B. Hirschberg, C. T. Bond, J. M. Kinzie, N. V. Marrion, J. Maylie, J. P. Adelman, *Science* **1996**, 273, 1709–1714.

⁴⁹ T. M. Ishii, J. Maylie, J. P. Adelman, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 23195–23200.

⁵⁰ R. MacKinnon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4265–4277

⁵¹ A. Girault, J.-P. Haelters, M. Potier-Cartreau, A. Chantome, P.-A. Jaffres, P. Bougnoux, V. Joulin, C. Vandier, *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 697–713.

⁵² A. R. Rhoads, F. Friedberg, *FASEB J.* **1997**, 11, 331–340.

une boucle, dont chacun permet la chélation d'un ion calcium. L'ouverture des canaux auxquels la CaM est associée est provoquée par un changement de conformation de cette dernière après la fixation de 4 ions Ca^{2+} . À l'inverse, leur fermeture est due au décrochage des ions⁵³.

La cristallisation des complexes CaM/CaMBD en présence ou non d'ions calcium a pu être obtenue. Le lien entre la liaison de la protéine CaM et son site de liaison a clairement pu être identifié (Figure I. 6)⁵⁴.

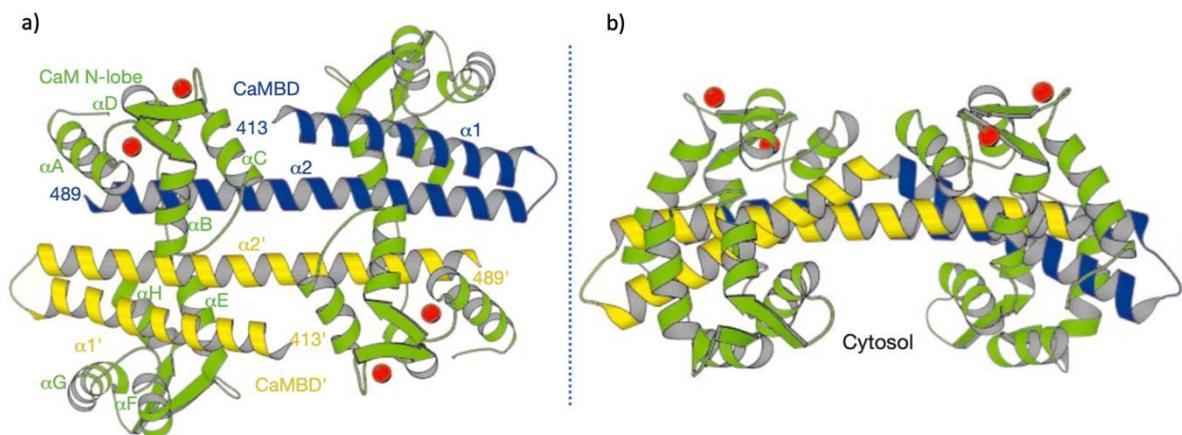


Figure I. 6: a) Structure du complexe CaMBD (en bleu et jaune) / CaM (vert) / Ca^{2+} (Rouge) du canal SK2 (Canal SK2 : voir paragraphe II.2.3.3). b) Changement de conformation de la CaM suite à la fixation de 4 ions Ca^{2+} . Figure tirée de Schumacher et al. (2001)⁵⁴.

La CaMBD est présente au niveau de chaque sous unités α des 6^{ème} DTM des canaux SKCa. La CaM est, quant à elle, positionnée perpendiculairement sur cette dernière. La liaison de la CaM sur la CaMBD permet à 4 ions calciums de se fixer au niveau des 2 régions « EF band » situées sur chaque extrémité N-terminale de la protéine CaM (Figure I. 6a). Cette chélation engendre un changement de conformation de la CaM sur son site de liaison et débouche sur l'activation du canal (Figure I. 6b).

II.2.3.3. Isoformes des canaux SKCa

Suite à la découverte des canaux SKCa, 3 séquences codantes pour ces canaux ont été mises en évidence, il s'agit des canaux SK1 (ou KCa2.1), SK2 (ou KCa2.2) et SK3 (ou KCa2.3)⁴⁶. Ces

⁵³ X.-M. Xia, B. Fakler, A. Rivard, G. Wayman, T. Johnson-Pais, J. E. Keen, T. Ishii, B. Hirschberg, C. T. Bond, S. Lutsenko, et al., *Nature* **1998**, 395, 503–507.

⁵⁴ M.A. Schumacher, A. F. Rivard, H. P. Bächinger, J. P. Adelman, *Nature*, **2001**, 410, 1120-1124.

isoformes possèdent entre 80 et 90% d'identité entre leur séquence en AA mais divergent au niveau de leurs extrémités -NH₂ et -COOH terminales. En revanche, ils n'ont que 15% de similitudes avec BKCa et entre 40-50% avec IKCa, ce qui peut justifier le fait que chacun de ces canaux ait ses propres caractéristiques électrophysiologiques.

En 2004, Chen *et al.* ont déterminé leur distribution dans des tissus humain et leur localisation dans des échantillons de corps caverneux et de colon⁵⁵ (Figure I. 7) .

Il en ressort que le canal SK4, qui appartient à la famille des canaux IKCa, est présent dans tous les tissus sauf le système nerveux central (SNC) et la tête du pancréas. Le canal SK1 est exempt de la plupart des tissus mais se retrouve majoritairement dans le SNC comparativement à SK4.

Concernant les canaux SK2 et SK3, ils sont présents dans la quasi-totalité des tissus testés mais le canal SK3 est le plus ubiquitaire de tous.

Comme énoncé plus haut, les canaux SKCa sont impliqués dans bons nombres de processus physiologiques importants dont l'activité est soumise à de multiples régulations. Lors d'un dysfonctionnement, l'activité de ces canaux peut être dérégulée et impliquée dans la progression de pathologies.

C'est le cas du canal KCa2.3 (SK3), qui est fortement impliqué dans la migration cellulaire de cellules cancéreuses hautement métastasiées du cancer du sein⁷.

⁵⁵ M.X. Chen, S. A. Gorman, B. Benson, K. Singh, J. P. Hieble, M. C. Michel, S. N. Tate, D. J. Trezise, *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, 369, 602–615.

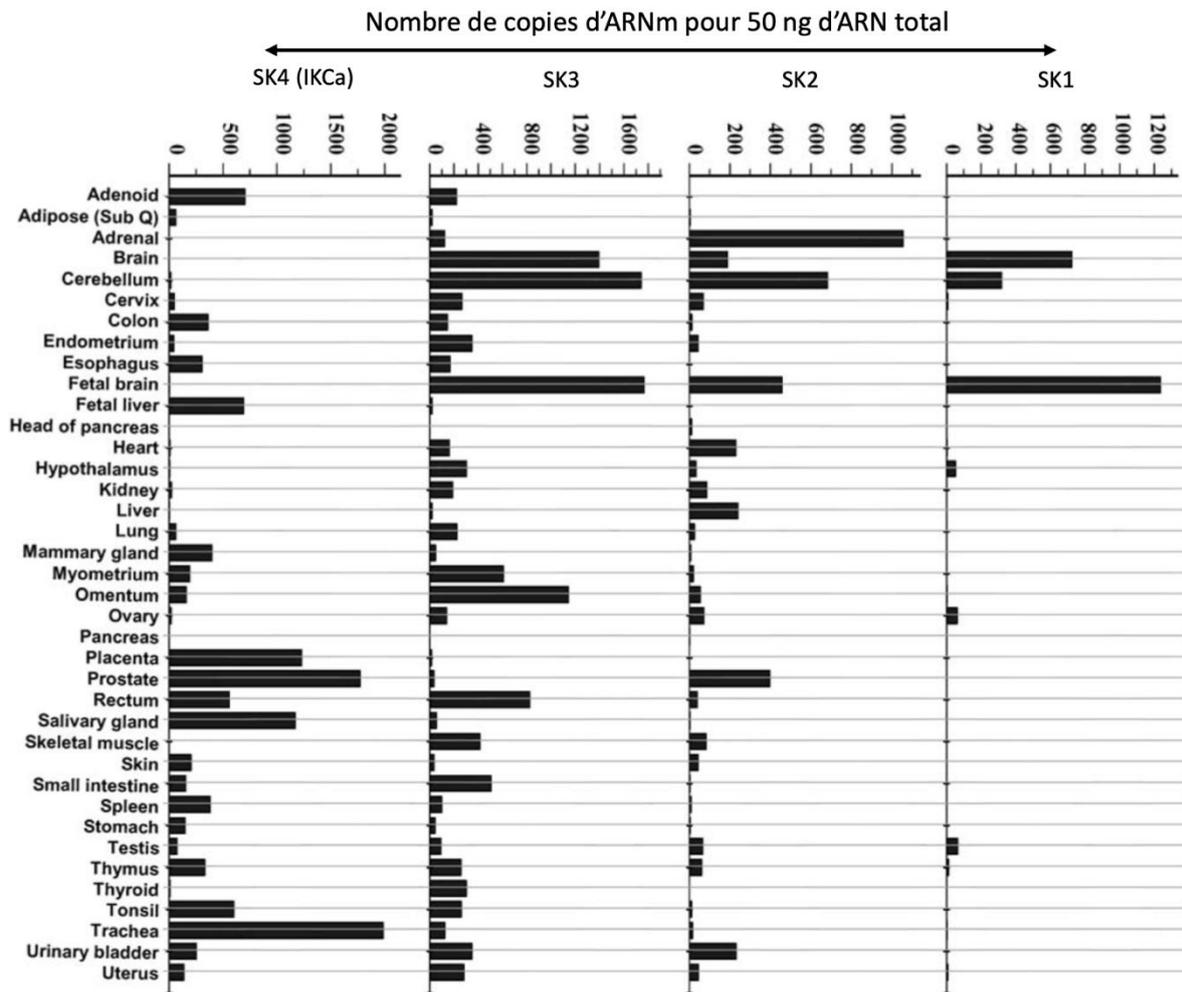


Figure I. 7 : Expression tissulaire des ARNm codant pour les canaux SK1-4 – Modifiée d'après Chen et coll. 2004⁵⁵.

II.2.3.4. Implication des canaux SKCa dans la migration cellulaire : cas du canal SK3.

En 2006, l'équipe du Pr. Christophe VANDIER a montré l'importance des canaux SK3 dans le processus de migration cellulaire de cellules hautement métastasiées du cancer du sein (cellules MDA-MB-435s). La réalisation de biopsies des cellules épithéliales de tumeurs mammaires a mis en évidence une expression anormale des canaux SK3 sur ces tissus alors qu'ils ne sont pas exprimés sur les cellules saines. Dans une autre étude, ils ont également démontré que ces canaux sont anormalement exprimés dans des lignées de mélanomes très

agressives⁵⁶. Dans ces deux cas, la présence anormale des canaux SK3 engendre une hyperpolarisation de la MP et conduit à une motilité cellulaire accrue.

Le canal SK3 est donc un facteur important dans le processus de migration cellulaire des cellules cancéreuses.

Comme vu au paragraphe II.1, le calcium joue un rôle important de médiation dans la mobilité cellulaire. Dans les cellules non excitables, telles que les cellules MDA-MB-435s, l'influx calcique est souvent régulé par des canaux potassiques.

Dans notre cas, le processus responsable de la migration cellulaire dépendant du canal SK3 peut-être résumé comme suit (Figure I. 8) :

- 1) La présence du canal SK3 va induire un efflux d'ions potassiques qui conduit à l'hyperpolarisation de la membrane plasmique et entraîne une augmentation du gradient électrochimique en ions calciques.
- 2) Ce gradient va générer un fort influx d'ions Ca^{2+} par le biais de canaux indépendants du voltage (complexe de canaux SK3/Orai1 présents dans les rafts)⁵⁷, induisant une augmentation accrue de leur concentration intracellulaire.
- 3) Cette hausse de la concentration en calcium va exercer un rétrocontrôle positif vis-à-vis du canal SK3 en exacerbant son activité et conduire à la migration des cellules épithéliales mammaires tumorales.

⁵⁶ A. Chantome, A. Girault, M. Potier, C. Collin, P. Vaudin, J.-C. Pagès, C. Vandier, V. Joulin, *Exp. Cell Res.* **2009**, 315, 3620–3630.

⁵⁷ A. Chantome, M. Potier-Cartereau, L. Clarysse, G. Fromont, S. Marionneau-Lambot, M. Gueguinou, J.-C. Pages, C. Collin, T. Oullier, A. Girault, F. Arbion, J. P. Haelters, P. A. Jaffres, M. Pinault, P. Besson, V. Joulin, P. Bougnoux, C. Vandier, *Cancer Res.* **2013**, 73, 4852–4861.

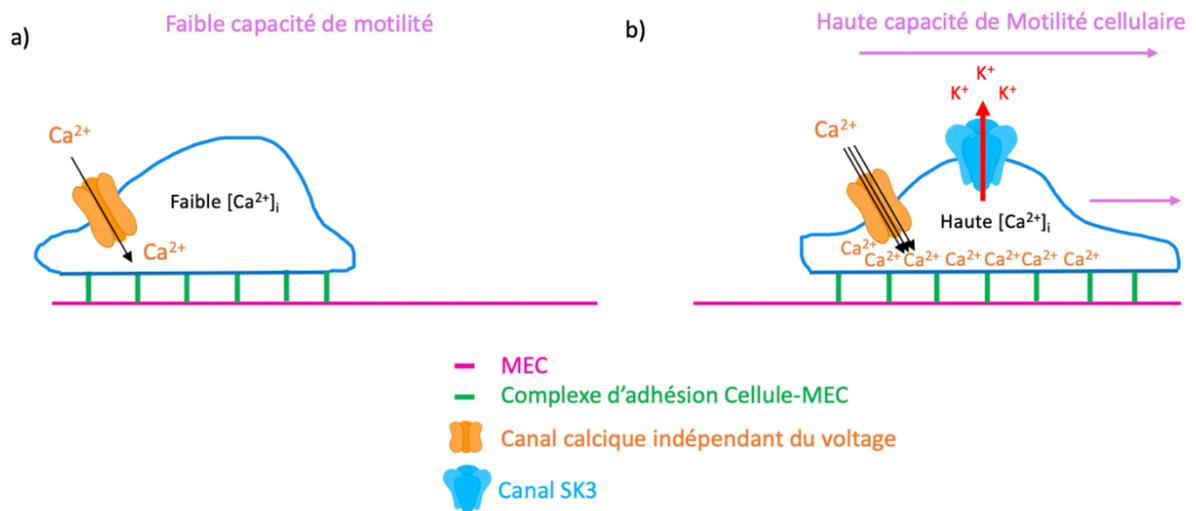


Figure 1. 8: Modèle explicitant le rôle du canal SK3 dans la mobilité des cellules cancéreuses. a) Sans la présence du canal SK3, la MP est dépolarisée, l'influx calcique est faible induisant une faible concentration en ions calcium et une faible capacité de migration des cellules épithéliales mammaires. b) En présence du canal SK3, l'hyperpolarisation (potentiel de membrane très négatif) de la MP induit un influx important d'ions calciques qui va exercer un rétrocontrôle positif sur SK3 et augmenter la capacité des cellules cancéreuses à migrer. - Inspiré de Potier *et al.*⁷

L'implication du canal SK3 dans le processus de migration cellulaire est donc très importante et constitue une nouvelle cible thérapeutique de choix pour le développement d'agents antimétastatiques.

III - Modulations des canaux SKCa

Si l'on se penche sur le profil pharmacologique des composés modulateurs des canaux K^+ et plus particulièrement des canaux SKCa, ils disposent d'un panel important de molécules naturelles et / ou synthétiques, capables de moduler plus ou moins efficacement et sélectivement leur fonction, dont l'étude a permis de mettre en lumière des mécanismes d'action variés.

III.1 Modulation par un effet allostérique⁵¹

Le premier mécanisme moléculaire conduisant à une modulation de l'activité des canaux SKCa met en œuvre un effet allostérique des molécules qui agissent sur la partie extracellulaire du canal conduisant à une diminution de son activité. C'est le cas de l'Apamine, peptide neurotoxique naturel issu du venin d'abeille. Cet inhibiteur est l'un des plus connus et est toujours couramment utilisé par les électrophysiologistes pour sa sélectivité vis-à-vis des canaux SKCa. En effet, l'Apamine n'a aucun effet sur les canaux BKCa et IKCa ce qui permet de les différencier lors des études. Néanmoins son manque de sélectivité vis-à-vis des isoformes des canaux SKCa ainsi que sa toxicité ont empêché son utilisation pour des études *in vivo*. En 2001, Shakkottai *et al.* ont synthétisé un peptide, le Lei-Dab7, qui est issu d'une mutation de la Leurotoxine, peptide provenant du venin de scorpion « *Leiurus quinquestriatus hebraeus* ». Ce peptide possède une affinité 650 fois supérieure pour le canal SK2 que pour les autres isoformes des canaux SKCa⁵⁸. Il est donc devenu un inhibiteur spécifique du canal SK2 et est toujours utilisé aujourd'hui.

III.2 Modulation *via* un « effet bouchon »

Certains alcaloïdes sont capables d'agir sur les canaux SKCa en les bloquant selon un mode d'action appelé « effet bouchon » en particulier ceux appartenant à la famille des benzyloquinolines, comme la N-méthyl-laudoanine, l'atracurium besilate et la tubocurarine (Figure I. 9). Ils bloquent sélectivement les isoformes SK2 et SK3 mais leur concentration biologiquement active, qui est bien plus importante (5 à 20 μM) et supérieure à l'IC₅₀ de l'apamine (10 nM pour le canal SK3), a empêché leur utilisation thérapeutique dans la modulation des canaux SKCa. Des dérivés de la N-méthyl-laudoanine, qui s'est avérée être la plus efficace des molécules alcaloïdes, ont été synthétisés sans obtenir plus de succès.

⁵⁸ V. G. Shakkottai, I. Regaya, H. Wulff, Z. Fajloun, H. Tomita, M. Fathallah, M. D. Cahalan, J. J. Gargus, J.-M. Sabatier, K. G. Chandy, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 43145–43151.

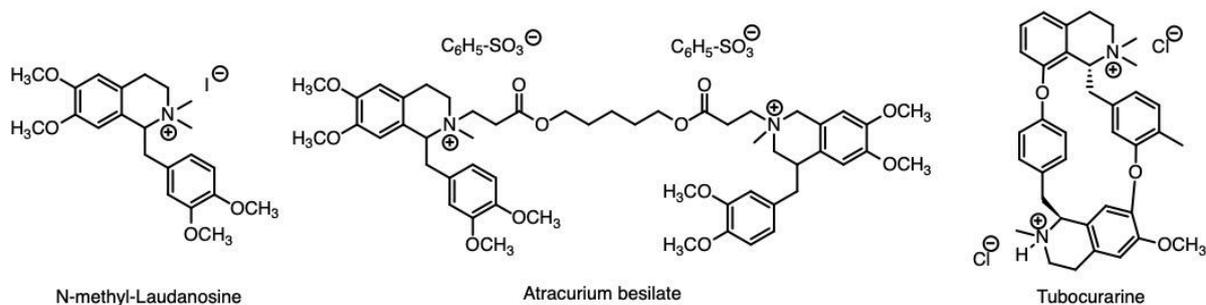


Figure I. 9: Sélection de molécules appartenant à la famille des alcaloïdes capables de moduler les isoformes des canaux SKCa⁵¹

Cependant, ces composés, qui appartiennent également à la classe des curares non dépolarisants, sont couramment utilisés dans le milieu médical et plus particulièrement dans les services de réanimation et de chirurgie⁵⁹, et ce, à des concentrations bien plus importantes que celles utilisées pour la modulation des canaux ioniques. Ils sont issus majoritairement de plantes provenant d'Amazonie telles que « Chondrodendron tomentosum et Strychnos toxifera ». Dans le cas de l'atracurium besylate, il est toujours couramment utilisé en réanimation et plus particulièrement lors des intubations. Il est administré par perfusion continue à des doses allant de 0.25 à 0.75 mg/Kg/h et il possède une durée d'action de 25 à 30 minutes provoquant une relaxation musculaire⁶⁰. Les transmissions neuromusculaires sont dépendantes de l'action de l'acétylcholine (ACh) sur son récepteur nicotinique nAChR. Lorsque 2 molécules d'ACh se fixent simultanément sur les 2 sous-unités alpha du canal nAChR, ce dernier subit un changement de conformation qui engendre son ouverture pendant une milliseconde et permet le passage non sélectif et rapide des cations sodium, potassium et calcium. L'influx rapide de sodium dépolarise la membrane des cellules musculaires ce qui va entraîner une contraction musculaire⁶⁰. L'atracurium bésilate va agir comme bloquant neuromusculaire en se liant de façon non covalente et de manière compétitive sur les deux sites de liaison de l'ACh et ainsi inhiber de manière réversible la transmission des impulsions au niveau des nAChR.

Des petites molécules organiques cationiques ont montré une bonne efficacité mais sans sélectivité observée, c'est le cas du tétraéthylammonium (TEA). Des toxines issues du venin

⁵⁹ A. Suppini, E. Kaiser, M. Sallaberry, C. Colavolpe, D. Pellissier, G. François, *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* **1999**, *18*, 341–354.

⁶⁰ D. B. Coursin, R. C. Prielipp, *Crit. Care Clin.* **1995**, *11*, 957–981.

de scorpions ont également été testées et se sont révélées inhibitrices des canaux SKCa, peu sélectives et létales chez les souris^{61a, b}.

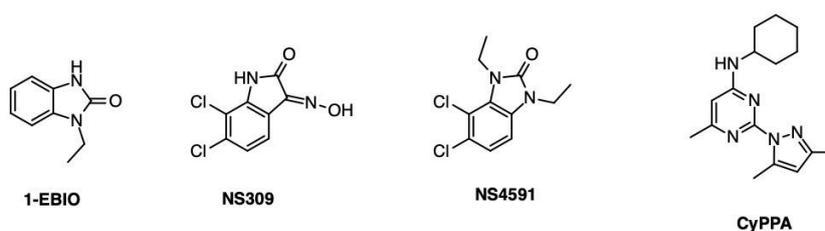
La modulation sélective des canaux SKCa reste donc un défi majeur car aucune molécule inhibitrice possédant, à la fois, un effet « bloquant » et une sélectivité avérée, n'a encore été identifiée.

III.3 Modulation par une modification de leur sensibilité aux ions Ca²⁺⁵¹

Le troisième mécanisme d'action porte sur une modification de la sensibilité des canaux SKCa aux ions calciums. La modulation aurait donc lieu dans le milieu intracellulaire avec probablement une interaction avec la CaM ou bien sur son site de liaison mais le mécanisme est encore inconnu. Des dérivés du benzimidazole tels que le NS8593 inhibent l'activité des canaux SKCa selon ce mode d'action. Ce dernier possède également une action inhibitrice sur SK1, SK2 et SK3 avec une sélectivité plus importante pour l'isoforme SK2. Cependant cette sélectivité reste encore trop faible et a mené à d'autres études pour tenter d'obtenir des inhibiteurs plus sélectifs. La littérature fait également état de molécules capables d'activer la sensibilité calcique des canaux SKCa et IKCa, c'est le cas des molécules NS309, NS4591, ou encore le 1-EBIO. Mais leur sélectivité s'est encore avérée insuffisante. Le composé CyPPA a été le seul parmi les composés cités ci-dessus à présenter une sélectivité accrue pour les isoformes SK3 et SK2 tandis qu'il n'a aucune action sur le canal SK1 et la famille IKCa. La capacité de ces molécules à moduler la sensibilité des isoformes des canaux SKCa suggère qu'elles ont besoin de faibles concentration intracellulaire en calcium pour exercer leur modulation. Quelques exemples des composés activateurs et inhibiteurs sont regroupés dans la [Figure I. 10](#).

⁶¹ a) R. Romi-Lebrun, M.-F. Martin-Eauclaire, P. Escoubas, F. Q. Wu, B. Lebrun, M. Hisada, T. Nakajima, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 457–464. b) J.-J. Wu, L.-L. He, Z. Zhou, C.-W. Chi, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2844–2849.

A) Composés activateurs



B) Composés inhibiteurs

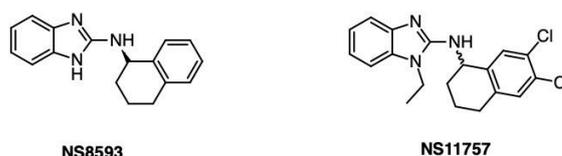


Figure I. 10 : Exemple de composés A) Activateurs, B) Inhibiteurs capables de moduler la sensibilité aux ions calcium des canaux SKCa.⁵¹

En 2011, Potier *et al.* ont montré pour la première fois la modulation des canaux ioniques par un composé éther-lipidique synthétique appartenant à la classe des alkyl-glycéro-phospholipides (APL). Il s'agit de l'Edelfosine (1-O-octadécyl-2-O-méthyl-rac-glycéro-3-phosphocholine ou ET18-O-CH₃) (Figure 1)⁶².

III.4 Les éthers-lipides

III.4.1 Généralités

Les lipides font certainement partie des constituants présents dans les premiers organismes vivant sur terre il y a 3,7 milliards d'années⁶³. Leur évolution les a conduits vers une diversité moléculaire inégalée, impliquée dans bon nombre de mécanismes cellulaires. Certains d'entre eux, en plus de leur rôle dans la compartimentalisation cellulaire et sub-cellulaire, sont aussi impliqués dans des processus biologiques en tant que, par exemples, médiateurs ou messagers biochimiques (ex : les diacylglycérols (DAG)) et interviennent également dans la communication et la signalisation inter- et intracellulaire. C'est le cas des phospholipides

⁶² M. Potier, A. Chantome, V. Joulin, A. Girault, S. Roger, P. Besson, M.-L. Jourdan, J.-Y. LeGuennec, P. Bougnoux and C. Vandier, *Br. J. Pharmacol.*, **2011**, 162, 464–479.

⁶³ D. Deamer, *Life* **2017**, 7, 5.

comme le 1-*O*-hexadécyl-2-*O*-acétyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (PAF) qui est un facteur crucial dans l'activation plaquettaire et qui est responsable de nombreuses activités physiologiques telles que l'apoptose et l'angiogenèse⁶⁴. Aujourd'hui, plusieurs travaux montrent que les lipides et plus particulièrement les éthers-lipides (EL), qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, ont un rôle dans l'avènement de situations pathologiques^{65a, b}. À *contrario*, ils peuvent aussi être à la base de nouvelles approches thérapeutiques y compris pour certains cancers.

III.4.2 Les éthers-lipides anticancéreux naturels

Les éthers lipides représentent une grande variété de composés lipidiques comportant une liaison éther. Ceux possédant une fonction glycérol sont les constituants minoritaires des membranes plasmiques des cellules des mammifères alors qu'ils sont les composants majoritaires des cellules archéennes. Ces composés sont appelés éthers d'alkyls-glycérols (AKGs) et ils sont constitués d'une longue chaîne d'alcool gras lié au glycérol par une ou deux fonction(s) éther(s). Dans les MP on les retrouve sous deux formes : les alkyl-lipides et les plasmalogènes (ou alkényl-lipides) (Figure I. 11).

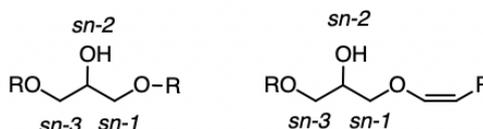


Figure I. 11: Schéma des 1-*O*-alkyl-*sn*-glycérol à gauche et 1-*O*-alkèn-1-yl-*sn*-glycérol à droite.

Ces derniers sont formés par un alcool gras lié par une liaison éther vinylique sur la position *sn*-1 du glycérol et dont la position *sn*-2 est le plus souvent enrichi en acide gras poly-insaturés (AGPI). Ces caractéristiques leur confèrent des propriétés particulières^{66a, b}. Ils agissent comme antioxydants endogènes vis-à-vis du stress oxydant qui peut être un facteur d'inflammation, de mutagenèse et amener au développement des cancers. Il est décrit que lors de désordres neurologiques, une diminution du taux de plasmalogènes est observée pouvant conduire à la maladie d'Alzheimer ou à une ischémie cérébrale.

⁶⁴ D. M. Stafforini, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2003**, *40*, 643–672.

⁶⁵ a) N. Jiménez-Rojo, H. Riezman, *FEBS Lett.* **2019**, *593*, 2378–2389. b) J. M. Dean, I. J. Lodhi, *Protein Cell* **2018**, *9*, 196–206.

⁶⁶ a) W. Kern, A. Lutz, G. Spitteller, W. J. Zeller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 64–66. b) T. Brosche, *Arch. Gerontol. Geriatr.* **1997**, *25*, 73–81.

En 1915, Kossel et Edlbacher ont été les premiers à isoler un alkyl-glycérol issu d'une étoile de mer « *Asterias rubens* ». Cet AKG correspondait à l'alcool batylique (1-*O*-octadécyl-*sn*-glycérol). Ce dernier a été retrouvé en 1958 par Toyama *et al*, dans l'huile de foie d'Élasmobranchie ainsi que 2 autres AKGs : l'alcool chimylique (1-*O*-hexadécyl-*sn*-glycérol) et l'alcool sélachylique (1-*O*-octadéc-9-ényl-*sn*-glycérol) (Figure I. 12). Des études ont démontré que l'alcool batylique était capable de stimuler l'hématopoïèse⁶⁷, et l'alcool sélachylique, quant à lui, pouvait protéger de la leucopénie et de la thrombopénie chez les patients ayant subi une radiothérapie⁶⁸. Ces EL sont retrouvés en mélange (diversité de la longueur de la chaîne alkyle et du degré des insaturations) en grande quantité dans le foie de plusieurs espèces marines (requins, chimères etc.). Le foie des requins peut contenir une quantité d'éther de glycérols correspondant à 20% de leur masse corporelle ce qui leur confère une protection contre les infections et les tumeurs⁶⁹.

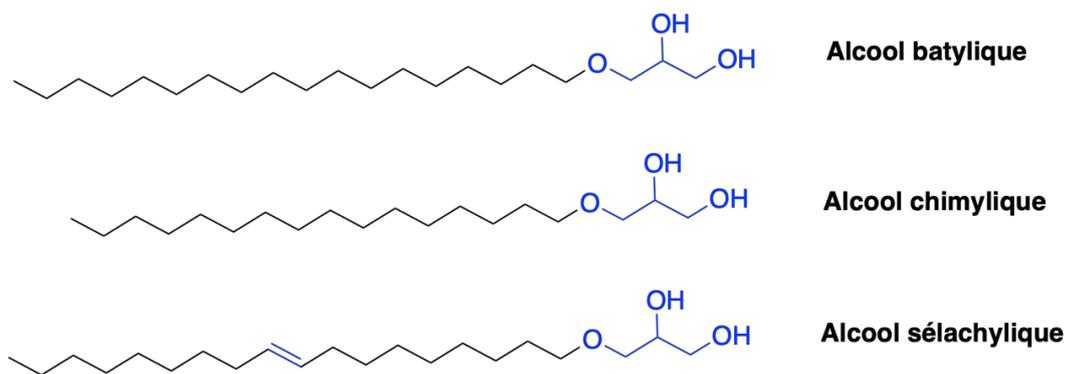


Figure I. 12: Alkyl-glycérols extrait de l'huile de foie d'Élasmobranches.

De plus, ces extraits de l'huile de foie de requin, administrés chez des patientes atteintes d'un cancer du sein juste avant leur radiothérapie, provoquaient une diminution de la progression tumorale⁷⁰.

Les AKGs joueraient également un rôle important dans le processus de production d'anticorps et l'immunostimulation⁷¹. Chez l'homme ils sont présents en faible quantité. On les retrouve dans la moelle osseuse, la rate, le foie, le colostrum et le lait maternel en

⁶⁷ R. H. C. Penny, A. I. Wright, J. W. Stoker, *Br. Vet. J.* **1964**, *120*, 286–293.

⁶⁸ A. Brohult, *Nature* **1958**, *181*, 1484–1485.

⁶⁹ D. C. Malins, J. C. Wekell, C. R. Houle, *J Lipid Res*, **1965**, *6*, 100-105.

⁷⁰ A. Brohult, J. Brohult, S. Brohult, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **1978**, *57*, 79–83.

⁷¹ B. Z. Ngwenya, D. M. Foster, *Exp. Biol. Med.* **1991**, *196*, 69–75.

différentes proportions⁷². Ils sont issus de notre alimentation ou bien de la biosynthèse endogène. Cette dernière est la voie principale en apport d'EL pour l'organisme et comprend 6 ou 7 étapes correspondant respectivement à la synthèse des alkyl-glycérophospholipides (AGPLs) et des alkényl-glycérophospholipides. La voie de biosynthèse a été décrite par Nagan *et al.* en 2001, elle débute dans les peroxyosomes puis se poursuit dans le cytoplasme⁷³.

Les AGPLs sont les constituants majoritaires de la membrane plasmique. Leur squelette glycérol se compose de deux chaînes d'ester d'acide gras en position *sn-1* et *sn-2*. Elles sont, le plus souvent, respectivement saturées et insaturées. La position *sn-3* est, quant à elle, composée d'une tête polaire phosphate souvent reliée par une liaison phosphodiester à des groupements polaires de type choline, éthanolamine, sérine etc. (Figure I. 13).

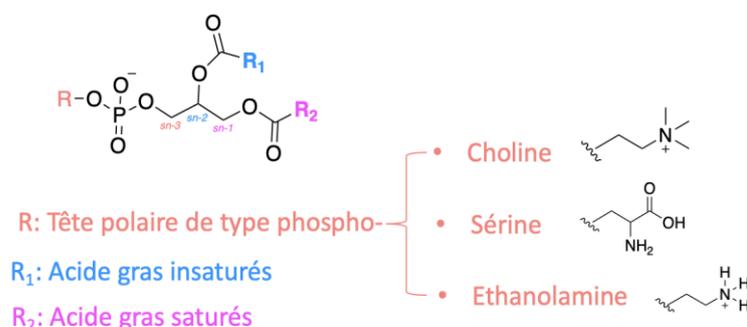


Figure I. 13: Structure des alkyls-glycérophospholipides.

Parmi ces différents APGLs, la 2-lysophosphatidylcholine (2-LPC, 1-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), qui est issue de l'hydrolyse de l'ester d'acide gras en position *sn-2* de la phosphatidylcholine, suite à l'action de l'enzyme phospholipase A2, a été découverte dans les années 1960 (Figure I. 14).

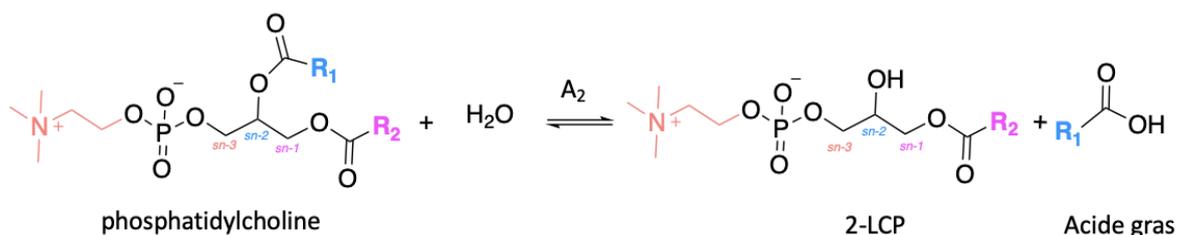


Figure I. 14: réaction d'hydrolyse de la phosphocholine via la phospholipase A2 permettant d'obtenir la 2-LCP.
 $R_1 = (CH_2)_n(CH=CH)_nCH_3$ et $R_2 = (CH_2)_nCH_3$.

⁷² B. Hallgreen, A. Niklasson, G. Stållberg, H. Thorin, *Acta Chemica Scandinavica*, **1974**, 28, 1029-1034.

⁷³ Nagan, R. A. Zoeller, *Prog. Lipid Res.* **2001**, 40, 199-229.

Cette molécule 2-LPC était capable de renforcer l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux sur des modèles *in vitro* et *in vivo* suite à son accumulation dans leur membrane plasmique⁷⁴. Néanmoins, la fragilité de sa liaison ester en position *sn-1* en milieu biologique, suite à l'action de l'acyltransférase, limitait son intérêt thérapeutique⁷⁵. Pour pallier à ce phénomène, des analogues de la 2-LCP possédant des liaisons éthers, plus stables, ont été synthétisés afin de former différents alkyl-lysophospholipides (ALPs) synthétiques.

III.4.3 Les éthers-lipides et lipides anticancéreux synthétiques

Les ALPs sont des analogues de la 2-LCP où les fonctions acyles présentent en position *sn-1* et *sn-2* ont été modulées par une fonction éther plus stable en milieu biologique. (Figure I. 15a). Cette famille d'alkyl-lysophosphocholines synthétiques comprend également d'autres composés qui sont dépourvus du motif glycérol et ne sont constitués que d'une tête polaire phosphate reliée par une liaison phosphodiester à d'autres groupements polaires de type choline, pipéridine etc. et d'une chaîne d'acide gras (Figure I. 15b).

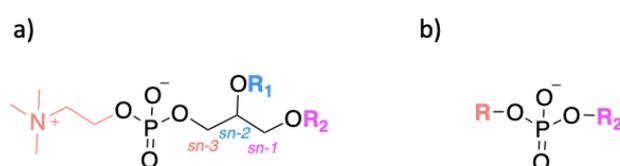


Figure I. 15: structures des a) ALPs analogues de la 2-LVP, b) des ALPs dépourvus de squelette glycérol.
R= Fonction choline, pipéridine etc. R₁ = H, CH₃ etc. et R₂ = (CH₂)_nCH₃.

La présence de ces nouvelles fonctions éthers rend les ALPs moins facilement métabolisable par l'organisme et un bon nombre d'entre eux se sont avérés être des modulateurs immunitaires très efficaces⁷⁶, dont une partie, possédait également des propriétés antiprolifératives importantes⁷⁷. Parmi cette nouvelle classe de composés on retrouve notamment, la miltéfosine, la périfosine ou encore l'Édelfosine. On les appelle également les alkyl-éthers-lipides (AELs) (Figure I. 16).

⁷⁴ a) P. G. Munder and M. Modolell, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1973**, 45, 133–135.

⁷⁵ E. Mulder, L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **1965**, 106, 106-117.

⁷⁶ M. Modolell, R. Andreesen, W. Pahlke, U. Brugger, P. G. Munder, *Cancer Research*, **1979**, 39, 4681- 4686.

⁷⁷ W. J. Houlihan, M. Lohmeyer, P. Workman, S. H. Cheon, *Med. Res. Reviews*, **1995**, 3, 157-223.

a) Structure de la miltéfosine



b) Structure de la périfosine



c) Structure de l'Édelfosine



Figure I. 16: Structure de certains ALPs synthétiques : a) miltéfosine, b) périfosine et c) Édelfosine.

La miltéfosine, bien connue pour ses propriétés anticancéreuses, est toujours couramment utilisée en chimiothérapie aujourd'hui pour traiter les métastases cutanées issues d'un cancer primaire du sein⁷⁸. C'est également un traitement antitumoral efficace chez les patients atteints de lymphome cutané⁷⁹, de métastases cutanées issues d'un mélanome⁸⁰ ou encore de carcinome épidermoïde⁸¹. Des essais cliniques de phase II avaient débuté avec cette molécule pour des patients atteints d'un cancer avancé de la tête et du cou ou encore pour des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique^{82a, b}. Les résultats obtenus ont été décevant suite à une faible activité antitumorale de la molécule. De plus, la présence d'effets secondaires, avec notamment des troubles gastro-intestinaux, ont empêché les médecins d'augmenter la dose du traitement et mis fin à l'essai.

Parmi tous les composés qui constituent la famille des AELs synthétiques, l'Édelfosine a été identifié comme le composé qui a obtenu les meilleurs résultats. Cette molécule a été synthétisé par l'Allemand Günter Kny en 1969.

III.4.4 L'Édelfosine

L'Édelfosine est un alkyl-glycérophospholipide possédant une tête polaire de type phosphocholine. C'est le composé le plus étudié de la famille des APLs. Sa structure moléculaire est proche à celle du PAF. Leur différence réside dans la modulation de la

⁷⁸ R. Kaminsky, *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 **2002**, 3, 550–554.

⁷⁹ R. Dummer, M. Krasovec, J. Röger, H. Sindermann, G. Burg, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1993**, 29, 963–970.

⁸⁰ B. Ragnarsson-Olding, E. Djureen-Mårtensson, E. Månsson-Brahme, J. Hansson, *Acta Oncol.* **2005**, 44, 773–777.

⁸¹ I. Altunay, A. A. Çerman, D. Sakiz, B. Ates, *Ann. Dermatol.* **2015**, 27, 442.

⁸² a) J. Verweij, A. S. Th. Planting, G. Stoter, D. Gandia, J. P. Armand, *Eur. J. Cancer* **1993**, 29, 778–779. b) A. S. T. Planting, G. Stoter, J. Verweij, *Eur. J. Cancer* **1993**, 29, 518–519.

position *sn*-2 qui, pour l'Edelfosine est un groupement méthoxy vs un groupement acétyl pour le PAF (Figure I. 17).

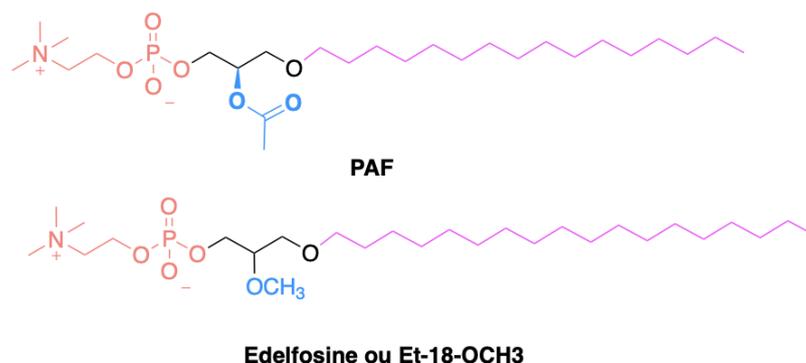


Figure I. 17: Structure du PAF et de l'Édelfosine.

III.4.4.1. Activités anti-tumorales et biomédicales

De nombreux travaux décrivent l'action antinéoplasique de l'Edelfosine. Il a notamment été démontré que cet AEL inhibe la formation des métastases⁸³ et l'angiogenèse⁸⁴. De plus, son activité antimétastatique est accrue lorsqu'elle est couplée à des nanoparticules lipidiques⁸⁵. Cette molécule est également responsable d'autres activités biomédicales (maladies auto-immunes,^{86a, b} leishmaniose^{87a, b}) ce qui la rend polyvalente dans ses utilisations.

Sa grande polyvalence thérapeutique montre également une grande diversité dans ses mécanismes d'action dont beaucoup sont encore mal connus aujourd'hui. Certains d'entre eux sont décrits ci-dessous.

⁸³ A. Estella-Hermoso de Mendoza, M. A. Campanero, H. Lana, J. A. Villa-Pulgarin, J. de la Iglesia-Vicente, F. Mollinedo and M. J. Blanco-Prieto, *Nanomed.*, **2012**, 7, 679–690.

⁸⁴ F. J. Candal, D. C. Bosse, W. Ralph Vogler, E. W. Ades, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1994**, 34, 175–178.

⁸⁵ M. A. Aznae, B. Lasa-Saracibar, A. Estella-Hermoso de Mendoza, M. J. Blanco-Prieto, *Int. J. Pharm.*, **2013**, 454, 720–726.

⁸⁶ a) C. Cabaner, C. Gajate, A. Macho, E. Muñoz, M. Modolell, F. Mollinedo, *Br. J. Pharmacol.*, **1999**, 127, 813–825. b) T. A. Rasmussen, J. L. Anderson, F. Wightman, S. R. Lewin, *Curr. Opin. HIV AIDS*, **2017**, 12, 96–104.

⁸⁷ a) P. Escobar, S. Matu, C. Marques and S. L. Croft, *Acta Trop.*, **2002**, 81, 151–157. b) J. A. Villa-Pulgarín, C. Gajate, J. Botet, A. Jimenez, N. Justies, R. E. Varela-M, Á. Cuesta-Marbán, I. Müller, M. Modolell, J. L. Revuelta, F. Mollinedo, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 11, e0005805.

III.4.4.2. Diversité des mécanismes d'action

Comme les APLs, l'Edelfosine n'a aucune action sur l'ADN des cellules tumorales. Elle agit *via* son insertion dans leur membrane plasmique.

Mollinedo et Gajate se sont beaucoup attachés à comprendre l'un des mécanismes d'action atypique de ce composé. Ils ont démontré que lors de son intégration dans les membranes plasmiques des cellules, l'Edelfosine était un médiateur de la voie de signalisation de la mort cellulaire FAS / CD95 présente au niveau des radeaux lipidiques (microdomaines de faible densité de la MP, très riche en cholestérol et en sphingolipides. Ils sont également appelés « rafts »). Ainsi, l'Edelfosine, en s'incorporant dans la membrane plasmique, réorganiserait les protéines présentes dans les rafts favorisant la formation des DISC ou « Death-inducing signaling complex ». Le rapprochement des différents médiateurs de signalisations de la mort cellulaire (récepteur FAS/CD95 – adaptateur FADD et effecteur caspase-8) vers les complexes de DISC des suites de l'intégration de l'Edelfosine dans la MP déclencherait le processus apoptotique⁸⁸. Mollinedo a également prouvé, sur des cellules leucémiques, que l'effet de l'Edelfosine était propre aux cellules néoplasiques.

Nieto-Miguel *et coll.* ont montré un autre mode d'action pour l'Edelfosine des suites de son insertion dans la MP du réticulum endoplasmique (RE). Les fonctions de ce dernier sont altérées ce qui provoque un stress et conduit à l'apoptose des cellules tumorales. En effet, l'Edelfosine, en s'accumulant dans la MP des cellules tumorales solides va induire un certain nombre de changement dans les processus homéostatiques régulés par le RE. Elle va notamment conduire à l'inhibition de la phosphatidylcholine, de la synthèse des protéines, provoquer un relargage du Ca^{2+} et d'autres facteurs qui vont induire un stress et provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses⁸⁹.

En tant que médicament proapoptotique, un nouveau mode d'action a récemment été découvert. Celui de la modulation du canal SK3 conduisant à une réduction de la migration SK3 dépendantes de cellules cancéreuses mammaires hautement invasives⁶².

⁸⁸ C. Gajate, F. Gonzalez-Camacho and F. Mollinedo, *PLoS ONE*, **2009**, 4, e5044.

⁸⁹ T. Nieto-Miguel, R. I. Fonteriz, L. Vay, C. Gajate, S. Lopez-Hernandez and F. Mollinedo, *Cancer Res.*, **2007**, 67, 10368–10378.

III.4.4.3. Edelfosine et modulation du canal SK3

L'Edelfosine en s'incorporant dans la MP et plus particulièrement dans les rafts serait capable de moduler l'activité de certaines protéines qui y sont intégrées ou qui en sont proches. C'est le cas du canal SK3, médiateur de la migration cellulaire des cellules MDA-MB-435s⁶². L'Edelfosine, à de faible concentration (1 μ M) inhibe la migration cellulaire SK3 dépendante de 50%.

Pour prouver que l'inhibition de la migration dépendait bien d'une action de la molécule *via* le canal SK3 et non par un autre mode d'action, des tests de migration ont été réalisés avec la molécule en présence d'Apamine, inhibiteur peptidique spécifique des canaux SKCa. Pour cela, Potier *et coll.* ont utilisé des SiRNA (Small Interfering RNA) SK3. Ces derniers ont la particularité de se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messagers de la protéine SK3 et d'inhiber son expression au sein des cellules cancéreuses MDA-MB-435s. L'inhibition de l'expression de la protéine a menée à une diminution de la migration cellulaire des cellules tumorales MDA-MB-435s. Lorsque de l'Edelfosine est ajoutée sur ces mêmes cellules, aucune réduction supplémentaire de la migration n'est observée. À contrario, l'expérience inverse a été réalisée. Les cellules 184A1 qui, initialement, n'expriment pas le canal SK3, ont été transfectées avec la protéine. L'ajout de l'Edelfosine sur ces cellules initialement SK3- a mené à une réduction de la migration prouvant que la molécule inhibe bien la migration cellulaire *via* un inhibition du canal SK3.

Pour tenter de comprendre son mécanisme d'action vis-à-vis du canal SK3, Potier et al. se sont intéressés à déterminer le niveau d'expression de la protéine et son adressage à la membrane plasmique. Pour cela, les cellules ont été traitées ou non traitées avec de l'Edelfosine en présence ou non de la Protéinase K. Cette dernière est une enzyme dont le rôle est de cliver des liaisons peptidiques d'une protéine dans le domaine extracellulaire. Ce clivage permet ensuite de comparer le pool membranaire et cytoplasmique. Les cellules ont ensuite été contrôlées par Western Blot (Figure I. 18).

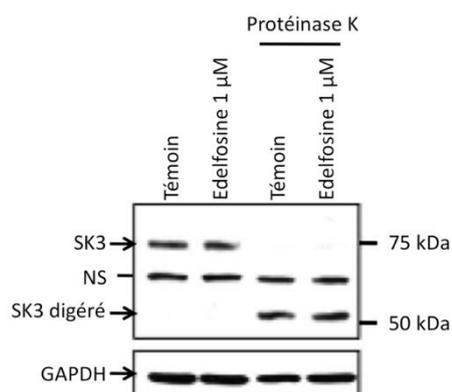


Figure I. 18: Étude de l'adressage membranaire du canal SK3 par Western Blot et l'utilisation de la protéinase K - d'après Potier et coll.⁶²

Après un traitement de 24h avec la molécule, l'adressage à la membrane ainsi que l'expression du canal SK3 ne sont pas impactés.

Une troisième expérimentation a été réalisée pour déterminer l'influence de l'Edelfosine sur la modulation du courant ionique dépendant du canal SK3 (Figure I. 19).

La mesure du courant ionique est réalisée grâce à la technique de Patch-Clamp. Cette technique a été mise au point par Erwin Neher et Bert Sakmann en 1976 ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 1991. Elle consiste à mesurer les courants ioniques micro- ou macroscopiques d'une cellule isolée en réponse à un stimuli physique ou chimique.

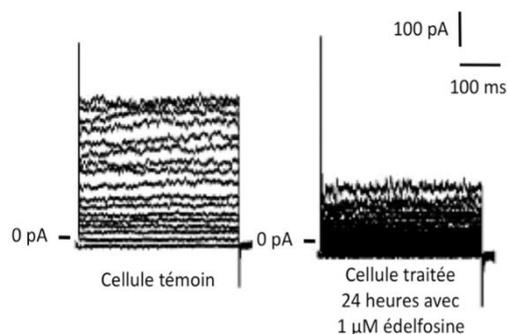


Figure I. 19: Mesure du courant ionique des cellules MDA-MB-435s traitées ou non pendant 24H avec 1µM d'Edelfosine grâce à la technique de patch-clamp - d'après Potier et coll.⁶²

Dans les cellules MDA-MB-435s, l'application de 1µM d'Edelfosine pendant 24h entraîne une diminution drastique du courant ionique ainsi qu'une dépolarisation de leur MP. C'est la première fois que des études montrent l'inhibition du courant d'un canal ionique impliqué dans la migration des cellules cancéreuses par l'Edelfosine.

Toute cette étude a permis de proposer une hypothèse de mécanisme d'action pour cette molécule (Figure I. 20).

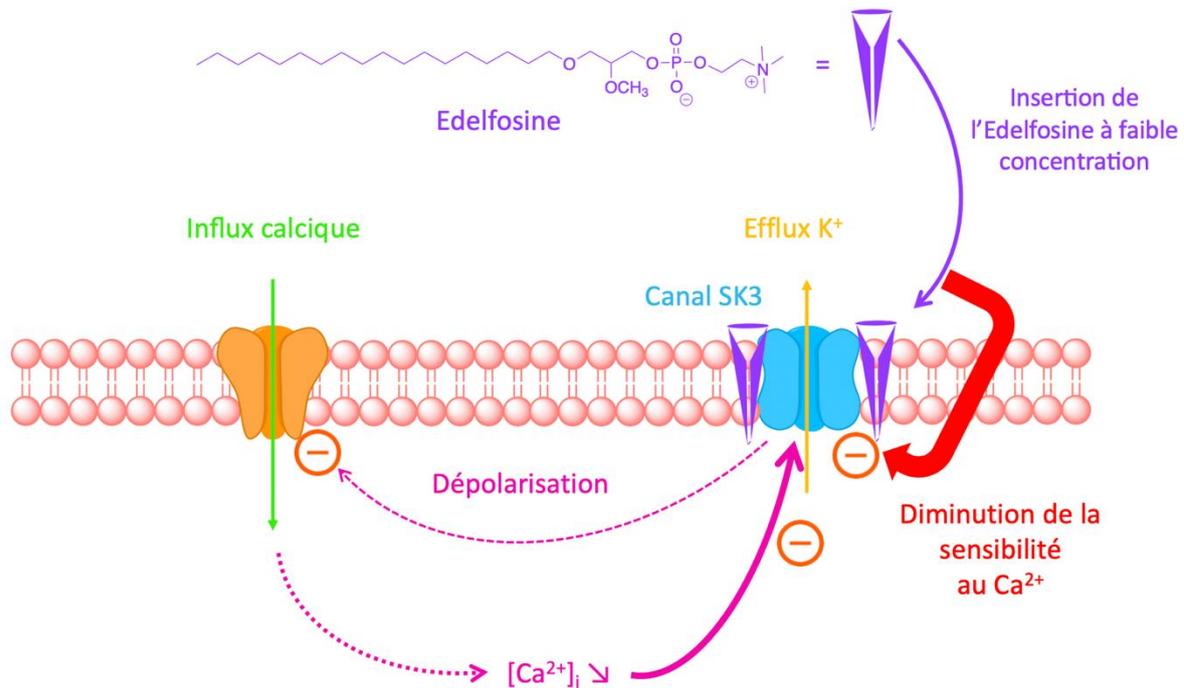


Figure I. 20: Hypothèse de mécanisme d'action pour l'Edelfosine. Inspiré de Potier *et coll.*⁶²

Néanmoins, le mécanisme d'action de l'Edelfosine n'est pas encore totalement élucidé. Les études ont démontré que la molécule, en s'intégrant dans la bicouche lipidique, dépolarise de façon importante la membrane plasmique des cellules, ce qui va induire une diminution du gradient électrochimique de calcium et conduire à une réduction de la concentration calcique intracellulaire. Cette dernière serait responsable de la diminution de l'activité du canal SK3 mais aussi, de l'inhibition de la migration cellulaire.

III.4.4.4. Efficacité et toxicité

Pour juger de l'efficacité et de la toxicité de l'Edelfosine, divers tests précliniques sur des animaux ont été réalisés. Ces études ont montré que le mode d'injection de la molécule ainsi que sa préparation étaient importants pour son efficacité. Elles ont également révélé un certain nombre d'effets secondaires tels que des hémolyses lors d'une injection par voie intraveineuse, ou encore des irritations gastro-intestinales par voie orale. De façon globale,

la toxicité s'est avérée négligeable pour des doses efficaces de la molécule sur le développement de tumeurs solides primaires dans des modèles murins⁹⁰.

Des essais cliniques de phase I et II ont donc été engagés. L'essai de phase I s'est avéré encourageant avec une diminution des cellules tumorales circulantes et une rémission sur quelques mois. Quelques effets secondaires ont aussi été constatés comme des troubles gastro-intestinaux, hépatiques et pulmonaires^{91a, b, c}. Quant à l'essai de phase II, moins de 2 patients sur un panel de 116 individus ont eu des effets bénéfiques. La majorité d'entre eux a développé des effets secondaires comme une anorexie, des vomissements ou des nausées. Des résultats plus encourageants ont été obtenus avec une augmentation de la concentration de l'Edelfosine mais ils ont été couplés avec une augmentation prévisible des effets secondaires⁹².

En raison de l'efficacité variable de l'Edelfosine et du nombre d'effets secondaires qu'elle engendre *in vivo*, des études structure-activité ont été précédemment réalisées au laboratoire pour tenter de palier à sa toxicité et pourquoi pas augmenter son efficacité.

III.4.4.5. Études structure-activité de l'Edelfosine⁸

Notre laboratoire s'est donc attaché à réaliser une étude structure-activité de la molécule afin de déterminer quelles sont les parties indispensables à conserver pour le maintien de son activité biologique vis-à-vis de la migration cellulaire dépendante du canal SK3. L'objectif était d'obtenir des analogues possédant une toxicité moindre mais dont l'activité inhibitrice des canaux SK3 soit conservée. Les positions des possibles variations structurales envisagées sont représentées dans la [Figure I. 21](#).

⁹⁰ W. Hardman, C. Barnes, C. Knight and I. Cameron, *Br. J. Cancer*, **1997**, 76, 347–354.

⁹¹ a) W. E. Berdel, et al., *American Cancer Soc.*, **1982**, 50, 2011-2015. b) W. E. Berdel, U. Fink, P. A. Maubach, B. Permanetter and J. Rastetter, *Blut*, **1982**, 44, 177–186. c) W. E. Berdel, U. Fink and J. Rastetter, *Lipids*, **1987**, 22, 967–969.

⁹² P. Drings, I. Günther, U. Gatzemeier, F. Ulbrich, B. Khanavkar, W. Schreml, J. Lorenz, W. Brugger, H. D. Schick, J. v. Pawel and R. Nordström, *Oncol. Res. Treat.*, **1992**, 15, 375–382.

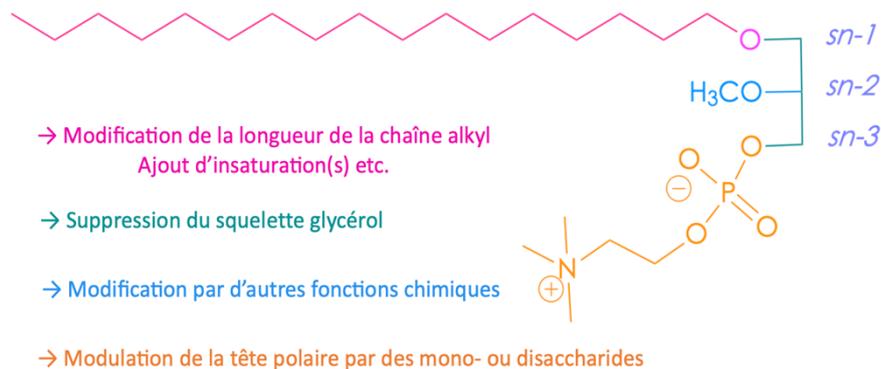


Figure I. 21: Vision globale des modifications structurales de l'Edelfosine.

Les résultats obtenus pour les différentes modulations sont détaillés dans les paragraphes suivants.

a) Analogues dépourvus du squelette glycérol

L'analogue de l'Edelfosine qui ne possède plus le squelette glycérol est la miltéfosine (hexadécylphosphocholine Figure I. 22). La tête polaire est directement reliée à la chaîne alkyle.



Figure I. 22: Structure de la miltéfosine.

Les tests de migration cellulaire *in vitro* ont montré que la miltéfosine réduisait la migration cellulaire SK3 dépendante de - 20% à 300 nM, ce qui est significativement plus faible que l'Edelfosine qui, pour une même concentration, inhibe la migration cellulaire dépendante du canal SK3 de -60%⁹³. Pour autant, la miltéfosine fait tout de même partie des APCs connu pour avoir des propriétés anticancéreuses⁹³. On peut donc en déduire que le squelette glycérol semble jouer un rôle important dans la modulation de l'activité des canaux SKCa.

⁹³ Hilgard, E. Kampher, L. Nolan, J. Pohl, T. Reissmann, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1991**, *117*, 403–408.

b) Modulation de la position *sn-1* (Figure I. 23)

Des diminutions de la longueur de la chaîne alkyl ont été synthétisés avec des analogues en 16 et 14 carbones notamment.

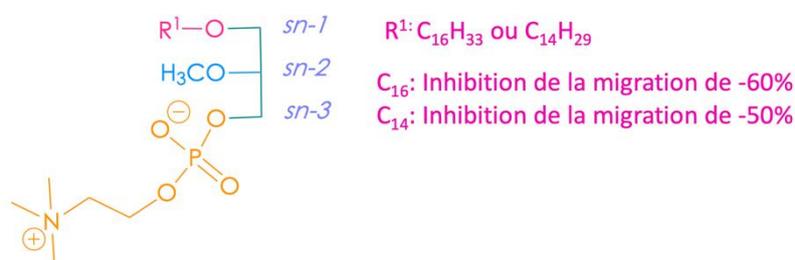


Figure I. 23: Modulation de la position *sn-1* de l'Edelfosine.

L'analogue de l'Edelfosine en C16 inhibe la migration dépendante de la même façon que l'Edelfosine tandis que celui à 14 carbones inhibe la migration cellulaire de façon un peu moins importante. Autrement dit une chaîne alkyl composé d'un minimum de 14 carbones semble nécessaire pour moduler l'activité du canal SK3. La longueur de la chaîne grasse est donc un facteur important pour la modulation du canal SK3.

Au vu des résultats obtenus, des études de viabilité cellulaire concernant l'Edelfosine et son analogue en C16 ont été effectuées (Figure I. 24).

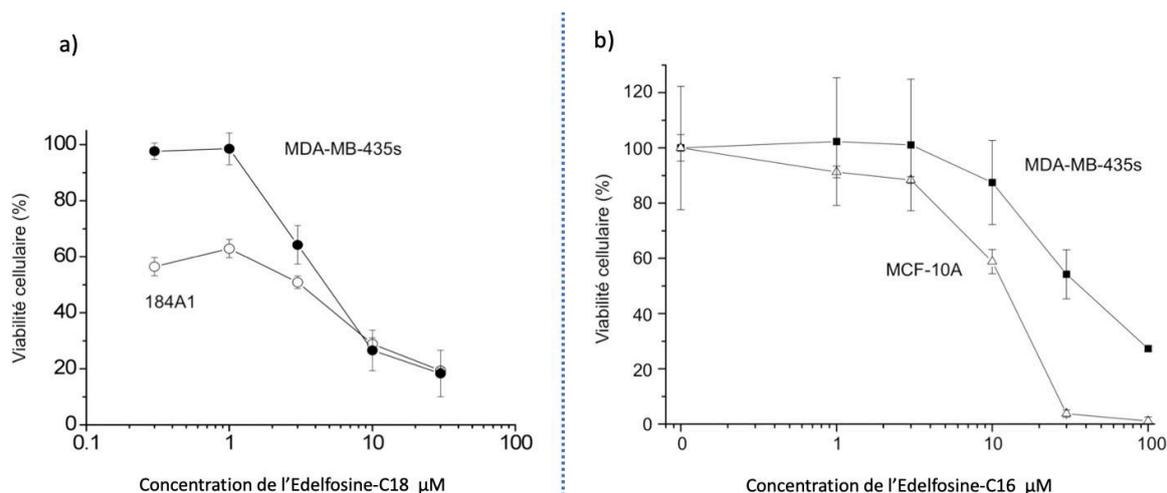


Figure I. 24: Tests de toxicité cellulaire de l'Edelfosine et de son analogue en C16. (184A1 et MCF-10A: cellules épithéliales non cancéreuses issues de glandes mammaires).⁸

À sa concentration active de 1 μM , l'Edelfosine n'est pas toxique envers les cellules cancéreuses MDA-MB-435s mais l'est beaucoup plus pour les cellules saines 184A1. Ces résultats peuvent expliquer le nombre d'effets secondaires recensés lors des essais cliniques réalisés avec cette molécule. Quant à son homologue en C16, il est beaucoup moins toxique que l'Edelfosine envers les cellules saines. C'est pourquoi, pour la suite des modulations, il a été décidé que la chaîne alkyl en 16 carbones serait conservée.

c) Modulation de la position *sn-2* (Figure I. 25).

Les études révèlent que le groupement méthoxy initialement présent en position *sn-2* est essentiel pour l'inhibition de l'activité du canal SK3. De plus, la diversité des résultats obtenus prouve que cette position joue un rôle important dans la modulation du canal.

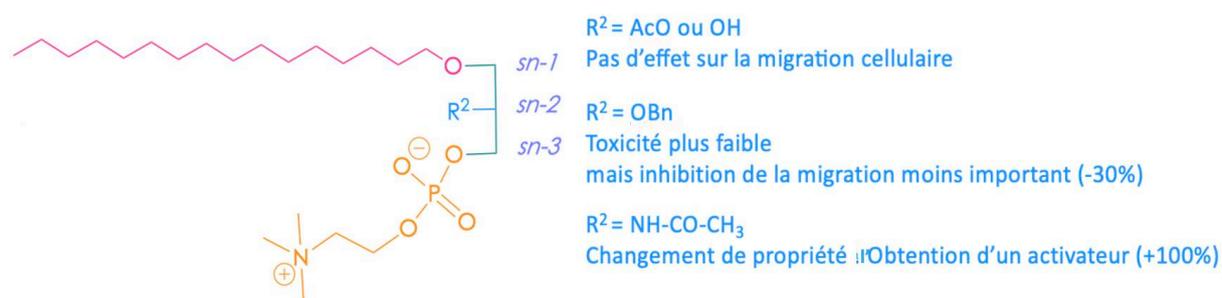


Figure I. 25: Modulation de la position *sn-2*.

d) Modulation de la position *sn-3*

La dernière position *sn-3* a été modulée par divers saccharides (mono ou disaccharides) protégés sous la forme d'acétate majoritairement ou bien déprotégés (Figure I. 26).



Figure I. 26: Modulation de la position *sn-3*.

Il a été décidé de substituer la tête polaire phosphocholine par des groupements saccharidiques des suites d'une analogie des études relatives à un autre canal potassique, le TREK-1. Ce dernier est activé par des lipides ayant une forme de cône inversé et possédant une tête polaire volumineuse⁹⁴. Fait intéressant, plus la tête polaire est volumineuse, plus l'effet sur le canal TREK-1 est important. L'hypothèse étant que la substitution de la phosphocholine par un groupement saccharidique augmente l'activité inhibitrice des analogues sur la migration cellulaire et sur le canal SK3 mais aussi puisse limiter la toxicité du fait de l'absence de charge.

Ainsi, parmi tous les saccharides testés, le β -lactose a fourni les meilleurs résultats.

e) Analogue retenu

Ainsi, l'analogue de choix est constitué d'une tête polaire dissaccharidique de type β -lactose insérée sur la position *sn-1* du motif glycérol, d'un groupement méthoxy en *sn-2* et d'une chaîne lipide en 16 carbones en position *sn-3*. Il a été baptisé « Ohmline » (Figure I. 27).

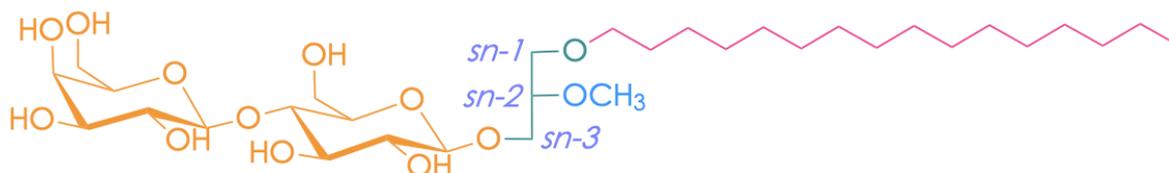


Figure I. 27: Structure de l'Ohmline.

L'Ohmline possède une faible solubilité qui est de l'ordre de 6 mg/mL (concentration de 9 mM) ce qui peut poser quelques problèmes lorsqu'il s'agit d'administrer la molécule lors de la réalisation de tests *in vivo*. Les tests de toxicité aiguë sont également impossibles. Dans le but d'améliorer la solubilité de l'Ohmline, Sevrain *et al.* ont synthétisé des analogues de type glyco-phospho-glycero-ether-lipides (GPGELs) afin de les comparer à l'Ohmline⁹⁵. L'insertion d'un groupement phosphate entre la tête polaire dissaccharidique et le motif glycérol a

⁹⁴ F. Maingret, *EMBO J.* **2000**, *19*, 2483–2491

⁹⁵ C. M. Sevrain, J.-P. Haelters, A. Chantôme, H. Couthon-Gourvès, A. Girault, C. Vandier, P.-A. Jaffrès, *MedChemComm* **2012**, *3*, 1471.

permis d'augmenter la solubilité à 13 mg/mL (13 mM). Néanmoins, malgré une hausse de la solubilité, l'efficacité d'inhibition du courant ionique dépendant du canal SK3 ainsi que l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire des analogues n'ont pas été améliorées et les résultats ont été similaires à ceux de l'Ohmline.

III.4.5 L'Ohmline⁸

III.4.5.1. Effet sur la migration SK3 dépendante

Les tests de migration cellulaire de l'Ohmline sur les cellules cancéreuses MDA-MB-435s ont révélé une inhibition de la migration dépendante de la concentration employée (Figure I. 28a). Après 24h d'incubation de la molécule sur les cellules cancéreuses et pour une concentration de 300 nM, une inhibition de la migration à hauteur de 50% est obtenue.

La question, qui s'est posée ensuite, concerne l'action spécifique de l'Ohmline envers le canal SK3. Pour cela, la molécule a été testée sur des cellules cancéreuses MDA-MB-435s qui n'expriment plus le canal SK3 (Figure I. 28b).

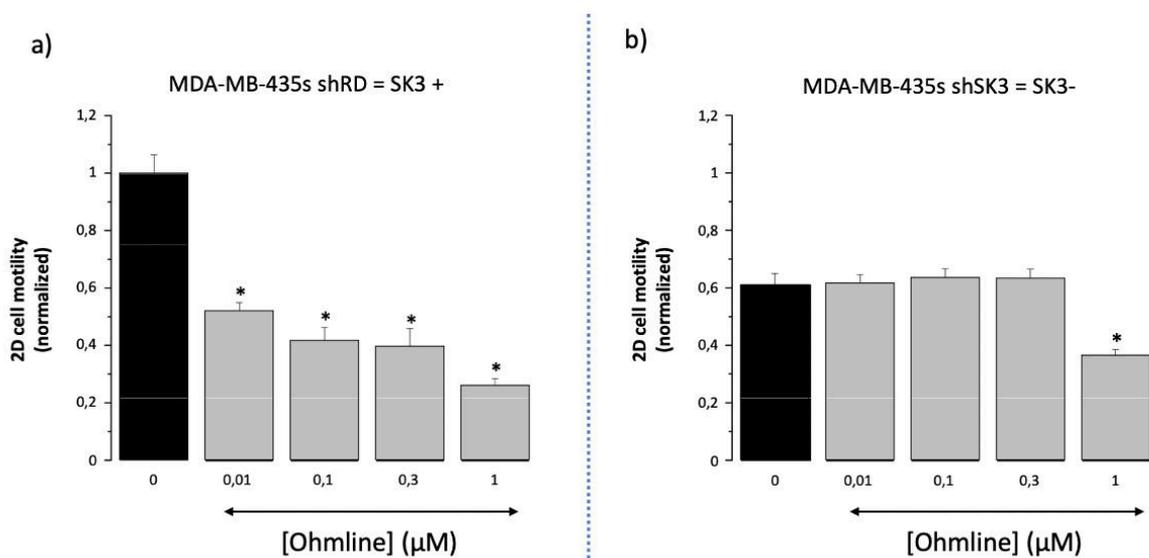


Figure I. 28: a) Inhibition de la migration SK3 dépendante par l'Ohmline à différentes concentrations. b) Spécificité de l'Ohmline vis-à-vis du canal SK3 - Test d'inhibition de la migration sur des cellules cancéreuses qui n'expriment plus le canal SK3 – d'après Girault *et coll.* (2011)⁸.

La suppression des canaux SK3 des cellules MDA-MB-435s a totalement supprimé l'effet inhibiteur de l'Ohmline sur la migration cellulaire, sauf à la concentration de 1 μM (Figure I. 28b). Ces résultats montrent que des concentrations efficaces d'Ohmline jusqu'à 0.3 μM ont réduit la migration cellulaire SK3-dépendante. Cependant, l'effet de l'Ohmline observé à la concentration de 1 μM sur les cellules SK3 laisse supposer que l'Ohmline puisse moduler la migration *via* des voies qui soient indépendantes de l'activité du canal SK3.

III.4.5.2. Modulation du courant ionique

Pour montrer l'effet de l'Ohmline sur les canaux SK3 des cellules MDA-MB-435s, des mesures de patch-clamp ont été réalisées. Les études montrent l'enregistrement typique des courants sortants témoins de cellules entières et du courant sortant après l'incubation de 1 μM d'Ohmline pendant 24h. On remarque que le traitement avec l'Ohmline a réduit considérablement les courants SKCa sensibles à l'Apamine, qui sont principalement des courants SK3⁷. Contrairement à la migration, la modulation du courant ionique, n'est pas dépendant de la concentration de l'Ohmline utilisée. Les valeurs du courant dépendant de SK3 résultant, après 24 h d'incubation de l'Ohmline à différentes concentrations, étaient de :

-34,8 \pm 7,9% à 10 nM

-53,3 \pm 12,0% à 100 nM

-59,5 \pm 22,2% à 300 nM

et de -51,7 \pm 17,6% à 1 μM

Une inhibition de -73% a été obtenu pour une concentration de 10 μM .

III.4.5.3. Test de viabilité cellulaire

Au vu des résultats plus qu'encourageants, des études de toxicité ont été effectuées sur cellules saines et cancéreuses (Figure I. 29).

Contrairement à l'Edelfosine, l'Ohmline n'a aucun effet sur la viabilité des cellules non tumorales MCF-10A jusqu'à 10 μM . La même observation est faite sur la viabilité des cellules cancéreuses sauf à la concentration de 10 μM , où un léger effet toxique est observé.

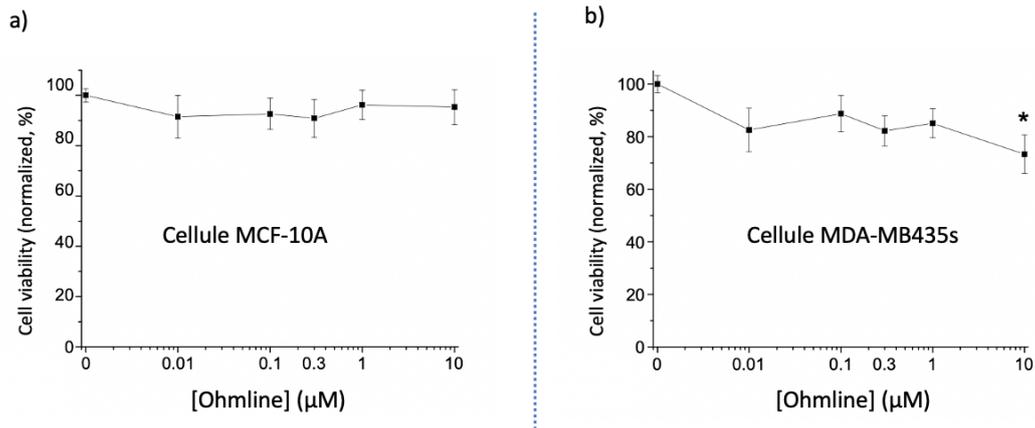


Figure I. 29: Tests de viabilité cellulaire de l'Ohmline sur a) cellules saines et b) cellules cancéreuses - d'après Girault *et coll.* (2011)⁸

III.4.5.4. Sélectivité vis-à-vis des canaux SK3

Les études se sont poursuivies par la détermination de la sélectivité de l'Ohmline envers la famille des canaux SKCa et IKCa (SK4). Les résultats sont présentés dans la Figure I. 30.

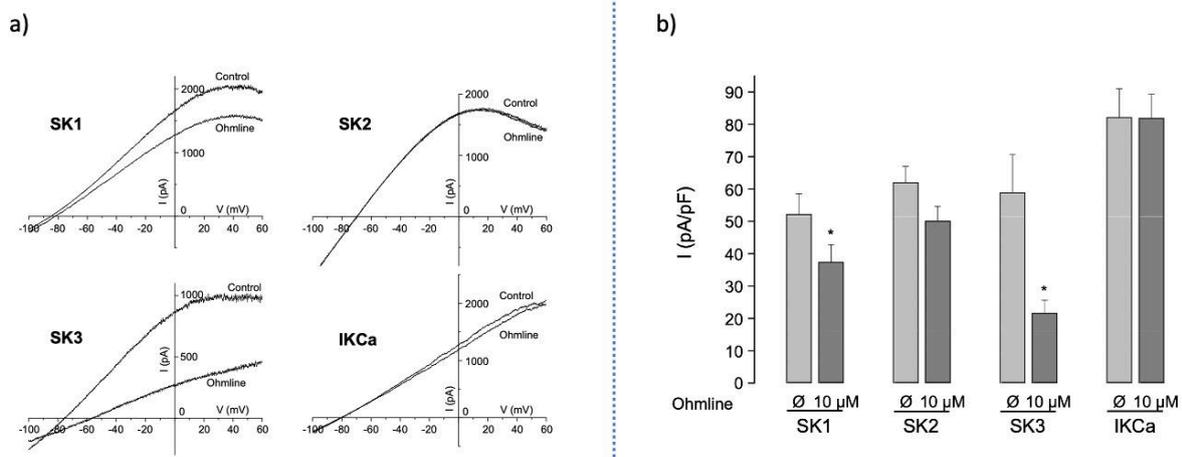


Figure I. 30: a) Action de l'Ohmline sur la modulation du courant ionique des isoformes de la famille des canaux SKCa et IKCa à 10µM. B) Histogrammes correspondants à la modulation de chaque isoforme. D'après Girault *et coll.* (2011)⁸

En résumé, l'Ohmline n'a aucune action sur la famille IKCa (SK4), elle possède un effet négligeable sur le canal SK2 et module SK1 à hauteur de -20%. Pour finir, l'Ohmline module uniquement le canal SK3 de façon significative à hauteur de -73% à 10µM. C'est la première

molécule à montrer une sélectivité aussi importante vis-à-vis de la famille des canaux SKCa et IKCa.

III.4.5.5. Effet de la stéréochimie de l'Ohmline

Des études visant à comprendre l'influence de la stéréochimie de la molécule sur l'inhibition de l'activité du canal SK3 ont été menées. En effet, l'Ohmline possède un carbone asymétrique en position *sn-2* du squelette glycérol. Cette question a mené à la synthèse de chacun des diastéréoisomères β -R et β -S au sein de notre laboratoire. Ils ont ensuite pu être évalués (Figure I. 31).

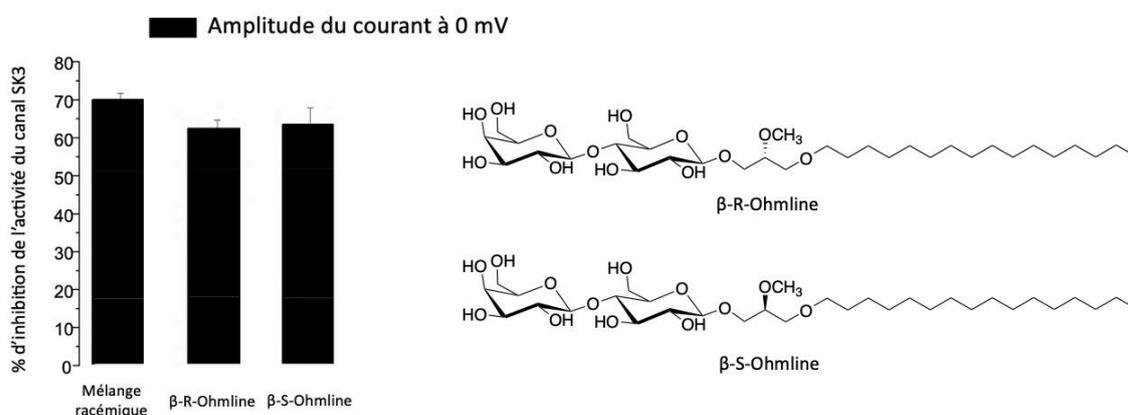


Figure I. 31 : Effet des deux diastéréoisomères de l'Ohmline sur la modulation de l'activité du canal SK3.⁸

Les deux diastéréoisomères exercent la même activité sur le canal SK3 en comparaison au mélange racémique. Elles ont toutes une efficacité comparable. C'est pourquoi, pour la suite des études, le mélange racémique est utilisé.

L'Ohmline est donc une molécule amphiphile capable de moduler efficacement et sélectivement à la fois le courant ionique et la migration cellulaire dépendants du canal SK3 et ce, sans générer aucune toxicité aux concentrations efficaces. C'est à notre connaissance la première molécule de cette nature à posséder ce profil pharmacologique.

Ces très bons résultats ont permis la réalisation d'une étude de l'effet de cette molécule sur des modèles *in vivo*.

III.4.5.6. Études *in vivo*

La capacité de l'Ohmlin à réduire le développement de métastases *in vivo* a été étudiée grâce à un modèle murin de xélogreffe orthotopique. Des souris « nues » ont reçu une greffe de cellules MDA-MB-435s modifiées génétiquement pour exprimer la luciférase. Certaines d'entre elles ont ensuite été traitées par voie intraveineuse avec 15 mg/kg d'Ohmlin trois fois par semaine pendant 12 semaines. Quant aux autres, elles ont été traitées dans les mêmes conditions avec un véhicule. Durant toute l'étude, l'Ohmlin n'a révélé aucune toxicité (Figure I. 32).

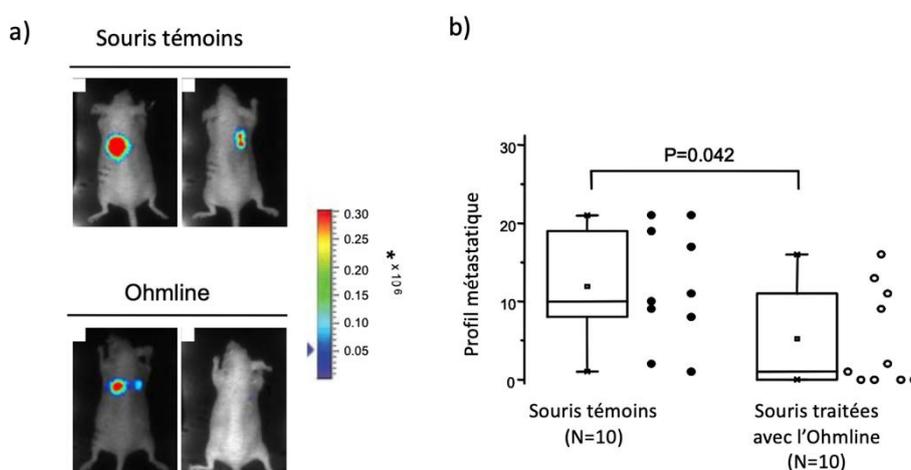


Figure I. 32 : a) Images de bioluminescences des souris témoins et des souris qui ont reçu le traitement. b) Score métastatiques des souris témoins versus souris traitées avec l'Ohmlin. D'après Girault et coll. (2011)⁸.

A la fin du traitement, la présence de métastases au niveau du poumon, des ganglions lymphatiques et des os a été mise en évidence. Certaines ont été visualisées *in vivo* par imagerie de bioluminescence (BLI) tandis que d'autres ont été visualisées *ex vivo*. En utilisant une approche clinique, Girault et coll. ont pu quantifier le nombre de métastases présentes par souris en fonction de l'intensité obtenue par BLI des métastases. Il en ressort que le traitement avec l'Ohmlin déplace le score métastatique vers un profil moins métastatique. Une seconde étude *in vivo* a démontré que l'Ohmlin a tendance à diminuer les métastases osseuses et pulmonaires, sites préférentiellement colonisés suite à un cancer primaire mammaire et qu'elle n'avait, en revanche, aucun impact sur la tumeur originelle (Figure I. 33).

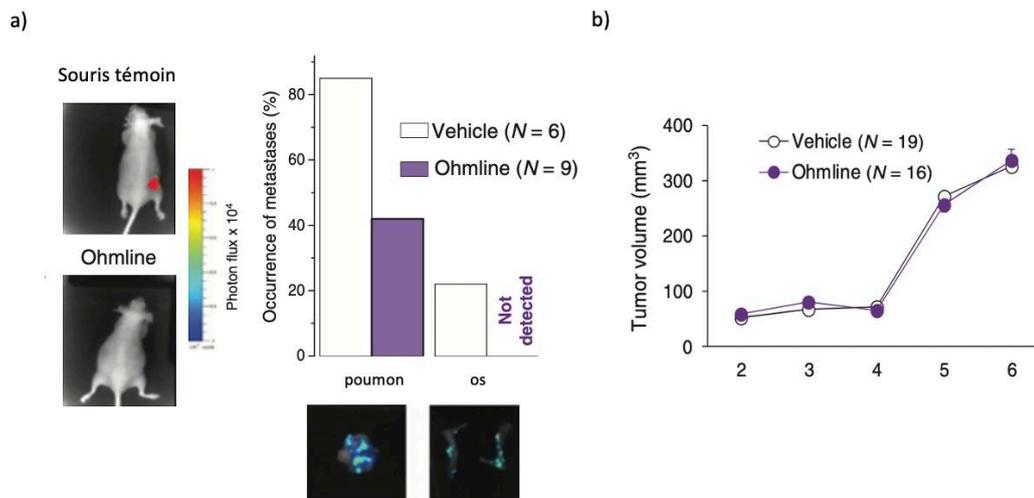


Figure I. 33: a) images bioluminescentes de souris « nues », 15 semaines après les injections des cellules SK3 et le traitement avec l'Ohmlin, ou un placebo, sur des souris qui ont développé des tumeurs pulmonaires et osseuses. (N correspond au nombre de souris), les images *ex vivo* de métastases pulmonaires et osseuses sont présentées sous le graphique. b) Évolution dans le temps de la croissance tumorale enregistrée chez le véhicule et les souris traitées par l'Ohmlin. Adapté de Chantôme *et al.* (2013)⁵⁷

Le traitement des souris qui ont reçu l'Ohmlin entraîne l'absence des métastases osseuses tandis que pour les métastases pulmonaires, une réduction de 50% est observé. L'Ohmlin possède donc une action antimétastasiante mais n'a aucun effet sur le développement de la tumeur primaire.

III.4.5.7. Hypothèse de mécanisme d'action⁵⁷

Chantôme *et al.* se sont ensuite intéressés à la compréhension du mécanisme d'action de l'Ohmlin. Grâce à un Western Blot, ils ont mis en évidence le canal calcique non voltage dépendant responsable de l'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules cancéreuses (Figure I. 34). Il s'agit de Orai1, canal calcique déjà connu pour être responsable de la migration dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses.

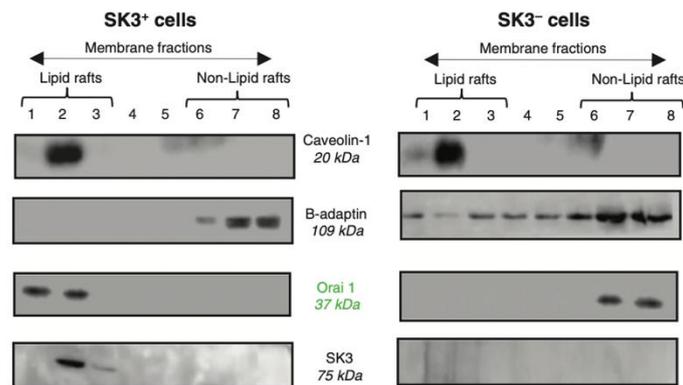


Figure I. 34: Wester Blot qui prouve la présence du canalpexe Orai1/SK3 dans les radeaux lipidiques des cellules cancéreuses MDA-MB-435s. D'après Chantôme *et al.* (2013)⁵⁷.

Dans leur étude, ils démontrent que le canal SK3 contrôle l'entrée constitutive du Ca^{2+} et la migration des cellules cancéreuses grâce à une interaction avec le canal calcique Orai1. Les mécanismes d'actions sont détaillés dans la Figure I. 35 ci-dessous. Son association avec le canal Orai1 formerait un canalpexe fonctionnel au sein des radeaux lipidiques et serait responsable de la migration cellulaire des cellules tumorales. La présence de lésions ostéolytiques rend l'activité du canalpexe encore plus importante. Leur localisation au sein des rafts semble primordiale pour contrôler la migration des cellules cancéreuses. Les canaux SK3 et Orai1, lorsqu'ils sont dissociés et en dehors des rafts, ne sont pas capable de promouvoir la migration cellulaire. L'Ohmline, en s'incorporant dans la membrane plasmique, jouerait le rôle d'agent perturbateur en dissociant le canalpexe Orai1/SK3 et en délocalisant chacune des protéines en dehors des radeaux lipidiques les rendant ainsi non fonctionnelle.

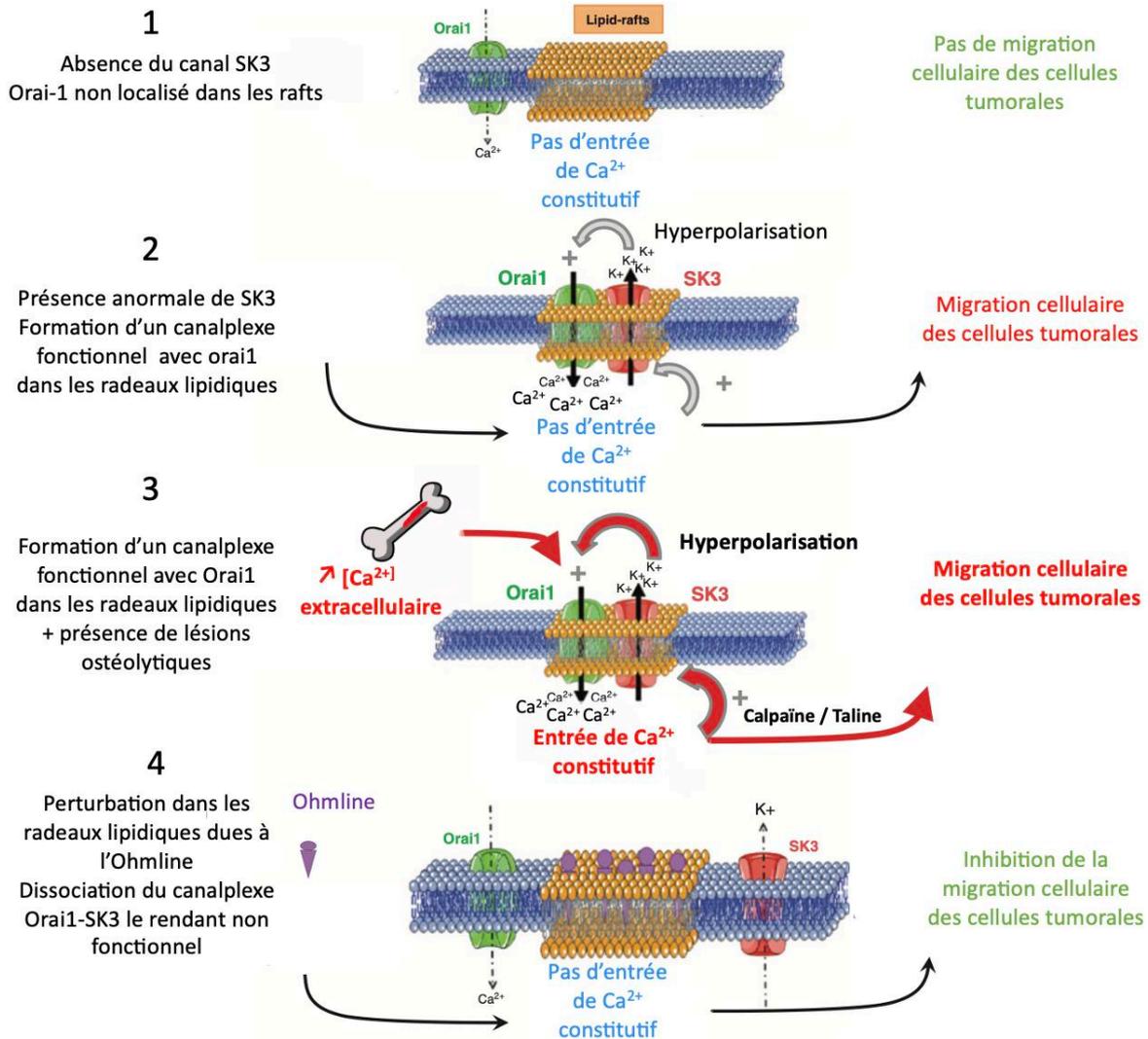


Figure I. 35: Mécanisme d'action proposé pour l'Ohmline. Inspiré de Chantôme *et coll.*⁵⁷.

L'Ohmline, de par sa structure qui diffère de tous les modulateurs de canaux ioniques connus aujourd'hui et de par son profil pharmacologique atypique, est reconnu prometteuse pour le développement de nouveaux agents antimétastatiques.

III.4.6 Étude de dynamisme moléculaire et RMN 2H ⁹⁶

Bien que l'action de l'Ohmline, sur la modulation de l'activité du canal SK3 conduisant à l'inhibition du développement des métastases, soit peu commune, son interaction au sein de

⁹⁶ F. E. Herrera, C. M. Sevrain, P.-A. Jaffrès, H. Couthon, A. Grélard, E. J. Dufourc, A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, C. Vandier, A. M. Bouchet, *ACS Omega* **2017**, 2, 6361–6370.

la membrane plasmique ainsi que son mécanisme d'action à l'échelle cellulaire et moléculaire sont encore inconnus. Herrera *et al.* ont réalisé une étude visant à évaluer le comportement de l'Ohmline une fois incorporée dans des membranes modèles. Pour cela, ils ont souhaité répondre à deux grandes questions : 1) Quel est le coefficient de partition de l'Ohmline entre le milieu aqueux et une bicouche lipidique ? 2) l'Ohmline possède-t-elle des interactions spécifiques avec les lipides de la MP qui pourraient engendrer une modification des propriétés biophysiques de la membrane?

Pour répondre à la première question, des études de RMN du deutérium ou RMN ^2H ont été réalisées.

III.4.6.1. Étude par RMN ^2H

Pour réaliser cette étude, une version de l'Ohmline deutérée a été synthétisée au laboratoire par le Dr. Charlotte Sevrain. Le groupe méthoxy en position *sn*-2 a été remplacé par un équivalent deutéré $-\text{OCD}_3$ (Figure I. 36).

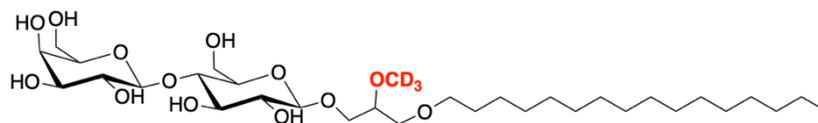


Figure I. 36 : Analogue deutéré en position *sn*-2 de l'Ohmline.

La RMN ^2H est intéressante car elle permet de déterminer si l'Ohmline, lorsqu'elle est en contact avec une membrane modèle (liposome), présente un signal isotrope ou anisotrope correspondant respectivement à un environnement aqueux ou lipidique. Les études ont été réalisées dans les membranes modèles réalisées à partir de phosphatidylcholine (POPC) ou d'un mélange POPC / cholestérol (Chol)/ sphingomyéline (SM) en différentes proportions.

La première étude en RMN ^2H permet de déterminer le coefficient de partition de l'Ohmline au sein de différents environnements lipidiques ou non (Figure I. 37).

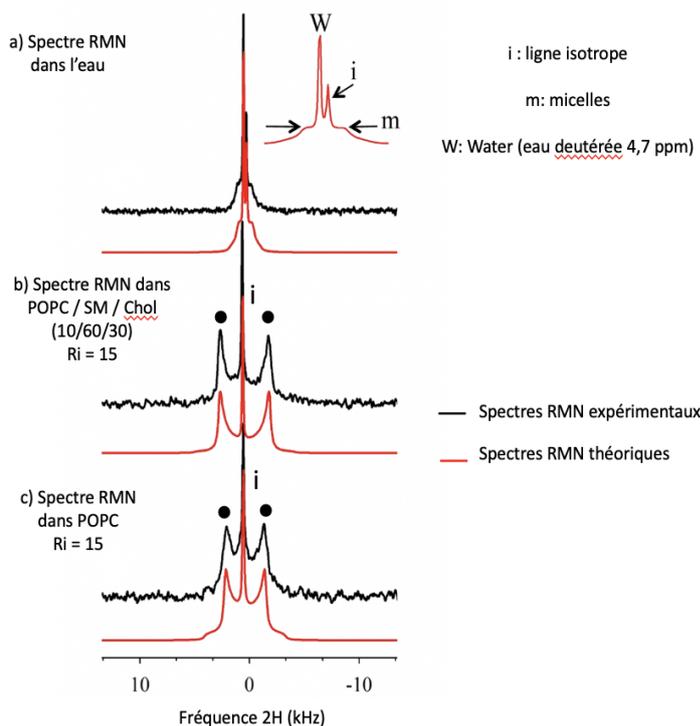


Figure I. 37 : Spectres RMN ^2H de l'Ohmline deutérée dans différents environnements lipidiques ou non. Modifiée d'après Herrera et coll.⁹⁶

Le spectre a) de la Figure I. 37 correspond au spectre RMN ^2H de l'Ohmline deutérée dans l'eau à 7,6 mM. Il apparaît que l'Ohmline existe alors sous une forme libre (signal isotrope i, pour 18%) et sous forme agrégée (probablement des micelles, m pour 82%). Dans un mélange POPC / SM / Chol (spectre b) la symétrie spectrale obtenue (●) de part et d'autre de la ligne isotrope est caractéristique d'une compartimentalisation complète de l'Ohmline au sein de la membrane modèle indiquant qu'après incorporation dans la membrane, le processus est

irréversible (les signaux associés aux micelles ou à la molécule en solution dans l'eau ne sont plus observés). La même observation est faite pour les membranes modèles réalisées à partir de POPC 100% (spectre c). Cela prouve que l'Ohmline possède une affinité plus importante pour les bicouches lipidiques que pour une auto-association en micelles dans les milieux aqueux. De plus, la composition de la bicouche n'a pas l'air d'avoir d'importance puisque des résultats identiques sont obtenus à la fois dans 100% POPC et dans un mélange 10/60/30 de POPC / SM / Chol. Le signal est élargi dans les membranes rigides riches en cholestérol montrant une mobilité réduite de l'Ohmline dans de telles membranes.

Une seconde étude par RMN ^2H à l'état solide, cette fois-ci en utilisant du POPC perdeutééré comme sonde (10%) sur la chaîne palmitique en position *sn-1*, a été menée pour comprendre l'effet de l'Ohmline sur la dynamique de plusieurs systèmes membranaires. Les expérimentations ont été faites à 45°C (Figure I. 38) car, à température ambiante, aucun effet sur la dynamique des membranes n'est observé. En absence d'Ohmline et pour les

systèmes comportant uniquement du POPC, le spectre obtenu est relativement étroit, signe d'un dynamisme important de la membrane modèle (spectre a). À *contrario*, plus la quantité de cholestérol augmente plus les spectres s'élargissent indiquant une diminution de la dynamique des membranes modèles (spectres b et c).

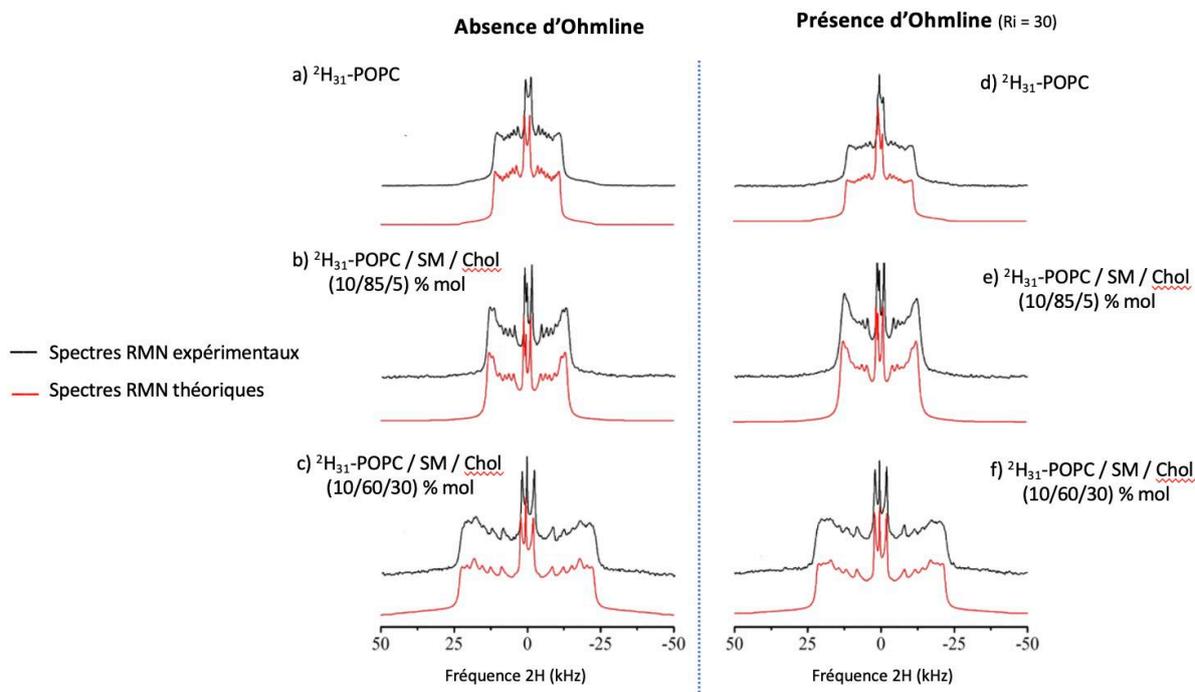


Figure I. 38: Spectres RMN ^2H à l'état solide réalisées à 45°C dans différents environnements lipidiques en présence ou non d'Ohmline. Modifiée d'après Herrera et coll.⁹⁶

En présence d'Ohmline, les formes spectrales sont identiques mais deviennent légèrement plus étroites, preuve que le composé réduit la dynamique des membranes. L'étude du paramètre d'ordre carbone - hydrogène ou carbone – deutérium de la chaîne lipidique est beaucoup plus représentative (Figure I. 39). Ce paramètre, déterminé expérimentalement par RMN ^2H ou de façon théorique par des approches de modélisation (dynamique moléculaire), permet d'estimer le degré d'ordre tout au long de la chaîne carbonée placée dans un environnement lipidique⁹⁷.

Sur la Figure I. 39, la présence d'un plateau pour les carbones 2 et 8 et d'un paramètre d'ordre élevé est représentative de la rigidité qu'exerce l'environnement proche des têtes

⁹⁷ T. J. Piggot, J. R. Allison, R. B. Sessions, J. W. Essex, *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 5683–5696.

polaires des amphiphiles de la bicouche sur les carbones qui lui sont proches. À l'inverse, le faible paramètre d'ordre obtenu pour les positions 10 à 16, indique un désordre très important de ces positions au sein des membranes modèles. Si l'on s'intéresse aux courbes obtenues pour les différentes membranes modèles testées, on constate que dans le cas du POPC seul (courbes a), la présence d'Ohmlin (courbe d) ne modifie pas le paramètre d'ordre de la bicouche. Pour un mélange complexe en lipides POPC / SM / Chol (10 /85 /5) (courbes b et e), le paramètre d'ordre est légèrement plus désordonné que pour le cas précédent. Par la suite, le pourcentage de cholestérol a été augmenté jusqu'à 30% révélant, en présence de l'Ohmlin, une augmentation du désordre au sein de la bicouche lipidique (courbes c et f).

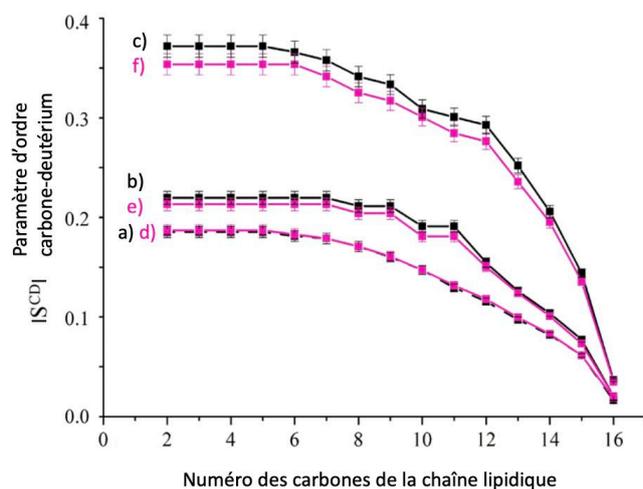


Figure I. 39 : Mesure du paramètre d'ordre en présence ou non de l'Ohmlin pour différentes compositions lipidiques. Modifiée d'après Herrera et coll.⁹⁶

Ces résultats indiquent que la molécule de l'Ohmlin peut légèrement modifier les propriétés physico-chimiques (paramètre d'ordre) de la bicouche et que cet effet est d'autant plus important que la bicouche est initialement très rigide (riches en Cholestérol).

La suite de cette étude s'est poursuivie par la détermination de la localisation de la molécule de l'Ohmlin au sein d'une bicouche lipidique modèle. Pour cela, des études de dynamique moléculaire ont été réalisées.

III.4.6.2. Étude de dynamique moléculaire

Cette étude a montré que l'Ohmlin interagit principalement avec les atomes d'oxygène des groupes carbonyle et phosphate du 1,2-distearoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DSPC), de la SM et, dans une moindre mesure, avec l'atome d'oxygène du cholestérol (Figure I. 40). Cette interaction serait responsable d'une réduction de la stabilisation du cholestérol au sein

de la membrane qui, en l'absence d'Ohmline, interagit également avec les atomes d'oxygène des groupes carbonyle de DSPC et SM.

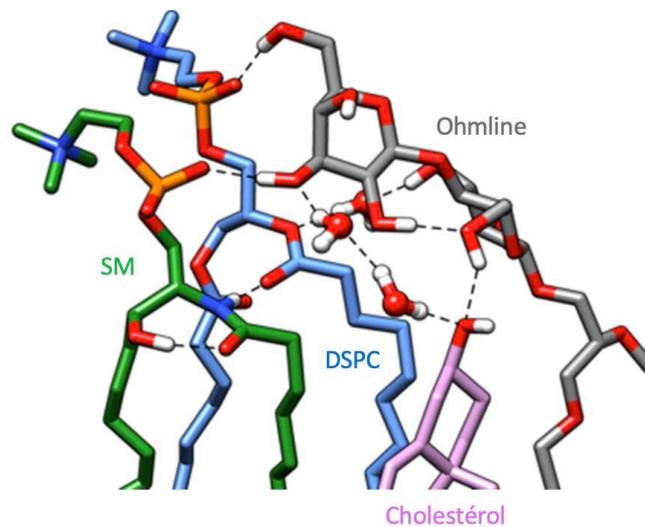


Figure I. 40 : Étude de dynamisme moléculaire de l'Ohmline sur une membrane modèle. Modifiée d'après Herrera et coll.⁹⁶

C'est la première fois que les interactions moléculaires entre l'Ohmline et les membranes modèles sont suggérées. Ainsi, en s'incorporant dans la bicouche lipidique, l'Ohmline modifierait la position de la fonction hydroxyle du cholestérol de son site de liaison induisant de nouveaux réarrangements avec les autres lipides présents au sein de la bicouche. Ces réarrangements lipidiques vont engendrer une déstabilisation dite coopérative au sein de la membrane plasmique modèle qui pourrait être responsable de la modulation de l'activité du canal SK3.

Suite aux résultats obtenus, les hypothèses retenues concernant l'action de l'Ohmline *vis-à-vis* du canal SK3 seraient une action indirecte située à distance de sa cible thérapeutique. L'Ohmline, après son insertion au sein de la bicouche, provoquerait une réaction en chaîne menant à la fermeture du canal SK3 *via* un « effet domino ».

Ce mécanisme serait un nouveau paradigme puisque le mécanisme usuel de l'action d'un médicament se fait par un lien direct avec une cible, le plus souvent protéique. Ici, les résultats obtenus, sans pouvoir exclure complètement un lien entre l'Ohmline et la protéine cible (SK3) au sein des membranes plasmiques, suggèrent que la modulation des propriétés biophysique de la membrane pourrait avoir une répercussion sur la fonction de certaines protéines présentes en son sein.

Objectifs du projet de thèse

Les études décrites dans ce premier chapitre montrent l'importance et l'implication de la protéine SK3 dans le processus de migration cellulaire. L'efficacité et la sélectivité de l'Ohmlin en font une très bonne candidate pour le développement d'une nouvelle classe d'agents antimétastatiques. Cependant, pour envisager le développement de médicaments antimétastatiques dans le milieu médical, la compréhension de leur mécanisme d'action et de leur comportement supramoléculaire sont primordiaux.

Des études de dynamique moléculaire ont déjà été entreprises dans ce sens. Bien que la compréhension du mécanisme d'action de l'Ohmlin soit en bonne voie, sa localisation à l'échelle cellulaire, elle, reste encore indéterminée même si des hypothèses ont été exposées sans certitude. C'est pourquoi, le premier objectif a été de développer et synthétiser plusieurs analogues fluorescents de l'Ohmlin. Leur stratégie de synthèse ainsi que le choix de la sonde fluorescente seront exposés, suivis par les résultats biologiques *in vitro* obtenus et les études de fluorescence réalisées.

Ce projet a aussi fait l'objet d'une mobilité internationale au Centre National de Biotechnologie de Madrid (CNB), où le Dr. José Requejo-Isidro, expert en biophysique des membranes, m'a accueilli. L'étude par microscopie confocale d'un de nos composés fluorescents sur des cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231) sera discutée.

Le second objectif a consisté à synthétiser de nouveaux analogues de l'Ohmlin où les positions stratégiques de la molécule ont été modulées (positions *sn-1* et *sn-2*), afin de mieux comprendre d'une part, les groupements chimiques essentiels à son activité et, d'autre part, d'explorer de nouvelles fonctions chimiques jamais étudiées jusqu'à aujourd'hui. De nouvelles stratégies de synthèse ont également tenté d'être développées au laboratoire dans le but de simplifier celles déjà utilisées et optimisées, tout cela dans le but de compléter les études de structure-activité actuellement en cours. La synthèse des analogues sera présentée et les résultats biologiques obtenus seront commentés.

Chapitre 2 :
Analogues fluorescents
de l'Ohmline :
Synthèses, évaluations
biologiques et études
biophysiques

Chapitre 2 - Analogues fluorescents de l'Ohmlin : synthèses, évaluations biologiques et études biophysiques.

I - Généralités

L'Ohmlin est une molécule amphiphile appartenant à la famille des glyco-glycéro-éther-lipides. Parmi un large panel de molécules, elle a obtenu les meilleurs résultats *in vitro* et *in vivo* concernant l'inhibition de l'activité du canal SK3, responsable, à la fois, de la migration des cellules cancéreuses mammaires et du développement des métastases osseuses, et ce, sans générer d'effet secondaire⁷. Cela fait de l'Ohmlin, un nouvel outil thérapeutique potentiel pour le développement d'un traitement anti-métastatique.

Cependant, son mécanisme d'action est encore mal connu. Seules des hypothèses ont été exposées avec, notamment, les études réalisées par Herrera *et al.* par RMN ²H et par modélisation (dynamique moléculaire)⁹⁶. Pour rappel, ces études suggèrent que l'Ohmlin serait capable de modifier les propriétés biophysiques des membranes riches en cholestérol, ce qui, *via* un effet domino, aurait un impact sur la modulation des canaux ioniques SK3 intégrés dans les radeaux lipidiques. Les études réalisées par Chantôme *et al.* ont également montré que l'Ohmlin était capable de dissocier le canalplexe fonctionnel Orai1-SK3, également localisé dans les domaines riches en cholestérol des membranes plasmiques de certaines cellules cancéreuses⁵⁷.

Les résultats de ces études laissent ainsi supposer différentes hypothèses de mécanisme d'action qui pourraient expliquer l'effet de l'Ohmlin sur la modulation des canaux SK3. La première : l'Ohmlin, après son intégration dans la membrane plasmique, pourrait interagir directement avec les canaux SK3 *via* un mécanisme d'action allostérique et moduler les courants ioniques dépendants. Cependant, nous avons montré dans le [chapitre 1](#) (voir [paragraphe III.4.5.5](#)) que la chiralité de la position *sn*-2 du motif glycérol n'a aucun effet sur l'efficacité de l'Ohmlin⁸. Cette observation réduit la pertinence de cette hypothèse car les interactions directes protéine-antagoniste sont souvent très sensibles à la configuration absolue de l'antagoniste. La seconde hypothèse serait que l'Ohmlin, en modifiant la fluidité des membranes rigides, pourrait déstabiliser les canaux SK3. Enfin, on ne peut exclure en

troisième hypothèse, que l'intégration de l'Ohmlin au sein de la membrane plasmique puisse déclencher des processus d'endocytose en agissant sur la courbure de la membrane plasmique⁹⁸ ou par un autre mécanisme non identifié qui pourrait réduire l'expression des canaux SK3 au niveau de la membrane.

C'est pourquoi, des études plus approfondies concernant sa distribution ainsi que sa localisation à l'échelle cellulaire sont nécessaires pour nous permettre d'en savoir davantage sur le mécanisme d'action de cette molécule.

Pour cela, la spectroscopie de fluorescence est une technique universelle de choix. Les sondes fluorescentes sont largement étudiées de par leur grande sensibilité *vis-à-vis* de leur microenvironnement et des nombreuses informations qu'elles peuvent apporter. Les interactions qu'elles produisent au contact de la lumière avec la matière organique, permettent, par exemple, de suivre de nombreux processus membranaires importants ou encore, d'investiguer sur la structure des membranes cellulaires de systèmes vivants (Figure II. 1)⁹⁹.

Champ d'application	Informations obtenues
Polymères	Dynamique des chaînes de polymères, microviscosité, volume libre, orientation des chaînes dans des échantillons étirés, miscibilité, séparation de phase, diffusion d'espèce à travers des réseaux de polymères, dynamique de cyclisation des chaînes, suivi de polymérisation, dégradation.
Surfaces des solides	Nature de la surface des grains de silice colloïdale, argiles, zéolithes, gels de silice, verre poreux, alumine: rigidité, polarité et modification de surfaces.
Solutions de tensioactifs	Concentration micellaire critique (CMC), distribution de réactifs dans les systèmes de tensioactifs, propriétés de l'interface et polarité, dynamique des solutions de tensioactifs, coefficient de partage, transitions de phase, influence d'additifs.
Vésicules	Caractérisation de la bicouche: microviscosité, paramètre d'ordre, transition de phase; effets d'additifs, pH interne, perméabilité.
Membranes biologiques	Caractérisation de la bicouche: microviscosité, paramètres d'ordre; interactions lipides-protéine, diffusion de translation, accessibilité des sites, changement de structure; potentiels de membrane, effets d'additifs, localisation de protéines, organisation latérale, dynamique.
Protéines	Sites de liaisons, dénaturation, accessibilité des sites, dynamique, distances, transition conformationnelle.
Acides nucléiques	Flexibilité, dynamique de torsion, structure en hélice, déformation dues aux agents intercalants, photoclivage, accessibilité, carcinogénèse.
Cellules vivantes	Visualisation des membranes, lipides, protéines, ADN, ARN, antigènes de surface, glyco-conjugués de surface, dynamique de la membrane: perméabilité, potentiel; pH intracellulaire, concentration en calcium, sodium, chlorure, protons dans le cytoplasme, état rédox, activités enzymatique, interactions cellule-cellule et cellule-virus, fusion de membrane, endocytose, viabilité, cycle cellulaire, activité cytotoxique.
Immunologie	Fluoroimmunoessais

Figure II. 1 : informations obtenues grâce à l'utilisations de sondes fluorescentes pour différents domaines d'application. Inspiré de B. Valeur (2005)⁹⁹.

⁹⁸ T. Schubert, W. Römer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2015**, *1853*, 2992–3005.

⁹⁹ B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, De Boeck, Bruxelles, **2005**.

Ce large domaine d'application de la spectroscopie de fluorescence et de l'utilisation de sondes fluorescentes nous a motivé à synthétiser des analogues fluorescents de l'Ohmline. Pour leur synthèse, des attentions particulières ont été portées sur le choix de la sonde fluorescente à utiliser et de son positionnement dans la structure moléculaire. En effet, en fonction de la taille de la sonde et de sa localisation intramoléculaire, les propriétés biologiques des lipides d'intérêts peuvent être altérées. Or, notre objectif était de concevoir des analogues fluorescents de l'Ohmline dont l'activité biologique reste inchangée ou, très peu modifiée. Pour cela, les analogues fluorescents devaient ressembler au maximum à l'Ohmline.

I.1 Localisation de la sonde fluorescente

Nous avons vu dans la partie III.4.4.5 du chapitre 1, qui concerne l'étude structure-activité de l'Édelfosine et qui a mené à l'obtention de l'Ohmline, que certaines positions ainsi que certaines fonctions chimiques de la molécule sont d'une grande importance pour le maintien et / ou l'amélioration de l'activité biologique (Figure II. 2).

Les glyco-glycéro-éther-lipides sont constitués d'un motif glycérol comprenant : une tête polaire hydrophile de type saccharidique en position *sn-3*, une fonction chimique reliée en position *sn-2* par une fonction éther ou non, et une longue chaîne lipidique reliée au motif glycérol par une fonction éther en position *sn-1*. En conséquence, il existe, à priori, trois régions dans la molécule auxquelles la sonde fluorescente pourrait être couplée de manière covalente (Figure II. 2).

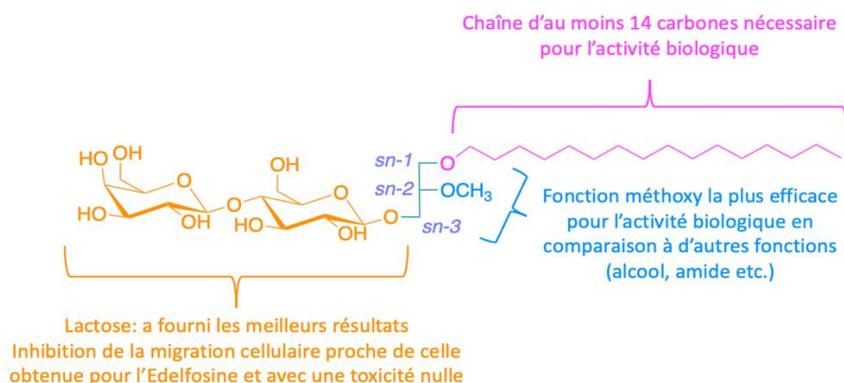


Figure II. 2 : Rappel des fonctions chimiques et positions importantes de l'Ohmline pour le maintien de l'activité biologique dirigée contre le canal SK3.

La tête polaire dissaccharidique de type lactose a été, parmi toutes les autres têtes polaires étudiées (mono- et dissaccharidique, phosphocholine etc.), celle qui a donné les meilleurs résultats lors des études biologiques, avec également une absence de toxicité à la concentration active de la molécule. De plus, dans le cas de l'Ohmlin, les études de Berthe *et al.* ont montré que la stéréochimie du motif dissaccharidique était essentiel pour l'activité biologique. En effet, seul l'anomère β est actif¹⁰⁰. De ce fait, l'insertion de la sonde fluorescente sur le motif dissaccharidique, outre le fait de la complexité de sa réalisation, se serait avérée peu judicieuse et complexe, avec un risque élevé de modifier l'activité biologique de la molécule.

En ce qui concerne la modulation de la position *sn-2*, si l'Édelfosine, qui se caractérise par la présence d'un groupe méthoxy en position *sn-2*, inhibe l'activité du canal SK3⁶², son analogue hydroxy (correspondant au composé lyso-PAF) est un composé qui n'a aucun effet sur la protéine⁸. Ce résultat suggère que le groupe méthoxy de l'Ohmlin revêt certainement d'une grande importance pour l'inhibition du canal SK3. C'est pourquoi nous avons souhaité conserver ce groupement méthoxy, et estimé que l'insertion de la sonde fluorescente sur cette position serait peu judicieuse, et certainement préjudiciable, pour l'activité biologique de l'analogue fluorescent. La seule option restante était celle de positionner la sonde fluorescente au niveau de la chaîne lipidique.

Cette dernière, qui possède entre 14 et 16 atomes de carbone au minimum, est importante à l'activité de la molécule (une chaîne en C₁₂ génère un composé inactif – voir composés soufrés - [chapitre 5](#)). Elle permet un ancrage de la molécule dans une bicouche lipidique comme cela a été montré par RMN ²H. Nous avons émis l'hypothèse que la chaîne lipidique de l'Ohmlin aurait pour rôle de positionner le composé au sein de la bicouche conduisant ainsi à la modulation des canaux SK3. Selon cette hypothèse, il apparaît alors nécessaire de conserver un caractère hydrophobe à cette chaîne afin qu'elle puisse continuer de remplir son rôle d'ancrage.

De ce fait, l'incorporation d'une sonde fluorescente sur cette partie hydrophobe de l'Ohmlin pouvait être envisagée selon plusieurs stratégies : la première consisterait à placer la sonde fluorescente au milieu d'une chaîne lipidique insaturée (telle qu'une chaîne oleyle par exemple). Cette stratégie, qui met en œuvre une réaction thiol-ène photo-click

¹⁰⁰ W. Berthe, C. M. Sevrain, A. Chantôme, A. M. Bouchet, M. Gueguinou, Y. Fourbon, M. Potier-Cartereau, J.-P. Haelters, H. Couthon-Gourvès, C. Vandier, P.-A. Jaffrès, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1531–1539.

supposerait la synthèse d'un thiol fluorescent hydrophobe. Cette stratégie a été utilisée précédemment par l'équipe pour générer des composés amphiphiles cationiques comportant des chaînes ramifiées, utilisés pour la délivrance d'acides nucléiques¹⁰¹. Cependant ces travaux ont montré que la ramification de la chaîne lipidique, selon cette voie de synthèse, entraîne une modification des propriétés supramoléculaires des composés amphiphiles. En effet, l'étude de Afonso *et al.*, montre que la ramification des chaînes lipidiques conduit à la formation de phase hexagonale inverse (H_{II}) alors que les amphiphiles non-ramifiés adoptent une organisation lamellaire (L_α) (Figure II. 3).

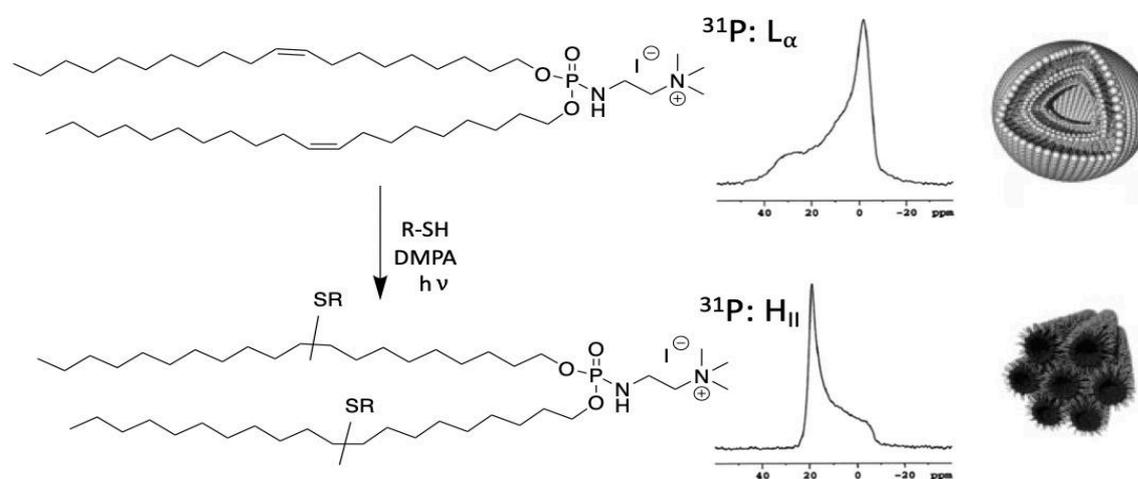


Figure II. 3: Synthèse et études de la ramification de chaînes lipidiques insaturées d'amphiphiles cationiques via la réaction de chimie click thiol – ène, sur la formation de phase lamellaire ou bien hexagonale inverse, après formulation dans l'eau. (R = benzyl, cyclohexyle, n-C₁₂H₂₅, n-C₆H₁₂. Adapté de Afonso *et al.*¹⁰¹

Cette stratégie pourrait donc entraîner de forte modification des interactions entre le composé amphiphile et la membrane laissant entrevoir un risque de perte d'activité. C'est pourquoi cette stratégie n'a pas été retenue.

La seconde option consiste à intégrer la sonde fluorescente au sein de la chaîne lipidique. Selon cette stratégie, la sonde pouvait être, à priori, localisée à proximité de la position *sn-1*, en milieu de chaîne ou bien en position terminale. La position *sn-1* ne nous est pas paru opportune du fait de sa proximité avec la position *sn-2* qui possède un effet important sur

¹⁰¹ D. Afonso, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, A. Grélard, S. Prakash, M. Berchel, N. Kervarec, E. J. Dufourc, T. Montier, P.-A. Jaffrès, *Soft Matter* **2016**, *12*, 4516–4520.

l'activité. Par ailleurs, positionner la sonde fluorescente à proximité de la position *sn-1* ou en milieu de chaîne complique la synthèse puisqu'il est alors nécessaire d'avoir une sonde fluorescente di-fonctionnalisée : la première permettrait de lier la molécule fluorescente à la position *sn-1* du glycérol, et la seconde, selon la nature de la sonde fluorescente retenue, permettrait d'y incorporer une chaîne lipidique linéaire afin d'obtenir un domaine hydrophobe suffisamment long (Figure II. 4a).

C'est pourquoi, nous avons estimé que la position qui serait la plus apte à recevoir la sonde fluorescente, mais aussi la plus susceptible de ne pas, ou peu, modifier l'activité biologique, serait de fixer la sonde au niveau du carbone terminale de la chaîne lipidique (également appelée position oméga) (Figure II. 4b).

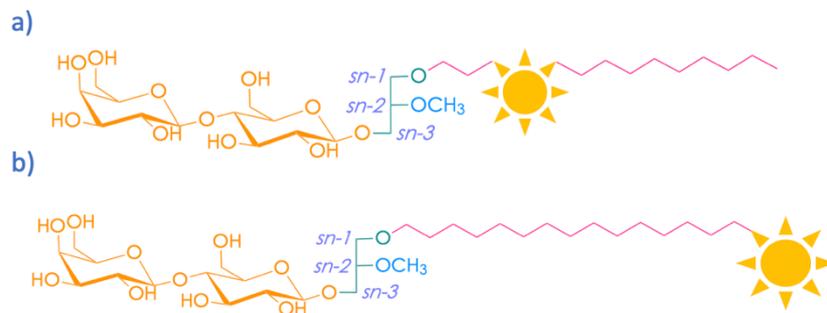


Figure II. 4: Différentes options pour l'insertion de la sonde fluorescente a) à proximité de la position *sn-1*, b) en bout de chaîne lipidique.

Nous avons ensuite déterminé la nature de la sonde fluorescente à utiliser.

1.2 Les sondes fluorescentes

Il existe une multitude de sondes fluorescentes. La majorité d'entre elles sont de petite taille et sont de nature poly-aromatique comme le naphthalène ou l'anthracène par exemple, et / ou hétéro-aromatiques telles que le DAPI, la fluorescéine etc. Elles sont classées en fonction de leur spécificité. On peut distinguer, par exemple, les sondes de polarité, de pH, d'anions, de cations *etc.* C'est pourquoi, le choix d'un fluorophore doit être mûrement réfléchi afin qu'il soit adapté à l'étude pour laquelle on souhaite l'utiliser⁹⁹.

Depuis longtemps, les membranes plasmiques des cellules vivantes ainsi que les membranes modèles de liposomes artificiels représentent un domaine d'application important pour

l'utilisation de sondes fluorescentes. En effet, la plupart des fonctions cellulaires dépendent fortement de leur environnement lipidique, car elles sont contrôlées par des protéines localisées au sein, ou à proximité de la membrane plasmique.

C'est pourquoi, une compréhension moléculaire de la distribution, et de la contribution des lipides, dans les processus de développement de la maladie, pourrait permettre de développer de nouvelles approches de prévention, de diagnostic et de guérison.

Pour cela, la synthèse de nombreux analogues fluorescents de lipides naturels ou synthétiques ne cesse de se développer. Les travaux de Lavis *et al.* examinent, de façon non exhaustive, une liste des sondes fluorescentes couramment utilisées dans les domaines de la chimie / biologie, ainsi que leurs propriétés chimiques et photophysiques¹⁰² dont la [Figure II. 5](#) en représente en partie. La revue de Maier *et al.* reprend, quant-à-elle, les propriétés et les applications de certaines sondes fluorescentes couramment utilisées en biologie et biophysique¹⁰³. Parmi celles-là, le NBD (N-4-NitroBenzo-2-oxa-1,3-Diazole), le BODIPY® et le pyrène sont les plus couramment utilisés pour la synthèse de nombreux analogues de lipides naturels (phospholipides, sphingolipides, acides gras, triglycérides, stéroïdes), mais aussi pour des lipides synthétiques tels que les alkyl-phosphocholines par exemple. Ainsi, pour sélectionner et valider le choix de la sonde fluorescente à utiliser, nous nous sommes inspirés de certains des résultats obtenus, et nous avons également regardé les principales caractéristiques que doit posséder un bon fluorophore.

¹⁰² | L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142–155.

¹⁰³ O. Maier, V. Oberle, D. Hoekstra, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 116, 3–18.

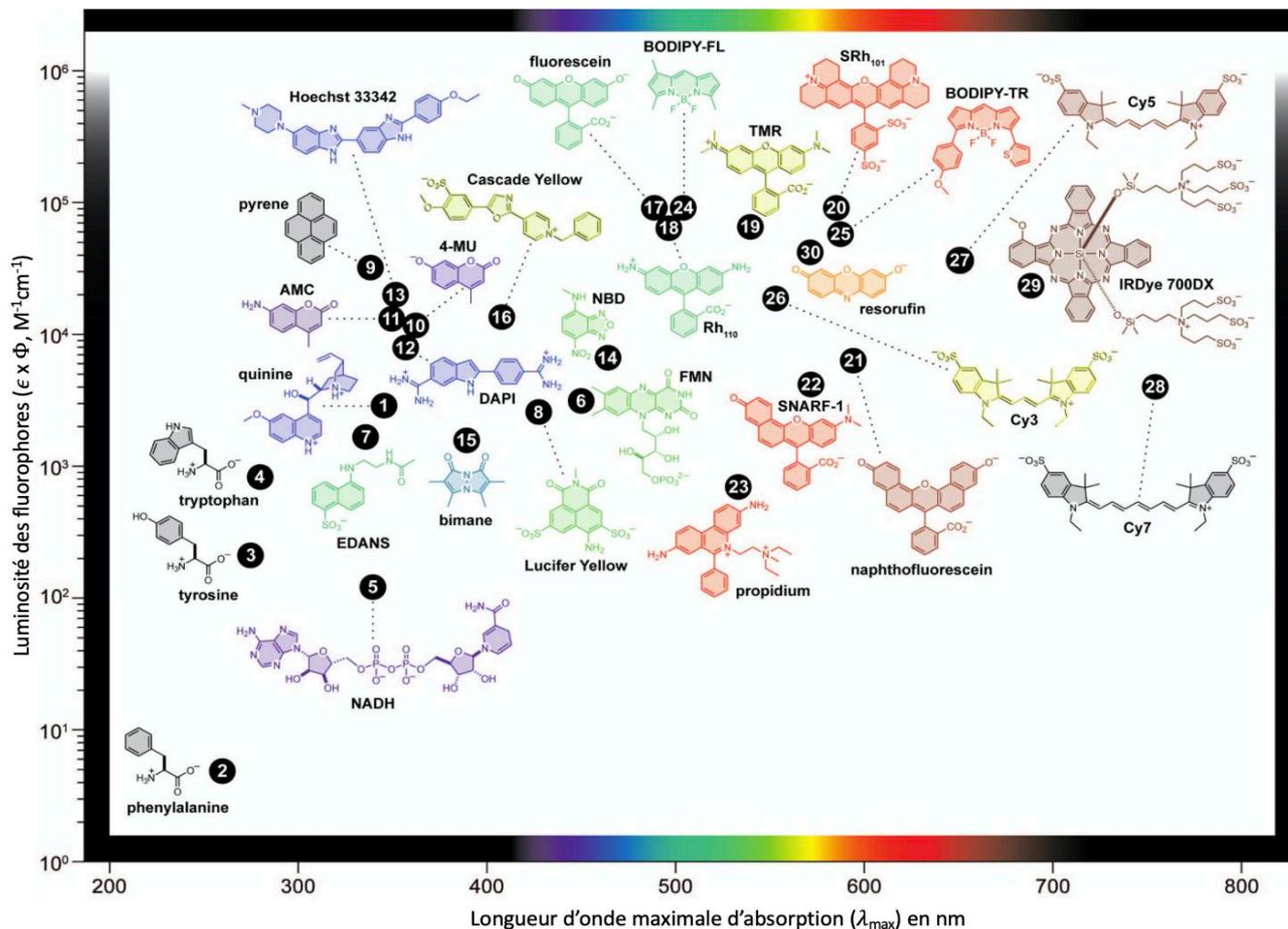


Figure II.5 : Figure non exhaustive de fluorophores couramment utilisés dans les domaines de la chimie et de la biologie. Cette figure représente la luminosity du fluorophore ($\epsilon \times \Phi$) en fonction de leur longueur d'onde maximale d'absorption (λ_{\max} abs). La couleur de chacun des fluorophores correspond, quant à elle, à la leur longueur d'onde maximale d'émission (λ_{\max} em). Adaptée de Lavis *et al.*¹⁰².

En effet, une sonde fluorescente doit posséder plusieurs qualités à savoir⁹⁹ :

1. Un coefficient d'extinction molaire ou d'absorption molaire ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) le plus élevé possible. Il exprime la capacité d'un fluorophore à absorber la lumière, soit l'énergie apportée par un photon, à une longueur d'onde.
2. Une photo-stabilité élevée. Plus cette dernière est élevée et moins le fluorophore sera sensible au photo-blanchiment. Celui-ci survient lorsque la capacité du fluorophore à fluorescer s'amenuise, et est provoqué par diverses réactions chimiques qui se produisent entre le fluorophore et les molécules de son environnement comme l'oxygène par exemple.
3. Une durée de vie de fluorescence à l'état excité (τ) élevée. Elle est une qualité importante car elle définit la fenêtre des temps d'observation des phénomènes dynamiques.

4. Un rendement quantique de fluorescence Φ élevé. Il correspond au retour à l'état fondamental, avec émission de photons de fluorescence, d'une fraction de molécules excitées.
5. Et enfin une brillance élevée ($M^{-1}.cm^{-1}$). On peut l'obtenir facilement en multipliant le coefficient d'absorption molaire et le rendement quantique de fluorescence. Plus un fluorophore possèdera une brillance importante, plus il sera facilement détectable, à de faibles concentrations, dans les cellules.

I.2.1 Analogues d'alkyl-phosphocholines fluorescents

En 2004, les études de Quesada *et al.* ont permis le développement du premier analogue fluorescent de l'Edelfosine¹⁰⁴, éther lipide antitumoral synthétique uniquement absorbé par les cellules malignes et capable de déclencher l'apoptose dans une grande variété de cellules tumorales humaines⁸⁸. Pour cela, ils ont utilisé une sonde fluorescente de type ω -phényltétra-ène¹⁰⁴ (PTE-ET) (Figure II. 6) et leur analogue fluorescent a montré une activité biologique comparable à celle de l'Edelfosine. De plus, les expériences de microscopie ont révélé que le composé PTE-ET était capable de s'accumuler dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique, comme les radeaux lipidiques, pour différentes cellules humaines cancéreuses. Cependant sa faible intensité de fluorescence et sa faible stabilité ont rapidement induit un photoblanchiment et empêché son utilisation en microscopie confocale. En 2014, d'autres analogues fluorescents de l'Edelfosine ont été synthétisés par Mollinedo *et al.* avec des sondes fluorescentes de type, polyène-yne et BODIPY®¹⁰⁵ (Figure II. 6).

¹⁰⁴ E. Quesada, J. Delgado, C. Gajate, F. Mollinedo, A. U. Acuña, F. Amat-Guerri, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5333–5335.

¹⁰⁵ F. Mollinedo, M. Fernández, V. Hornillos, J. Delgado, F. Amat-Guerri, A. U. Acuña, T. Nieto-Miguel, J. A. Villa-Pulgarín, C. González-García, V. Ceña, C. Gajate, *Cell Death Dis.* **2011**, 2, e158–e158.

Analogues fluorescents de l'Edelfosine

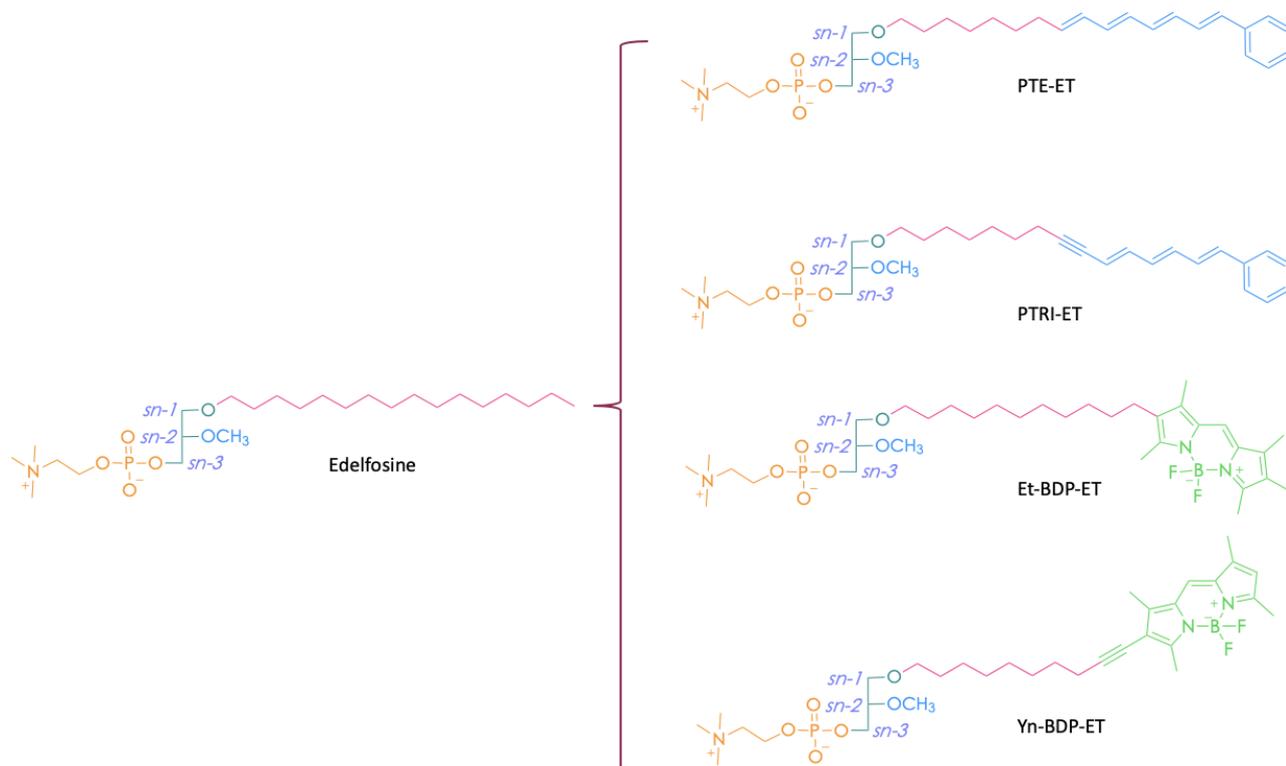


Figure II. 6: Analogues fluorescents de l'Edelfosine : Et-BDP-ET: 1-*O*-(11'-(6''thyl-1'',3'',5'',7''-tetraméthyl-4'',4''-difluoro-4''-bora-3a'',4a''-diazas-indacen-2''-yl)undécyl)-2-*O*-méthyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine); PTE-ET: (all-(*E*)-1-*O*-(15'-phénylpentadéca-8',10',12',14'-tétraényl)-2-*O*-méthyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine); PTRI-ET : (all-(*E*)-1-*O*-(15'-phénylpentadéca-10',12',14'-trien-8'-ynyl)-2-*O*-méthyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine) et Yn-BDP-ET: (1-*O*-(13'-(1'',3'',5'',7''-tétraméthyl-4'',4''-difluoro-4''-bora-3a'',4a''-diazas-indacen-2''-yl)tridéca-12'-ynyl)-2-*O*-méthyl-*rac*-glycéro-3-phosphocholine). La couleur des sondes fluorescences correspond à la couleur de leur longueur d'onde d'émission.

L'analogue PTRI-ET, comme son homologue PTE-ET, a montré une faible photo-stabilité ainsi qu'un rendement de fluorescence médiocre. Dans le but de palier aux « points faibles » de ces deux sondes fluorescentes, deux autres analogues, Et-BDP-ET et Yn-BDP-ET, possédant tous deux une sonde BODIPY®, ont été synthétisés. Ce motif a permis d'améliorer à la fois leur rendement quantique de fluorescence et leur photo-stabilité, ce qui a rendu possible l'utilisation de la microscopie confocale. Celle-ci a d'ailleurs permis de visualiser la localisation subcellulaire des composés fluorescents dans des cellules HeLa.

Cependant, les faibles rendements de la synthèse réactionnelle de la sonde BODIPY® nous ont incité à choisir une autre sonde fluorescente. Celle-ci se devait d'être de la même nature que la chaîne lipidique et de posséder la capacité de s'intégrer facilement dans les

membranes plasmiques des cellules¹⁰⁶. Pour cela, nous avons choisi le pyrène (Figure II. 7). Cette sonde fait partie des sondes membranaires les plus couramment utilisées, notamment pour les molécules phospholipidiques^{105, 107a, b}.

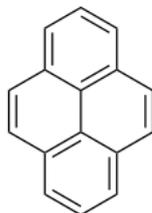


Figure II. 7: Le pyrène.

I.2.2 Caractéristiques et applications du pyrène

Le pyrène est une sonde hydrophobe, dont ses propriétés spectrales sont de première importance pour ses applications. Il possède la particularité d'avoir une durée de vie à l'état excité assez longue ($\tau > 100$ ns), ce qui lui permet de former, de façon dépendante à la concentration, des excimères¹⁰⁶. Leur formation permet d'obtenir, après excitation, une émission de fluorescence décalée vers le rouge, caractérisée par l'apparition d'une large bande à des longueurs d'onde plus élevées, allant de 425 à 550 nm, centrée vers 470 nm¹⁰⁸. Les excimères se forment lorsque deux molécules de pyrène (au moins) sont à une distance de ~ 10 Å l'un de l'autre. Cette capacité de former des excimères a été couramment exploitée, notamment pour surveiller la fusion membranaire^{109a, b}, les processus de transfert de phospholipides^{110a, b}, ou encore pour étudier la conformation des protéines¹¹¹.

Le rapport d'émission monomère / excimère calculé en comparant l'intensité de fluorescence (ou rendement quantique) du premier pic de monomère (typiquement ~ 375 nm) par rapport à la bande excimère (généralement ~ 470 nm), est un indicateur relatif de l'étendue de la formation d'excimère, et donc de la proximité spatiale entre deux fragments

¹⁰⁶ P. Somerharju, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116*, 57–74.

¹⁰⁷ a) M. J. Parry, A. Jutila, P. K. J. Kinnunen, J.-M. Alakoskela, *J. Fluoresc.* **2006**, *17*, 97–103. b) R. F. Eppard, U. Schlattner, T. Wallimann, M.-L. Lacombe, R. M. Eppard, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 126–137.

¹⁰⁸ H.-J. Galla, W. Hartmann, *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *27*, 199–219.

¹⁰⁹ a) J. G. Orsel, I. Bartoldus, T. Stegmann, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3369–3375. b) T. Stegmann, P. Schoen, R. Bron, J. Wey, I. Bartoldus, A. Ortiz, J. L. Nieva, J. Wilschut, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11330–11337.

¹¹⁰ a) Y. Barenholz, T. Cohen, E. Haas, M. Ottolenghi, *Biophys. J.* **1991**, *60*, 110–124.

b) Y. Barenholz, T. Cohen, E. Haas, M. Ottolenghi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3085–3090.

¹¹¹ S. S. Lehrer, in *Proteins Struct. Funct. Eng.* (Eds.: B.B. Biswas, S. Roy), Springer US, Boston, MA, **1995**, pp. 115–132.

pyrène. Il peut notamment aider à la caractérisation de domaines structuraux des membranes et donner une indication sur leur dépendance à certains facteurs internes ou externes, tels que, la température ou la composition lipidique par exemple.

En biologie cellulaire, les lipides fluorescents possédant un motif pyrène sont des outils prometteurs pour étudier la structure et la conformation des protéines, et ce, grâce à ses caractéristiques spectrales uniques¹¹². En effet, le pyrène est sensible à l'espace et l'environnement, ce qui permet d'étudier la conformation des protéines, les changements conformationnels, le repliement et le dépliement des protéines, les interactions protéine-protéine, protéine-lipide et protéine-membrane^{113, 114}.

Par exemple, la molécule β -py-C₁₀-HPC (Figure II. 8) a été utilisée pour élucider l'effet de plusieurs espèces extrinsèques, telles que le calcium¹¹⁵, le facteur d'activation plaquettaire¹¹⁶, ou de certains médicaments anticancéreux¹¹⁷ etc. sur la structure et la dynamique des bicouches lipidiques.

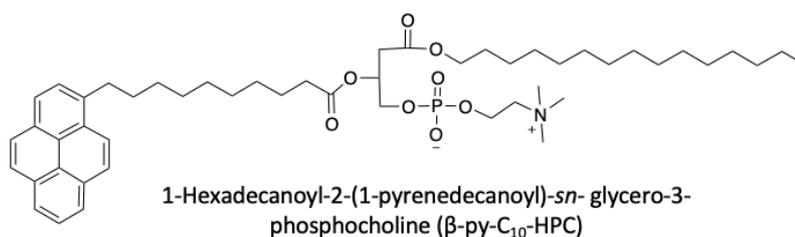


Figure II. 8: Analogue fluorescent phospholipidique avec une sonde pyrène (β -py-C₁₀-HPC).

Le principal inconvénient de cette sonde est qu'elle nécessite une excitation UV, fonction qui n'est pas possible et disponible pour tous les microscopes du fait d'une énergie d'irradiation bien trop importante qui s'avère souvent létale pour les cellules, ce qui rend difficile les études.

Malgré les faiblesses de la sonde fluorescente pyrène, nous l'avons tout de même sélectionnée au vu du nombre important d'études qui l'utilise pour la caractérisation et / ou l'étude des membranes modèles et / ou biologiques d'une part, mais aussi de par son

¹¹² G. Bains, A. B. Patel, V. Narayanaswami, *Molecules* **2011**, *16*, 7909–7935.

¹¹³ C. Wu, C. Wang, L. Yan, C. J. Yang, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, *5*, 495–504.

¹¹⁴ P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336–342.

¹¹⁵ K. K. Eklund, J. Vuorinen, J. Mikkola, J. A. Virtanen, P. K. J. Kinnunen, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3433–3437

¹¹⁶ T. Thuren, J. A. Virtanen, P. K. J. Kinnunen, *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *53*, 129–139.

¹¹⁷ P. Mustonen, P. K. J. Kinnunen, *J. Bio. Chem* **1993**, *268*, 1074–1080.

caractère hydrophobe, qui permet de conserver le caractère amphiphile de nos futurs analogues et de permettre leur ancrage au sein de la membrane plasmique d'autre part.

II - Synthèses des analogues fluorescents de l'Ohmline

La préparation des analogues fluorescents de l'Ohmline est une synthèse convergente en deux parties. La première consiste à obtenir la partie aglycone (ou partie lipidique fluorescente) de la molécule, qui est constituée de neuf étapes réactionnelles. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, utilisé le pyrène méthanol comme précurseur commercial. Ce composé pyrénique est déjà fonctionnalisé et décrit dans la littérature pour préparer des conjugués pyrènes^{118a, b} (Figure II. 9).

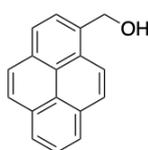


Figure II. 9: Sonde fluorescente pyrène méthanol.

Puis la seconde partie consiste à synthétiser la partie glycone, en 3 étapes, correspondant à la synthèse de la tête polaire dissaccharidique (Figure II. 10).

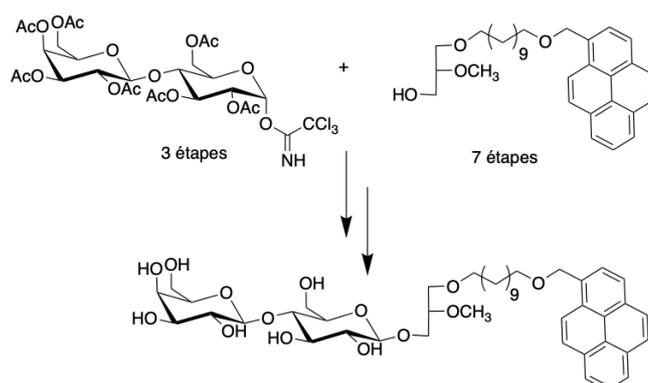


Figure II. 10: Illustration de la réaction de glycosylation entre le synthon glycone et aglycone d'intérêt.

¹¹⁸ a) Z. Wang, Y. Yu, D. Zhang, D. Zhu, *Chin. Sci. Bull.* **2006**, *51*, 1947–1954. b) K. Hayashi, Y. Mitsuyoshi, T. Kamei, T. Shimanouchi, K. Suga, Y. Okamoto, H. Nakamura, H. Umakoshi, *ACS Omega* **2018**, *3*, 3572–3580.

II.1 Synthèse du bloc aglycone

La longueur du domaine hydrophobe étant importante pour la modulation de l'activité des canaux SK3, il nous fallait, en plus du pyrène, y intégrer une chaîne alkyle de longueur variable. Ne sachant pas concrètement quelle longueur serait optimale, nous avons fait le choix de retenir 3 longueurs de chaînes alkyles différentes, caractérisées par la présence de 4, 11 ou 16 atomes de carbone (Figure II. 11).

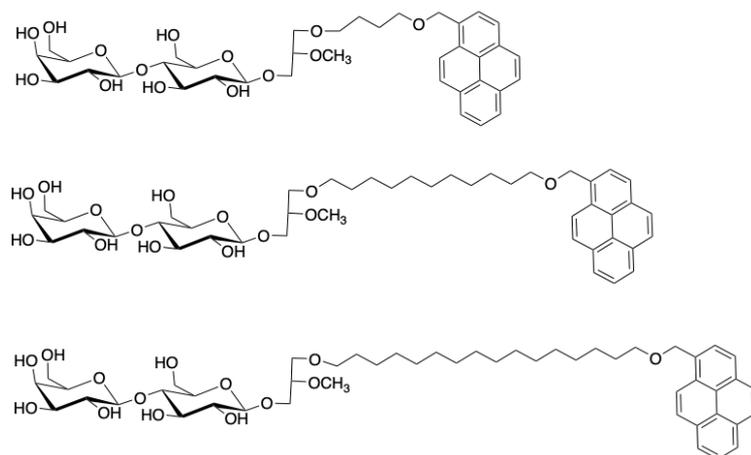


Figure II. 11: Structure des 3 analogues fluorescents de l'Ohmline envisagés avec différentes longueurs de chaînes : 4, 11 et 16 carbones.

Voie A – Synthèse à partir du pyrène méthanol (Figure II. 12)

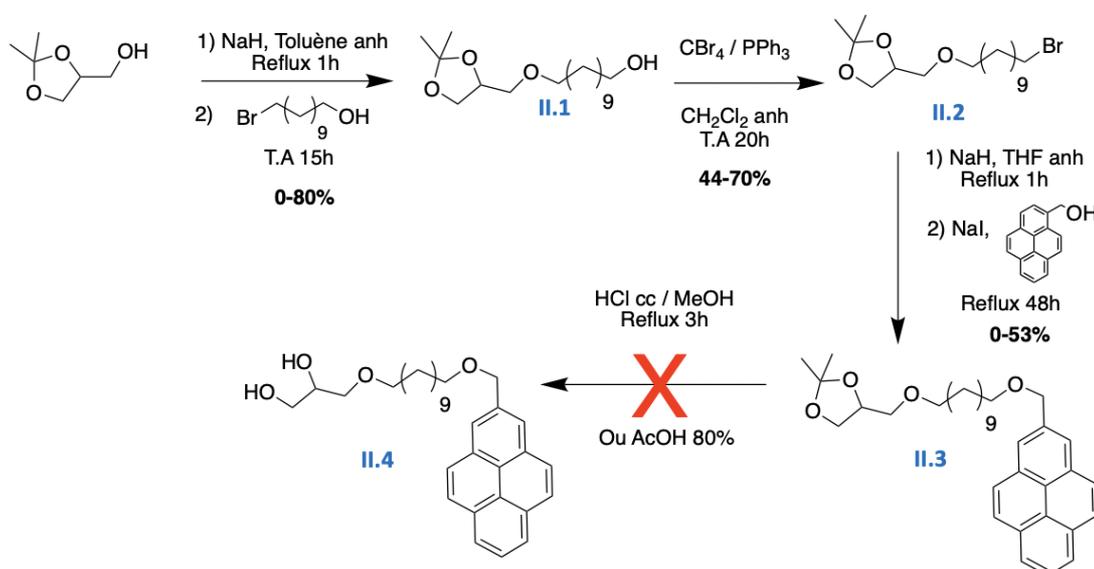


Figure II. 12: schéma réactionnel de la première voie de synthèse utilisant le pyrène méthanol.

Le pyrène méthanol est un composé commercial facilement fonctionnalisable à partir de la fonction alcool. La synthèse débute par une substitution nucléophile de type 2 (S_N2) sur le solkétal ou (2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthanol par le 11-bromoundécane afin de produire l'alcool lipidique II.1, avec des rendements allant de 0 à 80%. La diversité des résultats obtenus est due à la cinétique de la réaction, qui, lorsque la durée du chauffage au reflux est trop importante, favorise la formation du dimère lipidique. La deuxième étape consiste en une réaction de bromation de l'alcool lipidique II.1, *via* la réaction d'Appel, pour mener au dérivé II.2. Le pyrène méthanol a ensuite été utilisé comme nucléophile, sous la forme d'un alcoolate, pour produire l'intermédiaire lipidique fluorescent II.3. Cependant, la déprotection de la fonction acétal de II.3 avec HCl concentré dans du méthanol, ou bien de l'acide acétique (80%) dans H₂O, a produit un mélange de composés, probablement en raison de la position réactive de la fonction éther du pyrène méthanol.

En conséquence, nous avons modifié la stratégie de synthèse pour éviter l'incorporation d'un hétéroatome dans le domaine hydrophobe tout en conservant la sonde fluorescente pyrène.

Voie B : avec la sonde pyrène (Figure II. 13)

La fixation du pyrène sur la chaîne lipidique se fait *via* une acylation de Friedel et Craft¹¹⁹. Pour cela, une réaction de chloration est en premier lieu effectuée sur les dérivés acides 11-bromoundécanoïque II.5a et 16-bromohexadécanoïque II.5b, grâce au chlorure de thionyle utilisé en large excès (7 Eq.). Celui-ci doit être fraîchement distillé pour que la réaction soit quantitative. L'excédent de chlorure de thionyle doit être obligatoirement éliminé pour la suite de la synthèse. Les produits II.6a et II.6b sont contrôlés par RMN ¹H puis directement utilisés pour l'acylation de Friedel et Craft. Pour cela, le chlorure d'aluminium est déposé solide sur les composés II.6a ou II.6b préalablement placés sous N₂ en solution dans du CH₂Cl₂ anhydre. Le mélange est agité à 0°C pendant 15 minutes puis, le pyrène, dilué dans un grand volume de CH₂Cl₂ anhydre (~200 mL), est ajouté goutte à goutte sur le mélange, toujours à 0°C.

¹¹⁹C. Bombelli, F. Bordini, S. Borocci, M. Diociaiuti, R. Lettieri, F. Limongelli, G. Mancini, S. Sennato, *Soft Matter* **2011**, *7*, 8525.

Travailler à haute dilution permet de s'affranchir des phénomènes de π -Stacking dus à la présence des cycles aromatiques conjugués du pyrène. Dès l'ajout de la première goutte de pyrène, le mélange réactionnel devient rouge brique. Il est laissé sous agitation pendant 15h puis traité et purifié pour donner les analogues lipidiques fluorescents **II.7a** et **II.7b** sous la forme d'un seul régioisomère.

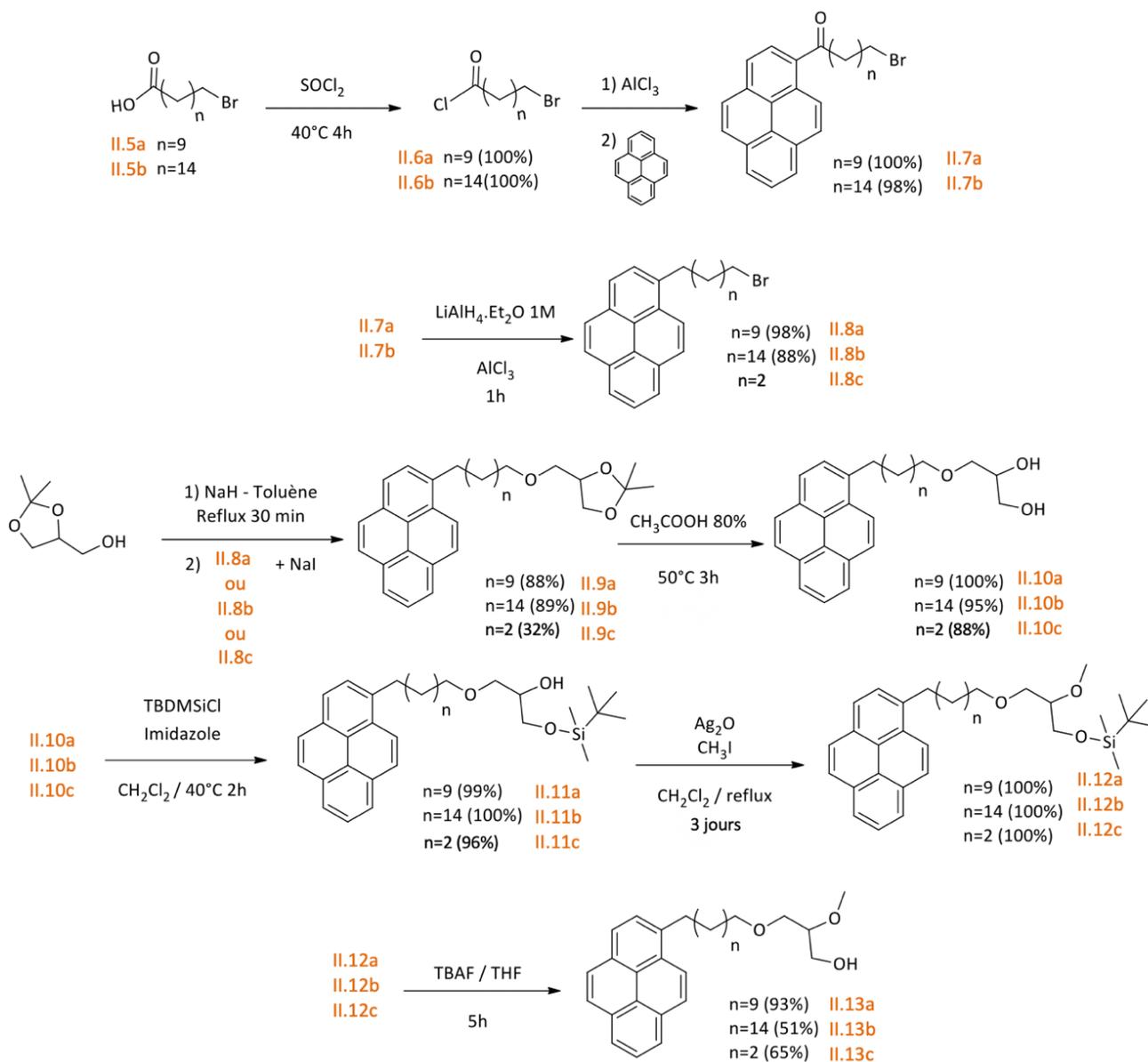


Figure II. 13: Schéma de la synthèse réactionnelle de la partie aglycone fluorescente avec la sonde pyrène.

La fonction cétone de ces composés est ensuite réduite grâce à l'utilisation complémentaire du chlorure d'aluminium (AlCl_3) et du tétrahydruroaluminat de lithium (LiAlH_4) en solution

1M dans du THF¹²⁰. Cette réaction permet d'obtenir les composés **II.8a** et **II.8b**. Pour le composé **II.8c**, nous nous sommes inspiré des travaux de Furuta *et al.*¹²¹, qui utilise le pyrène butanol comme précurseur, ce qui nous a permis de gagner 2 étapes réactionnelles. Une réaction d'Appel a été réalisé sur le dérivé pyrène butanol afin d'obtenir le dérivé bromobutylpyrène correspondant **II.8c**.

Les composés **II.8a**, **II.8b** et **II.8c** subissent ensuite une attaque nucléophile de la fonction alcoolate du solkétal, générée par l'action de l'hydrure de sodium (NaH), pour obtenir les dérivés **II.9a**, **II.9b** et **II.9c** correspondants. La déprotection de la fonction acétal par de l'acide acétique à 80%, au reflux pendant 3h mène aux composés **II.10a**, **II.10b** et **II.10c**. Cette synthèse s'effectue de façon quantitative. Sa réussite est une preuve supplémentaire que l'oxygène en position benzylique du pyrène méthanol est bien problématique pour l'aboutissement de la première voie de synthèse. L'alcool primaire, des dérivés **II.10a** et **II.10b** et **II.10c**, plus réactif, est protégé par le chlorure de *tert*-butyldimethylsilyle (TBSiCl) en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) pour obtenir les composés **II.11a** et **II.11b** et **II.11c**.

Un second protocole a été mis en place pour le composé **II.11c**. Il devait consister à améliorer la stratégie de synthèse originelle en éliminant 6 étapes réactionnelles (Figure II. 14).

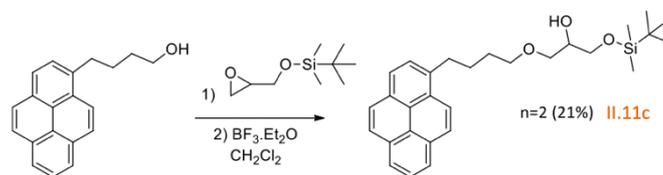


Figure II. 14: Autre protocole mis en place pour l'obtention du dérivé **II.11c**.

L'ouverture régiosélective de l'époxyde en présence d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) et du pyrène butanol nous a permis d'obtenir le composé **II.11c**¹²². Mais le faible rendement obtenu et les nombreuses espèces intermédiaires formées nous ont dissuadé de poursuivre dans cette voie.

Par la suite, la méthylation de l'alcool secondaire, selon les conditions réactionnelles de synthèse de l'Ohmline, a été infructueuse (formation de l'alcoolate par NaH puis ajout de iodométhane (CH_3I)). C'est pourquoi nous avons adapté la méthode décrite par Magnusson

¹²⁰ C. Bombelli, F. Bordi, S. Borocci, M. Diociaiuti, R. Lettieri, F. Limongelli, G. Mancini, S. Sennato, *Soft Matter*, **2011**, 7, 8525

¹²¹ K. Furuta, K. Tomokiyo, M.T. Kuo, T. Ishikawa, M. Suzuki. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 7529-7540.

¹²² P. N. Guivisdalsky, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4637-4642.

*et al.*¹²³ décrivant une méthylation en présence d'oxyde d'argent (I) (Ag₂O) et de CH₃I avec un très bon rendement. Cette méthode est également appelée méthode de Irvine-Purdie¹²⁴, et fait référence aux deux scientifiques qui l'ont mise au point en 1903. Plusieurs études démontrent que, l'alkylation des alcools réalisée par la voie « classique » de Williamson (formation d'un nucléophile alcoolate réagissant, par la suite, avec un halogénure d'alkyle primaire *via* une substitution nucléophile de type 2), donne, dans certains cas, des rendements inférieurs aux attentes ou bien aucun produit souhaité. C'est le cas des travaux de Hickey *et al.*, décrivant la synthèse de molécules de type norbornane, dont, certaines d'entre elles, possèdent des propriétés antibactériennes. Leur étude montre que la méthode classique d'alkylation (NaH, CH₃I, DMF, 55°C, 16h) n'est pas adaptée pour ce type de composés¹²⁵. L'utilisation du protocole originel de Irvine et Purdie, qui emploie de l'oxyde d'argent en présence d'iodure de méthyle, a permis de palier aux difficultés de synthèse rencontrées, et ce, avec des rendements de synthèse honorables. Cette méthode est connue pour être également utilisée pour réaliser des mono- ou bis-alkylations de diols¹²⁶, ou encore des per-méthylation de glucides¹²⁷.

Dans notre cas, cette méthode a été très fructueuse et nous a permis d'obtenir les dérivés **II.12a** et **II.12b** et **II.12c** de façon quantitative et sans qu'une purification par chromatographie sur colonne soit nécessaire.

Pour terminer, la déprotection de l'alcool primaire par du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) a permis d'obtenir les 3 motifs glycéro-lipidiques fluorescents **II.13a**, **II.13b** et **II.13c** qui constituent le synthon aglycone.

La suite de la synthèse s'est poursuivie avec la préparation du bloc glycone, qui est constitué par la tête polaire dissaccharidique de type lactose.

II.2 Synthèse du bloc glycone

Le choix de la méthode de synthèse du bloc glycone est d'une grande importance. En effet, elle peut permettre de définir la stéréochimie de la liaison glycosidique formée suite au

¹²³ C. D. Magnusson, G. G. Haraldsson, *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21*, 2841–2847.

¹²⁴ T. Purdie, J. C. Irvine, *J Chem Soc Trans* **1903**, *83*, 1021–1037

¹²⁵ S. M. Hickey, T. D. Ashton, J. M. White, J. Li, R. L. Nation, H. Y. Yu, A. G. Elliott, M. S. Butler, J. X. Huang, M. A. Cooper, F. M. Pfeffer, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 28582–28596.

¹²⁶ A. Bouzide, G. Sauvé, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5945–5948.

¹²⁷ H. G. Walker, M. Gee, R. M. McCready, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2100–2102.

couplage des 2 synthons glycone et aglycone. Ce couplage est réalisé au travers d'une réaction de glycosylation.

II.2.1 Réaction de glycosylation – Généralités

La réaction de glycosylation met en jeu une espèce nucléophile, appelée accepteur de glycosyle, et une espèce électrophile, appelée donneur de glycosyle. Le carbone anomérique du donneur de glycosyle est souvent activé par un bon groupe partant et / ou par l'action d'un activateur (acide de Lewis par exemple).

L'attaque nucléophile de l'accepteur sur le carbone anomérique activé du donneur va former une liaison glycosidique, et donner, dans une majorité des cas, 2 anomères (ou diastéréoisomères) α et β , qui seront caractéristiques du ou des produit(s) formé(s) (Figure II. 15/ Figure II. 15).

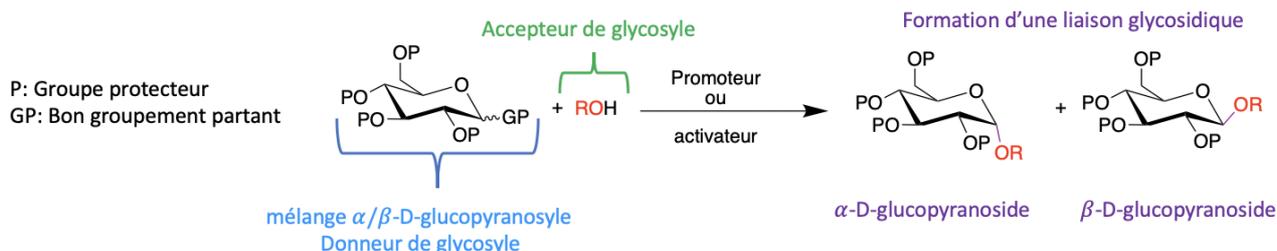


Figure II. 15: Réaction de glycosylation – exemple du glucose.

Plusieurs méthodes de glycosylation sont décrites dans la littérature, nous en décrivons seulement quelques-unes dans la prochaine partie.

II.2.1.1. Quelques méthodes de glycosylation connues

II.2.1.1.1. La méthode de Fisher¹²⁸

Cette méthode a été développée dans les années 1890 et consiste à placer un saccharidique non protégé dans un milieu alcoolique (qui joue à la fois le rôle de solvant et d'accepteur de

¹²⁸ B. Capon, *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 407–498.

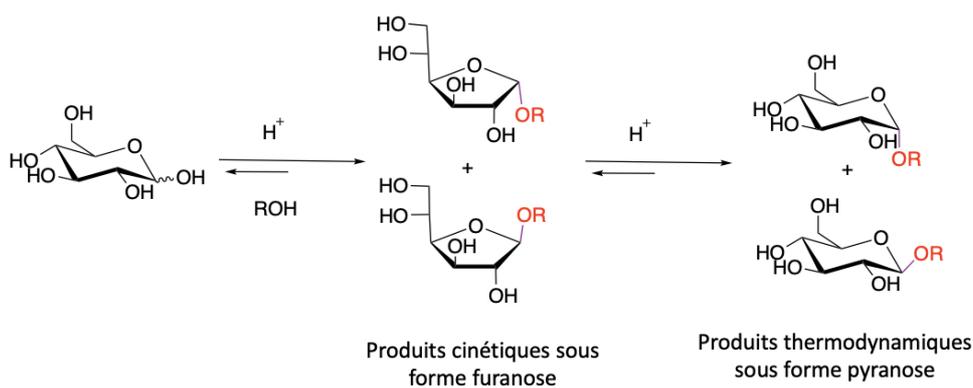


Figure II. 16: La glycosylation par la méthode Fisher, exemple du D-glucose.

glycosyle) en présence d'un acide fort tel que l'acide chlorhydrique, qui lui, jouera le rôle de catalyseur (Figure II. 16).

Si la cinétique de la réaction est contrôlée (basse température, temps de réaction court), les produits (énantiomères) cinétiques, correspondant à la forme furanose, seront favorisés. À l'inverse, si le temps de réaction est plus long et la température plus élevée, les produits thermodynamiquement les plus stables, sous forme pyranose, seront préférentiellement formés.

Cette méthode est la plus couramment utilisée pour la préparation des glycosides simples.

II.2.1.1.2. La méthode de Koenigs et Knorr¹²⁹

Une seconde méthode a été développée en 1901 par Koenigs et Knorr. Leur procédure consiste en la réaction d'un halogénure de glycosyle per-*O*-acylé (tel que le bromure de 2,3,4,6-tétra-acétyl- α -D-glucopyranosyle) avec un alcool, en présence d'un sel de métaux

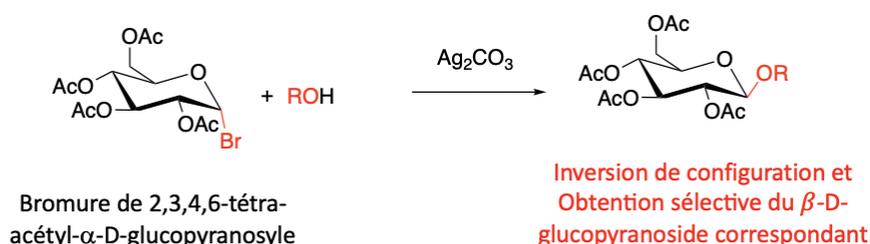


Figure II. 17: Protocole de glycosylation *via* la méthode de Koenigs et Knorr.

¹²⁹ K. Igarashi, in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Elsevier, **1977**, pp. 243–283.

lourd comme promoteur, tels que le carbonate d'argent (Ag_2CO_3) ou encore l'oxyde d'argent (Ag_2O) (Figure II. 17). Lorsque le promoteur est un sel de mercure ou bien un acide de Lewis, on parle de la méthode Helferich.

La méthode de Koenigs et Knorr a l'avantage d'être stéréospécifique en favorisant la formation des 1,2-*trans*-glycosides ou anomères β .

La stéréospécificité de cette méthode est due à la présence d'un groupement protecteur participant en position C2. En effet, suite à l'activation du brome par le carbonate d'argent, par exemple, la fonction acyle de la position C2, par le biais d'une assistance anchimérique, va former l'ion acétoxonium. L'accepteur de glycosyle, en attaquant cet ion formé, va conduire à l'obtention exclusive de l'anomère β (Figure II. 18).

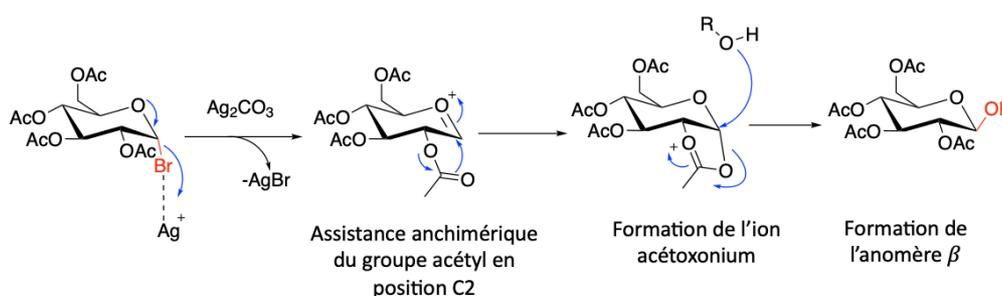


Figure II. 18: Mécanisme réactionnel de la réaction de glycosylation de la méthode de Koenigs et Knorr.

Cette stéréospécificité a également été obtenue avec des groupements protecteurs, non participants cette fois-ci, tel que le benzyle par exemple, toujours en présence de sels d'argent. Cette fois-ci, la stéréosélectivité fait intervenir un mécanisme bi-moléculaire de type $\text{S}_{\text{N}}2$ entre l'atome de brome issu du donneur de glycosyle, l'argent issu du promoteur et l'attaque de l'accepteur sur le carbone anomérique par la face β . Ce mécanisme est aussi appelé effet « push-pull » (Figure II. 19).

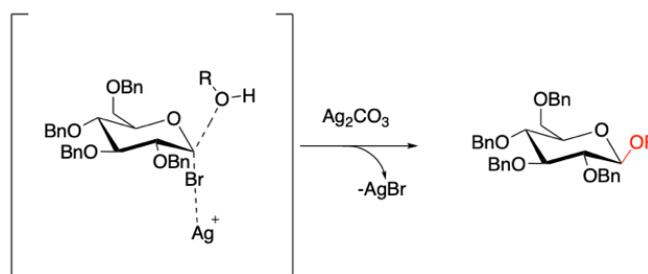


Figure II. 19: Mécanisme "push-pull" sans assistance de groupe participant en position C2.

L'obtention majoritaire du diastéréoisomère 1,2-*cis*-glucoside est également possible sans groupement participant, grâce à l'utilisation du triflate d'argent (AgOTf). L'obtention de l'anomère α majoritaire passerait, dans ce cas, par la formation de l'ion oxocarbénium (Figure II. 20).

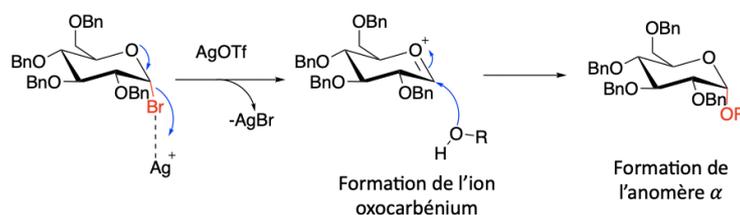


Figure II. 20: Mécanisme de formation de l'anomère via l'utilisation du triflate d'argent.

La méthode de Koenigs et Knorr possède l'avantage de pouvoir obtenir de façon majoritaire l'un ou l'autre des deux anomères glycosidique. Son désavantage est l'utilisation de sels de métaux lourds, toxiques pour l'environnement et dont le traitement nécessite des conditions de stockage et de traitement particuliers.

II.2.1.1.3. La méthode des trichloroacétimidates¹³⁰

Une autre méthode intéressante est celle qui utilise les trichloroacétimidates comme activateur de la position anomérique et comme bon groupement partant. Cette méthode a été décrite par Schmidt *et al.* en 1980 et à l'avantage de ne fournir que l'anomère β lorsque la position C2 possède un groupement participant, et ce, quelle que soit la configuration du donneur de glycosyle de départ¹³¹. L'anomère β est obtenu par réaction de l'accepteur de glycosyle, à basse température et en présence d'un acide de Lewis, sur le donneur qui comporte un groupement participant en position C2 (Figure II. 21).

¹³⁰ Y. Zeng, J. Ning, F. Kong, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3729–3733.

¹³¹ R. Schmidt., *Pure and Appl. Chem.*, **1989**, 61, 7, 1257-1270.

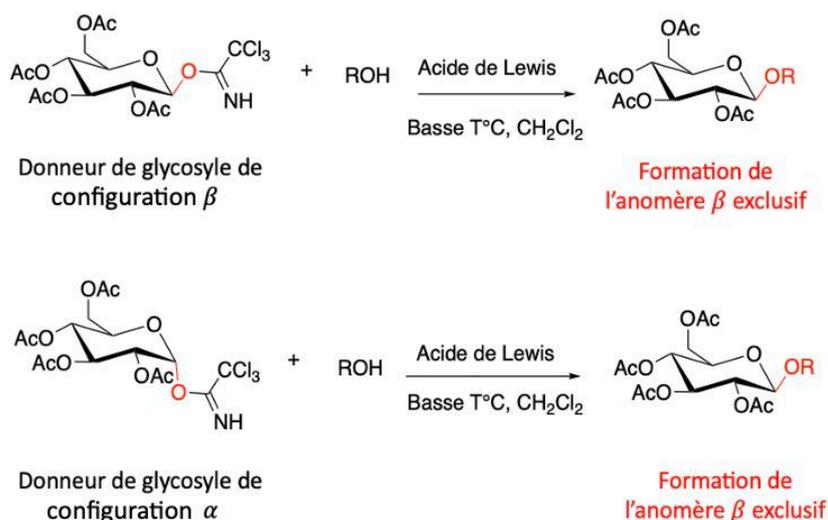


Figure II. 21: Méthode des trichloroacétimidates permettant l'obtention exclusive de l'anomère β .

Dans le cas où le motif saccharidique ne possède pas de groupement participant en position C2, la réaction sera stéréospécifique et sera également dépendante de la configuration du donneur. Si celui-ci est de configuration β , le glycoside obtenu sera de configuration α . Inversement, si le donneur est de configuration β , le glycoside de conformation α sera obtenu, faisant donc apparaître un mécanisme de type S_N2 .

Lorsque la méthode emploie également un donneur de glycosyle, sans assistance anchimérique possible, en présence d'un solvant polaire et plus dissociant tel que l'acétonitrile (ACN), l'anomérisation du glycoside obtenu sera exclusivement β et ce, peu importe l'anomérisation du donneur de départ. Cela peut s'expliquer par la formation de l'ion oxonium qui se retrouve rapidement piégé par l'ion nitrilium issu de l'acétonitrile.

Cette méthode a l'avantage d'être peu coûteuse et d'être stéréospécifique. Dans notre cas, comme vu précédemment, seul l'anomère β est actif biologiquement¹⁰⁰, c'est pourquoi nous avons utilisé cette méthode pour l'activation de notre motif dissaccharidique de type lactose.

II.2.2 Activation du lactose par la méthode des trichloroacétimidates (Figure II. 22)

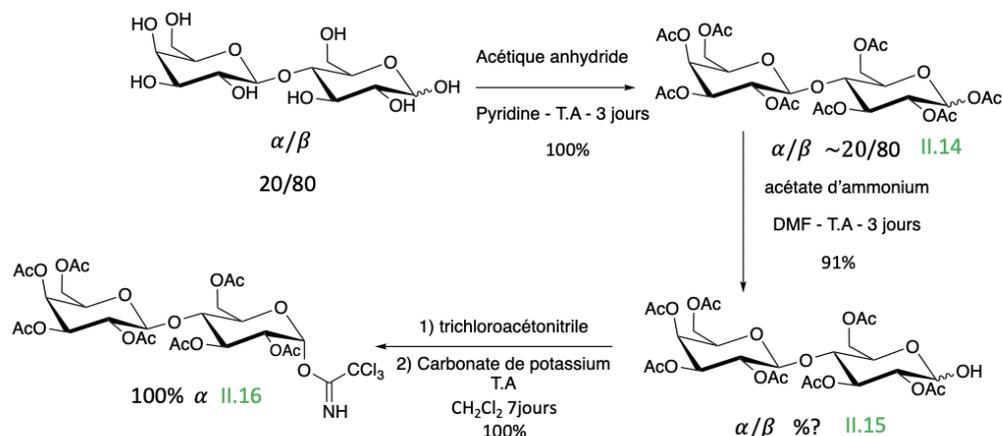


Figure II. 22: Activation du synthon dissacharidique via la méthode des trichloroacétimidates.

Nous sommes partis d'un mélange de diastéréoisomères α / β en proportion (20 / 80) pour le lactose de départ. Toutes les fonctions alcools ont été préalablement protégées par de l'anhydride acétique afin d'obtenir le composé II.14, avec un groupe participant acyle en position C2 du lactose *per-O*-acylé en proportion $\alpha/\beta \cong 20/80$, d'après le spectre ^1H . La valeur des constantes de couplage ainsi que des déplacements chimiques des protons anomériques sont de très bons indicateurs de la présence des 2 anomères¹³². L'anomère α possède une constante de couplage plus faible que l'anomère β ($J_{\text{cis}} < 5$ Hz) ainsi qu'un déplacement chimique plus déblindé. Dans notre cas, la valeur de la constante de couplage du doublet correspondant, est de $J_{\text{H1}\alpha\text{-H2}} = 3,84$ Hz pour un déplacement chimique de 6,22 ppm. Dans le cas de l'anomère β , il est caractérisé par un doublet dont la constante de couplage est égale à $J_{\text{H1}\beta\text{-H2}} = 8,27$ Hz et dont le déplacement chimique est plus blindé, soit à 5,65ppm.

Par la suite, la déprotection sélective de la fonction alcool, portée par le carbone anomérique (position C1) a été réalisée grâce à de l'acétate d'ammonium pour obtenir le composé II.15. Le spectre ^1H ne nous a pas permis de discerner la présence et les proportions des 2 anomères. Seul le spectre ^{13}C nous a fourni une indication sur la présence des 2 formes α / β grâce aux valeurs de déplacement chimique des carbones anomériques.

¹³² W. A. Bubb, *Concepts Magn. Reson.* **2003**, 19A, 1–19.

L'anomère α possède un déplacement à 90,13ppm tandis que celui de l'anomère β est de 95,28ppm. Cette déprotection sélective a permis de fonctionnaliser la position anomérique par le trichloroacétimidate, grâce à l'utilisation du trichloroacétonitrile, afin d'obtenir le composé **II.16** sous la configuration exclusive α . La présence d'un doublet à 6,45ppm dont la valeur de la constante de couplage est égale à $J_{H1\alpha-H2} = 3,7\text{Hz}$ le confirme.

La suite de la synthèse a consisté à coupler la tête polaire dissaccharidique **II.16** avec les motifs glycéro-lipidiques fluorescents **II.13a, b et c** *via* une réaction de glycosylation.

II.2.3 Réaction de glycosylation

La réaction de glycosylation a été activée par l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, qui a permis à l'accepteur de glycosyle (**II.13a, b ou c**) d'attaquer plus facilement le donneur **II.16**, pour obtenir les composés **II.17a, b et c**. Puis l'utilisation en quantité catalytique du carbonate de potassium nous a permis d'obtenir les analogues fluorescents glyco-glycéro-lipidiques de l'Ohmline d'intérêts **OP1, OP2 et OP3** (Figure II. 23).

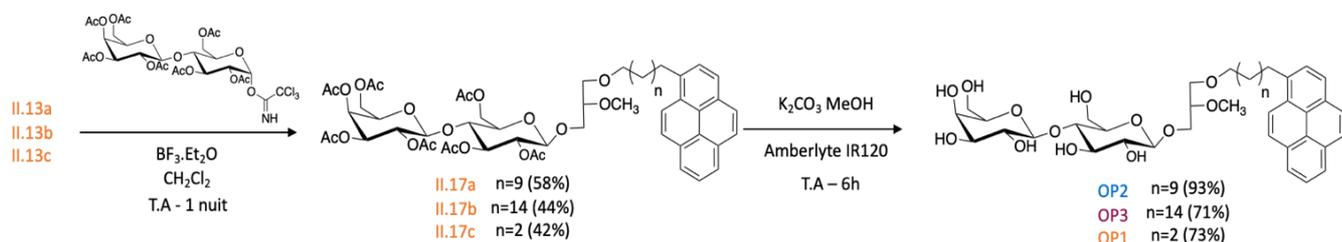


Figure II. 23: Réaction de glycosylation entre le lactose activé par le trichloroacétimidate et les précurseurs glyco-lipidiques fluorescents.

Les études de RMN du ^{13}C révèlent que seul l'anomère β est présent pour chacun des analogues fluorescents obtenus (Figure II. 24).

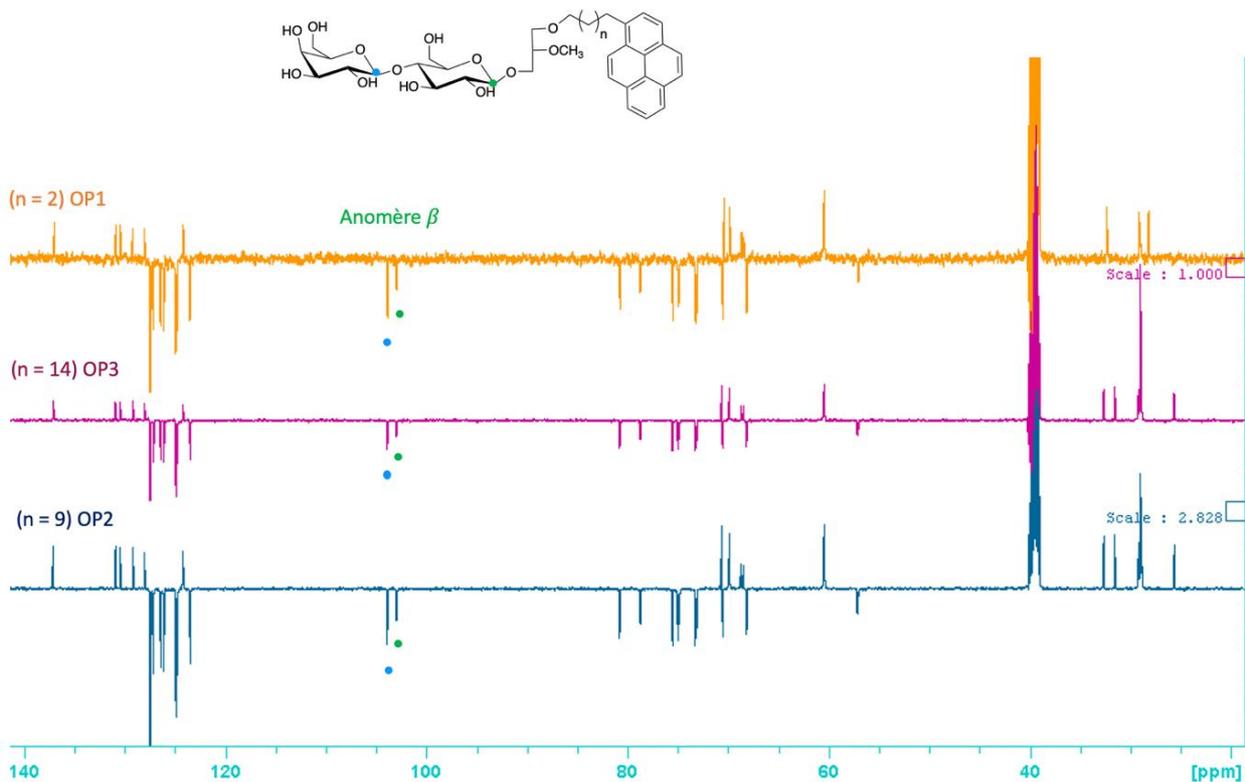


Figure II. 24: Spectre RMN ^{13}C Jmod des produits finaux OP1, OP2 et OP3.

Pour lever l'ambiguïté sur l'obtention unique de l'anomère β , une expérience RMN « Gate Decoupling » ($^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$) a été réalisée. Celle-ci permet de calculer les constantes de couplage vicinaux $^1J_{\text{C-H}}$ dont les valeurs sont caractéristiques des anomères α et β . Pour un anomère α la constante de couplage doit être de $^1J_{\text{C-H1}} \cong 170\text{Hz}$ tandis que pour l'anomère β elle doit être de $^1J_{\text{C-H1}} \cong 160\text{Hz}$ (Figure II. 25).

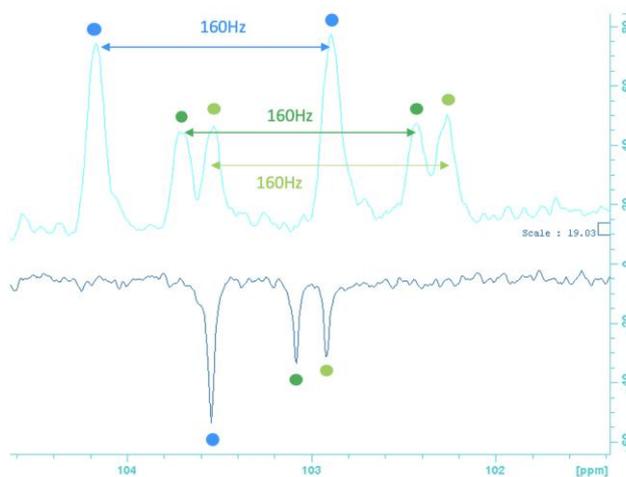


Figure II. 25: Expériences RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ou Gate Decoupling (spectre du haut) et expérience Jmod (spectre du bas) pour le composé OP2.

Les constantes de couplage mesurées, qui possèdent toutes la valeur de 160 Hz, sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature et nous permettent de conclure que l'analogue OP2 est bien de configuration exclusive β . Sur la base des études réalisées pour OP2 ainsi que sur les spectres Jmod obtenus (Figure II. 24), on peut faire l'hypothèse que les deux autres analogues fluorescents obtenus, OP1 et OP3, sont également de configuration exclusive β .

Une modification de la tête polaire a été également effectuée. Le lactose a été remplacé par un monosaccharide, le glucose. Pour cela, le même protocole expérimental, qui a permis l'obtention du composé II.16, a été utilisé. La glycosylation a été effectuée entre le précurseur lipidique fluorescent II.13b et le glucose per-O-acylé II.18 pour donner le composé II.19. La déprotection finale de la tête polaire par de le carbonate de potassium nous a permis d'obtenir le composé final II.20 (Figure II. 26), également sous la configuration exclusive β .

L'activité biologique des 4 analogues fluorescents de l'Ohmline a ensuite pu être déterminée.

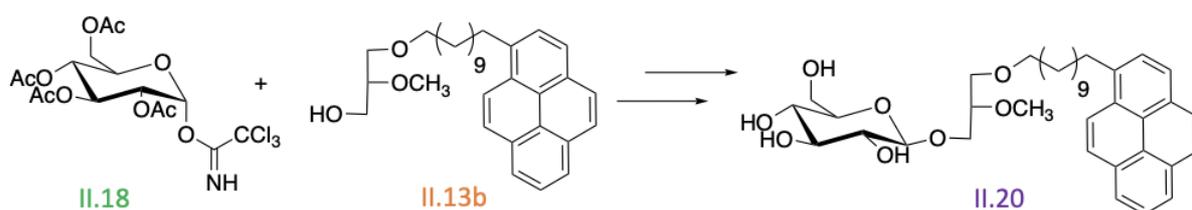


Figure II. 26: Obtention du composé II.20

III - Évaluations biologiques de OP1, OP2, OP3 et II.20.

Les évaluations biologiques ont été réalisées au sein de l'unité INSERM U1069 de l'Université de Tours (équipe du Pr. Christophe Vandier). La capacité d'inhibition du courant ionique dépendant du canal SK3 a été étudiée grâce à la technique de patch-clamp. Les cellules utilisées provenaient de lignées embryonnaires de rein humain qui sur-expriment le canal SK3 (HEK293T-SK3+) ou qui ne l'expriment pas (HEK293T - SK3-). Les études concernant l'inhibition de la migration cellulaire ont, quant à elles, été réalisées sur des cellules cancéreuses mammaires hautement invasives, les cellules MDA-MB435s. Le contrôle utilisé

pour toutes ces analyses a été notre composé de référence, l'Ohmline. Chacune des expérimentations a été réalisée de façon indépendante (N) et chacune d'entre elles est faite en triplicat (n) (soit pour une expérimentation : N=1, n=3 ; deux expérimentations N=2, n=6 etc.).

III.1 Étude des composés sur l'inhibition du canal SK3

Le patch-clamp est la technique de référence pour l'étude électrophysiologique des canaux ioniques transitant de part et d'autre de la membrane plasmique¹³³. La mesure est rendue possible grâce à la mise en contact d'une micropipette de verre remplie d'une solution conductrice, avec la surface d'une cellule isolée. Le patch-clamp peut être utilisé sous différentes configurations. Pour nos études, la configuration « cellule-entière » ou « whole-cell-configuration » a été utilisée.

Elle consiste à « aspirer », puis rompre, la partie de la membrane plasmique qui se trouve au contact de la micropipette. La rupture permet à la solution conductrice d'entrer en contact avec le milieu intracellulaire de la cellule, ce qui permet la mesure des courants macroscopiques générés par l'ensemble des canaux ioniques présents au sein de la membrane (Figure II. 27).

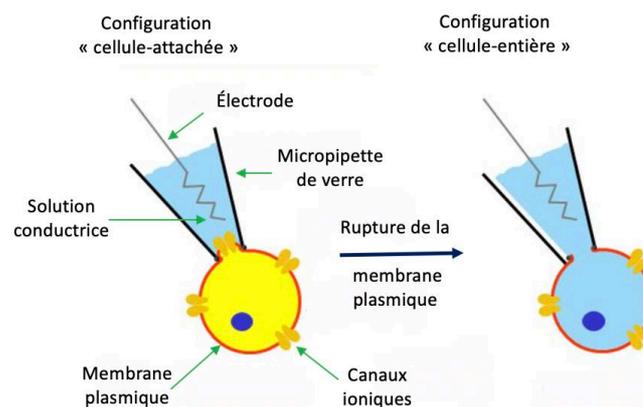


Figure II. 27 : configuration « whole-cell » ou cellule-entière du patch-clamp.

¹³³ Joffre M. Électrophysiologie moléculaire. I. La technique du patch-clamp, vol. 1. Paris : Hermann, 2001, p64.

Avant de détailler les résultats biologiques obtenus, la structure de chacun des composés est rappelée dans la **Figure II. 28**.

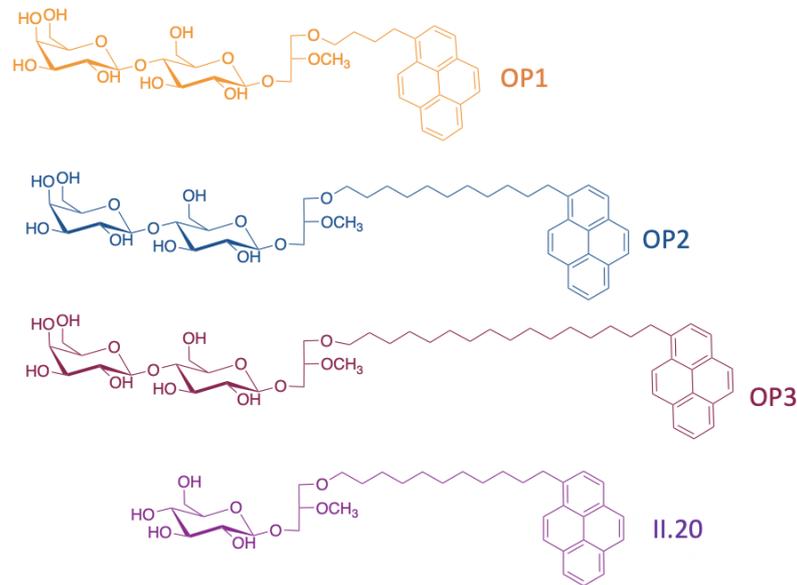


Figure II. 28: Structure des analogues fluorescents de l'Ohmline obtenus **OP1**, **OP2**, **OP3** et **II.20**.

Les études ont révélé, pour les composés **OP1** (n=2) et **OP3** (n=14), que l'inhibition du courant (pour une amplitude mesurée à 0 mV, 1 minute après l'application de nos composés à la concentration de 10 μ M), était extrêmement faible. En effet, les valeurs d'inhibition sont respectivement de $-9,88 \pm 2,89\%$ et $-11,11 \pm 5,04\%$ (**Figure II. 29**).

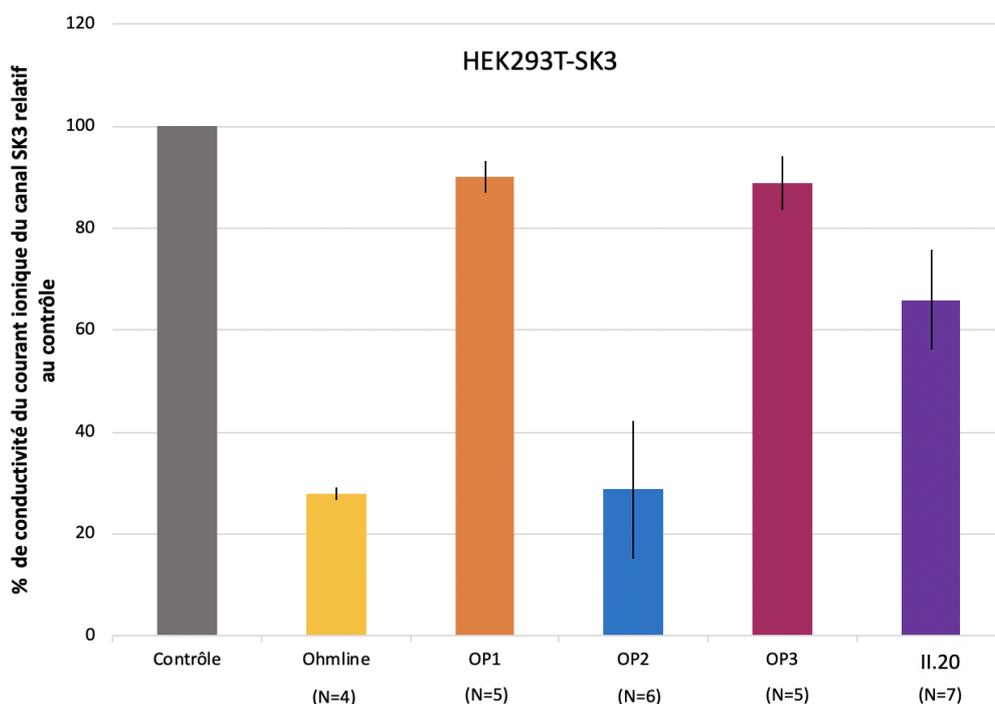


Figure II. 29: Mesure par patch-clamp des composés **OP1**, **OP2**, **OP3** et **II.20**, visant à étudier leur modulation du courant ionique dépendant de SK3 sur les cellules HEK293T-SK3. N correspond au nombre de manipulations indépendantes réalisées pour chacun des composés.

À *contrario*, le composé **OP2** (n=9) inhibe fortement le courant ionique dépendant du canal SK3 à hauteur de $-71.3 \pm 13.3\%$. Les valeurs d'inhibition du courant ionique de l'Ohmline étant de $-72,08 \pm 1.08\%$, le composé **OP2** a été le seul, parmi le panel d'analogues fluorescents synthétisés, à obtenir des résultats d'inhibition quasi équivalents à ceux de l'Ohmline. Le composé **II.20**, quant à lui, inhibe plus faiblement le courant, à hauteur de $-34,0 \pm 9.5\%$ (Figure II. 29).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus pour d'autres analogues étudiés à savoir :

1) la présence du motif lactose (disaccharide) conduit à une inhibition plus forte qu'avec un motif glucose (monosaccharide). Cette observation est cohérente avec une étude antérieure relative aux composés non-fluorescent⁸.

2) la longueur de la chaîne lipidique est également importante pour la modulation de l'activité du canal SK3.

La suite des études biologiques s'est poursuivie avec l'étude de l'inhibition de la migration cellulaire.

III.2 Étude des composés sur l'inhibition de la migration cellulaire

Pour cette étude, seul le composé **OP2**, montrant une inhibition significative du courant ionique dépendant du canal SK3 a été testé.

Pour cela, la migration cellulaire a été analysée dans des plaques de 24 puits avec des inserts de culture cellulaire à membrane en polyéthylène téréphtalate dont la taille de pore est de 8 μm . Dans le compartiment cellulaire supérieur, les cellules MDA-MB-435 ont étéensemencées en présence du composé à tester, à la concentration de 300 nM. Après 24 h, les cellules stationnaires, qui n'ont pas migré, ont été éliminées de la face supérieure de la membrane, tandis que celles ayant migrées dans la partie inférieure des inserts ont été fixées, puis les noyaux ont été colorés et comptabilisés. L'histogramme de gauche de la Figure II. 30 montre l'effet de **OP2** et de l'Ohmline dans la migration cellulaire des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435s exprimant les canaux SK3 endogènes (SK3+ (N=3, n=6)). L'Ohmline à la concentration de 0,3 μM inhibe la migration cellulaire SK3 dépendante

de - 50% tandis que **OP2**, à cette même concentration n'a aucun effet. C'est pourquoi, la concentration de ce composé a été augmenté à 1 μM . Cette fois-ci, une inhibition de la migration de $-32.5 \% \pm 4.8 \%$ a été constatée. **OP2** est donc capable d'inhiber la migration cellulaire dépendante du canal SK3 à une concentration de 1 μM .

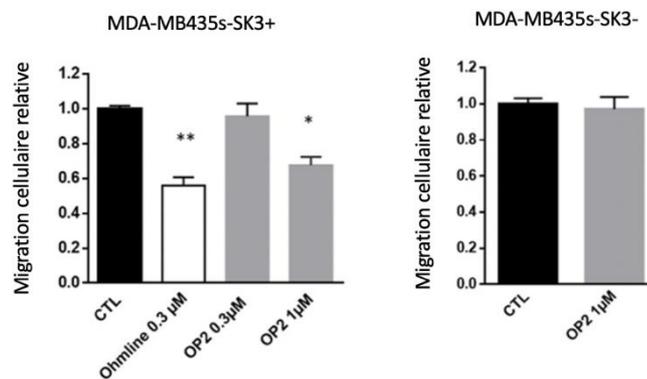


Figure II. 30: Étude de l'inhibition de la migration pour **OP2** à 0.3 et 1 μM (figure de gauche N=3, n=6) et étude de la spécificité de **OP2** (figure de droite N=3, n=9).

Pour prouver que l'action de **OP2** était bien due à une inhibition de l'activité du canal SK3, sa spécificité a été étudiée sur les cellules MDA-MB435s (SK3-) qui n'expriment plus le canal SK3 à la surface membranaire. L'histogramme de droite de la Figure II. 30 ne montre aucun effet d'**OP2** sur la migration cellulaire des MDA-MB-435 n'exprimant pas le canal SK3 (SK3-), preuve que la modulation du courant ionique de ce composé passe bien par l'inhibition du courant dépendant du canal SK3.

Le composé **OP2**, est donc, à notre connaissance, le premier modulateur fluorescent spécifique, et efficace vis-à-vis de la modulation de l'activité du canal SK3.

Par la suite, nous avons entrepris des mesures de fluorescence des 3 composés **OP1** à **OP3**, en milieu aqueux, puis dans un environnement lipidique, afin de mieux comprendre leurs propriétés de fluorescence au sein de différents environnements lipidiques ou non, avant d'entreprendre des études de microscopies.

IV - Études de fluorescences des composés OP1, OP2 et OP3

IV.1 Étude en milieu aqueux

Nous avons, dans un premier temps, enregistré la fluorescence des 3 composés dans l'eau à différentes concentrations : 0,1, 0,2 et 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figure II. 31).

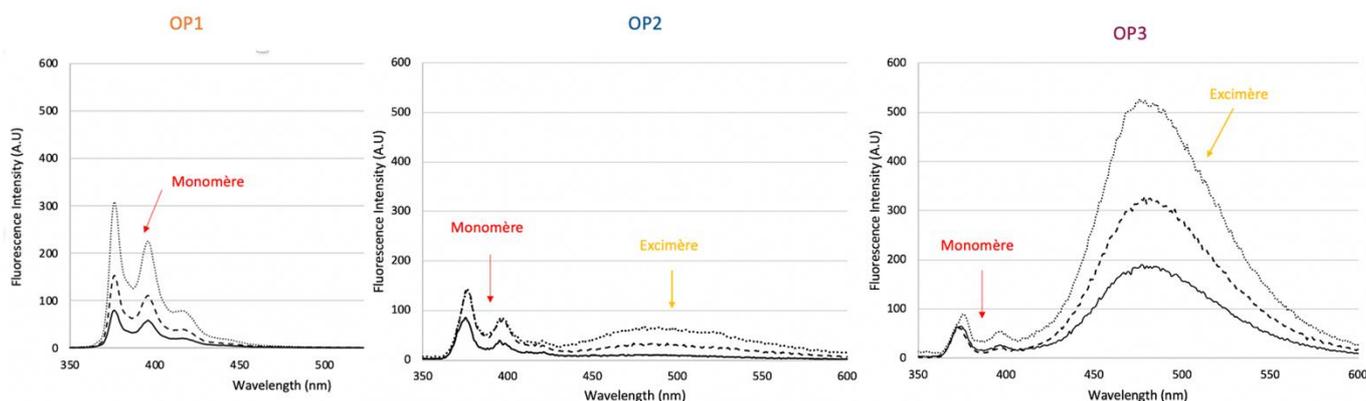


Figure II. 31: Mesure de fluorescence dans l'eau pour les composés OP1, OP2 et OP3 à différentes concentrations : 0,1 (trait plein), 0,2 (ligne en tiré) et 0,4 (ligne en pointillée) $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (gain du détecteur 800).

On peut observer que la fluorescence des monomères est caractérisée par une émission de fluorescence allant de 360 à 440 nm alors que l'émission des excimères est caractérisée par une large bande allant de 425 à 600 nm avec un maximum aux environs de 490 nm, ce qui est concordant avec les résultats des autres études portant sur les propriétés de fluorescence du pyrène^{134,135,136}.

Dans le cas du composé OP1, qui possède l'espaceur alkyle le plus court ($n=2$), il n'existe que sous la forme de monomère aux 3 concentrations étudiées. Le composé serait donc complètement soluble en milieux aqueux et n'aurait pas tendance à former des agrégats. La chaîne alkyle, très courte, limite le caractère hydrophobe du composé, qui semble donc, ne pas s'agréger à ces concentrations.

En ce qui concerne le composé OP2, sa fluorescence à la concentration de 0,1 μM ne montre que la présence de monomère. Cependant, aux deux autres concentrations plus élevées, la

¹³⁴ H. J. Pownall, L. C. Smith, *Chem. Phys. Lipids*, **1989**, 50, 191-211.

¹³⁵ G. Jones, V. I. Vulle, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 2457-2460.

¹³⁶ G. K. Bains, S. H. Kim, E. J. Sorin, V. Narayanaswami, *Biochemistry*, **2012**, 51, 6207-6219.

présence d'excimères est détectée. La présence de l'excimère est attribuée, cette fois-ci, à son hydrophobicité plus élevée, due à la chaîne alkyle en 11 carbones. Cette hydrophobicité élevée favoriserait son auto-assemblage en micelle dans l'eau. Pour finir, le composé **OP3**, qui possède un espaceur de 16 carbones, forme majoritairement des excimères même à la concentration la plus faible, ce qui suggère que même à 0,1 μM , **OP3** a tendance à s'auto-assembler pour former des agrégats¹¹⁹.

IV.2 Étude dans un environnement lipidique

Nous avons ensuite étudié les propriétés fluorescentes des composés **OP1-3** placés dans différents environnements lipidiques. Pour ces études, nous avons utilisé des liposomes de différentes compositions comme modèle de membrane plasmique et nous avons utilisé deux stratégies d'incorporation des composés **OP1-3** dans les liposomes. Un premier protocole de pré-insertion, qui implique de mélanger l'un des composés **OP** avec les autres lipides sélectionnés (par exemple DOPC, DOPC / Cholestérol -70/30 mol% ou Egg-PC), avant la formation des liposomes a été utilisé, tandis que le second protocole, a consisté, quant à lui, à ajouter l'un des composés **OP** sur les liposomes déjà formés (protocole de post-insertion).

IV.2.1 Protocole de pré- et post-insertion

Des solutions mères des composés **OP1-3** ont été préparées dans du méthanol à une concentration de 50 μM . Des solutions mères d'EggPC, de DOPC et de cholestérol ont été préparées dans du chloroforme à la concentration de 1 mmol/L. Pour les mélanges d'EggPC ou de DOPC en présence de cholestérol, des solutions mères des différents mélanges ont été préparées contenant chacune 30% molaire de cholestérol et 70% molaire d'EggPC ou de DOPC.

Le protocole de post-insertion est identique à celui de la pré-insertion sauf que, dans ce cas, les composés **OP1-3** ont été ajoutés après sonication. La concentration finale de **OP1**, **2** ou **3** est toujours de 0,2 μM (rapports lipides/OP = 40 ou 200). Selon le premier protocole, l'un des composés **OP1-3** a été mélangé avec du DOPC, du DOPC / cholestérol (70/30% molaire),

de l'Egg-PC ou de l'Egg-PC / cholestérol (70/30% molaire) pour former un film lipidique qui a produit des solutions liposomales après hydratation et sonication. Dans ces formulations, la concentration finale de composés OP était de 0,2 μM et la concentration de lipides de 8 μM , 24 μM et 40 μM . En conséquence, les rapports molaires lipide/OP sont de 40, 120 et 200. Pour le deuxième protocole (post-insertion), l'un des composés OP, dissous dans quelques μL de méthanol, est ajouté sur l'une des solutions liposomales. La composition et la concentration sont identiques à celles utilisées pour le protocole de pré-insertion. Ce dernier vise à mimer la distribution homogène des composés OP dans les liposomes alors que le protocole de post-insertion permet de prendre en compte le processus de migration des composés OP1-3 de la solution vers les liposomes.

Pour les études de fluorescence, les échantillons ont tous été excités à 331 nm.

IV.2.1.1. Cas du composé OP2 (Figure II. 32)

Concernant la procédure de pré-insertion de OP2, et ce, quel que soient les lipides utilisés, l'intensité de fluorescence du monomère augmente lorsque le rapport lipide/OP2 augmente de 40 à 200, tandis que la fluorescence de l'excimère « a tendance » à diminuer. Cela sous-tend que OP2, dont la fluorescence dans l'eau est très faible (Figure II. 31), est inséré dans les liposomes et qu'il existe principalement sous la forme de monomère, et quasi exclusivement pour la dilution la plus élevée (soit correspondant au rapport lipide/OP2 le plus élevé = 200). Lorsque le rapport lipide/OP2 diminue, la fluorescence des monomères et des excimères est observée dans les liposomes, suggérant une certaine proximité des composés fluorescents.

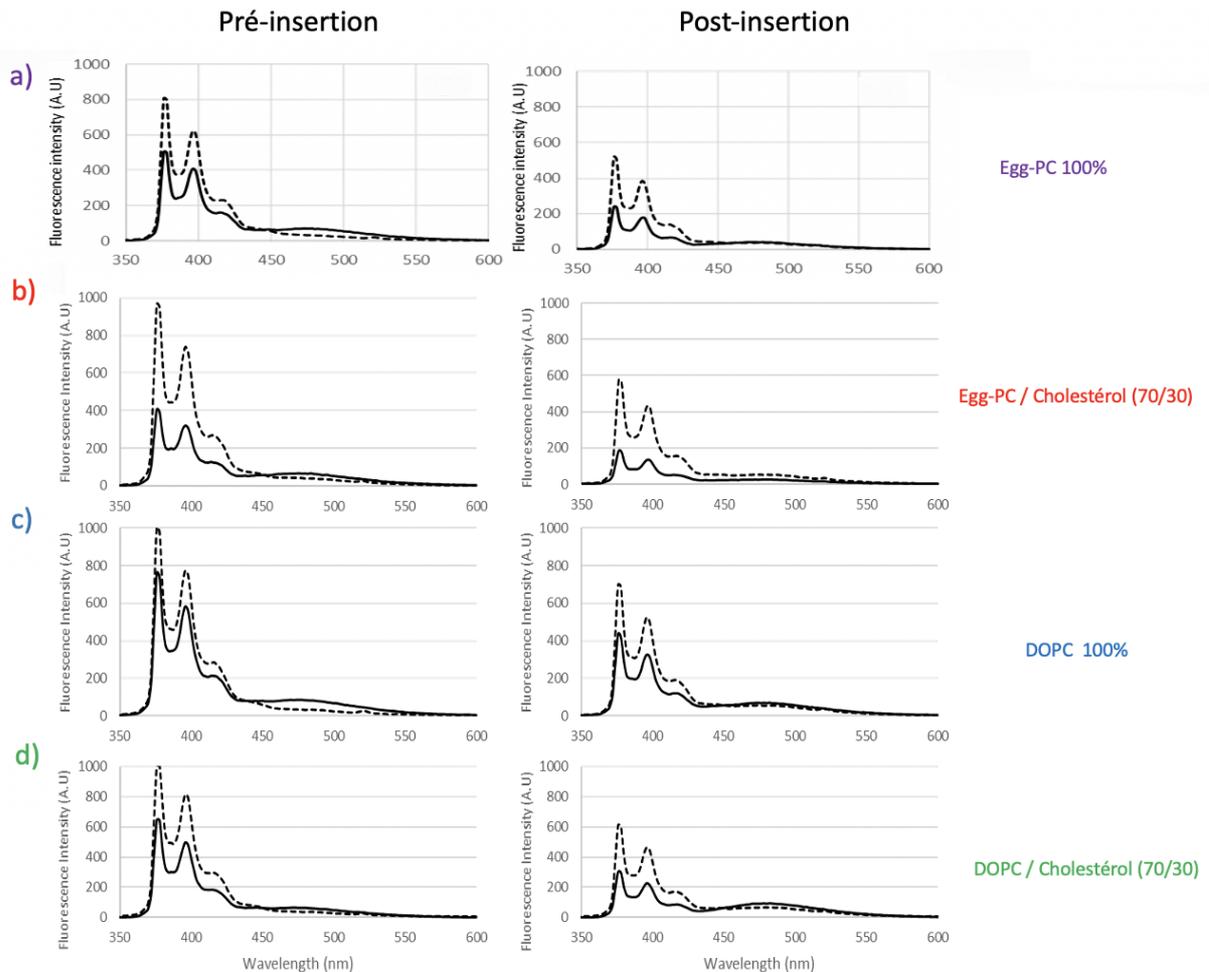


Figure II. 32: Spectres de fluorescence (excitation à 331 nm) d'OP2 (0,2 µM) intégrés dans différentes formulations liposomales à deux concentrations de lipides 8 µM et 40 µM produisant un rapport final lipide/OP2 = 40 (trait plein) et 200 (trait pointillé). Deux protocoles ont été utilisés : pré-insertion et post-insertion a) Egg-PC b) Egg-PC / cholestérol (rapport 70/30 mol), c) DOPC et d) DOPC / cholestérol (rapport 70/30 mol) (Gain du détecteur 750).

Concernant la procédure de post-insertion de OP2 (Figure II. 32), son intensité de fluorescence du monomère est plus faible que dans le cas de la procédure de pré-insertion (en ce qui concerne le rapport Egg-PC/OP = 200).

Pour ce protocole, l'intensité des signaux représente environ 65% du signal obtenu lors du protocole de pré-insertion. Étant donné que l'intensité de fluorescence du monomère de OP2 dans l'eau est très faible (Figure II. 31), ces résultats suggèrent que OP2 soit intégré dans la bicouche liposomale. L'évolution du rapport du composé OP2, existant sous forme de monomère ou d'excimère dans les liposomes, peut être évaluée en mesurant le rapport d'intensité I_{376} / I_{484} . Les valeurs obtenues sont répertoriées dans le Tableau II. 1.

Composés	I_{376}/I_{484} Pré-insertion	I_{376}/I_{484} Post-insertion
OP2	21	8,5
OP3	21	4

Tableau II. 1: Valeurs du rapport d'intensité obtenus pour les composés OP2 et OP3 pour les 2 procédures et dans le cas où la dilution a été la plus élevée (rapport Lipide / OP = 200).

Ces résultats indiquent que le protocole de post-insertion induit une distribution plus hétérogène du composé OP2 au sein de la bicouche lipidique modèle puisque le signal de l'excimère est relativement « plus intense » par rapport au protocole de pré-insertion. Ce dernier, quant à lui, favorise une distribution homogène du composé OP2 au sein de la bicouche puisque les analogues fluorescents sont formulés en même temps que les autres lipides constituant la membrane modèle des liposomes. Enfin, on peut également noter que, quelle que soit la composition de la formulation liposomale et le protocole utilisé, ces derniers ont un faible effet sur l'incorporation de OP2.

IV.2.1.2. Cas du composé OP3

Tout comme le composé OP2, la procédure de pré-insertion pour OP3 (Figure II. 33) indique que l'intensité de fluorescence du monomère (376 nm) augmente lorsque le rapport lipide/OP3 augmente, alors que la fluorescence de l'excimère (484 nm) diminue. Cela montre que OP3, dont la fluorescence est aussi très faible dans l'eau (Figure II. 31), est inséré dans les liposomes, essentiellement sous la forme de monomère, pour la dilution la plus élevée. Lorsque le rapport lipide/OP3 diminue, la fluorescence des monomères et des excimères est observée dans les liposomes, suggérant, tout comme pour OP2, une certaine proximité des composés fluorescents.

Concernant la procédure de la post-insertion, l'intensité de fluorescence du monomère pour OP3 est plus faible que pour la procédure en pré-insertion (en ce qui concerne le rapport Egg-PC/OP3 = 200). Pour cette procédure, l'intensité des signaux représente environ 35% du signal obtenu pour la méthode de pré-insertion pour OP3. L'intensité de fluorescence du monomère de OP3 étant très faible dans l'eau (Figure II. 31), on peut estimer que OP3 est

intégré, au liposome mais en quantité moins importante que lors de la pré-insertion. Tout comme pour **OP2**, le rapport d'intensité I_{376} / I_{484} a également été évalué (voir [Tableau II. 1](#)).

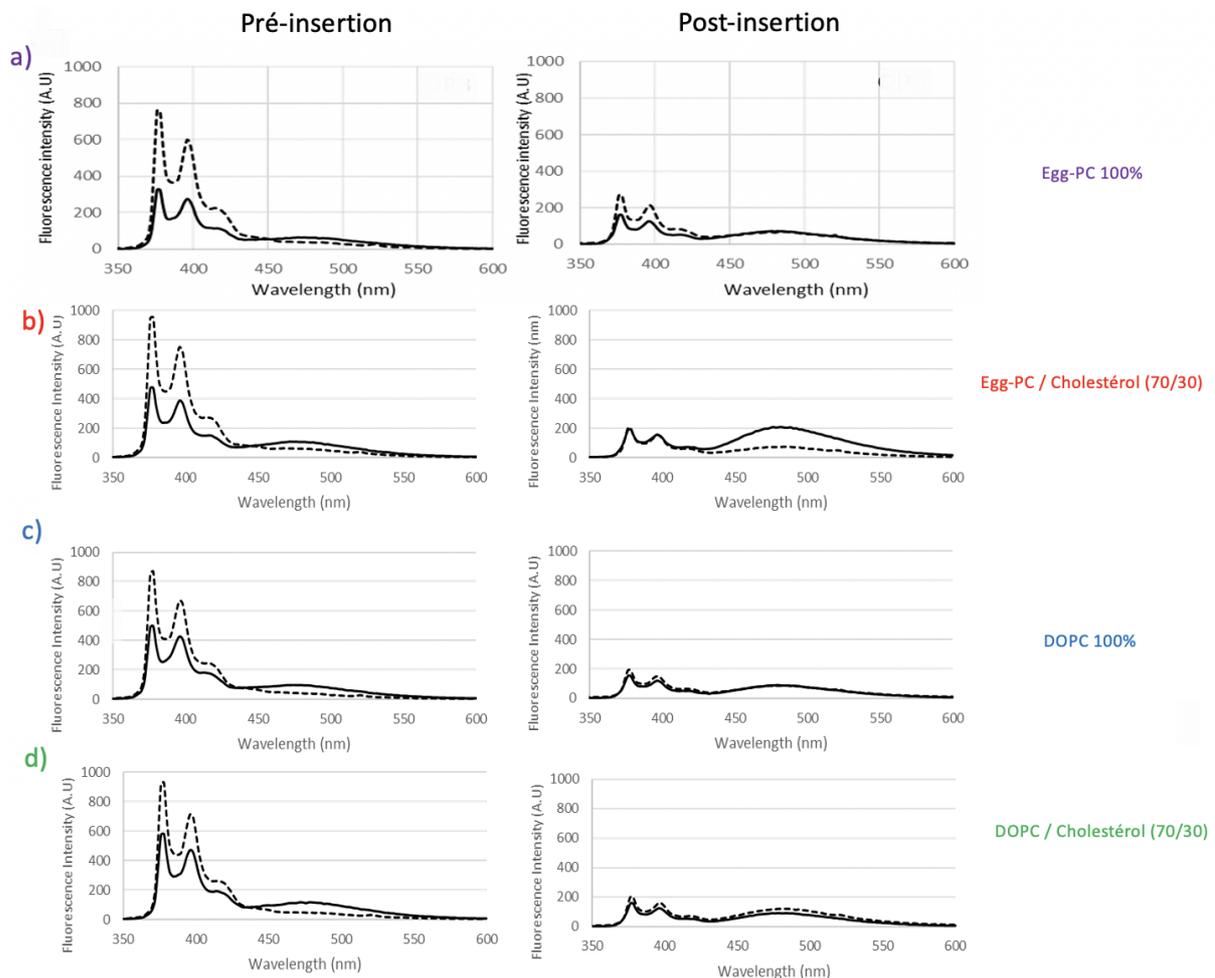


Figure II. 33: Spectres de fluorescence (excitation à 331 nm) d'**OP3** (0,2 µM) intégrés dans différentes formulations liposomales à deux concentrations de lipides 8 µM et 40 µM produisant un rapport final lipide/**OP3** = 40 (trait plein) et 200 (trait pointillé). Deux protocoles ont été utilisés : pré-insertion et post-insertion a) Egg-PC b) Egg-PC / cholestérol (rapport 70/30 mol), c) DOPC et d) DOPC / cholestérol (rapport 70/30 mol)

Les résultats indiquent que :

- 1) Le protocole de post-insertion pour **OP3** induit une distribution plus hétérogène au sein de la bicouche lipidique modèle puisque le signal de l'excimère est plus intense par rapport au protocole de pré-insertion. Ce dernier, quant à lui, favorise une distribution homogène de **OP3** au sein de la bicouche puisque les analogues fluorescents sont formulés en même temps que les autres lipides constituant la membrane modèle des liposomes.

- 2) L'intensité relative de la fluorescence (monomère + excimère) après post-insertion des composés OP2 vs OP3 suggère que OP2 intègre la bicouche lipidique plus efficacement que OP3 (voir Figure II. 32 et Figure II. 33).
- 3) La nature plus hydrophobe du composé OP3, du fait de sa longue chaîne hydrophobe de 16 carbones, suggère que dans l'eau, cet analogue est plus agrégé et pourrait, par conséquent, intégrer les liposomes avec un état d'agrégation plus élevé, ou présenter une mobilité plus faible au sein de la bicouche, ce qui expliquerait la plus faible valeur relative obtenue pour le rapport I_{376} / I_{484} par rapport au composé OP2.

IV.2.1.3. Cas du composé OP1 (Figure II. 34)

Dans le cas du composé OP1, seules des études sur des formulations liposomales à base de Egg-PC 100% ou bien Egg-PC / Cholestérol (70/30) ont été réalisées.

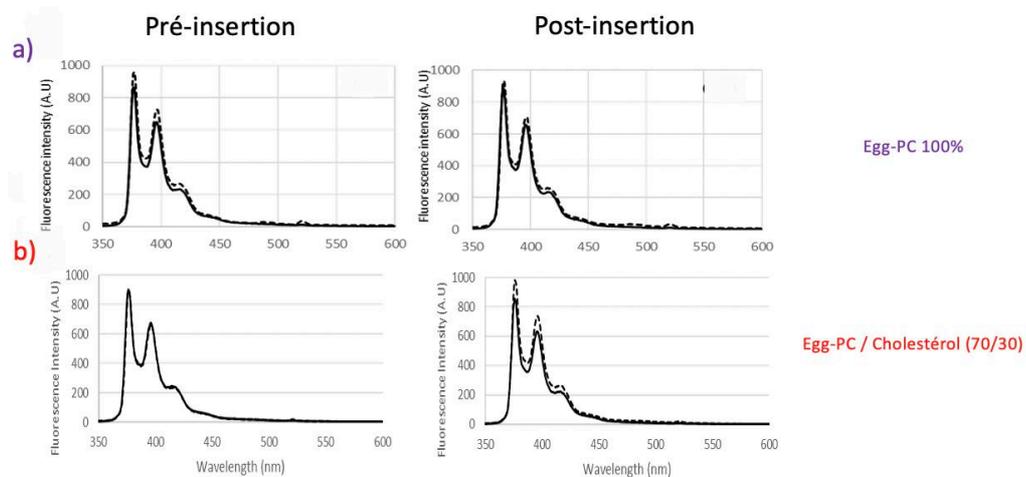


Figure II. 34: Spectres de fluorescence (excitation à 331 nm) d'OP1 (0,2 µM) intégrés dans différentes formulations liposomales à deux concentrations de lipides 8 µM et 40 µM produisant un rapport final lipide/OP1 = 40 (trait plein) et 200 (trait pointillé). Deux protocoles ont été utilisés : pré-insertion et post-insertion a) Egg-PC b) Egg-PC / cholestérol (rapport 70/30 mol).

Pour OP1, le résultat est complètement différent. Seule la fluorescence du monomère est observée, et ce, quels que soient les deux rapports lipide / OP1, le protocole ou la composition liposomale utilisés. De plus, l'intensité de fluorescence est quasiment identique dans les deux cas. Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses. La première serait que le composé OP1 s'intégrerait, et se disperserait dans les liposomes, ce qui rendrait la proximité

entre plusieurs composés fluorescents faible, et pourrait justifier l'absence d'excimère. L'autre possibilité serait que OP1, à la concentration de 0,2 µM, et ce, malgré la présence du pyrène, existerait principalement en solution dans l'eau, ce qui empêcherait son insertion dans les membranes liposomales. Cette dernière hypothèse permettrait d'expliquer la très faible variation de fluorescence selon le rapport lipide / OP1.

En conclusion, l'analyse de fluorescence des composés fluorescents OP1 à 3 dans différentes compositions liposomales indique que OP1 n'est probablement pas intégré dans les liposomes. À *contrario*, OP2 et OP3 seraient capables de s'intégrer dans les liposomes, et ce, indépendamment du protocole utilisé et de la composition en liposomes.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'étude par microscopie du composé biologiquement actif OP2, afin de comprendre ses effets au sein de cellules cancéreuses. Les études ont été réalisées au centre National de Biotechnologie de Madrid.

V - Études de microscopie

Pour mieux comprendre les effets du composé OP2 sur les cellules, des cellules de cancer du sein (MDA-MB-231) qui avaient été traitées avec ce composé ont été utilisées. Pour cela, deux types d'expériences ont été réalisées : la première a consisté à imager les cellules après l'ajout du composé OP2, tandis que la seconde, avait pour objectif de visualiser la cinétique d'internalisation de notre composé en le laissant incuber dans un milieu de culture pendant 24 heures avant l'imagerie.

Dans le premier cas, le milieu enrichi en sérum utilisé pour la culture cellulaire a été remplacé par un milieu sans sérum pour pouvoir effectuer le traitement avec OP2 à la concentration totale de 1 µM. Dans le second cas, OP2 a directement été ajouté au milieu déjà enrichi en sérum, pour une concentration totale en OP2 de 10 µM, et les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires afin de tester la viabilité cellulaire. Notre composé s'est incorporé au sein de la membrane plasmique des cellules dans les 45 minutes suivant le traitement (Figure II. 35a). On peut remarquer que sa distribution est abondante dans la membrane plasmique.

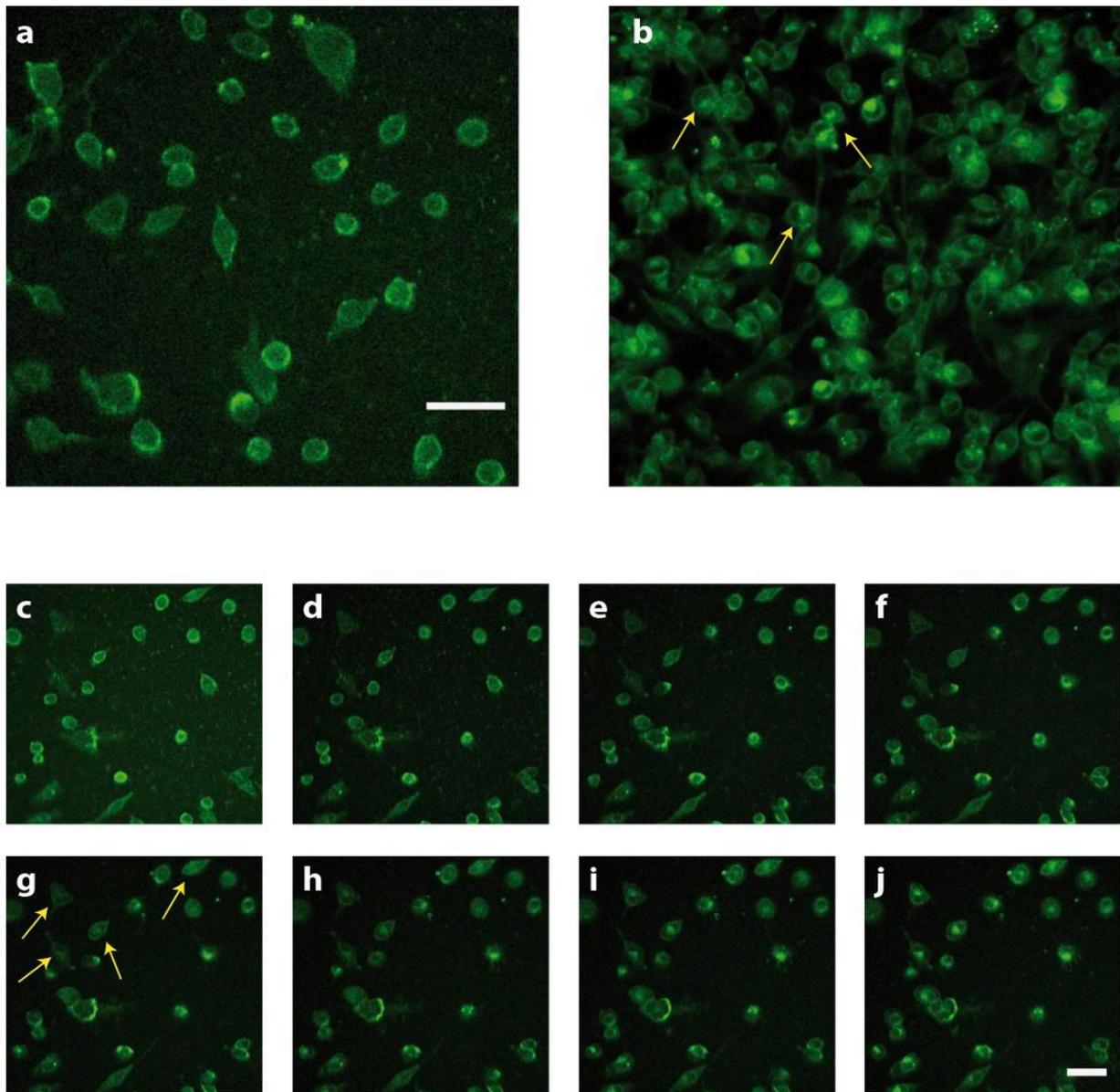


Figure II. 35 : Étude par microscopie du composé OP2. Ce dernier est internalisé dans des cellules MDA-MB-231 après son ajout au milieu de culture. (a) 45 min après l'addition d'OP2 à 1 μM (concentration totale). Lors de l'internalisation, OP2 se distribue dans la membrane plasmique et dans le cytoplasme, mais ne s'internalise pas dans le noyau cellulaire. (b) Cellules imagées 24h après traitement avec OP2 (10 μM), confirmant la viabilité cellulaire. (c-j) Les cellules ont été imagées toutes les 15 minutes à partir de (c) $t_0 = 60$ min après l'ajout d'OP2 (concentration totale de 1 μM) et se terminant à (j) $t_f = 165$ min après le traitement. OP2 commence à s'accumuler autour du noyau 2h après le traitement (g, flèches jaunes). (a-j) la barre d'échelle est de 50 μm et l'excitation de fluorescence a été réalisée à 340 nm et émission enregistrée l'a été de 468 à 552 nm.

Au même moment, on a pu encore détecter une fluorescence de fond dans le milieu (fond vert Figure II. 35a), preuve qu'après 45 minutes, l'absorption de OP2 n'était pas encore complète. 24h après le traitement des cellules avec OP2 (Figure II. 35b ; OP2 à 10 μM), on a pu noter que la population de cellules fluorescentes avait augmenté, indiquant qu'à cette concentration de 10 μM , les cellules étaient saines et viables. De plus, aucune émission de

fluorescence de fond du dimère n'a été observée dans le milieu. On peut noter que la présence simultanée de dimères et de monomères pour OP2 en solution avait déjà été remarquée, lors des études de fluorescence, pour une concentration 25 fois plus faible soit à 0,4 μM (Figure II. 31, ligne pointillée) et que la proportion de dimères par rapport aux monomères augmente avec la concentration du composé.

Pour mieux comprendre la dynamique de l'absorption cellulaire de OP2, la même région de la boîte de culture a été imagée toutes les 15 minutes, en commençant 1 heure après le traitement (Figure II. 35 c-j). L'émission de dimère de fond était négligeable 1,5 heure après le traitement (Figure II. 35e), ce qui suggère une incorporation complète de notre composé dans les cellules. L'accumulation de OP2 à la périphérie du noyau était visible 2h après le traitement (Figure II. 35g, flèches jaunes) alors que les noyaux n'étaient pas fluorescents. Cette accumulation a été encore observée 24h après le traitement (Figure II. 35b, flèches jaunes).

Au total, cette étude montre que OP2 est rapidement incorporée dans la bicouche lipidique, puisque son internalisation est clairement observée dans les cellules dans les 45 minutes après son ajout, même à la plus faible concentration (1 μM). Cette intégration rapide dans la membrane plasmique est cohérente avec les mesures obtenues *via* la technique du patch clamp. Le deuxième point est que ce composé, après une première localisation au niveau des membranes plasmiques, qui survient dans les 2 premières heures, est ensuite internalisé près du noyau. Cependant, il est difficile d'identifier avec précision la région cellulaire où OP2 s'accumule.

Dans une étude précédente portant sur les analogues fluorescents de l'Édelfosine, Mollinedo *et al.* ont rapporté que leurs composés fluorescents se localisaient dans les mitochondries et que leur internalisation était médiée par des radeaux lipidiques¹⁰⁵. Dans le cas de l'Ohmlin et de OP2, des études supplémentaires seront nécessaires pour établir leur localisation exacte dans la cellule.

De récentes études ont néanmoins montré que le canal SK3 est également présent au sein des mitochondries¹³⁷. Puisque l'Ohmlin fluorescent s'internalise, il serait intéressant d'étudier la modulation des canaux potassiques SK3 mitochondriaux par OP2 ou l'Ohmlin.

¹³⁷ M.Y. Yang, A.K.S. Camara, M. Aldakkak, W.M. Kwok, D. F. Stowe., *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **2017**, 1857, 442-458.

Le développement d'un nouvel analogue fluorescent, dont la sonde fluorescente serait plus adaptée à des études par microscopie confocale pourrait être une alternative pour nous permettre d'identifier les zones d'accumulations intracellulaires.

Récemment, une autre étude a été réalisée visant à tester si la diminution de l'activité du canal SK3 par OP2 pourrait être due à une diminution de l'expression de la protéine SK3 au niveau de la membrane plasmique, a été réalisée. Pour cela, un test de protéinase-K a été effectué.

VI - Test de la protéinase kinase (Figure II. 36)

La protéinase K est une enzyme appartenant à la famille des protéases. Cette famille est connue pour cliver, une ou plusieurs liaisons peptidiques issues des boucles protéiques extracellulaires, ce qui génère des protéines de plus petites tailles qui peuvent être mises en évidence par Western Blot. En comparant l'analyse Western Blot en présence ou en absence de protéinase K et en comparant les cellules mises en contact de l'Ohmline ou du composé OP2, il est possible de mettre en évidence des différences d'expression de la protéine SK3 à la membrane plasmique.

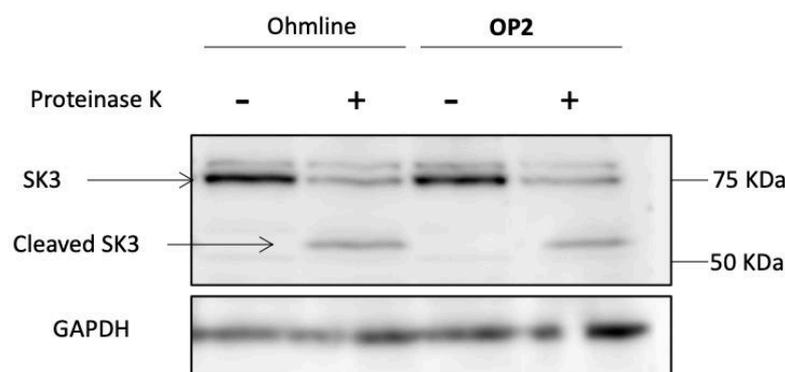


Figure II. 36: Distribution de la protéine SK3 à la membrane plasmique et à la membrane intracellulaire après traitement avec l'Ohmline ou OP2 pendant 02h20 à 1 μ M. L'addition de la protéinase K dans le milieu de culture cellulaire conduit à un clivage de la protéine SK3 situé à la membrane plasmique, ce qui entraîne une masse moléculaire apparente de 55 KDa. Le Western blot montre qu'en l'absence de la protéinase K, le niveau d'expression de SK3 (à la MP et à la membrane intracellulaire) est similaire pour les deux traitements. Le test de clivage par la protéinase K montre que la distribution de SK3, au sein de la membrane plasmique et de la membrane intracellulaire, est similaire après un traitement avec l'Ohmline ou avec le composé OP2.

Dans notre cas, en l'absence de la protéinase K, la protéine SK3 complète possède à une masse moléculaire de 75 kDa. Cette bande représente la protéine SK3 localisée à la fois à la membrane plasmique et dans la cellule. L'intensité de cette bande est comparable en présence de l'Ohmline ou du composé OP2.

Suite à la présence de protéinase K, un clivage de la protéine SK3, qui était située au niveau de la membrane plasmique, est observé. Sa masse moléculaire apparente est de 55 kDa. Les traitements par l'Ohmline ou le composé OP2 ont tous deux révélé une bande caractéristique de même intensité de la protéine SK3 clivée à 55 kDa en présence de protéinase K. L'intensité des bandes à 55 kDa (correspondant au canaux SK3 initialement présents à la membrane plasmique) et la bande non-clivée (75 kDa ; correspondant à la protéine présente dans la cellule) sont semblables, ce qui indique que le composé OP2 n'entraîne pas de modification de l'expression membranaire de SK3 en comparaison à l'Ohmline.

Ces résultats montrent donc que OP2 ne modifie pas l'expression de la protéine SK3 à la membrane plasmique par rapport à l'Ohmline.

VII - Conclusion

Dans cette partie, la synthèse de 4 analogues fluorescents de l'Ohmline a été décrite. Seul le composé OP2, dont la longueur de l'espaceur est de 11 carbones, s'est avéré efficace pour inhiber les canaux SK3 avec une efficacité comparable à celle de l'Ohmline (Mesures obtenues par patch-clamp à 10 μ M).

Les études de migration cellulaire ont montré que OP2 est moins efficace que l'Ohmline puisqu'à la concentration de 300 nM, il est inefficace. En revanche, à 1 μ M, une inhibition de la migration cellulaire SK3 dépendante est observée. L'effet de OP2 sur la viabilité cellulaire des cellules MDA-MB435s à la concentration de 1 μ M pendant 48H n'a révélé aucune toxicité.

Les études de migration cellulaire, ont, contrairement à l'Ohmline, révélé une action de la molécule OP2 qui est dépendante de la concentration utilisée. Sa viabilité cellulaire a

également été testée sur les cellules MDA-MB435s à la concentration de 1 μ M pendant 48H et aucune des expérimentations n'a révélé de toxicité.

Le composé **OP2** serait donc, à notre connaissance, le premier analogue fluorescent à posséder ce profil pharmacologique et à inhiber l'activité du canal SK3 ainsi que la migration cellulaire SK3 dépendante.

Les études de fluorescences réalisées en milieu aqueux ou dans différents milieux lipidiques se sont avérées complémentaires des études de microscopie. Le composé **OP2** est capable de s'intégrer dans la bicouche et, après plusieurs minutes, de s'internaliser dans les cellules cancéreuses. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de localiser précisément la position exacte de l'internalisation du composé **OP2**, mais les images obtenues nous ont tout de même fourni des pistes. Le composé, une fois internalisé, est localisé près du noyau et non pas uniquement dans la membrane plasmique de ce dernier.

La synthèse de nouveaux analogues fluorescents possédant une sonde plus adaptée à des études de microscopie confocale pourrait permettre de localiser plus précisément le composé fluorescent. Cependant, les sondes fluorescentes de type BODIPY® ont une polarité plus élevée que le pyrène ce qui pourrait perturber l'ancrage dans la membrane plasmique et donc par conséquent, la modulation des canaux SK3.

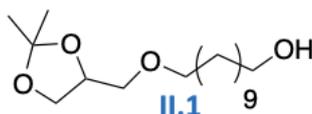
Experimental section

A. Solvents and analyzes – This part is common for all experimental protocols of this manuscript.

Solvents were dried with a solvent purification system MBraun-SPS (toluene, CH₂Cl₂, THF, DMF) or freshly distilled on appropriate driers. All compounds were fully characterized by ¹H (500.133, 399.922 or 300.131 MHz) and ¹³C NMR (125.803 or 75.474 MHz) NMR spectroscopy (Bruker AMX-3 300, Avance 400, Avance 500 and DRX 500 Spectrometers). Chemical shifts δ are given in ppm. Coupling constants J are given in hertz. The following abbreviations were used: s for singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet, m multiplet, dd doublet of doublet, dt doublet of triplets. When needed, ¹³C Heteronuclear HMQC and HMBC were used to unambiguously establish molecular structures. Mass spectrometry analyses were performed by Bruker Autoflex MALDI TOF-TOF (Brest University) Matrix used UTL HCCA. The melting points were measured by a kofler bench. Molecular sieve (5Å). The pyrene derivatives **II.8c** was prepare following a reported procedure¹³⁸.

B. General experimental protocols – Aglycone part synthesis -Route A with methanol pyrene

11-((2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)undecan-1-ol (**II.1**)

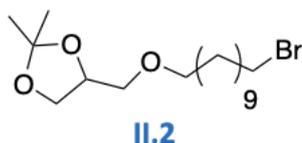


NaH (1.2 Eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 25 mL of toluene were added. Solketal (1 Eq.) was

¹³⁸ K. Furuta, K. Tomokiyo, M. T. Kuo, T. Ishikawa, M. Suzuki, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7529–7540.

added and the mixture was refluxed for 1 h. 11-bromo-undecanol solid (1 Eq.) was slowly added into the solution. The reaction mixture was stirred at reflux during two hours and overnight at room temperature. The solution was quenched by 40 mL of H₂O. The aqueous layer was extracted three times with 3*10mL of Et₂O and the organic layer with 3*10 mL of H₂O. The organic layer was dried upon MgSO₄ and concentrated to give the crude compound **1**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluant: petroleum spirit / ethyl acetate (1:1)) to give the pure compound **1** as a yellow oil with 80 % yield. R_f (petroleum spirit / ethyl acetate (1:1)): 0.5; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 4.28 (J_{HH}= 6 Hz, CH *sn*-2); 4.07 (dd, 1H, J_{HH}= 8.4 Hz, J_{HH}= 6.4 Hz, H_a CH₂ *sn*-3); 3.75 (dd, 1H, J_{HH}= 8.4, Hz, J_{HH}= 6.4, H_b CH₂ *sn*-3); 3.65 (t, 2H, J_{HH}= 6.8 Hz, CH₂ α-OH); 3.53-3.39 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α-solketal); 1.57-1.521 (m, 4H, 2 CH₂ fatty chain); 1.42 (s, 3H, CH₃ acetal); 1.36 (s, 3H, CH₃ acetal); 1.27 (m, 14H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 109.22 (C_q); 74.62 (CH *sn*-2); 71.74 (CH₂ *sn*-1); 70.4 (CH₂ α-solketal); 66.8 (CH₂ *sn*-3); 32.65 (CH₂ β OH); 29.62 (CH₂ fatty chain); 29.41 (CH₂ fatty chain); 29.3 (CH₂ fatty chain); 26.63 (CH₃ acetal); 26.06 (CH₂ fatty chain); 25.9 (CH₂ fatty chain); 25.64 (CH₂ fatty chain); 25.29 (CH₃ acetal).

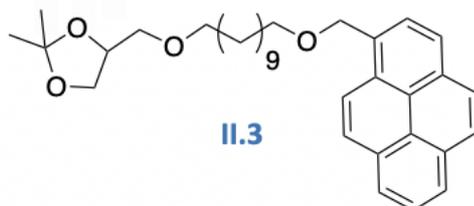
4-(((11-Bromoundecyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (**II.2**)



CBr₄ (1.0 Eq.) was added to **1** (1.0 Eq.) in 20 mL dry CH₂Cl₂. The mixture was cooled at 0°C and PPh₃ (1.1 Eq.) was slowly added. The reaction was stirred 20 hours at room temperature. The mixture was quickly poured into stirring hexane at 0°C. The precipitated solid was filtered on Celite and the filtrate was concentrated to give the crude compound **2**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluant: petroleum spirit/ ethyl acetate (8:2)) to give the pure compound **2** as a colorless oil with 70 % yield; R_f (petroleum spirit / ethyl acetate (9 : 1)): 0.6; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 4.18 (qt, 1H, J_{HH}= 6.0 Hz, CH *sn*-2); 3.99 (dd, 1H, J_{HH}= 8.4 Hz, J_{HH}= 6.4 Hz, H_a CH₂ *sn*-3); 3.66 (dd, 1H, J_{HH}= 8.0 Hz, J_{HH}= 6.4 Hz, H_b CH₂ *sn*-3); 3.45-3.28(m, 4H, CH₂ *sn*-3 + CH₂ α-solketal); 1.79 (qt, 2H, J_{HH}= 7.2, CH₂ fatty chain); 1.51-1.46 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.28 (s, 3H, CH₃ acetal); 1.35 (s, 3H, CH₃ acetal); 1.20 (m, 14H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 109.3 (C_q); 74.7 (CH *sn*-2); 71.8

(CH₂ *sn*-1); 70.9 (CH₂ α-solketal); 66.9 (CH₂ *sn*-3); 33.9 (CH₂ fatty chain); 32.8 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 29.6 (CH₂ fatty chain); 28.7 (CH₂ fatty chain); 28.1 (CH₂ fatty chain); 26.7 (CH₃ acetal); 26.15 (CH₂ fatty chain); 26.0 (CH₂ fatty chain); 25.4 (CH₃ acetal).

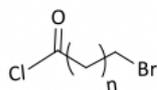
2,2-Dimethyl-4-(((11-(pyren-1-ylmethoxy)undecyl)oxy)methyl)-1,3-dioxolane (II.3)



NaH (4 Eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 5 mL of dry THF were added and solid pyrene methanol (4 Eq.) was added. The mixture was stirred one hour at reflux before addition of compound **2** (1 Eq.) and sodium iodide (1 Eq.). The solution was stirred 2 days at reflux. The mixture was quenched by methanol and the aqueous layer was washed with 3*10 mL of Et₂O and the organic layer with 3*10 mL H₂O. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to give the crude compound **3**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluant : petroleum spirit / ethyl acetate (9:1)) to give the pure compound **3** as a yellow solid with 53 % yield; R_f (petroleum spirit / ethyl acetate (9 : 1)): 0.21; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 8.36 (d, 1H, J_{HH}= 9.2 Hz, H_{ar}); 8.12 (m, 4H, H_{ar}); 8.0 (m, 4H, H_{ar}); 5.2 (s, 2H, CH₂ α pyrene); 4.28 (qt, 1H, J_{HH}= 6 Hz, CH *sn*-2); 4.07 (dd, 1H, J_{HH}= 8.4 Hz, J_{HH}= 6.4 Hz, H_a CH₂ *sn*-3); 3.75 (dd, 1H, J_{HH}= 8.4 Hz; J_{HH}= 6.4, H_b CH₂ *sn*-3); 3.62 (t, 2H, J_{HH}= 6.8 Hz, CH₂ α-OH); 3.53-3.39 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α-solketal); 1.67 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.57 (m, 4H, 2 CH₂ fatty chain); 1.45 (s, 3H, CH₃ acetal); 1.39 (s, 3H, CH₃ acetal); 1.27 (m, 14H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 131.8 (C_q); 131.2 (C_q); 130.8 (C_q); 129.3 (C_q); 127.55 (CH pyrene); 127.40 (CH pyrene) ; 127.27 (CH pyrene); 126.85 (CH pyrene); 125.85 (CH pyrene); 125.11 (CH pyrene); 124.45 (CH pyrene); 123.51 (CH pyrene); 109.32 (C_q solketal); 74.74 (CH *sn*-2); 71.85 (CH₂ *sn*-1); 71.79 (CH₂ α O); 71.46 (CH₂ α O); 70.95 (CH₂ α pyrene); 70.57 (CH₂ α-solketal); 66.92 (CH₂ *sn*-3); 29.83 (CH₂ fatty chain); 29.53 (CH₂ fatty chain); 29.41 (CH₂ fatty chain); 26.76 (CH₃ acetal); 26.21 (CH₂ fatty chain); 26.01 (CH₂ fatty chain); 25.41 (CH₃ acetal).

c. General experimental protocols – Aglycone part synthesis -Route B with pyrene

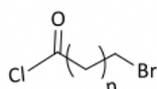
11-Bromoundecanoyl chloride (**II.6a**)



II.6a (n=9)

The procedure was adapted from the method reported by Bombelli et al.¹¹⁹: 11-Bromoundecanoic acid (3.0 g, 11.3 mmol, 1 Eq.) was placed in a two-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. Thionyl chloride (5.8 mL, 79.2 mmol, 7 Eq.) was added dropwise. At the end of the addition, the mixture was stirred at 40°C for 4 hours. Then, the excess of thionyl chloride was removed by evaporation thanks to a rotary evaporator. Compound **II.6a** was obtained as a clear brown oil in quantitative yield and was used in the next step without further purification. ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 3.40 (CH₂ α Br, t, 2H, J_{HH}= 6.8 Hz), 2.88 (CH₂ α CO, t, 2H, J_{HH}= 7.2 Hz), 1.85 (CH₂ β Br, m, 2H), 1.70 (CH₂ β CO, m, 2H), 1.42 (CH₂ fatty chain, m, 2H), 1.29 (CH₂ fatty chain, m, 10H).

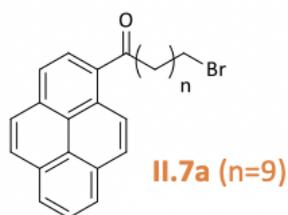
16-Bromohexadecanoyl chloride (**II.6b**)



II.6b (n=14)

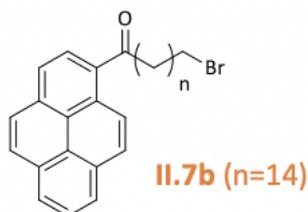
In a two-neck-bottom flask containing 16-Bromohexadecanoic acid (4.7 g, 14.0 mmol, 1 Eq.) was added thionyl chloride (12.4 mL, 104.4 mmol, 7 Eq.). The mixture was stirred at 40°C during 4 hours. Then, the excess of thionyl chloride was removed by evaporation. The compound **II.6b** was obtained as a clear yellow liquid in quantitative yield. ¹H NMR (CDCl₃, 399.92 MHz): 3.38 (CH₂ α Br, t, 2H, J_{HH}= 6.8 Hz), 2.85 (CH₂ α CO, t, 2H, J_{HH}= 7.6 Hz), 1.80 (CH₂ β Br, m, 2H), 1.66 (CH₂ β CO, m, 2H), 1.37 (CH₂ fatty chain, m, 2H), 1.29 (CH₂ fatty chain, m, 21H).

11-Bromo-1-(pyren-1-yl)undecan-1-one (**II.7a**)



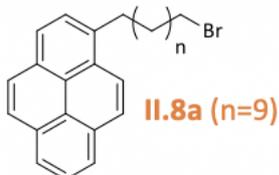
The procedure was adapted from the method reported by Bombelli et al.¹¹⁹: **II.6a** (3.20 g, 11.3 mmol, 1 Eq.) diluted in 30 mL of anhydrous CH_2Cl_2 was placed in a three-neck-round bottom flask fitted with a thermometer and an additional funnel. The solution was cooled at 0°C . Aluminum chloride solid (1.80 g, 13.5 mmol, 1.2 Eq.) was added. Then, pyrene (2.3 g, 11.3 mmol, 1 Eq.), previously diluted in anhydrous CH_2Cl_2 (80 mL), was slowly added (≈ 30 minutes) to the solution at 0°C . The solution became dark red. At the end of the addition, the mixture was stirred at room temperature for 16 hours. HCl 1M (30 mL) was added to the heterogeneous solution at 0°C and stirred for 15 minutes. The organic layer was extracted with 3×10 mL of H_2O . The organic layer was filtrated and concentrated to give the crude compound **II.7a**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: toluene 100%) to give the pure compound **II.7a** as a yellow solid in quantitative yield. Rf TLC (Eluent: toluene 100%): 0.7; Melting point: 68°C ; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): 8.85 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz); 8.31-8.0 (m, 8H, H_{ar}); 3.37 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ Br, $J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz); 3.19 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ CO, $J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz); 1.81 (m, 4H, $\text{CH}_2 \beta$ CO, $\text{CH}_2 \beta$ Br); 1.45-1.19 (m, 14H, CH_2 fatty chain). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.803 MHz): 205.5 (CO); 133.6 (C_q); 133.0 (C_q); 131.1 (C_q); 130.6 (C_q); 129.5 (CH pyrene); 129.4 (C_q); 127.1-124.1 (CH pyrene); 42.7 ($\text{CH}_2 \alpha$ CO); 34.1 ($\text{CH}_2 \alpha$ Br); 32.8 ($\text{CH}_2 \beta$ Br); 29.4-28.2 (CH_2 fatty chain); 25.0 ($\text{CH}_2 \alpha$ CO); MALDI TOF m/z calculated 448.140 found $\text{M}^{+\bullet}$ 448.312 and $[\text{M}+\text{H}]^+$ 449.310.

16-Bromo-1-(pyren-1-yl)-hexadecan-1-one (**II.7b**)



II.6b (5g, 14.1 mmol, 1.2 Eq.) was placed in a three-neck-round bottom flask. Aluminium chloride (1.90 g, 14.1 mmol, 1.2 Eq.) diluted in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added at 0°C and the mixture was stirred during 1 hour. Pyrene (2.38g, 11.8 mmol, 1 Eq.), previously diluted in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was slowly added to the solution at 0°C . The solution became dark red. After the addition, the mixture was stirred at room temperature during 16 hours. HCl 1M was poured into the solution at 0°C and stirred for 15 minutes. The organic layer was extracted with 3*10 mL of H_2O and the aqueous layer with 3*30 mL of CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated to give the crude compound **II.7b**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: toluene 100%) to give the pure compound **II.7b** as a yellow solid in quantitative yield. Rf TLC (Eluent: toluene 100%): 0.7; Melting point: 72°C ; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): 8.87 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz); 8.30-8.0 (m, 8H, H_{ar}); 3.39 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ Br, $J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz); 3.19 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ CO, $J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz); 1.81 (m, 4H, $\text{CH}_2 \beta$ CO, $\text{CH}_2 \beta$ Br); 1.41-1.33 (m, 6H, CH_2 fatty chain); 1.24 (m, 18H, CH_2 fatty chain). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.803 MHz): 205.6 (CO); 133.6 (C_q); 133.1 (C_q); 131.2 (C_q); 130.7 (C_q); 129.6 (CH pyrene); 129.5 (C_q); 127.2-124.1 (CH pyrene); 42.8 ($\text{CH}_2 \alpha$ CO); 34.2 ($\text{CH}_2 \alpha$ Br); 32.97 ($\text{CH}_2 \beta$ Br); 29.7-28.3 (CH_2 fatty chain); 25.1 ($\text{CH}_2 \alpha$ CO); MALDI TOF m/z calculated 518.218 found $[\text{M}+\text{H}]^+$ 519.390.

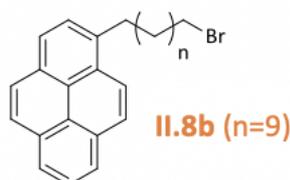
1-(11-Bromoundecyl)pyrene (**II.8a**)



Procedure adapted from Bombelli et al.^[2] and Boal et al.^[3] A solution of LiAlH_4 1M in Et_2O (9 mL, 0.5 Eq.) was added to drip at 20°C to solid aluminum chloride (5.77 g, 43.3 mmol, 2.5 Eq.) placed in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser, a thermometer and an additional funnel. A white solid was formed. Then, compound **12b** (7.8

g; 17.3 mmol, 1 Eq.), previously diluted in anhydrous CH₂Cl₂ (120 mL) was added dropwise at 20°C (in 45 minutes) on the white solid. The solution became first red and then yellow after each addition of **2a**. At the end of the addition, the mixture was stirred for 1 hour at 20°C. The reaction was quenched by addition of H₂O (50 mL) and HCl 1M (50 mL). The solution was washed with brine, filtrated and dried over MgSO₄ to give the crude compound **4b** as a yellow solid in a quantitative yield. The product was used in the next step without further purification. R_f TLC (Eluent: hexane 100%): 0.52; Melting point: 62°C; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}= 9.2 Hz); 8.16-7.85 (m, 8H, H_{ar}); 3.39 (t, 2H, CH₂ α Br, J_{HH}= 7.2 Hz); 3.33 (t, 2H, CH₂ α CO, J_{HH}= 7.6 Hz); 1.84 (m, 4H, CH₂ β CO, CH₂ β Br); 1,50-1,24 (m, 14H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 137.2 (C_q); 131.38 (C_q); 130.87 (C_q); 129.61 (C_q); 128.53 (C_q); 127.47-125.67 (CH pyrene); 125.0 (C_q); 124.7-124.5 (CH pyrene); 34.03 (CH₂ α pyrene); 33.55 (CH₂ α Br); 32.78 (CH₂ β Br); 31.88 (CH₂ β pyrene); 29.75-28.11 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 434.161 found M⁺• 434.285.

1-(16-Bromohexadecyl)pyrene (**II.8b**)

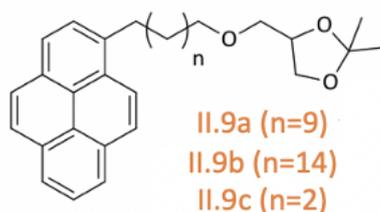


The procedure was adapted from the method reported by Bombelli et al.¹¹⁹ and Boal et al.¹³⁹ A solution of LiAlH₄ 1M in Et₂O (6.1 mL, 0.5 Eq.) was added dropwise at 20°C to solid aluminum chloride (3.8 g, 28.9 mmol, 2.5 Eq.) (at the difference with Bombelli et al. we add the solution of LiAlH₄ on AlCl₃ without any other solvent) placed in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser, a thermometer and an additional funnel. A white solid was formed. Then, compound **II.7b** (6g; 11.5 mmol, 1 Eq.), previously diluted in anhydrous CH₂Cl₂ (120 mL) was added dropwise at 20°C (in 45 minutes) on the white solid. The solution became red at the moment of the addition and then few second after (depending on the scale of the reaction) the color turned yellow. At the end of the addition, the mixture was stirred for 1 hour at 20°C. The reaction was quenched by addition with care H₂O (50 mL) and HCl 1M (50 mL). The solution was washed with brine, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated to give the crude compound **II.8b** as a yellow solid in 88% yield

¹³⁹ A. K. Boal, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 5019–5024.

(5.1g). The product was used in the next step without further purification. Rf TLC (Eluent: hexane 100%): 0.6 ; Melting point: 70°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.131 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}}=9.0$ Hz); 8.18-7.86 (m, 8H, H_{ar}); 3.41 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ Br, $J_{\text{HH}}=6.0$ Hz); 3.34 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ CO, $J_{\text{HH}}=6.0$ Hz); 1.92-1.80 (m, 4H, $\text{CH}_2 \beta$ CO, $\text{CH}_2 \beta$ Br); 1.55-1.40 (m, 7H, CH_2 fatty chain); 1.27 (m, 19H, CH_2 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): 137.5 (C_{q}); 131.6 (C_{q}); 131.1 (C_{q}); 129.81 (C_{q}); 128.73 (C_{q}); 127.67-125.87 (CH pyrene); 125.2 (C_{q}); 124.89-123.67 (CH pyrene); 34.2 ($\text{CH}_2 \alpha$ pyrene); 33.77 ($\text{CH}_2 \alpha$ Br); 32.99 ($\text{CH}_2 \beta$ Br); 32.10 ($\text{CH}_2 \beta$ pyrene); 29.98-28.32 (CH_2 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 504.239 found $\text{M}^{+\bullet}$ 504.370.

General procedure for the insertion of the 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (Compounds II.9a-c):



NaH (5.5 Eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 10 mL of toluene were added. Solketal (5 Eq.) was added and the mixture was refluxed for 1 h. At room temperature, **II.8a-c** (1Eq.) was slowly added without solvent. NaI was Equally added without solvent (1 Eq.) and the mixture was then refluxed for 1 days. The reaction was quenched by few mL of MeOH and the solution was extracted with Et_2O . The organic phase was washed with water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to give the crude compounds **II.9a-c**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: toluene/ Et_2O (9:1)) to give the pure compounds **II.9a-c** between 32% and 88% yield as a yellow oil.

2,2-Dimethyl-4-(((11-(pyren-1-yl)undecyl)oxy)methyl)-1,3-dioxolane (II.9a)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.9a** was prepared in 88% yield (5.2g). Rf (Eluent : toluene / Et_2O (9/1)) : 0.37; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}}=9.2$ Hz); 8.17-7.86 (m, 8H, H_{ar}); 4.28 (qt, 1H, $J_{\text{HH}}=6.4$ Hz, $\text{CH}_{\text{sn-2}}$); 4.07 (dd, 1H, $J_{\text{HH}}=6.4$ Hz, $J_{\text{HH}}=8.4$ Hz, $\text{H}_a \text{CH}_2 \text{sn-3}$); 3.74 (dd, 1H, $J_{\text{HH}}=6.4$ Hz, $J_{\text{HH}}=8.4$ Hz, $\text{H}_b \text{CH}_2 \text{sn-3}$); 3.65 (t, 2H, $J_{\text{HH}}=6.8$ Hz, $\text{CH}_2 \alpha\text{-OH}$); 3.53-3.39 (m, 4H, $\text{CH}_2 \text{sn-1} + \text{CH}_2 \alpha\text{-solketal}$); 3.34 (t, 2H, $J_{\text{HH}}=$

7.6 Hz, CH₂ α pyrene); 1.85 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.6 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.5 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.45 (s, 3H, CH₃ solketal); 1.39 (s, 3H, CH₃ solketal); 1.29 (m, 14H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 137.3 (C_q); 131.38 (C_q); 130.9 (C_q); 129.63 (C_q); 127.56 (C_q); 127.49-124.69 (CH pyrene); 125.03 (C_q); 124.55-123.48 (CH pyrene); 109.31 (C_q solketal); 74.73 (CH *sn*-2); 71.8 (CH₂ *sn*-1); 71.77 (CH₂ α O); 66.90 (CH₂ *sn*-3); 32.57 (CH₂ α pyrene); 31.91 (CH₂ β pyrene); 29.79-29.41 (CH₂ fatty chain); 26.75 (CH₃ acetal); 26.01 (CH₂ fatty chain); 25.40 (CH₃ acetal); MALDI TOF *m/z* calculated 486.313 found [M+H]⁺ 487.350.

2,2-Dimethyl-4-(((16-(pyren-1-yl)hexadecyl)oxy)methyl)-1,3-dioxolane (**II.9b**)

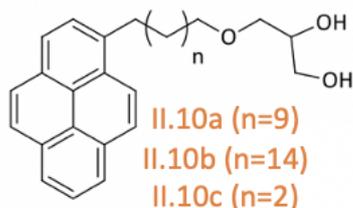
Using the aforementioned general procedure, the compound **II.9b** was prepared in 89% yield (5g). Rf (Eluent: toluene / Et₂O (95/5)): 0.53; ¹H NMR (CDCl₃, 300.131 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=12 Hz); 8.17-7.86 (m, 8H, H_{ar}); 4.25 (qt, 1H, J_{HH}= 7 Hz, CH *sn*-2); 4.07 (dd, 1H, J_{HH}= 6.4 Hz, J_{HH}= 8.4 Hz, H_a CH₂ *sn*-3); 3.74 (dd, 1H, J_{HH}= 6.4 Hz, J_{HH}= 8.4 Hz, H_b CH₂ *sn*-3); 3.53-3.39 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α-solketal); 3.34 (t, 2H, J_{HH}= 7.6 Hz, CH₂ α pyrene); 1.86 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.6 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.5 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.45 (s, 3H, CH₃ solketal); 1.39 (s, 3H, CH₃ solketal); 1.26 (s, 21H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 137.5 (C_q); 131.61 (C_q); 131.07 (C_q); 129.83 (C_q); 128.80(C_q); 127.65-125.85 (CH pyrene); 125.28 (C_q); 124.87-123.65 (CH pyrene); 109.47 (C_q solketal); 74.88 (CH *sn*-2); 72.01 (CH₂ *sn*-1); 71.94 (CH₂ α O); 67.06 (CH₂ *sn*-3); 33.75 (CH₂ α pyrene); 32.08 (CH₂ β pyrene); 29.96-29.59 (CH₂ fatty chain); 26.90 (CH₃ acetal); 26.18 (CH₂ fatty chain); 25.56 (CH₃ acetal); MALDI TOF *m/z* calculated 556.392 found M⁺ 556.559.

2,2-Dimethyl-4-(((4-(pyren-1-yl)butyl)oxy)methyl)-1,3-dioxolane (**II.9c**)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.9c** was prepared in 32% yield (480mg). Rf (Eluent : toluene / Et₂O (95/5)) : 0.47; ¹H NMR (CDCl₃, 300.131 MHz): 8.27-8.25 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=8 Hz); 8.16-7.96 (m, 7H, H_{ar}); 7.86-7.84 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=8 Hz); 4.27-4.21 (qt, 1H, J_{HH}= 12 Hz, J_{HH2}= 6 Hz, CH *sn*-2); 4.04-4.01 (dd, 1H, J_{HH}= 6 Hz, J_{HH}= 8 Hz, H_a CH₂ *sn*-3); 3.71-3.68 (dd, 1H, J_{HH}= 6 Hz, J_{HH}= 8 Hz, H_b CH₂ *sn*-3); 3.57-3.38 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α-solketal); 3.35 (t, 2H, J_{HH}= 7.7 Hz, CH₂ α pyrene); 1.96-1.88 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.79-1.72 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.40 (s, 3H, CH₃ solketal); 1.34 (s, 3H, CH₃ solketal); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 136.9 (C_q); 131.60 (C_q); 131.09 (C_q); 129.92 (C_q); 128.78 (C_q); 127.67-125.94 (CH

pyrene); 125.25 (C_q); 124.98-123.58 (CH pyrene); 109.52 (C_q solketal); 74.89 (CH *sn*-2); 72.09 (CH₂ *sn*-1); 71.73 (CH₂ α O); 67.04 (CH₂ *sn*-3); 33.44 (CH₂ α pyrene); 29.75 (CH₂ β pyrene); 28.48 (CH₂ fatty chain); 26.93 (CH₃ acetal); 25.57 (CH₃ acetal); MALDI TOF *m/z* calculated 388.499 found M⁺ 388.313.

General procedure for the acetal function deprotection (Compounds II.10a-c)



Acetic acid 80% (60 mL) and 15 mL of H₂O were added to **II.9a-c** (1 Eq.). The mixture was stirred for 3 hours at 50°C. Acetic acid and water were distilled under vacuum to produce compounds **II.10a-c** between 88 and 100% yield as yellow solid. These compounds were used in the next step without further purification.

3-((11-(Pyren-1-yl)undecyl)oxy)propane-1,2-diol (**II.10a**)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.10a** was prepared in quantitative yield (5.5g). R_f TLC (Eluent: toluene / Et₂O (1/1)): 0.15; Melting point : 56°C; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}= 9.2 Hz); 8.17-7.97 (m, 7H, H_{ar}); 7.87 (d, 1H, J_{HH}= 7.6 Hz, H_{ar}); 3.86 (m, 1H, CH *sn*-2); 4.07 (m, 2H, CH₂ *sn*-3); 3.50-3.41 (m, 5H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α-solketal); 3.34 (t, 2H, J_{HH}= 8 Hz, CH₂ α pyrene); 2.32 (s, 2H, OH); 1.85 (m, 2H, CH₂ β Solketal); 1.5 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.45 (m, 2H, CH₂ γ Solketal); 1.38-1.29 (m, 12H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 137.18 (C_q); 131.31 (C_q); 130.80 (C_q); 129.54 (C_q); 129.33 (C_q); 128.91-125.18 (CH pyrene); 124.94 (C_q); 124.60-123.35 (CH pyrene); 72.24 (CH₂ *sn*-1); 71.68 (CH₂ α solketal); 70.41 (CH *sn*-2); 64.08 (CH₂ *sn*-3); 33.47 (CH₂ α pyrene); 31.81 (CH₂ β pyrene); 29.69-29.31 (CH₂ fatty chain); 25.92 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 446.282 found M⁺ 446.454.

3-((16-(Pyren-1-yl)hexadecyl)oxy)propane-1,2-diol (**II.10b**)

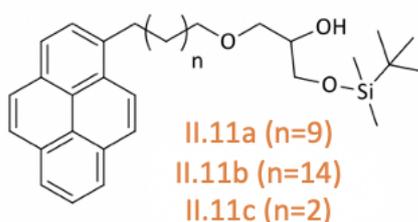
Using the aforementioned general procedure, the compound **II.10b** was prepared in 95% yield (4.4 g). R_f TLC (Eluent: toluene / Et₂O (3/7)): 0.4; Melting point: 90°C; ¹H NMR (CDCl₃, 300.131 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}= 9.0 Hz); 8.17-7.97 (m, 7H, H_{ar}); 7.87 (d, 1H, J_{HH}= 7.6 Hz,

H_{ar}); 3.87 (m, 1H, CH_{sn-2}); 3.85-3.61 (m, 2H, CH_2_{sn-3}); 3.54-3.43 (m, 4H, $CH_2_{sn-1} + CH_2_{\alpha}$ -solketal); 3.33 (t, 2H, $J_{HH} = 8$ Hz, CH_2_{α} pyrene); 2.09 (s, 2H, OH); 1.87 (m, 2H, CH_2 fatty chain); 1.56 (m, 2H, CH_2 fatty chain); 1.47 (m, 2H, CH_2 fatty chain); 1.29 (m, 21H, CH_2 fatty chain); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474 MHz): 137.40 (C_q); 131.52 (C_q); 131.01 (C_q); 129.73 (C_q); 128.66 (C_q); 127.59-125.79 (CH pyrene); 125.14 (C_q); 124.82-123.58 (CH pyrene); 72.41 (CH_2_{sn-1}); 71.90 (CH_2_{α} solketal); 70.64 (CH_{sn-2}); 64.24 (CH_2_{sn-3}); 33.68 (CH_2_{α} pyrene); 32.02 (CH_2_{β} pyrene); 29.92-29.56 (CH_2 fatty chain); 26.13 (CH_2 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 516.360 found M^+ 516.476.

3-((4-(Pyren-1-yl)butyl)oxy)propane-1,2-diol (**II.10c**)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.10c** was prepared in 88% yield (0.380g). R_f TLC (Eluent: toluene / Et_2O (3/7)) : 0.2; 1H NMR ($CDCl_3$, 399.922 MHz): 8.27-8.25 (d, 1H, H_{ar} , $J_{HH} = 9.0$ Hz); 8.18-7.97 (m, 7H, H_{ar}); 7.86-7.84 (d, 1H, $J_{HH} = 7.7$ Hz, H_{ar}); 3.88-3.83 (qt, 1H, $J_{HH} = 5.6$ Hz, CH_{sn-2}); 3.71-3.32 (m, 8H, $CH_2_{sn-3} + CH_2_{sn-1} + CH_2_{\alpha}$ -solketal + CH_2_{α} pyrene); 2.09 (s, 2H, OH); 1.94-1.87 (m, 2H, CH_2 fatty chain); 1.77-1.71 (m, 2H, CH_2 fatty chain); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474MHz): 136.63 (C_q); 131.50 (C_q); 130.96 (C_q); 129.89 (C_q); 128.67 (C_q); 127.58 - 125.88 (CH pyrene); 125.15 (C_q); 124.94 - 123.40 (CH pyrene); 72.39 (CH_2_{sn-1}); 72.39 (CH_2_{α} O); 71.56 (CH_2_{α} solketal); 70.68 (CH_{sn-2}); 64.14 (CH_2_{sn-3}); 33.27 (CH_2_{α} pyrene); 29.59 (CH_2_{β} pyrene); 28.28 (CH_2 fatty chain);

General procedure for the primary alcohol protection with *tert*-Butyldimethylsilyl chloride (compounds **II.11a-c**)



A solution of *tert*-Butyl(chloro)dimethylsilane (1.3 Eq.) and imidazole (2.5 Eq.) previously mixed in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) were added in solution of **II.10a-c** (1Eq.) in CH_2Cl_2 (20 mL). The mixture was stirred for 2 hours at 40°C. The mixture was poured into water (300 mL) and extracted with Et_2O . The combined ether extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give the crude compounds **II.11a-c** as yellow wax

between 96% and quantitative yield. These compounds were used in the next step without further purification.

1-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-((11-(pyren-1-yl)undecyl)oxy)propan-2-ol (**II.11a**)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.11a** was prepared in 99% yield (4.5g). Rf TLC (Eluent: toluene / ethyl acetate (4/1)): 0.57; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz); 8.17-7.97 (m, 7H, H_{ar}); 7.87 (d, 1H, $J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H_{ar}); 3.81 (m, 1H, $\text{CH } sn-2$); 3.64 (m, 2H, $\text{CH}_2 sn-3$); 3.46-3.42 (m, 4H, $\text{CH}_2 sn-1 + \text{CH}_2 \alpha\text{-solketal}$); 3.34 (t, 2H, $J_{\text{HH}} = 8$ Hz, $\text{CH}_2 \alpha$ pyrene); 2.36 (s, 2H, OH); 1.85 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ pyrene); 1.56 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ solketal); 1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma$ solketal); 1.36 (m, 14H, CH_2 fatty chain); 0.89 (m, 9H, CH_3 Si-*t*-Bu); 0.069 (m, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): 136.97 (C_q); 131.25 (C_q); 130.74 (C_q); 129.48 (C_q); 128.85 (C_q); 128.38-125.46 (CH pyrene); 125.14 (C_q); 124.89-123.23 (CH pyrene); 71.41 ($\text{CH}_2 sn-1$); 71.31 ($\text{CH}_2 \alpha$ solketal); 70.52 ($\text{CH } sn-2$); 63.97 ($\text{CH}_2 sn-3$); 33.37 ($\text{CH}_2 \alpha$ pyrene); 31.71 ($\text{CH}_2 \beta$ pyrene); 29.66-29.34 (CH_2 fatty chain); 25.97 (CH_2 fatty chain); 25.77 (CH_3 Si-*t*-Bu); -5.55 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 560.369 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 583.515, Theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 583.358.

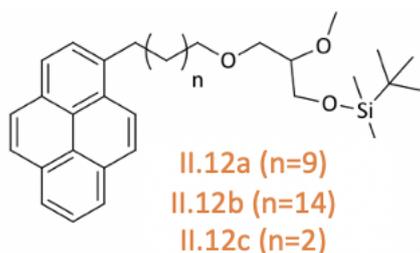
1-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-((16-(pyren-1-yl)hexadecyl)oxy)propan-2-ol (**II.11b**)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.11b** was prepared in quantitative yield (5.2g). Rf TLC (Eluent: toluene/ Et_2O (9:1)): 0.52; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.131 MHz): 8.31 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz); 8.2-7.96 (m, 7H, H_{ar}); 7.88 (d, 1H, $J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H_{ar}); 3.84 (m, 1H, $\text{CH } sn-2$); 3.67 (m, 2H, $\text{CH}_2 sn-3$); 3.52-3.44 (m, 4H, $\text{CH}_2 sn-1 + \text{CH}_2 \alpha\text{-solketal}$); 3.34 (t, 2H, $J_{\text{HH}} = 8$ Hz, $\text{CH}_2 \alpha$ pyrene); 2.17 (s, 1H, OH); 1.87 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ pyrene); 1.59 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ solketal); 1.50 (m, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ solketal); 1.28 (m, 22H, CH_2 fatty chain); 0.94 (m, 9H, CH_3 Si-*t*-Bu); 0.10 (m, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): 137.45 (C_q); 131.55 (C_q); 131.05 (C_q); 129.77 (C_q); 128.70 (C_q); 127.63-125.82 (CH pyrene); 125.18 (C_q); 124.85-123.62 (CH pyrene); 71.76 ($\text{CH}_2 sn-1$); 71.52 ($\text{CH}_2 \alpha$ solketal); 70.76 ($\text{CH } sn-2$); 64.18 ($\text{CH}_2 sn-3$); 33.72 ($\text{CH}_2 \alpha$ pyrene); 32.06 ($\text{CH}_2 \beta$ pyrene); 29.95-29.60 (CH_2 fatty chain); 26.23 (CH_2 fatty chain); 25.99 (CH_3 Si-*t*-Bu); -5.30 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 630.447 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 653.592, Theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 653.436.

1-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-((4-(pyren-1-yl)butyl)oxy)propan-2-ol (**II.11c**)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.11c** was prepared in 96% yield (0.480g). Rf TLC (Eluent: toluene/ ethyl acetate (4/1)): 0.6; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): 8.28 - 8.26 (d, 1H, H_{ar} , J_{HH} = 9.2 Hz); 8.16-7.96 (m, 7H, H_{ar}); 7.87-7.84 (d, 1H, J_{HH} = 7.8 Hz, H_{ar}); 3.83 - 3.78 (qt, 1H, J_{HH} = 10.9 Hz, J_{HH} = 5.3 Hz, CH_{sn-2}); 3.68 - 3.41 (m, 6H, CH_2_{sn-3} + CH_2_{sn-1} + CH_2_{α} -solketal); 3.36 (t, 2H, J_{HH} = 7.8 Hz, CH_2_{α} pyrene); 1.96 - 7.88 (m, 2H, CH_2_{β} pyrene); 1.79 - 1.73 (m, 2H, CH_2_{β} solketal); 0.87 (m, 9H, CH_3 Si-*t*-Bu); 0.04 (m, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): 136.72 (C_q); 131.45 (C_q); 130.93 (C_q); 129.81 (C_q); 128.62 (C_q); 127.56-125.83 (CH pyrene); 125.11 (C_q); 124.85-123.41 (CH pyrene); 71.64 (CH_2_{sn-1}); 71.39 (CH_2_{α} solketal); 70.73 (CH_{sn-2}); 64.13 (CH_2_{sn-3}); 33.28 (CH_2_{α} pyrene); 29.69 (CH_2 fatty chain); 28.34 (CH_2 fatty chain); 25.93 (CH_3 Si-*t*-Bu); -5.36 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 462.259 found $M^{+\bullet}$ 462.344 and $[M+Na]^+$ 485.335, theoretical value for $[M+Na]^+$ 485.248.

General procedure for the methylation reaction (compounds **II.12a-c**)



To a stirred solution of **II.11a-c** (1Eq.) previously diluted in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) and placed under nitrogen atmosphere, were added silver oxide (5 Eq.) and molecular sieves (~ 2 g). Iodomethane (10 Eq.) was added dropwise. The mixture was refluxed for 2 days and filtered on Celite. The celite pad was washed with dichloromethane. The filtrate was concentrated to produce **II.12a-c** as a dark yellow wax in quantitative yield. These compounds were used in the next step without further purification.

tert-Butyl(2-methoxy-3-((11-(pyren-1-yl)undecyl)oxy)propoxy)dimethylsilane (**II.12a**)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.12a** was prepared in quantitative yield (2g). Rf TLC (Eluent: toluene / Et_2O (9/1)): 0.21; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.133 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar} , J_{HH} = 9.0 Hz); 8.17-7.96 (m, 7H, H_{ar}); 7.87 (d, 1H, J_{HH} = 7.5 Hz, H_{ar}); 3.67 (m, 2H, CH_{sn-2} + CH_{α} $_{sn-3}$); 3.55 (m, 1H, CH_{β} $_{sn-3}$); 3.44 (s, 3H, CH_3 -OMe); 3.43-3.36 (m, 4H,

CH_2 *sn*-1 + CH_2 α -solketal); 3.34 (t, 2H, J_{HH} = 8 Hz, CH_2 α pyrene); 1.85 (m, 2H, CH_2 β pyrene); 1.48 (m, 2H, CH_2 β solketal); 1.37 (m, 2H, CH_2 γ Solketal); 1.27 (m, 10H, CH_2 fatty chain); 0.89 (m, 9H, CH_3 Si-*t*-Bu); 0.071 (m, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474 MHz): 137.13 (C_q); 131.33 (C_q); 130.82 (C_q); 129.56 (C_q); 128.92 (C_q); 128.47-125.20 (CH pyrene); 124.97 (C_q); 124.62-123.36 (CH pyrene); 80.99 (CH *sn*-2); 71.58 (CH_2 *sn*-1); 70.02 (CH_2 α solketal); 62.40 (CH_2 *sn*-3); 57.97 (CH_3 -OMe); 33.48 (CH_2 α pyrene); 31.82 (CH_2 β pyrene); 29.74-29.41 (CH_2 fatty chain); 26.05 (CH_2 fatty chain); 25.83 (CH_3 Si-*t*-Bu); -5.50 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 574.384 found $[M+Na]^+$ 597.488; Theoretical value for $[M+Na]^+$ 597.373.

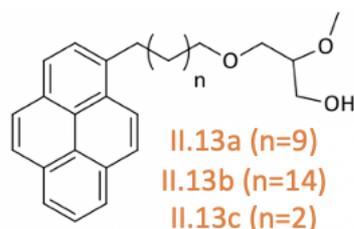
***tert*-Butyl(2-methoxy-3-((16-(pyren-1-yl)hexadecyl)oxy)propoxy)dimethylsilane (II.12b)**

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.12b** was prepared in quantitative yield (2g). Rf TLC (Eluent: toluene / ethyl acetate (4/1)) : 0.33; 1H NMR ($CDCl_3$, 300.131 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar} , J_{HH} = 9.0 Hz); 8.17-7.95 (m, 7H, H_{ar}); 7.87 (d, 1H, J_{HH} = 7.5 Hz, H_{ar}); 3.71 (m, 2H, CH *sn*-2 + CH_a *sn*-3); 3.55 (m, 1H, CH_b *sn*-3); 3.48-3.38 (m, 7H, CH_3 -OMe + CH_2 *sn*-1 + CH_2 α -solketal); 3.33 (t, 2H, J_{HH} = 8 Hz, CH_2 α pyrene); 1.86 (m, 2H, CH_2 β pyrene); 1.57 (m, 2H, CH_2 β solketal); 1.50 (m, 2H, CH_2 γ Solketal); 1.27 (m, 23H, CH_2 fatty chain); 0.93 (m, 9H, CH_3 Si-*t*-Bu); 0.10 (m, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474 MHz): 137.47 (C_q); 131.58 (C_q); 131.07 (C_q); 129.80 (C_q); 128.72 (C_q); 127.66-125.85 (CH pyrene); 125.21 (C_q); 124.88-123.65 (CH pyrene); 81.22 (CH *sn*-2); 71.85 (CH_2 *sn*-1); 70.27 (CH_2 α solketal); 62.61 (CH_2 *sn*-3); 58.24 (CH_3 -OMe); 33.75 (CH_2 α pyrene); 32.09 (CH_2 β pyrene); 29.98-29.65 (CH_2 fatty chain); 26.28 (CH_2 fatty chain); 26.05 (CH_3 Si-*t*-Bu); -5.23 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 644.462 found $[M+Na]^+$ 667.619; Theoretical value for $[M+Na]^+$ 667.452.

***tert*-Butyl(2-methoxy-3-((4-(pyren-1-yl)butyl)oxy)propoxy)dimethylsilane (II.12c)** Using the aforementioned general procedure, the compound **II.12c** was prepared in quantitative yield (470mg). Rf TLC (Eluent: toluene / ethyl acetate (4/1)): 0.4; 1H NMR ($CDCl_3$, 399.922 MHz): 8.17 (d, 1H, H_{ar} , J_{HH} = 7.6 Hz); 8.15-7.98 (m, 7H, H_{ar}); 7.87 (d, 1H, J_{HH} = 7.6 Hz, H_{ar}); 3.72(m, 2H, CH *sn*-2 + CH_a *sn*-3); 3.61-3.42 (m, 8H, CH_b *sn*-3 + CH_3 -OMe + CH_2 *sn*-1 + CH_2 α -solketal); 3.38 (t, 2H, J_{HH} = 8 Hz, CH_2 α pyrene); 1.98-1.92 (m, 2H, CH_2 β pyrene); 1.88-1.78 (m, 2H, CH_2 β solketal); 0.94 (m, 9H, CH_3 Si-*t*-Bu); 0.10 (m, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474 MHz): 136.89 (C_q); 131.50 (C_q); 130.98 (C_q); 129.82 (C_q); 128.68 (C_q); 127.57-126.57 (CH pyrene); 125.80 (C_q); 125.14-123.65 (CH pyrene); 81.17 (CH *sn*-2); 71.49 (CH_2 *sn*-1); 70.38

(CH₂ α solketal); 62.56 (CH₂ *sn*-3); 58.19 (CH₃ –OMe); 33.35 (CH₂ α pyrene); 29.77 + 28.45 (CH₂ fatty chain); 25.98 (CH₃ Si-*t*-Bu); -5.30 (CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 476.275 found [M+Na]⁺ 499.366; Theoretical value for [M+Na]⁺ 499.264.

General procedure for the deprotection of the *tert*-Butyl-dimethylsilyle protecting group (compounds II.13a-c):



Tetra-*n*-butylammonium fluoride (5 Eq.) was added to a stirred solution of **II.12a-c** (1 Eq.) diluted in dry THF (15 mL) previously placed under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred at room temperature overnight. The solution was quenched by addition of water (10 mL) and extracted with Et₂O (3*30 mL). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give the crude compound **II.13a-c**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/7)) to give the pure compound **II.13a-c** as a yellow wax or yellow solid between 51% and 93% yield.

2-Methoxy-3-((11-(pyren-1-yl)undecyl)oxy)propan-1-ol (II.14a)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.13a** was prepared in 93% yield (1g). R_f TLC (Eluent: toluene / ethyl acetate (7/3)): 0.23; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}= 9.2 Hz); 8.17-7.98 (m, 7H, H_{ar}); 7.88 (d, 1H, J_{HH}= 7.5 Hz, H_{ar}); 3.78-3.74 (m, 1H, CH_a *sn*-3); 3.67-3.62 (m, 1H, CH_b *sn*-3); 3.57-3.41 (m, 9H, CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1 + CH₂ α-solketal + CH₃ –OMe); 3.34 (t, 2H, J_{HH}= 8 Hz, CH₂ α pyrene); 1.85 (m, 3H, CH₂ β pyrene); 1.56 (m, 3H, CH₂ β solketal); 1.48 (m, 3H, CH₂ γ Solketal); 1.27 (m, 11H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 137.26 (C_q); 131.37 (C_q); 130.86 (C_q); 129.59 (C_q); 128.52 (C_q); 127.46-125.65 (CH pyrene); 125.0 (C_q); 124.69-123.44 (CH pyrene); 79.81 (CH *sn*-2); 71.82 (CH₂ *sn*-1); 70.50 (CH₂ α solketal); 62.57 (CH₂ *sn*-3); 57.67 (CH₃ –OMe); 33.53 (CH₂ α pyrene); 31.87 (CH₂ β pyrene); 29.75-29.37 (CH₂ fatty chain); 25.99 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 460.298 found M⁺• 460.474.

2-Methoxy-3-((16-(pyren-1-yl)hexadecyl)oxy)propan-1-ol (II.14b)

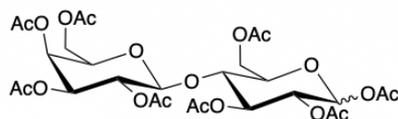
Using the aforementioned general procedure, the compound **II.13b** was prepared in 51% yield (840 mg). Rf TLC (Eluent: pentane / ethyl acetate (1/1)): 0.77; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 8.3 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}= 9.2 Hz); 8.16-7.95 (m, 7H, H_{ar}); 7.87 (d, 1H, J_{HH}= 7.5 Hz, H_{ar}); 3.77-3.73 (m, 1H, CH_a sn-3); 3.66-3.62 (m, 1H, CH_b sn-3); 3.57-3.39 (m, 9H, CH sn-2 + CH₂ sn-1 + CH₂ α-solketal + CH₃ -OMe); 3.33 (t, 2H, J_{HH}= 8 Hz, CH₂ α pyrene); 1.85 (m, 3H, CH₂ β pyrene); 1.56 (m, 3H, CH₂ β solketal); 1.48 (m, 3H, CH₂ γ Solketal); 1.27 (m, 22H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 137.43 (C_q); 131.50 (C_q); 130.99 (C_q); 129.71 (C_q); 128.64 (C_q); 127.57-125.77 (CH pyrene); 125.12 (C_q); 124.79-123.58 (CH pyrene); 79.85 (CH sn-2); 71.97 (CH₂ sn-1); 70.67 (CH₂ α solketal); 62.75 (CH₂ sn-3); 57.80 (CH₃ -OMe); 33.66 (CH₂ α pyrene); 32.0 (CH₂ β pyrene); 29.88-29.49 (CH₂ fatty chain); 26.11 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 530.376 found M⁺• 530.469.

2-Methoxy-3-((4-(pyren-1-yl)butyl)oxy)propan-1-ol (II.14c)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.13c** was prepared in 51% yield (185mg). Rf TLC (Eluent: pentane / ethyl acetate (3/7)): 0.66; Melting point = 82°C; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 8.28-8.25 (m, 1H, H_{ar}); 8.17-7.15 (m, 2H, H_{ar}); 8.11-8.08 (m, 2H, H_{ar}); 8.05-7.95 (m, 3H, H_{ar}); 7.87-7.84 (m, 1H, H_{ar}); 3.76-3.71 (m, 1H, CH_a sn-3); 3.65-3.60 (m, 1H, CH_b sn-3); 3.57-3.38 (m, 9H, CH sn-2 + CH₂ sn-1 + CH₂ α-solketal + CH₃ -OMe); 3.36 (m, CH₂ α pyrene); 1.96-1.87 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.80-1.72 (m, 3H, CH₂ β solketal); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 136.72 (C_q); 131.46 (C_q); 130.94 (C_q); 129.82 (C_q); 128.64 (C_q); 127.55-125.81 (CH pyrene); 125.11 (C_q); 124.87-123.42 (CH pyrene); 80.01 (CH sn-2); 71.60 (CH₂ α solketal); 70.53 (CH₂ sn-1); 62.55 (CH₂ sn-3); 57.80 (CH₃ -OMe); 33.28 + 29.64 + 28.32 (CH₂ pyrene); MALDI TOF *m/z* calculated 362.188 found M⁺• 362.287.

D. General experimental protocols – glycone part activation

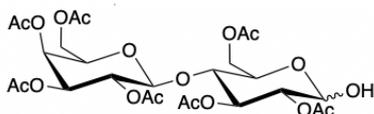
2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tetra-*O*-acetyl- α,β -D-glucopyranose (II.14)



II.14

α - β -D-Lactose (11.60 g, 1 Eq, 34 mmol) was diluted in 50 mL of pyridine. Then, acetic anhydride (38 mL, 407 mmol, 12 Eq) was added dropwise at -10°C . This reaction mixture is stirred during three days at room temperature. The solution is concentrated and diluted in CH_2Cl_2 , filtered and concentrated to give the crude compound **II.14**. TLC and NMR were correct, purification on silica gel was not carried out. This product was obtained as a white solid with a quantitative yield. R_f (Eluant : Petroleum spirit/ Ethyl acetate (4/6)) : 0.81; Melting point : Decomposition; NMR ^1H (CDCl_3 , 400,01 MHz): 6.25 (H_1 , d, 1H; $J_{\text{HH}} = 3.7\text{Hz}$; α anomer); 5.66 (H_1 , d, 1H; $J_{\text{HH}} = 8.40\text{ Hz}$; β anomer); 5.34 ($\text{H}_{4'}$, dd, 1H, $J_{\text{HH}} = 3.80\text{Hz}$; $J_{\text{HH}} = 0,80\text{ Hz}$); 5.23 (H_3 , t, 1H, $J_{\text{HH}} = 8.8\text{ Hz}$); 5.1-5.03 ($\text{H}_2 + \text{H}_{2'}$, m, 2H); 4.96-4.93 ($\text{H}_{3'}$, dd, 1H, $J_{\text{HH}} = 3.60\text{ Hz}$, $J_{\text{HH}} = 10.40\text{ Hz}$); 4.47-4.43 ($\text{H}_{6b} + \text{H}_{1'}$, m, 2H); 4.14-4.08 ($\text{H}_{6a} + \text{H}_{6'a} + \text{H}_{6'b}$, m, 4H); 3.86-3.81 ($\text{H}_{5'} + \text{H}_5$, m, 2H); 3.79-3.76 (H_4 , m, 1H); 2.17-1.96 (m, 29H, CH_3 acetate). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.803 MHz): 170.4-169.1 (CO -OAc), 101.0 (C_1'), 91.5 ($\text{C}1\alpha$), 75.63 (C_4), 73.51 (C_5), 72.72 (C_3), 71.05 (C_3'), 70.83 (C_5'), 70.52 (C_2), 69.05 (C_2'), 66.71 (C_4'), 61.85 (C_6), 60.93 (C_6'), 20.93-20.60 (CH_3 - Acetate).

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2,3,6-tri-*O*-acetyl- α,β -D-glucopyranose (II.15)

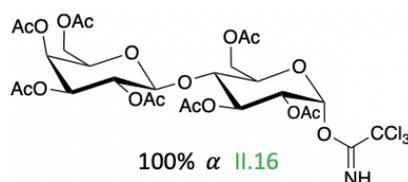


II.15

On **II.14**, (23.1 g, 1 Eq, 34 mmol) previously diluted in 50 mL of dry DMF, was added ammonium acetate (5.25 g, 2 Eq, 64 mmol). This solution was stirred three days. The

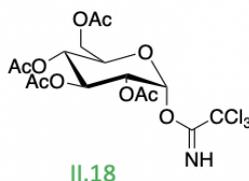
reaction mixture is concentrated and purified by silica gel chromatography to give the pure compound **II.15** as a white foam with 91 % yield. Rf TLC (Eluant : petroleum spirit/ Ethyl acetate (3:7)) : 0.67; Melting point : Decomposition; NMR ^1H (CDCl_3 , 500.13 MHz): 5.46 (H_3 , t, 1H, $J_{\text{H-H}} = 9.6$ Hz), 5.28 (m, 2H, H_1 et H_4'), 5.03 (H_2' , m, 1H); 4.9 (H_3' , dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 10.4$ Hz); 4.76 (H_2 , m, 1H); 4.42 (H_1' , H_{6b} , m, 2H); 4.52 (H_5 , H_{6a} , H_{6a}' , H_{6b}' , m, 4H); 3.86 (H_5' , m, 1H); 3.7 (H_4 , m, 1H); 2,0-1,97 (CH_3 acetate + EA, m, 27H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.771 MHz): 170.9-169.05 (CO -OAc), 101.2 ($\text{C}_{1'}$), 95.3 ($\text{C}_{1\beta}$), 90.1 ($\text{C}_{1\alpha}$), 75.81 (C_4), 73.49 (C_5), 72.96 (C_3), 71.07 ($\text{C}_{3'}$), 70.98 ($\text{C}_{5'}$), 70.66 (C_2), 69.11 ($\text{C}_{2'}$), 66.63 (C_4'), 61.90 (C_6), 60.85 ($\text{C}_{6'}$), 21.04-20.51 (CH_3 - Acetate).

2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl-1-O-(2,2,2-trichloroacetimidoyl)- α -D-glucopyranose (II.16)



Trichloroacetonitrile (6.51 g, 4.522 mL, 45.1 mmol, 5.5 Eq.) and potassium carbonate (1.25 g, 9.03 mmol, 1.1 Eq.) were added simultaneously on **II.15** (5.22 g, 8.2 mmol, 1 Eq.), previously diluted in dry CH_2Cl_2 (50 mL). The solution was stirred into 5 days at room temperature. The reaction mixture is filtrated on Celite and concentrated to give the pure compound **II.16** as a white powder with quantitative yield. Rf TLC (Eluant : Hexane/ Ethyl acetate (1:1)) : 0.4; Melting point : decomposition; NMR ^1H (CDCl_3 , 500,25 MHz): 8.65 (NH, s, 1H); 6.47 (H_1 , d, 1H, 4Hz; α anomer); 5.56 (H_3 , t, 1H, $J_{\text{H-H}} = 10$ Hz); 5.34 (H_4' , m, 1H); 5.13 (H_2' , m, 1H); 5.09 (H_2 , dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 10$ Hz); 4.96 (H_3' , dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 10.4$ Hz); 4.52 (H_1' , d, 2H, $J_{\text{H-H}} = 8$ Hz); 4.48 (H_{6a} , m, 1H); 4.16-4.05 (H_5 / $\text{H}_{6'a}$ / $\text{H}_{6'b}$ / H_{6b} CH2 ethyl acetate, m, 5H); 3.89-3.84 (H_4 / H_5' , m, 2H); 2.15-1.99 (CH_3 acetate/ CH_3 ethyl acetate, m, 27H); NMR ^{13}C (CDCl_3 , 500,13 MHz): 170.3-169.06 (CO acetate), 160.98 (CO-NH), 101.21 ($\text{C}_{1'}$), 92.89 ($\text{C}_1 \alpha$), 75.89 (C_4), 71.12-69.13 ($\text{C}_{5,5'}/\text{C}_{2,2'}/\text{C}_{3,3'}$), 66.60 (C_4'), 61.51 (C_6), 60.78 ($\text{C}_{6'}$), 20.87-20.47 (CH_3 acetate).

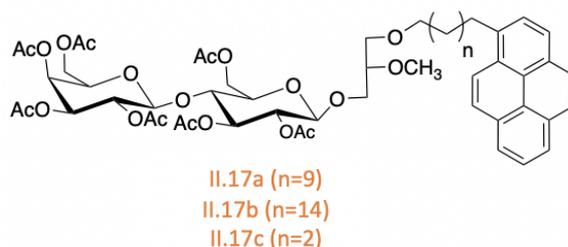
2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(2,2,2-trichloroacetimidoyl)- α -D-glucopyranose (**II.18**)



Trichloroacetonitrile (3.2g, 22.1 mmol, 5.5 Eq.) and potassium carbonate (620 mg, 4.42 mmol, 1.1 Eq.) were added simultaneously on 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α,β -D-glucopyranose (5.22 g, 8.2 mmol, 1 Eq.), previously diluted in dry CH₂Cl₂ (50 mL). The solution was stirred into 3 days at room temperature. The reaction mixture is filtrated on Celite and concentrated to give the pure compound **II.18** as a white powder with 91% yield. Rf TLC (Eluant : Hexane/ Ethyl acetate (1:4)) : 0.77; Melting point : decomposition; NMR ¹H (CDCl₃, 399;922 MHz): 8.69 (NH, s, 1H); 6.56 (H₁, d, 1H, J_{HH}= 3.2Hz; α anomer); 5.56 (H₃, t, 1H, J_{HH}= 9.6Hz); 5.20-5.11 (H₂+H₄, m, 2H); 4.29-4.11 (m, 3H, m, H₅ + H_{6a} + H_{6b}); 2.17-1.99 (CH₃ acetate, m, 12H); NMR ¹³C (CDCl₃, 500,13 MHz): 170.02-169.08 (CO acetate), 160.15 (CO-NH), 92.59 (C₁ α), 69.78+69.53+69.38 (C₅+C₂+C₃), 67.48 (C₄), 61.10 (C₆), 20.26-20.03 (CH₃ acetate).

E. General experimental protocols – glycosylation reaction

General procedure for the glycosylation reaction (compounds II.17a-c):



Peracetylated lactose trichloroacétimidate **II.16** (1.2 Eq.) solubilized in dry CH₂Cl₂ (20 mL) was added dropwise to a solution of **II.13a-c** (1 Eq.) in CH₂Cl₂ (15 mL). The mixture was stirred with molecular sieves (~ 2 g) during one hour under nitrogen atmosphere. At 0°C, boron trifluoride diethyl etherate (0.8 Eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at RT under inert atmosphere. The mixture was quenched by addition of water (20 mL). The organic layer was washed with aqueous saturated NaHCO₃ solution and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, concentrated to give the crude compounds **II.17a-c**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane/ ethyl

acetate (3/2)) to give the pure compounds **II.17a-c** as white foam between 42% and 58% yield.

1-O-Undecylpyrene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (II.17a)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.17a** was prepared in 58% yield (1.0 g). Rf TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/2)): 0.32; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.133 MHz): 8.22 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz); 8.11-7.91 (m, 7H, H_{ar}); 7.81 (d, 1H, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, H_{ar}); 5.32 (m, 1H, $H_{4'}$); 5.18-5.14 (m, 1H, H_3); 5.11-5.07 (m, 1H, $H_{2'}$); 4.96-4.93 (m, 1H, $H_{3'}$); 4.91-4.86 (m, 1H, H_2); 4.48-4.43 (m, 3H, $H_{6a} + H_1 + H_{1'}$); 4.1-4.02 (m, 3H, $H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b}$); 3.88-3.79 (m, 2H, $sn-3_b + H_{5'}$); 3.75 (t, 1H, H_4); 3.58-3.50 (m, 2H, $sn-3_a + H_5$); 3.44-3.33 (m, 9H, $-\text{OCH}_3 + \text{CH } sn-2 + \text{CH}_2 \text{ } sn-1 + \text{CH}_2 \alpha \text{ Solketal}$); 3.27 (t, 2H, $J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $\text{CH}_2 \alpha \text{ pyrene}$); 2.13-1.95 (m, 21H, $\text{CH}_3\text{-OAc Lactose}$); 1.82-1.76 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{ pyrene}$); 1.53-1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{ solketal}$); 1.45-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma \text{ pyrene}$); 1.32 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma \text{ solketal}$); 1.23 (m, 10H, fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.771 MHz): 170.12 (CO); 170.09 (CO); 169.92 (CO); 169.81 (CO); 169.54 (CO); 169.31 (CO); 168.87 (CO); 137.10 (C_q); 131.21(C_q); 130.70 (C_q); 129.43 (C_q); 128.35 (C_q); 127.32-125.53(CH pyrene); 124.82 (C_q); 124.55-123.30 (CH pyrene); 100.83 ($C_{1'}$); 100.69 + 100.58 ($C_1 \beta \text{ anomere}$); 79.14 + 78.77 (C_{sn-2} – two diastereoisomers); 76.10 (C_4); 72.61 (C_3); 72.39 (C_5); 71.56 (C α Solketal); 71.49 ($C_{5'}$); 70.78 (C_2); 70.44 ($C_{3'}$); 70.08 (C $sn-3_a$ – two diastereoisomers); 69.72 + 69.62 (C $sn-1$ - two diastereoisomers); 68.93 ($C_{2'}$); 68.52 (C $sn-3_b$ - two diastereoisomers); 66.47 ($C_{4'}$); 61.87 (C_6); 60.66 ($C_{6'}$); 58.00 + 57.66 (C $-\text{OMe}$); 33.35 ($\text{CH}_2 \alpha \text{ pyrene}$); 31.70 ($\text{CH}_2 \beta \text{ pyrene}$); 29.58 + 29.36 + 29.23 ($\text{CH}_2 \text{ fatty chain}$); 25.85 ($\text{CH}_2 \text{ fatty chain}$); 20.60 + 20.40 + 20.29 (C $-\text{OAc Lactose}$); MALDI TOF m/z calculated 1078.477 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1101.513, theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1101.467.

1-O-Hexadecylpyrene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (II.17b)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.17b** was prepared in 44% yield (805mg). Rf TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (7/3)): 0.14; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): 8.24 (d, 1H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz); 8.11-7.91 (m, 7H, H_{ar}); 7.82 (d, 1H, $J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H_{ar}); 5.31 (m, 1H, $H_{4'}$); 5.19-5.14 (m, 1H, H_3); 5.10-5.06 (m, 1H, $H_{2'}$); 4.94-4.90 (m, 1H, $H_{3'}$); 4.88-4.84 (m,

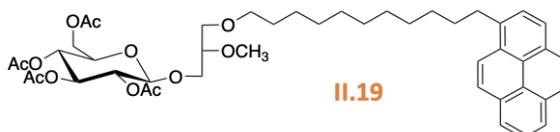
1H, H₂); 4.49-4.43 (m, 3H, H_{6a} + H₁ + H_{1'}); 4.1-4.01 (m, 3H, H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b}); 3.88-3.79 (m, 2H, *sn*-3_b + H_{5'}); 3.75 (t, 1H, J_{HH}= 9.2 Hz, H₄); 3.59-3.50 (m, 2H, *sn*-3_a + H₅); 3.45-3.38 (m, 9H, -OCH₃ + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1 + CH₂ α Solketal); 3.28 (t, 2H, J_{HH}= 8.0 Hz, CH₂ α pyrene); 2.13-1.93 (m, 21H, CH₃-OAc Lactose); 1.82-1.76 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.53-1.49 (m, 2H, CH₂ β solketal); 1.45-1.39 (m, 2H, CH₂ γ pyrene); 1.32 (m, 2H, CH₂ γ solketal); 1.19 (m, 24H, fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): 170.36 (CO); 170.16 (CO); 170.06 (CO); 169.78 (CO); 169.56 (CO); 169.10 (CO); 137.37 (C_q); 131.47 (C_q); 130.96 (C_q); 129.69 (C_q); 128.61 (C_q); 127.56-125.77 (CH pyrene); 125.08 (C_q); 124.79-123.55 (CH pyrene); 101.09 (C_{1'}); 100.95 + 100.85 (C₁ β anomere); 79.14 + 79.03 (C_{*sn*-2} – two diastereoisomers); 76.34 (C₄); 72.85 (C₃); 72.65 (C₅); 71.83 (C α Solketal); 71.74 (C_{5'}); 71.03 (C₂); 70.70 (C_{3'}); 70.36 (C *sn*-3_a – two diastereoisomers); 69.99 + 69.88 (C *sn*-1 – two diastereoisomers); 69.17 (C_{2'}); 68.79 (C *sn*-3_b – two diastereoisomers); 66.68 (C_{4'}); 62.09 (C₆); 60.87 (C_{6'}); 60.38 (ethyl acetate); 58.27 + 57.93 (C –OMe); 33.62 (CH₂ α pyrene); 31.97 (CH₂ β pyrene); 29.85 + 29.69 + 29.51 (CH₂ fatty chain); 26.11 (CH₂ fatty chain); 21.04 + 20.84 + 20.64 + 20.53 (C –OAc Lactose); 14.22 (ethyl acetate); MALDI TOF *m/z* calculated 1148.556 found [M+Na]⁺ 1171.381 and [M+K]⁺ 1187.343, theoretical value for [M+Na]⁺ 1171.545, theoretical value for [M+K]⁺ 1187.519.

1-O-Butylpyrene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (II.17c)

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.17c** was prepared in 42% yield (410mg). R_f TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/7)): 0.7; ¹H NMR (CDCl₃, 500.133 MHz): 8.24 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=9.6 Hz); 8.14-7.85 (m, 7H, H_{ar}); 7.84 (d, 1H, J_{HH}= 7.6 Hz, H_{ar}); 5.33 (m, 1H, H_{4'}); 5.16-5.13 (m, 1H, H₃); 5.10-5.07 (m, 1H, H_{2'}); 4.94-4.84 (m, 2H, H_{3'} + H₂); 4.45-4.38 (m, 3H, H_{6a} + H₁ + H_{1'}); 4.1-3.99 (m, 4H, H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b} + ethyl acetate); 3.88-3.79 (m, 2H, *sn*-3_b + H_{5'}); 3.73-3.68 (m, 1H, H₄); 3.59-3.28 (m, 12H, *sn*-3_a + H₅ + -OCH₃ + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1 + CH₂ α Solketal + CH₂ α pyrene); 2.14-1.95 (m, 21H, CH₃-OAc Lactose); 1.89 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.77-1.69 (m, 2H, CH₂ β solketal); 1.24 (t, 1.5H, ethyl acetate); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): 171.0 (CO); 170.20 (CO); 170.02 (CO); 169.93 (CO); 169.62 (CO); 169.42 (CO); 168.95 (CO); 136.64 (C_q); 131.28 (C_q); 130.76 (C_q); 129.64 (C_q); 128.46 (C_q); 127.39-125.69 (CH pyrene); 124.92 (C_q); 124.71-123.30 (CH pyrene); 100.91 (C_{1'}); 100.71 + 100.66 (C₁ β anomere); 79.19 + 78.83 (C_{*sn*-2} – two diastereoisomers); 76.13 (C₄); 72.61 (C₃); 72.39 (C₅); 71.52 (C_{5'}); 71.36 (C α Solketal); 70.85 (C₂); 70.50 (C_{3'}); 70.1 (C *sn*-3_a – two diastereoisomers);

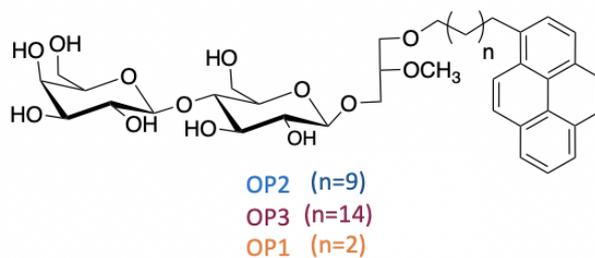
69.83 + 69.71 (C *sn*-1 - two diastereoisomers); 68.95 (C2'); 68.54 (C *sn*-3_b - two diastereoisomers); 66.48 (C_{4'}); 61.8 (C₆); 60.67 (C_{6'}); 60.38 (ethyl acetate); 58.11 + 57.76 (C – OMe); 33.12 + 29.46 +28.21 (CH₂ pyrene); 20.67 + 20.48 + 20.38 (C –OAc Lactose); 14.05 (ethyl acetate); MALDI TOF *m/z* calculated 980.368 found [M+Na]⁺ 1003.318, theoretical value for [M+Na]⁺ 1003.357.

1-O-Undecylpyrene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-(2,2,2-trichloroacetimidoyl)- α -D-glucopyranose (II.19)



Using the aforementioned general procedure, the compound **II.19** was prepared in 44% yield (376mg). Rf TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (7/3)): 0.4; ¹H NMR (CDCl₃, 500.132 MHz): 8.26 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=9.6 Hz); 8.14-7.85 (m, 7H, H_{ar}); 7.84 (d, 1H, J_{HH}= 7.6 Hz, H_{ar}); 5.21-5.17 (m, 1H, H₃); 5.10-5.03 (m, 1H, H₄); 5.03-4.97 (m, 1H, H₂); 4.53-4.50 (m, 1H, H₁); 4.27-4.10 (m, 2H, H_{6a} + H_{6b}); 3.94-3.86 (m, 1H, *sn*-3_a); 3.64-3.55 (m, 2H, H₅ + *sn*-3_b); 3.48-3.29 (m, 10H, *sn*-1 + *sn*-2 + OCH₃ + CH₂ α Solketal + CH₂ α pyrene); 2.07-2.00 (m, 12H, CH₃-OAc Lactose); 1.88-1.80 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.55-1.52 (m, 2H, CH₂ β solketal) 1.49-1.46 (m, 2H, CH₂ γ pyrene); 1.36 (m, 2H, CH₂ γ solketal); 1.27 (m, 12H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): 170.55 (CO); 170.18 (CO); 169.34 (CO); 169.17 (CO); 137.24 (C_q); 131.36 (C_q); 130.85 (C_q); 129.58 (C_q); 128.50 (C_q); 127.45-125.66 (CH pyrene); 124.97 (C_q); 124.68-123.44 (CH pyrene); 101.06 + 100.99 (C₁ β anomer); 79.31 + 78.90 (C_{*sn*-2} – two diastereoisomers); 72.76 (C₃); 72.725 (C α Solketal); 72.724 (C₅); 71.69 (C₂); 71.65 (*sn*-3_a - two diastereoisomers); 71.26+71.23 (*sn*-1 - two diastereoisomers); 69.82+69.71 (*sn*-3_b - two diastereoisomers); 68.34 (C₄); 61.84+61.81 (C₆); 58.21 + 57.84 (C –OMe); 33.51 + 25.99 (CH₂ pyrene); 20.64 + 20.55 + 20.51 (CH₃ Acetate glucose); MALDI TOF *m/z* calculated 780.393 found *m/z* [M+Na]⁺ 813.314, theoretical value for [M+Na]⁺ 813.382.

General procedure for final deprotection of peracetylated lactose (Compounds OP1-3 and II.20):



Potassium carbonate (0.5 Eq.) was added to a stirred solution of **II.17a-c** or **II.19** (1 Eq.) diluted in anhydrous MeOH (15 mL). The mixture was stirred for 6 hours at RT. The mixture is quenched by addition of a little amount of Amberlite (IR120H) (~ 300 mg) and the solution was stirred for 30 minutes. Then, the solution was filtered on a sintered funnel and the solvent was evaporated to produce compounds **OP1-3** or **II.20** between 71% and 93 % yield as a white powder.

1-O-Undecylpyrene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside (OP2)

Using the aforementioned general procedure, the compound **OP2** was prepared in 93% yield (530mg). ¹H NMR (DMSO, 500.253 MHz): 8.33 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=9.5 Hz); 8.26-8.02 (m, 7H, H_{ar}); 7.93 (d, 1H, J_{HH}= 8.0 Hz, H_{ar}); 5.08 (m, 2H, OH); 4.66-4.52 (m, 5H, OH); 4.20-4.17 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 3.77-3.72 (m, 2H, H_{6a} + CH₂ sn-3_a); 3.60-3.26 (m, 25H, H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH₃ - OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH₂ α pyrene + CH sn-2 + CH₂ sn-3_b + CH₂ sn-1); 3.0 (t, 1H, J_{HH} = 7.8 Hz, H₂); 1.79-1.73 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.46-1.38 (m, 4H, CH₂ β solketal + CH₂ γ pyrene); 1.34-1.28 (m, 2H, CH₂ γ Solketal); 0.83 (m, 10H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.804 MHz): 137.07 (C_q); 130.86 (C_q); 130.38 (C_q); 129.13 (C_q); 127.98 (C_q); 127.42-124.19 (CH pyrene); 124.18 (C_q); 124.14 (C_q); 123.44 (CH pyrene); 103.83 (C_{1'}); 102.92 + 102.85 (C₁ β anomere – two diastereoisomers); 80.73 (C₄); 78.73 + 78.71 (C sn-2 – two diastereoisomers); 75.48 + 74.95 + 74.79 + 73.08 (C₃ + C₅ + C_{2'} + C_{3'}); 73.2 (C₂); 70.54 (C α Solketal); 70.50 (C_{5'}); 69.81 (C sn-1 - two diastereoisomers); 68.66 + 68.41 (C sn-3 - two diastereoisomers); 68.09 (C_{4'}); 60.47 (C₆); 60.35 (C_{6'}); 57.10 + 57.01 (C - OMe); 32.60 (CH₂ α pyrene); 31.49 (CH₂ β pyrene); 29.13 + 28.96 + 28.92 + 28.90 + 28.80

(CH₂ fatty chain); 25.58 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 784.403 found [M+Na]⁺ 807.443, theoretical value for [M+Na]⁺ 807.393.

1-O-Hexadecylpyrene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside (OP3)

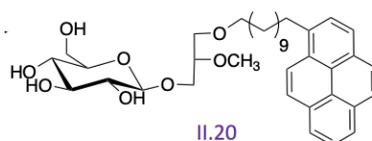
Using the aforementioned general procedure, the compound **OP3** was prepared in 71% yield (420mg). ¹H NMR (DMSO, 500.133 MHz): 8.33 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=9.5 Hz); 8.26-8.04 (m, 7H, H_{ar}); 7.93 (d, 1H, J_{HH}= 8.0 Hz, H_{ar}); 5.1-5.07 (m, 2H, OH); 4.77-4.49 (m, 5H, OH); 4.19-4.18 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 3.76-3.73 (m, 2H, H_{6a} + CH₂ *sn*-3_a); 3.60-3.29 (m, 25H, H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH₃ – OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH₂ α pyrene + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-3_b + CH₂ *sn*-1); 2.99 (t, 1H, J_{HH} = 7.8 Hz, H₂); 1.78-1.75 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.44-1.41 (m, 4H, CH₂ β solketal + CH₂ γ pyrene); 1.33-1.32 (m, 2H, CH₂ γ Solketal); 1.19 (m, 20H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.771 MHz): 137.07 (C_q); 130.88 (C_q); 130.39 (C_q); 129.15 (C_q); 127.99 (C_q); 127.43-123.44 (CH pyrene); 124.15 (C_q); 123.44 (CH pyrene); 103.84 (C_{1'}); 102.93 + 102.86 (C₁ β anomere – two diastereoisomers); 80.73 (C₄); 78.72 + 78.67 (C *sn*-2 – two diastereoisomers); 75.49 + 74.96 + 74.82 + 73.09 (C₃ + C₅ + C_{2'} + C_{3'}); 73.21 (C₂); 70.56 (C α Solketal); 70.51 (C_{5'}); 69.84 (C *sn*-1 - two diastereoisomers); 68.66 + 68.42 (C *sn*-3 - two diastereoisomers); 68.11 (C_{4'}); 60.48 (C₆); 60.36 (C_{6'}); 57.11 + 57.02 (C –OMe); 32.61 (CH₂ α pyrene); 31.49 (CH₂ β pyrene); 29.16 + 28.97 + 28.86 + 28.83 (CH₂ fatty chain); 25.60 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 854.482 found [M+Na]⁺ 877.475, theoretical value for [M+Na]⁺ 877.471, found [M+K]⁺ 893.437, theoretical value for [M+K]⁺ 893.445.

1-O-Butylpyrene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside (OP1)

Using the aforementioned general procedure, the compound **OP1** was prepared in 73% yield (102mg). ¹H NMR (DMSO, 500.133 MHz): 8.36 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}= 9.2 Hz); 8.29-8.21 (m, 4H, H_{ar}); 8.14-8.11 (m, 2H, H_{ar}); 8.07-8.05 (m, 1H, H_{ar}); 7.96-7.95 (m, 1H, H_{ar}); 4.20-4.19 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 3.79-3.72 (m, 2H, H_{6a} + CH₂ *sn*-3_a); 3.61-3.16 (m, 25H, H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH₃ – OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH₂ α pyrene + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-3_b + CH₂ *sn*-1); 3.01 (t, 1H, J_{HH} = 8 Hz, H₂); 1.84-1.81 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.67-1.65 (m, 2H, CH₂ β solketal); ¹³C NMR (DMSO, 125.771 MHz): 136.97 (C_q); 130.88 (C_q); 130.41 (C_q); 129.20 (C_q); 128.05 (C_q); 127.46-124.76 (CH pyrene); 124.21 (C_q); 124.15 (C_q);

123.50 (CH pyrene); 103.85 (C_{1'}); 102.95 + 102.89 (C₁ β anomere – two diastereoisomers); 80.73 (C₄); 78.73 + 78.67 (C *sn*-2 – two diastereoisomers); 75.50 + 74.97 + 74.84 + 73.22 + 73.10 (C₃ + C₅ + C_{2'} + C_{3'} + C₂); 70.52 (C_{5'}); 70.37 (C α Solketal); 69.83 (C *sn*-1 - two diastereoisomers); 68.63 + 68.41 (C *sn*-3 - two diastereoisomers); 68.12 (C_{4'}); 60.47 (C₆); 60.38 (C_{6'}); 57.11 + 57.02 (C –OMe); 32.34 + 29.09 + 28.18 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 686.294 found [M+Na]⁺ 709.346, theoretical value for [M+Na]⁺ 709.283, found [M+K]⁺ 725.308, theoretical value for [M+K]⁺ 725.257.

1-*O*-Undecylpyrene-2-*O*-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D- glucopyranoside (**II.20**)



Using the aforementioned general procedure, the compound **II.20** was prepared in 98% yield (560mg). ¹H NMR (DMSO, 500.253 MHz): 8.32 (d, 1H, H_{ar}, J_{HH}=9.5 Hz); 8.26-8.03 (m, 7H, H_{ar}); 7.92 (d, 1H, J_{HH}= 8.0 Hz, H_{ar}); 4.13-4.10 (m, 1H, H₁); 3.76-3.73 (m, 1H, *sn*-3_a); 3.67-3.64 (m; &H, H_{6a}); 3.47-3.43 (m, 4H, H₅ + H_{6b} + *sn*-1); 3.42-3.29 (m, 10H, H₃ + H₄ + CH₃ – OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH₂ α pyrene + MeOH); 3.28-3.04 (m, 3H, *sn*-2 + H₃ + H₄); 2.94 (t, 1H, J_{HH} = 7.8 Hz, H₂); 1.75-1.73 (m, 2H, CH₂ β pyrene); 1.42-1.40 (m, 4H, CH₂ β solketal + CH₂ γ pyrene); 1.39 (m, 2H, CH₂ γ Solketal); 0.85 (m, 10H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.804 MHz): 137.07 (C_q); 130.88 (C_q); 130.40 (C_q); 129.15 (C_q); 127.99 (C_q); 127.43-124.21 (CH pyrene); 124.16 (C_q); 123.44 (CH pyrene); 103.27 + 103.208 (C₁ β anomer); 78.75 (C₅); 76.89 + 76.71 (C_{*sn*-2} – two diastereoisomers + C₃); 73.32 (C₂); 70.54 (C α Solketal); 70.00 (C₄); 69.85 (*sn*-1 - two diastereoisomers); 68.46 + 68.24 (*sn*-3 - two diastereoisomers); 61.03 (C₆); 57.11 + 57.02 (C –OMe); 32.61-25.60 (CH₂ pyrene); MALDI TOF *m/z* calculated 622.513 found [M+•] 622.482, [M+K]⁺ *m/z* 661.425 theoretical value for [M+K]⁺ 661.312.

Fluorescence and liposomal formulations

Fluorescence was recorded on *Agilent Cary Eclipse* Fluorescence Spectrophotometer. Samples were excited at 331 nm in quartz cells. Stock solutions of OP compounds were prepared in methanol at 50 μM. EggPC, DOPC and cholesterol were purchased from Sigma-Aldrich. EggPC (ref 840051) is a mixture of PC whose molecular weight is 770 g/mol. It

contains mainly C_{16:0} (32.7%), C_{18:1} (32%), C_{18:2} (17.1 %), C_{18:0} (12.3%), C_{20:4} (2.7%), C_{16:1} (1.1%). Stock solutions of EggPC, DOPC and cholesterol were prepared in chloroforme at 1 mmol/L. For mixtures of EggPC or DOPC with cholesterol, stock solutions of the mixture were prepared containing 30% of cholesterol and 70% of either EggPC or DOPC (mol/mol). An aliquot of these lipids solutions was introduced in a glass tube and solvent was evaporated under vacuum. After solvent removal, pure water was added and let at 4°C for 5 nights. The samples were then warmed, vortexed, sonicated for 10 minutes. After 3 hours they were vortexed again and fluorescence was measured. The final concentration of lipids is either 8 μmol/L or 40 μmol/L. For pre-insertion experiments, stock solutions of one of the OP compounds (10μL) were added before evaporation of the solvent. For post-insertion they were added after sonication. The final concentration of OP 1, 2 or 3 was always 0.2 μM (lipid/OP ratios = 40 or 200).

Cell culture and imaging

100.000 MDA-MB-231 cells were seeded in 35 mm dishes in 1 mL serum-supplemented DMEM. Cells were treated with **OP2** 24h after seeding. For observation immediately after treatment, the serum-containing culture medium was replaced with serum-free DMEM before adding **OP2** at the required concentration; for observation 24h after treatment, **OP2** was added to the serum-supplemented DMEM.

Cells were imaged on a wide-field Leica microscope endowed with an EM-CCD (Andor DU8285) through an oil immersion 20x microscope objective (HC PL APO 20/0.70 IMM). **OP2** fluorescence was excited at 340 nm and emission was imaged from 468 to 552 nm (the emission range of pyrene excimer).

Chapitre 3 :
Modulation
de la position sn-1 de
l'Ohmline par un
motif
bis(phényl)diazène

Chapitre 3 : Modulation de la position *sn-1* de l'Ohmline par un motif bis(phényl)diazène

I - Généralités

Le bis(phényl)diazène, encore appelé azobenzène ou tout simplement « azo » a été décrit pour la première fois en 1834 par l'Allemand E. Mitscherlich¹⁴⁰ et a ensuite été étudié par Nobel en 1856¹⁴¹. Il s'agit d'un chromophore constitué, comme son nom l'indique, par deux cycles phényles et une liaison azoïque (-N=N-) (Figure III. 1).

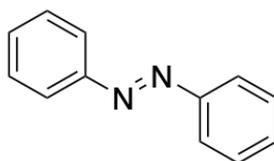


Figure III. 1: Structure du composé bis(phényl)diazène.

Ce n'est qu'en 1937 que G. S. Hartley a mis en évidence la formation de l'isomère géométrique *Cis* (*Z*) suite à une étude montrant l'influence de la lumière sur la configuration de la double liaison -N=N-¹⁴². Cette découverte fut le point de départ du développement de l'un des meilleurs commutateurs moléculaires organiques décrit à ce jour. On entend par commutateur moléculaire, tout système moléculaire qui, après avoir été soumis à un stimuli tel que la lumière, est capable d'effectuer des mouvements mécaniques entraînant des changements conformationnels et environnementaux du commutateur.

Ainsi, les azobenzènes possèdent de très nombreuses propriétés polyvalentes (chimiques, mécaniques, électroniques et optiques), qui les ont conduits à des applications de grande importance, principalement pour l'industrie chimique. Leur incorporation dans divers systèmes fonctionnels a été très largement étudiée au cours de la dernière décennie notamment pour développer des systèmes moléculaires photoréactifs également dis « intelligents ». Leur domaine d'application étant très vaste et varié, nous ne prendrons,

¹⁴⁰ E. Mitscherlich, *Ann. Phys. Chem.* **1834**, *108*, 225–227.

¹⁴¹ A. Noble, *Ann. Chem. Pharm.* **1856**, *98*, 253–256.

¹⁴² G. S. Hartley, *Nature* **1937**, *140*, 281–281.

dans notre cas, que des exemples de leur utilisation en photopharmacologie¹⁴³ pour, entre autres, la modulation de biomolécules¹⁴⁴.

Le terme photopharmacologie a été donné par l'équipe de Broichhagen *et al.*¹⁴³ suite à leurs travaux sur le développement de nombreux composés « photoswitchables » pour la modulation de multiples cibles biologiques. Ils ont défini la photopharmacologie comme étant la discipline qui « tente de contrôler une / des fonction(s) biologique(s) à l'aide de commutateurs synthétiques, dont leur rôle sera d'agir sur une grande variété de cibles biologiques (récepteurs couplés aux protéines G, les transporteurs, les enzymes, les lipides ou encore les canaux ioniques etc.) ».

I.1 Utilité de l'utilisation d'un motif azobenzène en photopharmacologie - exemples

L'introduction d'un fragment azobenzène dans une molécule à activité biologique, telle qu'une protéine, peut permettre le contrôle spatial et temporel de divers processus biologiques grâce à l'utilisation de la lumière. Cette stratégie est très intéressante car elle permet de contrôler la conformation et, par conséquent, l'activité des biomolécules de manière réversible sans ajout de réactif. De plus, les effets structurels provoqués par l'isomérisation peuvent initier une cascade de réponses secondaires photophysiques et photochimiques. La première application d'un azobenzène en biologie a été publiée en 1968 par Kaufman *et al.* qui ont utilisé le chlorure de p-azophényldiphénylcarbamide afin de « photoréguler » l'activité de la chymotrypsine, enzyme digestive sécrétée par le pancréas¹⁴⁵.

Autre exemple, l'isomérisation des dérivés « azo » a également été utilisée comme outil synthétique pour contrôler l'ouverture et la fermeture de certains canaux ioniques. Banghart *et al.* ont notamment développé un composé pour contrôler les canaux K⁺ (SPARK) présents dans les cellules neuronales¹⁴⁶. Ils ont démontré que leur composé permettait, à différentes

¹⁴³ J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947–1960.

¹⁴⁴ A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422.

¹⁴⁵ H. Kaufman, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, *Science* **1968**, *162*, 1487–1489.

¹⁴⁶ M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381–1386.

longueurs d'ondes d'excitations, d'activer et de désactiver le déclenchement du potentiel d'action des cellules neuronales suite à son changement de conformation.

Ainsi, lorsque le composé adopte sa configuration *trans*, le composé va venir « boucher » l'entrée du pore du canal et empêcher l'efflux d'ions K^+ , puis, suite à une irradiation à la longueur d'onde de 380 nm, l'isomère *cis*, dont ses deux noyaux phényles se sont rapprochés, ne va plus être apte à bloquer l'entrée du pore du canal, permettant le passage des ions (Figure III. 2).

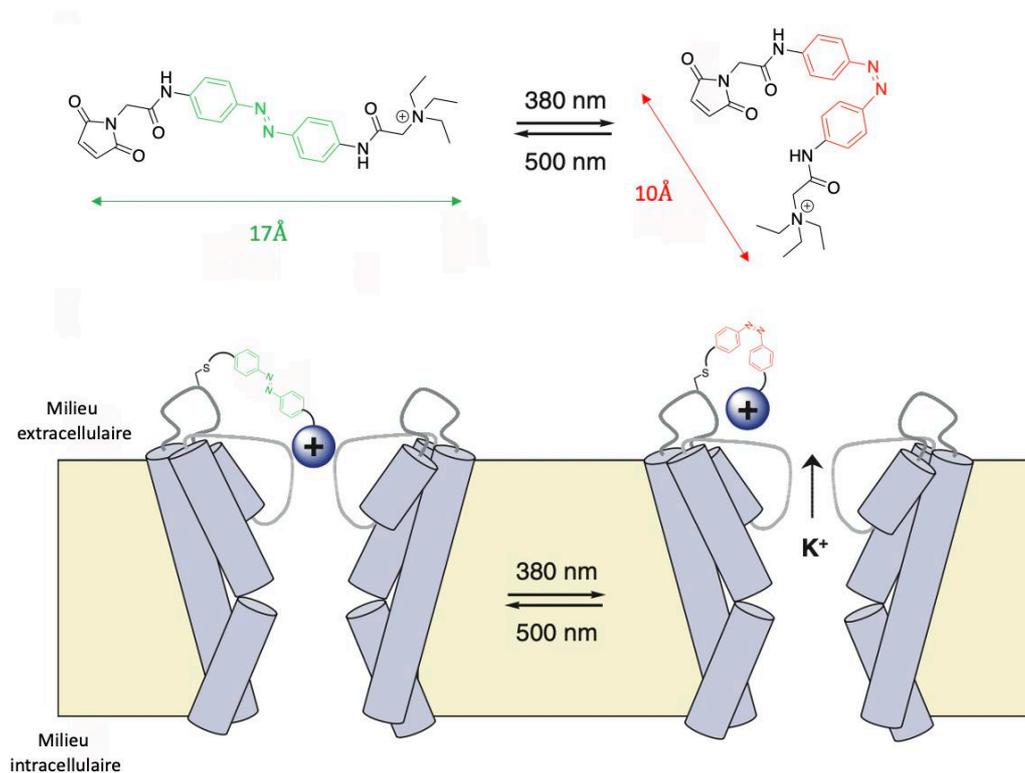


Figure III. 2: Représentation du photocontrôle d'un canal potassique grâce à l'utilisation d'un composé comportant un fragment azobenzène. Figure modifiée d'après Banghart et al. (2004)¹⁴⁶.

En 2006, les travaux de Volgraf et *al.* ont présenté un composé constitué d'un fragment azobenzène qui a été utilisé comme agoniste photochromique d'un récepteur ionotrope du glutamate (iGluR)¹⁴⁷. Le chromophore consiste en une unité maléimide terminale qui est associée de manière covalente à la protéine iGluR *via* un résidu cystéine, un motif azobenzène au centre et une tête glutamate. Dans ce cas-ci, seule la forme *cis* de l'azobenzène permet l'interaction du glutamate avec le site actif de la protéine.

¹⁴⁷ M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 47–52

Lorsque cette interaction se produit, la protéine se replie sur elle-même, déclenchant l'ouverture du canal ionique (Figure III. 3).

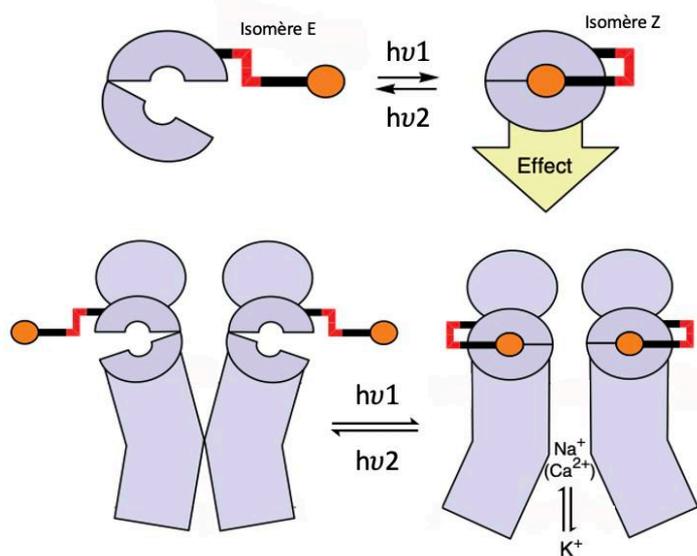


Figure III. 3: Schéma simplifié représentant l'ouverture photocontrôlée de la protéine iGluR grâce à l'utilisation d'un motif azobenzène. Modifiée d'après Volgraf et al. (2006)¹⁴⁷.

Aujourd'hui, la principale propriété de l'azobenzène qui suscite toujours un grand intérêt de la part de la communauté scientifique est sa propriété photochimique, en raison de sa facilité à isomériser sa double liaison N=N en présence d'une source lumineuse¹⁴⁸, mais aussi car sa réaction de photo-isomérisation est décrite comme étant la plus propre connue à ce jour¹⁴⁹. D'après Rau et *al.* cette réaction ne génère pas de réaction parasite ce qui fait que la molécule peut subir de très nombreux cycles d'isomérisations $Z \leftrightarrow E$ sans être endommagée.

1.2 Propriété photochimique de l'azobenzène

Comme vu dans la partie I - Généralités, le motif bis(phényl)diazène possède la capacité de s'isomériser, et ce, de façon rapide et réversible sous l'action d'une irradiation avec une lumière ayant une longueur d'onde d'excitation appropriée.

¹⁴⁸ G. S. Kumar, D. C. Neckers, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1915–1925.

¹⁴⁹ H. Rau, *Photochem and photophys.*, CRC, Boca Raton, **1990**, Chap 4.

Ce processus de photo-isomérisation modifie les propriétés du composé¹⁵⁰ et peut induire des variations de ses propriétés physico-chimiques¹⁵¹ (hydrophobicité, polarité etc.) ainsi qu'à une modification remarquable de leurs propriétés physiques, telles que la géométrie moléculaire, le moment dipolaire etc.¹⁵².

Ainsi, suite à une irradiation avec une longueur d'onde comprise entre 320 et 350 nm (λ_1), le *trans*-azobenzène s'isomériser facilement en isomère *cis* (*Z*) (Figure III. 4). La photo-réversion est rendue possible grâce à la haute stabilité thermodynamique de l'isomère *trans* (*E*) en comparaison à l'isomère *cis* qui lui est métastable. En effet, le *trans*-isomère est plus stable que l'isomère *cis* de 12 Kcal/mol¹⁵³ et la barrière énergétique pour passer de l'état photo-stationnaire à l'état photo-excité est de 23 Kcal/mol¹⁵⁴.

Ainsi, la relaxation de l'isomère *cis*→*trans* peut s'effectuer spontanément, en plaçant l'isomère *cis* dans le noir, et être aidé par une élévation de la température du milieu, ou encore, en utilisant une lumière dont la longueur d'onde d'excitation serait comprise entre 400 et 450 nm (λ_2) (Figure III. 4).

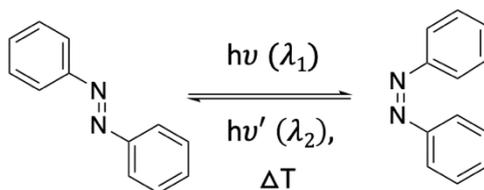


Figure III. 4: Structures des deux isomères géométriques de l'azobenzène.

En termes de cinétique de relaxation, il est important de noter qu'elle est fortement dépendante du degré de substitution de l'azobenzène, de la viscosité du milieu et de la température^{151, 153}.

Néanmoins, pour de nombreux dérivés d'azobenzènes, la conversion photochimique se produit à l'échelle de la picoseconde, tandis que la relaxation thermique de l'isomère *cis* en isomère *trans* est beaucoup plus lente (de quelques millisecondes à plusieurs heures voire jours)¹⁵⁵.

¹⁵⁰ K. Ichimura, Photochromism: Molecules and systems, H. Durr, H. Bouas-Laurent, Elsevier Amsterdam, **1990**, 903.

¹⁵¹ H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 1809–1825.

¹⁵² K. Morgenstern, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 213–223.

¹⁵³ H. Rau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12*, 224–235.

¹⁵⁴ E. V. Brown, G. R. Granneman, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 621–627.

¹⁵⁵ J. Garcia-Amorós, M. Martínez, H. Finkelmann, D. Velasco, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1287–1293.

I.3 Modification de la polarité induite par l'isomérisation

L'une des conséquences majeures de l'isomérisation du composé (*E*)-bis(phényl)diazène est la modification de la polarité de la molécule après irradiation UV (Figure III. 5). Le processus d'isomérisation implique une diminution de la distance entre les deux atomes de carbone en position 4 et 4' des cycles aromatiques de l'azobenzène de 9,0 Å sous forme *trans*, à 5,5 Å sous forme *cis* (Figure III. 5)¹⁵⁶.

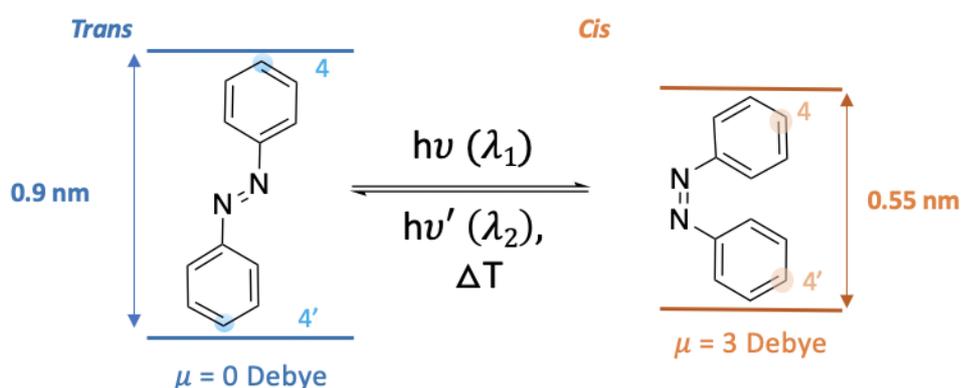


Figure III. 5: Modification de la polarité de l'azobenzène après irradiation UV.

De plus, le *trans*-azobenzène est presque plan et ne possède pas de moment dipolaire, tandis que l'isomère *cis* présente une géométrie angulaire responsable d'un moment dipolaire plus élevé. Les études de Hartley et *al.* ont démontré que la polarité du composé *trans* et celle du composé *cis* sont respectivement de $\mu_{trans} = 0$ Debye et $\mu_{cis} = 3$ Debye¹⁵⁷.

Le changement géométrique associé à l'isomérisation *trans*↔*cis* des azobenzènes est significatif et peut être utilisé pour détruire ou réorganiser l'ordre dans une grande variété de milieux organisés et produire un changement de nombreuses propriétés observables dans les systèmes contenant des motifs azoïques.

De nombreuses études se sont intéressées au mécanisme de photoisomérisation de l'azobenzène. Ce dernier a par ailleurs, fait l'objet de beaucoup d'attention de la part de la communauté scientifique et est toujours sujet à des controverses.

¹⁵⁶ M. Sato, T. Kinoshita, A. Takizawa, Y. Tsujita, *Macromolecules* **1988**, *21*, 1612–1616.

¹⁵⁷ G. S. Hartley, R. J. W. Le Fèvre, *J Chem Soc* **1939**, *0*, 531–535.

I.4 Mécanisme de la photo-isomérisation de l'azobenzène

Plusieurs mécanismes ont ainsi été proposés. Le premier impliquerait un mécanisme de rotation autour de la liaison N-N qui ferait intervenir un état de transition planaire¹⁵¹.

Une rupture homolytique de la liaison π du groupement diazène en serait l'origine. Cette dernière permettrait la formation d'une espèce intermédiaire bi-radicalaire, non rigide, permettant une rotation libre autour de la liaison simple jusqu'à l'obtention du *Cis*-isomère (Figure III. 6).

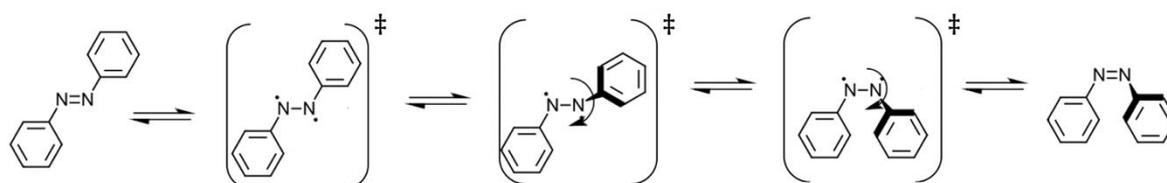


Figure III. 6: Mécanisme de rotation de l'azobenzène.

Un second mécanisme impliquerait, quant à lui, une inversion avec un état de transition linéaire avec un déplacement latéral dans le plan¹⁵¹. Cet état de transition serait dû au changement d'hybridation d'un des atomes d'azote, qui, initialement était sp^2 et qui passerait par un état d'hybridation sp (Figure III. 7).

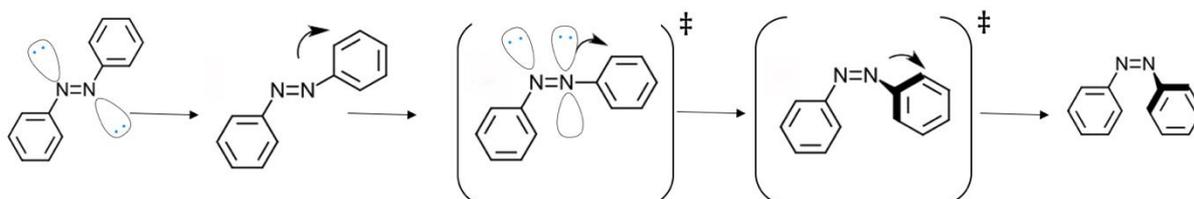


Figure III. 7: Mécanisme proposé pour l'inversion.

Des travaux récents de Tiberio et *al.* ainsi que de Maurer et *al.* ont fournis des preuves solides, de l'existence des mécanismes d'inversion ou de rotation^{158, 159}.

¹⁵⁸ G. Tiberio, L. Muccioli, R. Berardi, C. Zannoni, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 1018–1028.

¹⁵⁹ R. J. Maurer, K. Reuter, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 224303.

Cependant, d'autres mécanismes dits « mixtes » ont également été proposés¹⁵¹. Il s'agit de l'inversion concertée ou encore de la rotation assistée par une inversion. Tous les mécanismes sont regroupés dans la [Figure III. 8](#).

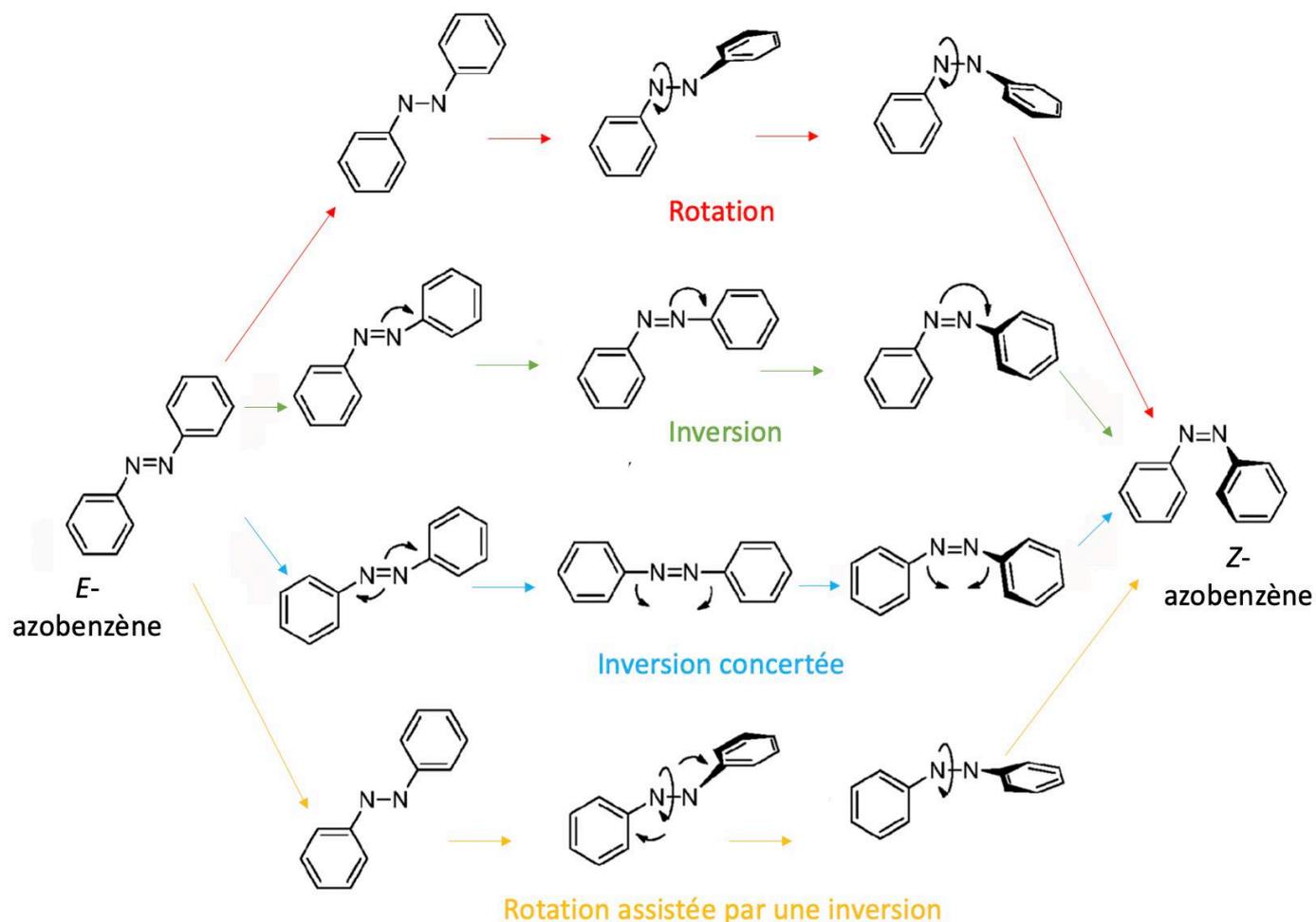
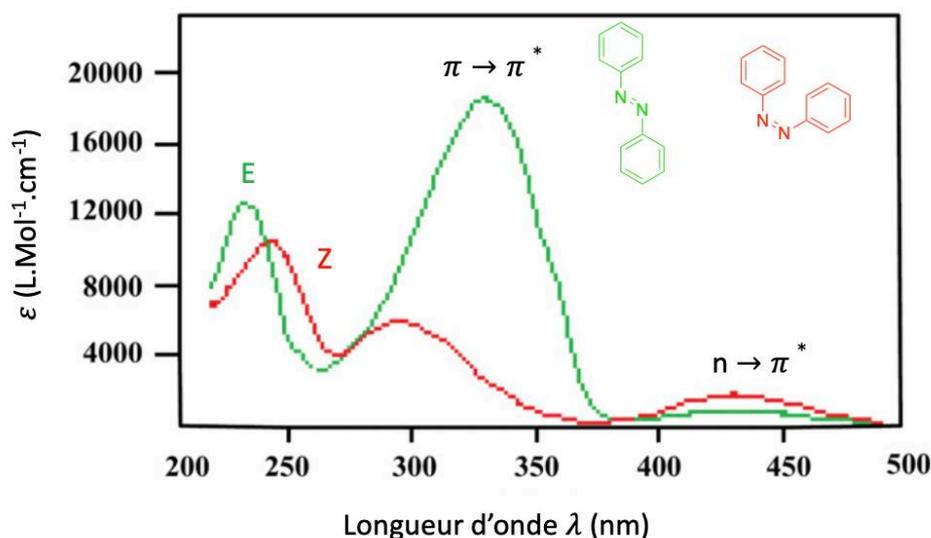


Figure III. 8: Différents mécanismes d'isomérisation trans → cis de l'azobenzène. Modifiée d'après Bandara et al.¹⁵⁰

L'ensemble des études menées suggère qu'il peut ne pas y avoir un mécanisme général, mais une compétition entre plusieurs mécanismes, en fonction du degré de substitution du chromophore et de l'environnement local. En effet, plusieurs études ont révélé que le mécanisme d'isomérisation de l'azobenzène était dépendant de plusieurs facteurs comme la température, la pression, les substituants des groupements phényles ou encore du solvant utilisé¹⁵¹.

I.5 Spectre d'absorption de l'azobenzène

Le spectre d'absorption UV – Vis de l'azobenzène présente deux bandes d'absorption caractéristiques correspondant à des transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_2$)¹⁶⁰ et $n \rightarrow \pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_1$)¹⁶¹ (Figure III. 9).



La transition $\pi \rightarrow \pi^*$ se situe généralement dans la région proche des UV tandis que la transition électronique $n \rightarrow \pi^*$ est située dans la région visible. Celle-ci est notamment due à la présence de paires d'électrons, non partagés, des atomes d'azote¹⁶². Ainsi, l'azobenzène subit une isomérisation *trans* \rightarrow *cis* par excitations des 2 états singulets $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_0 \rightarrow S_2$, tandis que la photo-réversion *cis* \rightarrow *trans*, elle, subit une excitation à l'état S_1 ou S_2 ¹⁶³. Le processus d'isomérisation implique, normalement, un changement de couleur vers des couleurs plus intenses.

Les spectres d'absorptions des deux isomères diffèrent principalement dans les aspects suivants (Figure III. 9)¹⁶⁴ :

¹⁶⁰ P. Hamm, S. M. Ohline, W. Zinth, *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 519–529.

¹⁶¹ I. K. Lednev, T.-Q. Ye, P. Matousek, M. Towrie, P. Fogg, F. V. R. Neuwahl, S. Umapathy, R. E. Hester, J. N. Moore, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *290*, 68–74.

¹⁶² T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *272*, 489–495

¹⁶³ Pietro. Bortolus, Sandra. Monti, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 648–652.

¹⁶⁴ N. Tamai, H. Miyasaka, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1875–1890.

- Isomère *trans* (*E*) : il est caractérisé par une bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ très intense, dont le coefficient d'extinction molaire est de l'ordre de $(\epsilon) \sim 2 \text{ à } 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La deuxième bande ($n \rightarrow \pi^*$) est, quant à elle, beaucoup plus faible. Cela peut s'expliquer par le fait que cette transition n'est pas permise dans l'isomère *trans* par les règles de symétrie.
- Isomère *Cis* (*Z*) : sa bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ est décalée vers des longueurs d'onde plus courtes (effet hypsochromique), et diminue significativement en intensité ($\epsilon \sim 7 \text{ à } 10 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La transition électronique $n \rightarrow \pi^*$ (380–520 nm) est, dans le cas de l'isomère *cis*, autorisée, ce qui entraîne une augmentation de l'intensité ($\epsilon \sim 1500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) par rapport à l'isomère *trans*.

L'excitation provoquée par la longueur d'onde dépend de la nature des substituants des groupes aryles. Dans la plupart des cas, l'isomérisation *trans* \rightarrow *cis* est favorisée par une irradiation à une longueur d'onde comprise entre 320 et 380 nm, tandis que des expositions à une longueur d'onde comprise entre 400 et 450 nm favorisent la photo-réversion *cis* \rightarrow *trans*.

Il est important de noter que la substitution des noyaux aromatiques de l'azobenzène, par des groupements électrodonneurs (GED) ou bien électroattracteurs (GEA), permet de modifier l'absorption du composé *via* la délocalisation des électrons π au sein de la structure. Cette modulation permet d'obtenir une variété de composés comportant chacun une longueur d'onde maximale d'absorption différente, recouvrant une large gamme du spectre électromagnétique allant des régions Ultra-Violette (UV), visible et Infra Rouge (IR)¹⁶⁵.

1.6 Objectifs

L'exigence de base d'un interrupteur moléculaire réussi est la présence de deux formes distinctes de la molécule qui peuvent être interconverties de manière réversible au moyen d'un stimulus externe, comme la lumière, la chaleur, la pression, les champs magnétiques ou électriques, le changement de pH, ou une réaction chimique. L'irradiation de matériaux contenant de l'azobenzène induit une isomérisation réversible entre les deux isomères, ce

¹⁶⁵ J. García-Amorós, D. Velasco, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1003–1017.

qui rend les azobenzènes commutables par la lumière (photoswitches). Comme décrit précédemment, la photoisomérisation des azobenzènes est accompagnée de changements significatifs dans les spectres d'absorption, la structure ou encore le moment dipolaire de la molécule. Ces changements peuvent ainsi modifier les propriétés du milieu environnant en les activant ou désactivant, ce qui fait des azobenzènes, l'un des chromophores les plus connus, développé, et utilisé dans de nombreux domaines.

Dans ce sens, nous avons développé de nouveaux analogues de l'Ohmline qui soient « photoswitchables » afin d'obtenir l'un des premiers composés amphiphiles « on, off », capable de moduler efficacement et spécifiquement l'activité du canal SK3. Ainsi, nous avons entrepris d'intégrer le motif azobenzène dans la chaîne lipidique de l'Ohmline. Nous avons fait l'hypothèse que sa configuration *E* (*trans*), caractérisée par une faible polarité, devrait conduire à un composé comportant un domaine hydrophobe étendu, favorable à l'intégration de la molécule dans les membranes. Un tel composé pourrait alors moduler les canaux SK3. En revanche, l'isomère *Z* (*cis*), caractérisé par un moment dipolaire élevé, conduira à un composé avec un moment dipolaire également plus élevé, pouvant perturber la localisation du composé dans la membrane plasmique. L'isomérisation *cis/trans* du motif azobenzène serait donc l'interrupteur entre un composé de configuration *E* agissant sur les canaux SK3 (« on ») et le diastéréoisomère *Z* qui pourrait être inactif (« off »).

Pour cela nous avons, dans un premier temps, synthétisé un analogue de l'Ohmline où le fragment azobenzène était placé sur la position *sn-1* du motif glycérol (Figure III. 10).

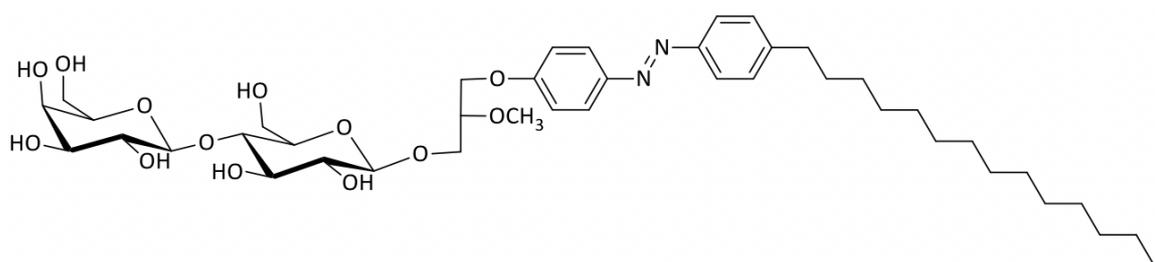


Figure III. 10: Structure du premier analogue de l'Ohmline possédant un motif azobenzène incorporé directement sur l'oxygène de la position *sn-1* du motif glycérol.

Dans un second temps, nous avons réalisé la synthèse de nouveaux analogues de l'Ohmline où le motif azobenzène est positionné en position terminale de la chaîne lipidique. Tout comme dans le cas des analogues fluorescents de l'Ohmline, l'optimisation de la synthèse a été valorisée en synthétisant 3 analogues, où la longueur de la chaîne lipidique séparant la

partie glycérol du motif azobenzène a été modifiée avec 6, 8 ou 11 atomes de carbone (Figure III. 11).

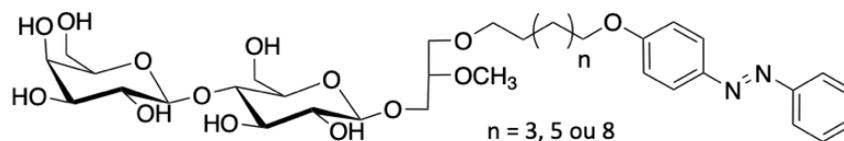


Figure III. 11: Structure des nouveaux analogues de l'Ohmline où le motif azobenzène est positionné en bout de chaîne lipidique.

II - Synthèse des amphiphiles comportant le motif azobenzène

Plusieurs réactions sont disponibles et décrites dans la littérature pour la synthèse des azobenzènes et de leur dérivés. La revue, très complète, de Hamon *et al.* détaille de manière non-exhaustive les réactions les plus couramment utilisées¹⁶⁶.

Dans notre cas, pour la synthèse de chacun de nos dérivés azobenzènes, nous avons utilisé une réaction de couplage entre un sel de diazonium de n-alkylaniline et le phénol. Pour cela nous sommes inspirés de plusieurs travaux^{167, 168, 169, 170, 171}.

Ainsi, pour le premier analogue, la synthèse a débuté par le composé 4-((4'-tétradécylphényl)diazényl)phénol. Sa synthèse s'effectue en 3 parties distinctes **A**, **B** et **C** (Figure III. 12).

Dans un premier temps, le chlorhydrate de tétradécaaniline (ou chlorure de 4-tétradécylbenzèneaminium) est obtenu par acidification de la tétradécaaniline commerciale. La diazotation de ce chlorhydrate est alors réalisée en présence de nitrite de sodium pour former le sel de n-alkylbenzènediazonium (partie **A**, Figure III. 12). Dans un second temps, l'ion phénolate est formé grâce à l'utilisation de phénol en excès, de soude et d'hydrogencarbonate de sodium à 0°C (partie **B**, Figure III. 12). Pour terminer (partie **C**, Figure III. 12), le sel de n-alkylbenzènediazonium préalablement formé (partie **A**) est ajouté, au goutte à goutte, sur l'ion phénolate formé (partie **B**).

¹⁶⁶ F. Hamon, F. Djedaini-Pilard, F. Barbot, C. Len, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10105–10123.

¹⁶⁷ S. Suwanprasop, S. Suksorn, T. Nhujak, S. Roengsumran, A. Petsom, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 5054–5059.

¹⁶⁸ K. Jia, X. Zhang, L. Zhang, L. Yu, Y. Wu, L. Li, Y. Mai, B. Liao, *Langmuir* **2018**, *34*, 11544–11552

¹⁶⁹ L. Dai, L. Cai, Y. Yuan, A. Liu, Z. Li, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2017**, *192*, 283–291.

¹⁷⁰ C. Blayo, J. E. Houston, S. M. King, R. C. Evans, *Langmuir* **2018**, *34*, 10123–10134.

¹⁷¹ D. Liu, S. Wang, S. Xu, H. Liu, *Langmuir* **2017**, *33*, 1004–1012.

La solution devient orange vif et la formation d'une mousse est observée. Celle-ci correspond à la neutralisation par l'hydrogénocarbonate de sodium de l'acide chlorhydrique formé. La réaction est maintenue sous agitation ainsi qu'à 0°C pendant toute une nuit à l'aide d'un cryostat. Le mélange est extrait avec de l'acétate d'éthyle, la phase organique est ensuite récupérée, séchée sur sulfate de magnésium anhydre, évaporée puis purifiée par distillation sous pression réduite grâce à un Kugelrohr, plus communément appelé four à boules. Ce dernier permet d'éliminer facilement le phénol en excès (par distillation sous vide) dont la température d'ébullition est de 182°C, et d'obtenir le dérivé « azo » III.1 souhaité avec un rendement de 89%.

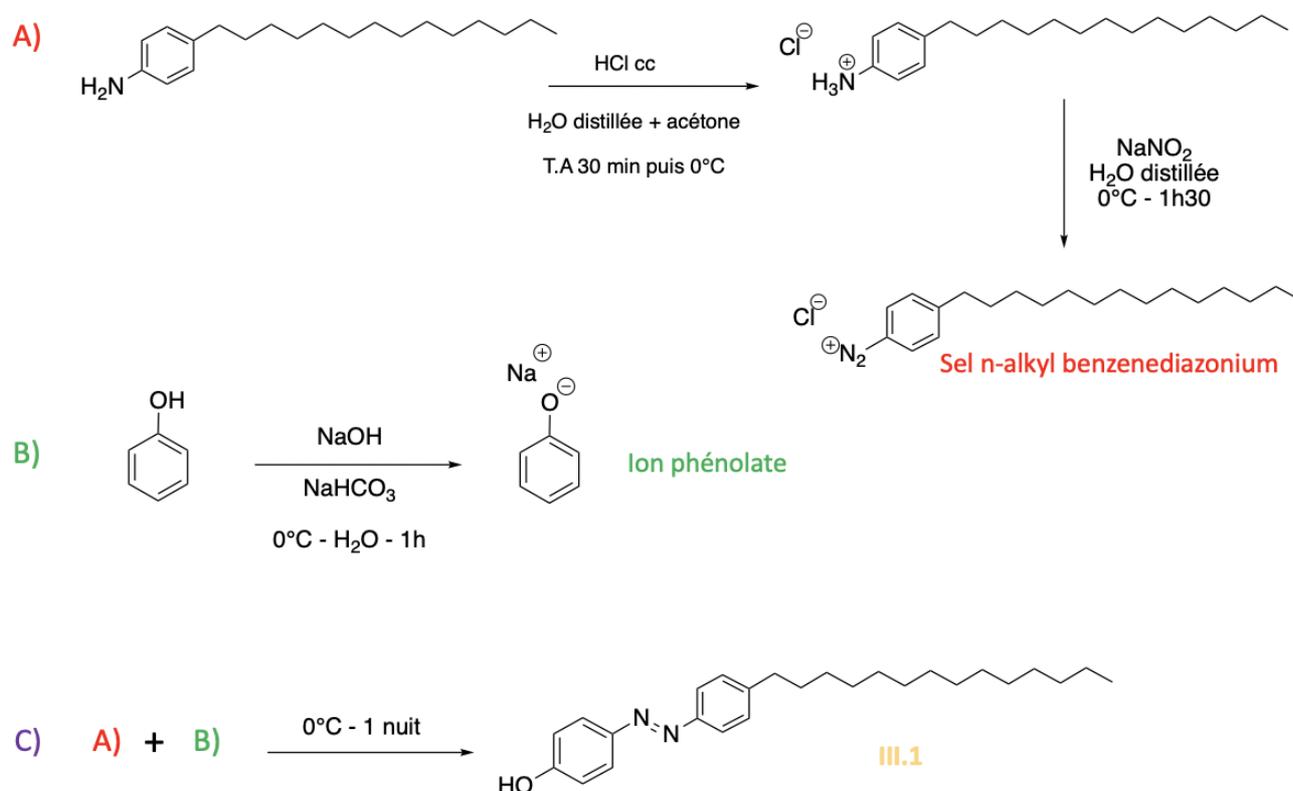


Figure III. 12: Synthèse du 4-((4'-tetradecylphenyl)diazényl)phenol III.1.

Ce dérivé III.1 a ensuite été utilisé comme nucléophile sur le composé III.2 préalablement synthétisé (Figure III. 13). Ce dernier a été obtenu par $\text{S}_{\text{N}}2$ sur l'alcool primaire du solkétal grâce à l'utilisation d'hydruure de sodium et du chlorure de 4-toluènesulfonyle plus communément appelé chlorure de tosylo. La $\text{S}_{\text{N}}2$ qui se produit ensuite entre les composés

III.1 et III.2 grâce à l'utilisation de carbonate de césium a permis l'obtention du composé III.3.

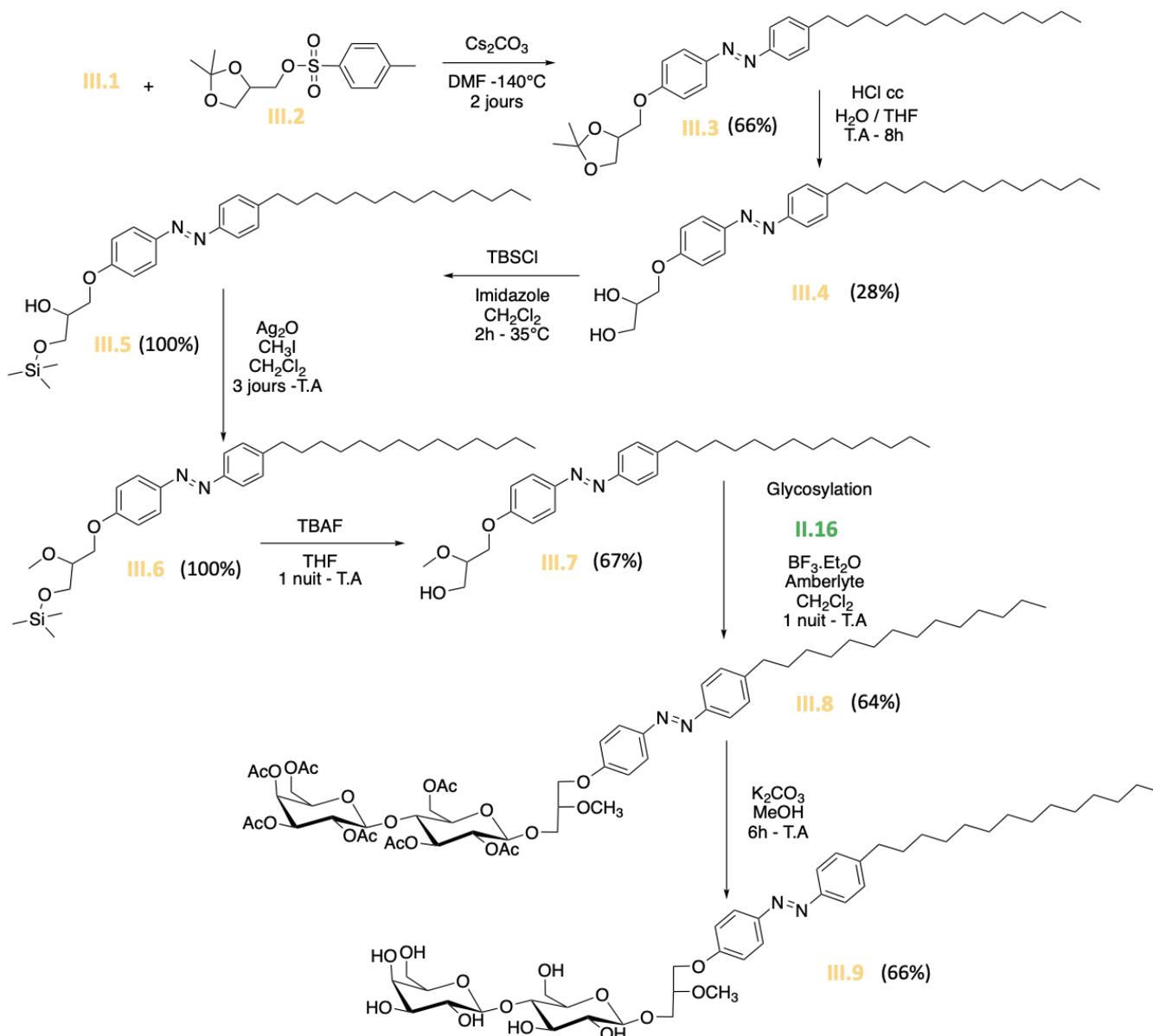


Figure III. 13: Synthèse du composé III.9.

Plusieurs conditions réactionnelles ont été testées (Figure III. 14) afin de tenter d'améliorer et optimiser les rendements obtenus. Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Smith et *al.* qui utilisent un dérivé azobenzène, possédant une fonction phénol en position para du motif diazène, et du solkétal en présence d'azodicarboxylate de diéthyle et de triphénylphosphine afin de réaliser une réaction de Mitsunobu permettant d'obtenir le

dérivé **III.3**¹⁷². Ces essais n'ont pas permis d'isoler le composé attendu malgré la variation de certains paramètres (durée de la manipulation, solvant, durée du chauffage). La seule réaction qui nous a permis d'isoler le composé **III.3** a été la réaction entre le phénolate et le solkétal-tosylé. Lors de cette réaction l'utilisation de carbonate de césium dans du DMF, porté au reflux et sous agitation pendant 2 jours a donné les meilleurs résultats (rendement 66%).

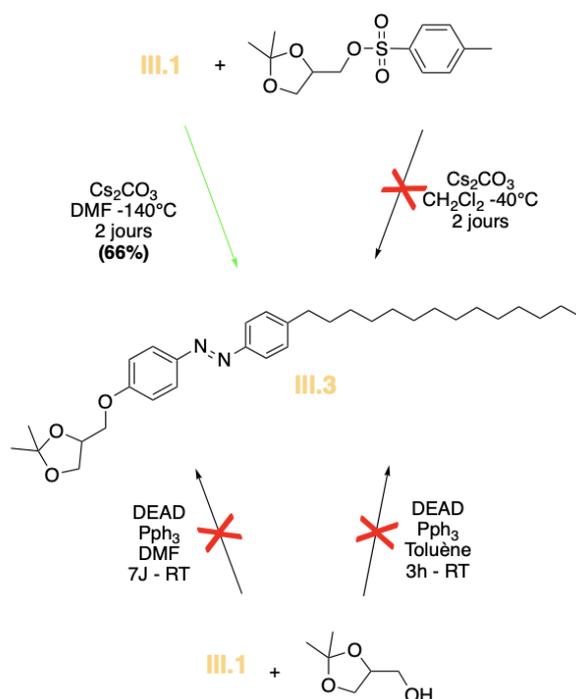


Figure III. 14: Différentes conditions réactionnelles testées pour l'obtention du dérivé **III.3**.

La suite de la synthèse ainsi que des conditions réactionnelles utilisées restent peu différentes de celles mise en place pour les analogues fluorescents de l'Ohmline présentés au [Chapitre 2](#).

La fonction acétal du dérivé **III.3** a été déprotégée par l'utilisation d'acide chlorhydrique concentré dans du THF à température ambiante pour obtenir le diol correspondant **III.4** avec un rendement de 28%.

L'alcool primaire de **III.4** a ensuite été protégé par du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence de DMAP afin d'obtenir le composé **III.5**. L'alcool secondaire a ensuite été méthylié *via* la méthode mise au point par Irvine-Purdie qui, pour rappel, emploie de l'oxyde d'argent

¹⁷² V. Chupin, I. Boldyrev, *Molbank* **2017**, 2017, M932.

et de l'iodométhane, pour nous permettre d'obtenir le composé III.6. La synthèse du bloc aglycone se conclut par la déprotection de l'alcool primaire par le fluorure de tétrabutylammonium dans du THF afin d'obtenir le composé III.7 avec un rendement de 67%. La réaction de glycosylation est ensuite effectuée entre les composés III.7 et II.16 (qui est de configuration exclusive α) pour obtenir le composé III.8. Pour finir, la déprotection des fonctions alcools du disaccharide par du carbonate de potassium nous a permis d'obtenir le composé III.9 désiré. Il a ensuite été transmis à Tours afin d'évaluer son action sur les canaux SK3.

III - Étude du composé III.9 sur l'inhibition du canal SK3

Comme pour les études des analogues fluorescents de l'Ohmlin, les mesures du courant ionique ont été réalisées grâce à la technique de Patch-Clamp en configuration « whole-cell » et dont la concentration utilisée en composé III.9 était de 10 μ M.

Jusqu'alors, toutes les mesures obtenues pour chacun de nos composés *via* la technique de Patch-Clamp, avaient été réalisées sur les cellules HEK293T-SK3, dont le plasmide de la protéine SK3 code pour le gène du rat (rSK3). Le composé III.9 ainsi que les autres analogues présentés dans ce chapitre ont tous été testés sur les cellules HEK293T-SK3, dont le plasmide de la protéine SK3 code, cette fois-ci, pour le gène humain (hSK3).

On peut noter que, pour les hSK3, l'efficacité de l'Ohmlin est plus importante. En effet chez les cellules rSK3 l'inhibition du courant ionique est de $-69 \pm 3.5\%$ (N=3) tandis qu'avec les cellules hSK3, l'inhibition passe à $-81,7 \pm 3,9\%$ (N=13). Ainsi, les études de Patch-Clamp ont montré que ce composé III.9 ne modulait que très peu le courant ionique dépendant du canal SK3, à hauteur de $-15,7 \pm 5,8\%$ (Figure III. 15).

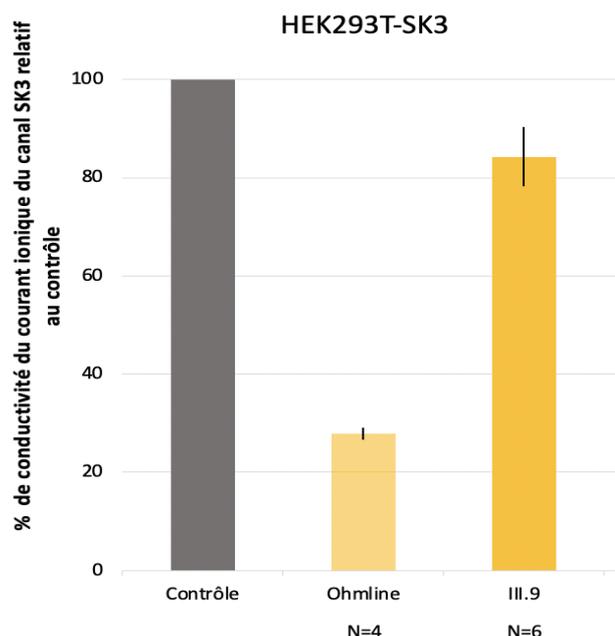


Figure III. 15: Études par patch-clamp de l'analogue III.9 et comparaison avec la modulation induite par l'Ohmline. Concentration des composés : 10 μ M.

Pour cette étude, le composé **III.9** n'a subi aucune irradiation lumineuse et se trouve donc sous sa configuration *E*. En termes de polarité, le *trans*-isomère est le diastéréoisomère qui possède au niveau du motif azobenzène la polarité la plus faible en comparaison à son isomère *cis* et qui se rapproche le plus de celle de l'Ohmline. Étant donné que ce composé *trans* a un très faible effet inhibiteur des canaux SK3, nous faisons l'hypothèse que son diastéréoisomère *Z*, beaucoup plus polaire au niveau du motif azobenzène, devrait être encore moins actif. C'est pourquoi nous n'avons pas entrepris l'isomérisation du composé *E* puisqu'une très faible inhibition du courant ionique a été observée avec ce composé. C'est également pour cela que les études de migration cellulaire n'ont pas été effectuées avec ce composé.

Pour expliquer l'absence de modulation des canaux SK3 par **III.9**, nous faisons l'hypothèse que le motif azobenzène placé directement au niveau du motif glycérol, perturbe l'interaction de ce composé avec les composés amphiphiles des membranes conduisant à une absence d'effet sur les canaux SK3.

Ce résultat nous a incité à synthétiser d'autres analogues où le fragment photo-isomérisable serait positionné en bout de chaîne lipidique. Selon cette nouvelle stratégie, le choix de la longueur de la chaîne lipidique entre le motif glycérol et le motif azobenzène n'était pas évident. Pour cette raison, nous avons entrepris la synthèse de plusieurs composés analogues dans lesquels la partie lipidique comporte soit 6, 8 ou 11 atomes de carbone (Figure III. 16).

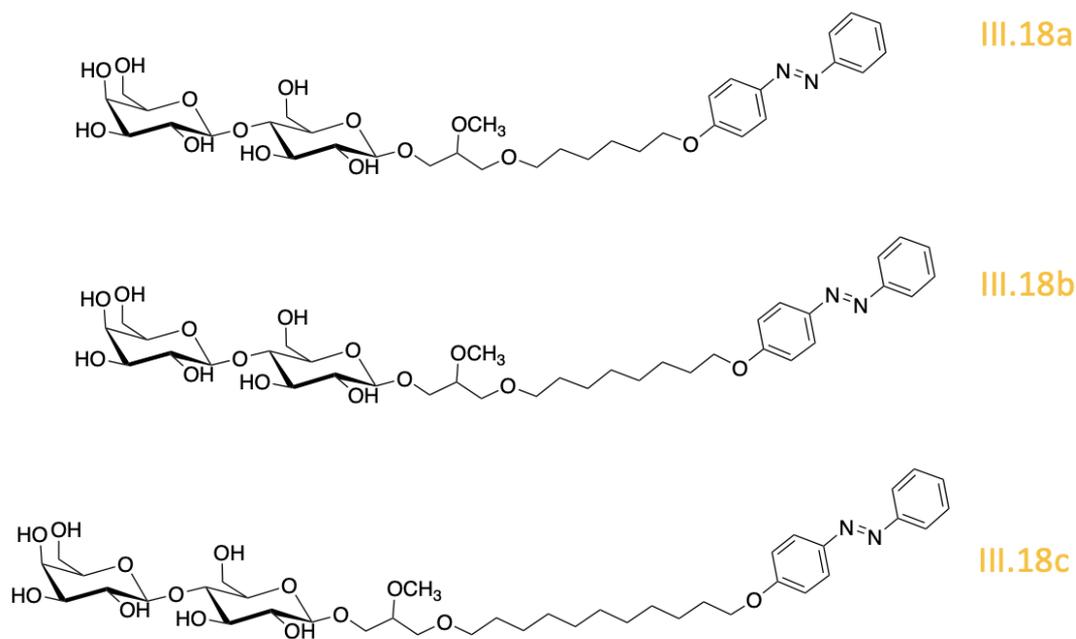


Figure III. 16: Structure des trois analogues de l'Ohmline possédant un motif azobenzène en bout de chaîne lipidiques, dont la longueur a été modifiée avec 6, 8 et 11 carbones.

IV - Modification de la position du motif azobenzène – synthèse de nouveaux analogues (Figure III. 17).

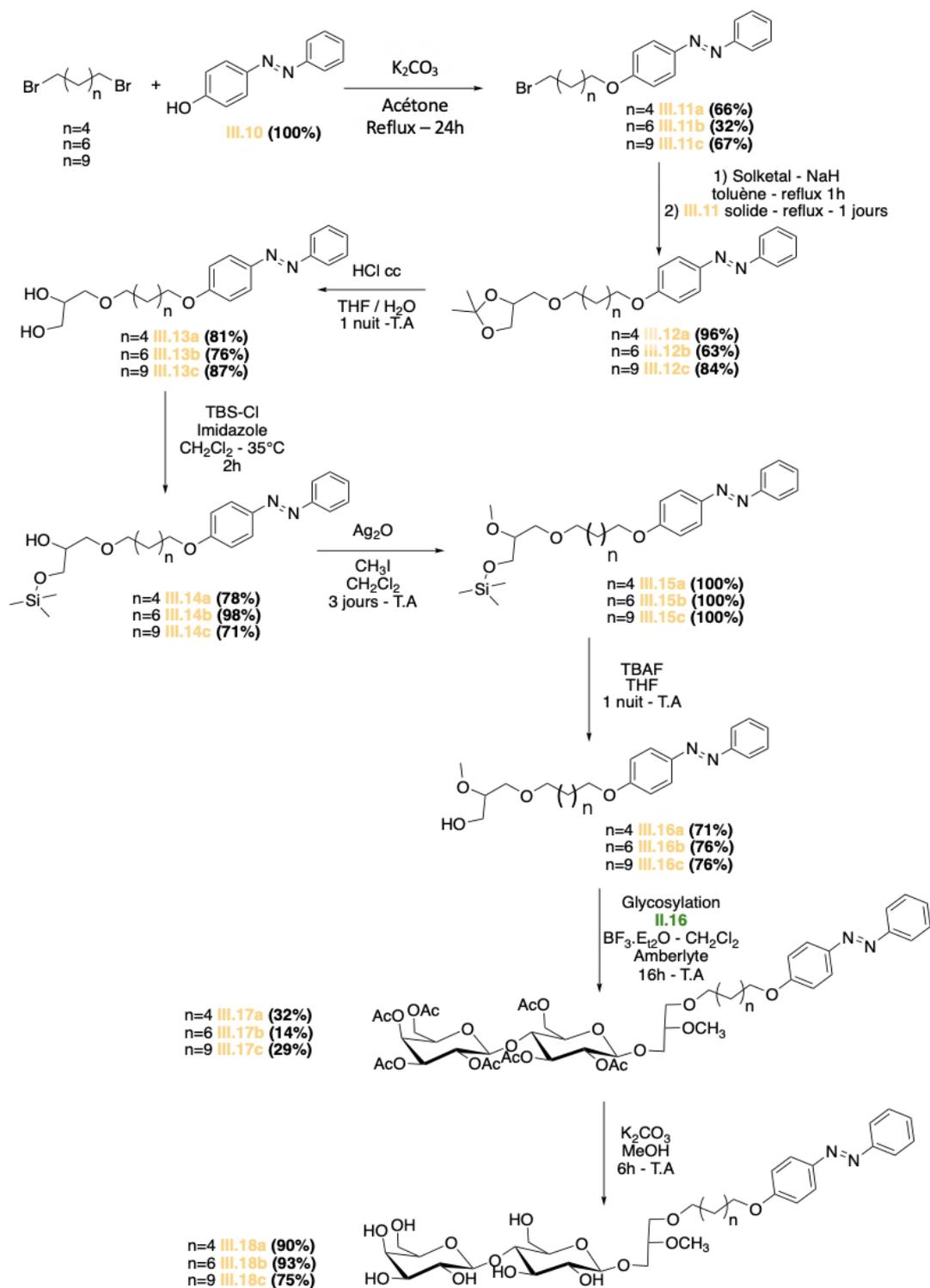


Figure III. 17: Synthèses réactionnelles des nouveaux analogues "photoswitchables" de l'Ohmline III.18a-c.

Pour cela, le motif bis(phényl)diazène III.10 a été, dans un premier temps, synthétisé en respectant la même procédure que pour le composé 4-((4'-tétradécylphényl)diazényl)phénol et a été obtenu de façon quantitative (Figure III. 12).

Pour l'insertion de la chaîne lipidique, nous nous sommes inspirés des travaux de Lin et *al.* qui utilisent les dérivés dibromés¹⁷³. Dans notre cas, nous avons utilisé les précurseurs 1,6-dibromohexane, 1,8-dibromooctane et 1,11-dibromoundecane pour nos synthèses. Ainsi, les composés III.11a-c ont été obtenus *via* une SN₂ du phénolate du motif azobenzène III.10, formé par le carbonate de potassium, sur chacun des précurseurs dibromés. Une nouvelle substitution nucléophile de type 2 a été effectuée entre l'alcoolate nucléophile du solkétal, formé grâce à l'utilisation de l'hydruire de sodium, et les dérivés III.11a-c, afin de former les composés III.12a-c correspondants. La suite de la synthèse est identique à celle réalisée pour l'obtention du composé III.9. L'alcool primaire du diol des composés III.13a-c, après déprotection de la fonction acétal par de l'HCl concentré (composés III.12a-c), a été protégé par le chlorure du *tert*-butyldiméthylsilane (composés III.14a-c) afin de réaliser la méthylation de l'alcool secondaire en position *sn*-2 par l'iodométhane en présence d'oxyde d'argent (III.15a-c). L'alcool primaire a ensuite été déprotégé par le TBAF ce qui a permis l'obtention des composés aglycones III.16a-c. Les composés III.17a-c ont pu être obtenus suite à la réaction de glycosylation entre les 3 blocs aglycones III.16a-c et la tête polaire dissaccharidique II.16. Les trois produits finaux III.18a-c ont été obtenus suite à la déprotection des fonctions hydroxyles du lactose par le carbonate de potassium dans du méthanol. D'après les analyses RMN, tous nos composés III.18a-c y compris le composé III.9 sont de configuration exclusive β (Figure III. 18). Les déplacements chimiques, pour chacun des composés, de la position anomérique sont compris entre 102.8 et 103.9 ppm, déplacements caractéristiques de l'anomère β .

¹⁷³ C.-G. Lin, W. Chen, S. Omwoma, Y.-F. Song, *J. Mater. Chem. C* **2015**, 3, 15–18.

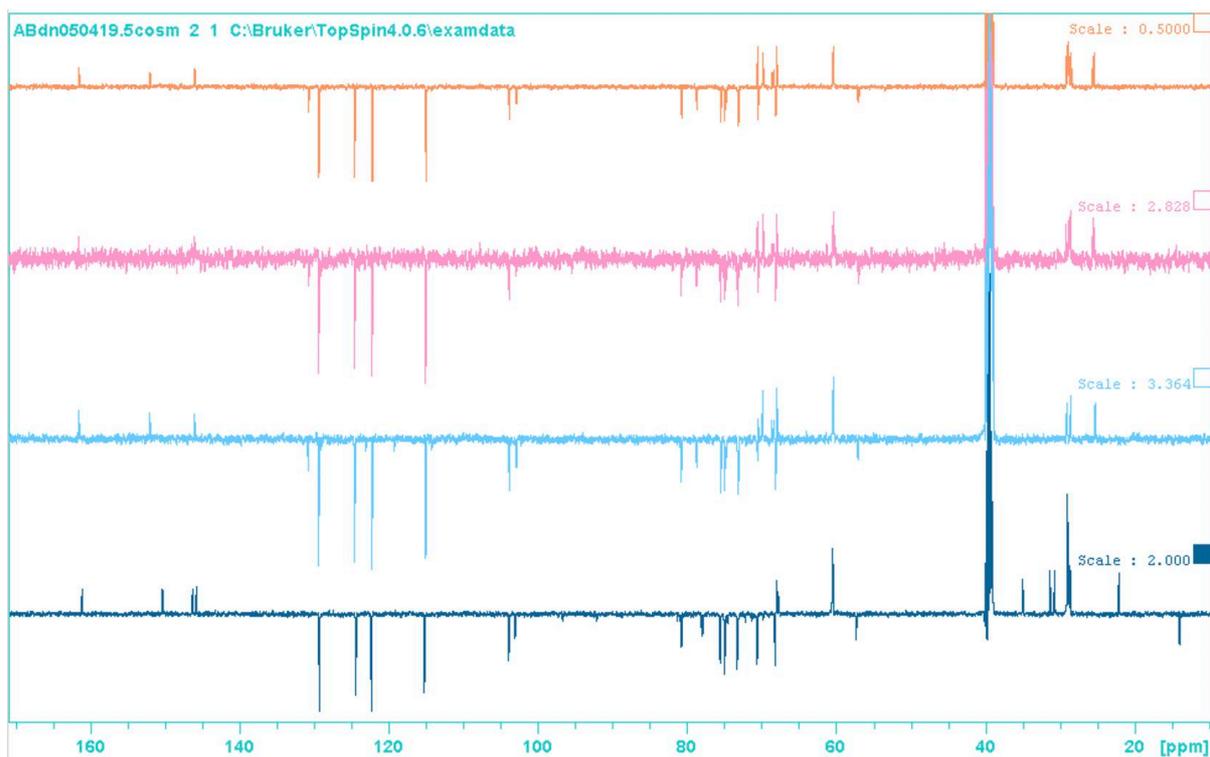


Figure III. 18: Spectre RMN des composés : III.9; III.17a (n=6); III.17b (n=8) et III.17c (n=11), tous de configuration exclusive β .

IV.1 Études des composés III.18a-c sur l'inhibition du canal SK3

En comparaison au composé III.9, les trois nouveaux analogues III.18a-c où le motif photo-isomérisable a été placé en bout de chaîne lipidique, ce sont avérés être des modulateurs efficaces envers l'inhibition de l'activité du canal SK3. En effet, les composés III.18a-c inhibent respectivement le courant ionique dépendant du canal SK3 à hauteur de -85.3 % (n=6), $-92,0 \pm 1,07\%$ (n=8) et $-78,4 \pm 4,8\%$ (n=11) (Figure III. 19). Ces résultats suggèrent que la chaîne lipidique, outre la longueur de la chaîne, peut subir des modifications et permettre une modulation plus importante vis-à-vis de l'activité du canal SK3. Ces résultats laissent donc entrevoir de nouvelles possibilités de synthèses de nouveaux analogues de l'Ohmlin.

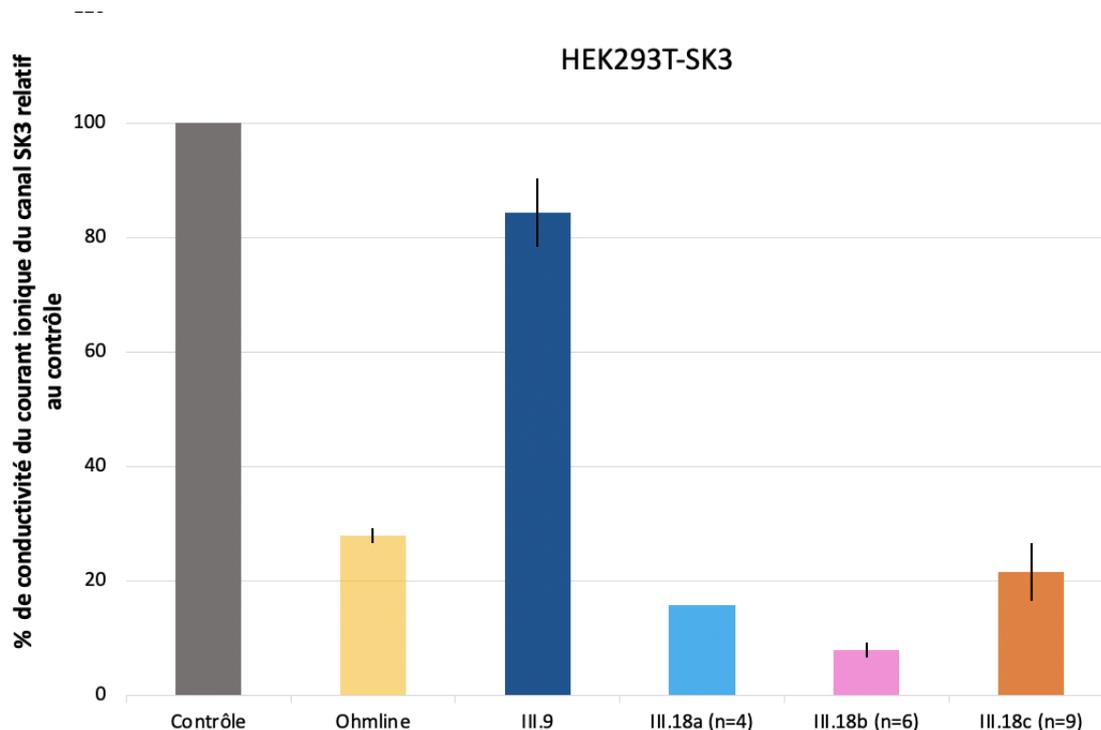


Figure III. 19: Mesures de Patch-Clamp des composés III.18a-c, III.9, et l'Ohmline.

Cependant, des études de sélectivité doivent encore être réalisées afin de connaître l'effet de ces nouveaux composés sur les isoformes du canal SK3. De plus, il serait intéressant de mesurer également l'évolution de la concentration calcique cytosolique, qui, en présence d'un inhibiteur de SK3, doit faire apparaître une diminution de la concentration.

Par la suite, nous avons entrepris des études spectroscopiques (RMN, analyses UV) notamment sur le composé III.18c (n=11) afin d'en savoir un peu plus sur le profil de nos composés et sur la présence ou non des deux isomères géométriques. En effet, parmi les molécules possédant un motif azobenzène, celles-ci se retrouvent majoritairement sous leur forme thermodynamiquement la plus stable à savoir l'isomère *trans* (ou *E*). Cependant, la lumière naturelle est susceptible d'entraîner la formation en petites quantités de l'isomère *cis*. Cette étude a été réalisée par RMN ^1H et Jmod d'un échantillon fraîchement synthétisé. Dans un second temps, nous avons également réalisé le même type de quantification, mais après différents temps d'irradiation. Nous avons également effectué un suivi cinétique afin d'avoir une idée du temps de photo-réversion de notre composé III.18c.

IV.2 Études RMN du composé III.18c et quantification du pourcentage d'isomères Z/E

Pour les études sur le composé III.18c (n=11), 2.7mg de composé (MW=780.90 g/mol) ont été dissous dans 1.5 mL de DMSO-d6 soit $C_{III.17c} = 2.31$ mM. 700 μ L ont ensuite été prélevés puis déposés dans un tube RMN. Le tube a été placé entre deux lampes UV (puissance de 18W), dont la longueur d'onde est de 370 nm, avec une distance de positionnement entre les deux lampes < 0.5 cm, puis irradié à différents temps (15 minutes, 1 heure et 21h). Le tube a ensuite été étudié par RMN (400 ou 500 MHz) directement après chaque irradiation.

IV.2.1 RMN 1H du dérivé III.18c (Figure III. 20 et Figure III. 21)

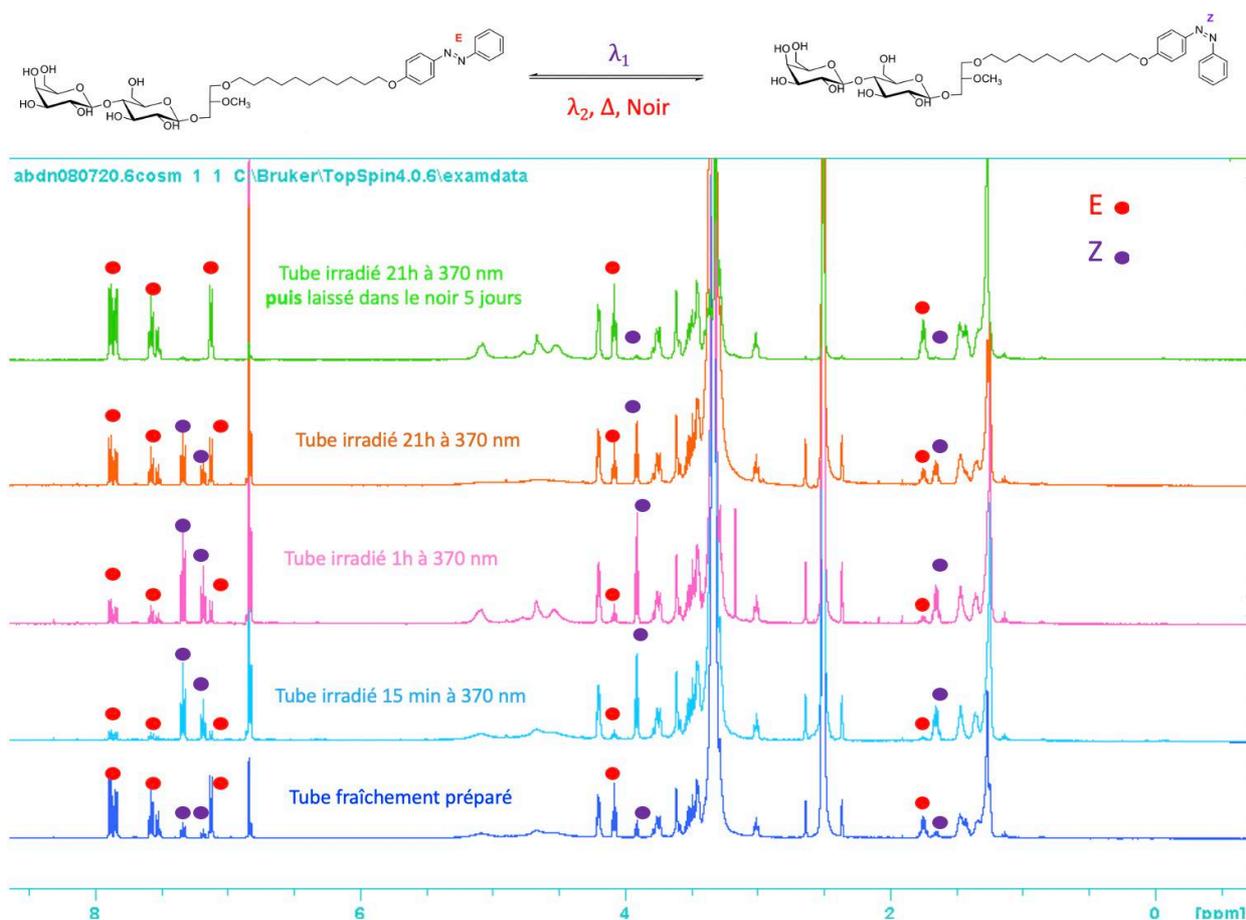


Figure III. 20: RMN 1H du composé III.18c après différents temps d'irradiation UV.

Ainsi, par le biais des signaux RMN, il est possible de distinguer, sans ambiguïté, la présence des deux isomères *cis* / *trans* dans l'échantillon en solution (point violet isomère *cis* (**Z**) et point rouge, isomère *trans* (**E**)). Le spectre de l'échantillon fraîchement préparé indique la présence en solution des deux isomères géométriques, avec le diastéréoisomère *trans*, produit thermodynamiquement majoritaire. L'irradiation pendant 15 minutes de l'échantillon, montre toujours la présence du composé *trans* mais cette fois-ci, en proportion minoritaire. Ce même échantillon a ensuite été irradié pendant une durée de 21h, puis aussitôt analysé. On s'attendait à visualiser de façon largement majoritaire, si ce n'est uniquement, le composé *cis* après un temps d'irradiation aussi long. Cependant, on peut constater que le *trans*-isomère est bien présent. Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2, un chauffage important peut-être à l'origine de la photo-réversion *cis* → *trans*. Dans notre cas, la présence en quantité importante de l'isomère *trans* peut, peut-être, s'expliquer par la chaleur dégagée par les lampes après un temps de fonctionnement aussi long qui aurait eu pour conséquence une augmentation de la température de notre échantillon. En effet, le tube RMN se trouvait à une distance $d < 0.5$ cm pendant toute la durée de l'irradiation, il était donc chaud lorsqu'il a été récupéré pour être analysé. Cette hypothèse pourrait justifier la présence de l'isomère *trans* malgré le temps d'irradiation long.

Ce même tube a ensuite été laissé dans le noir complet pendant 5 jours puis analysé. On remarque que la photo-conversion a bien eu lieu car la forme *trans* est majoritaire. Ainsi, on peut constater que lorsque l'échantillon est laissé dans le noir, ce dernier contient un pourcentage d'isomère *trans* plus important que dans celui qui vient seulement d'être préparé. Cette différence pourrait être attribuée à la lumière naturelle qui isomérisé partiellement l'isomère *E*.

Le zoom du spectre ^1H présent à la [Figure III. 21](#) permet de visualiser plus facilement les déplacements respectifs des deux isomères.

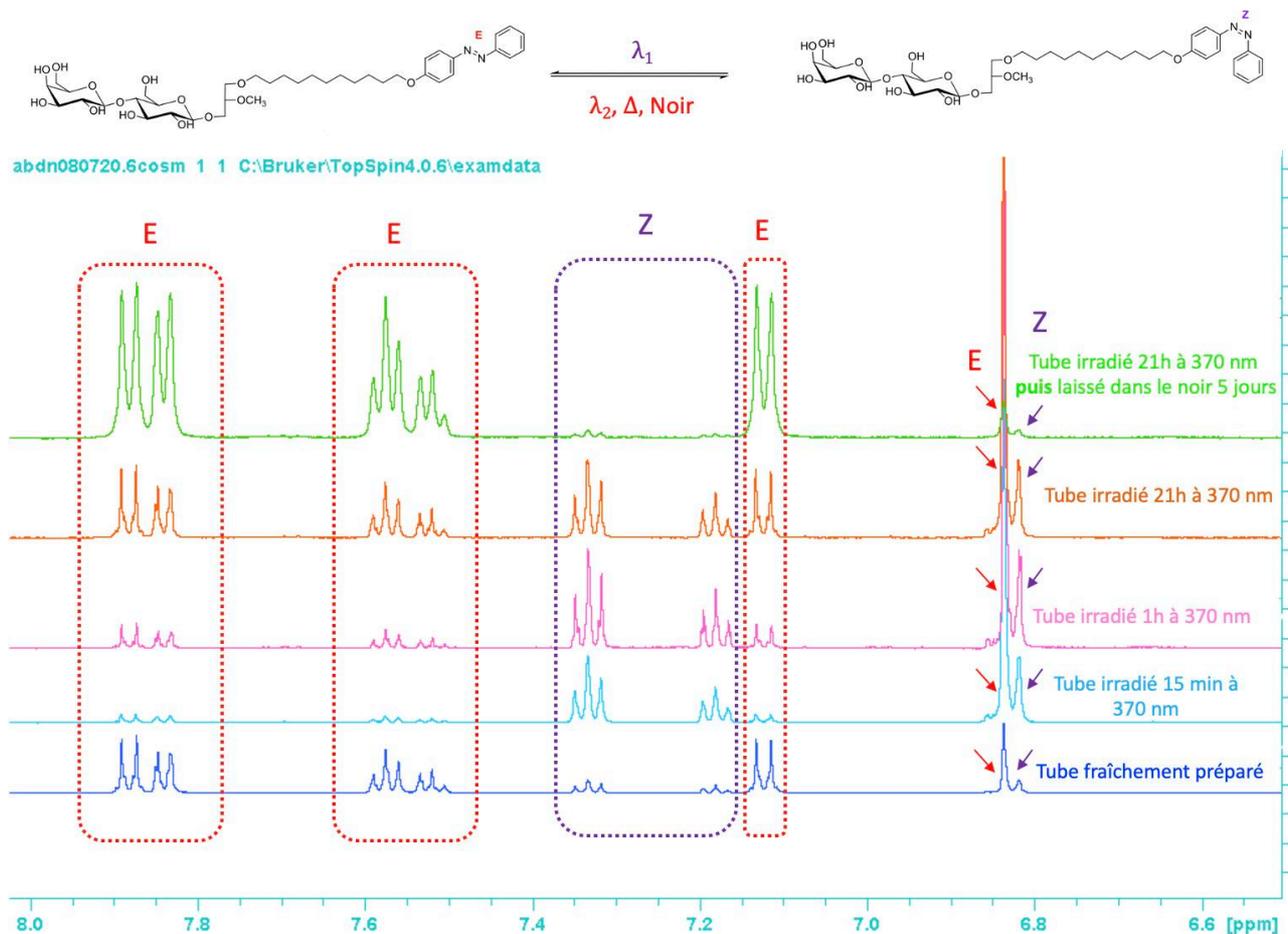


Figure III. 21: Zoom du spectre RMN ^1H du composé III.18c correspondant au déplacement chimique du dérivé azobenzène.

IV.2.2 Quantification du pourcentage d'isomères Z/E

Nous avons ensuite quantifié, grâce à l'intégration des protons, le pourcentage des 2 isomères présent dans l'échantillon, et ce, pour chacune des conditions réalisées. Les résultats sont présentés dans la Figure III. 22.

Ainsi, lorsque l'échantillon est fraîchement préparé, les deux isomères coexistent en solution. L'isomère *trans*, produit thermodynamiquement, est majoritaire avec 72,4% du mélange, contre 27,6% pour l'isomère *cis*. Après une irradiation de 15 minutes, la forme *cis* devient majoritaire à hauteur de 81,1% tandis qu'après une heure d'irradiation, un pourcentage équivalent de ce même isomère est observé, avec une valeur moyenne de

79,2%. On peut donc conclure que dans ces conditions d'expérience le taux maximal d'isomérisation, pour le composé III.18c, peut être obtenu après 15 minutes d'irradiation.

Moyenne %E avant irradiation	Moyenne %Z avant irradiation
72,4%	27,6%
Moyenne %E après 15 min irradiation	Moyenne %Z après 15 min irradiation
18,9%	81,1%
Moyenne %E après 60 min irradiation	Moyenne %Z après 60 min irradiation
20,8%	79,2%
Moyenne %E après 21h min irradiation	Moyenne %Z après 21h min irradiation
43,8%	56,2%
Moyenne %E après 21h min irradiation et laissé dans le noir 5 jours	Moyenne %Z après 21h min irradiation et laissé dans le noir 5 jours
87,1%	12,9%

Figure III. 22: pourcentage d'isomères Z/E obtenus grâce aux spectres RMN ^1H du composé III.18c, pour les différentes conditions d'irradiations.

Comme énoncé plus haut, après 21h d'irradiation, le pourcentage du *trans*-isomère est relativement important, avec une moyenne de présence en solution de 43,8%, contre 56,2% pour l'isomère *cis*. Ces résultats sont contradictoires avec ceux précédemment obtenus pour des temps d'irradiation plus courts. On s'attendait notamment à avoir un pourcentage d'isomère *trans* $\leq 20\%$, comme ceux obtenus après 15 minutes et 1 heure d'irradiation. La seule hypothèse qui pourrait justifier ce résultat serait une puissance des lampes trop importante pour la petite surface correspondant au tube RMN, (dont le diamètre est de 5 mm) et qui aurait généré un échauffement de la solution conduisant à un « équilibre » entre les deux formes en solution. Ce même tube a ensuite été laissé dans le noir pendant 5 jours et la photo-réversion a bien eu lieu, avec un pourcentage d'isomère *trans* plus important que celui de la solution fraîchement préparé, avec des valeurs respectives de 87,1% et 72,4%.

IV.2.3 Spectre RMN Jmod du composé III.18c

Les spectres ^{13}C Jmod, pour chacune des conditions d'irradiation, permettent également de visualiser, de façon distincte, la présence des deux isomères en solution (Figure III. 23). On remarque que les signaux présents vers 114, 119 et 127 ppm s'avèrent être des marqueurs caractéristiques de la présence de l'isomère dans l'échantillon.

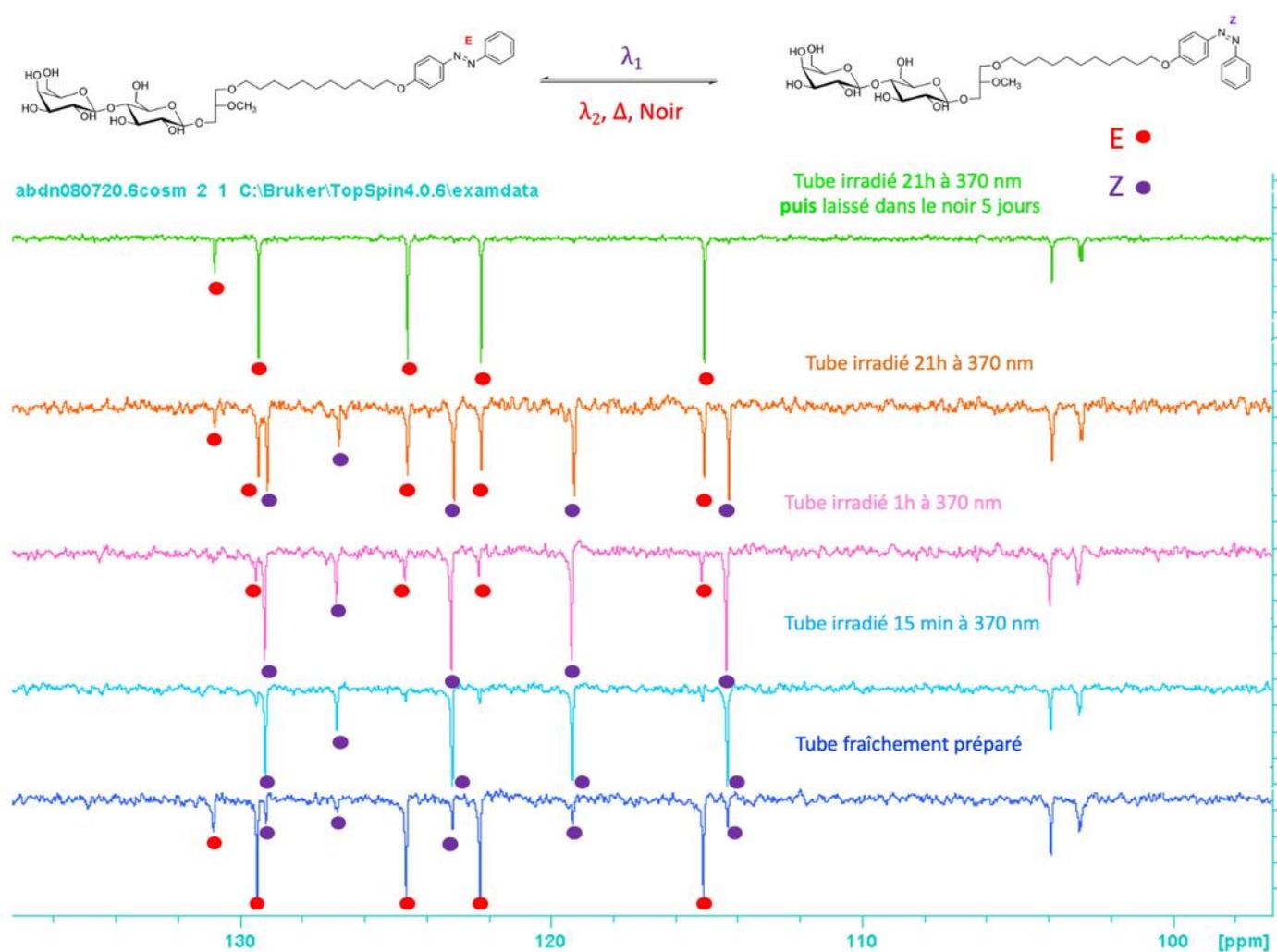


Figure III. 23: Spectres jmod obtenus pour le composé III.18c après les différentes conditions d'irradiations.

V - Étude de la photo-isomérisation du composé III.18c

V.1 Étude du temps d'isomérisation minimale pour une conversion *cis* maximale

Afin d'avoir une idée du temps minimal d'irradiation nécessaire à une conversion maximale de l'isomère *trans* en isomère *cis*, des études de spectroscopie UV-Visible ont été réalisées avec le composé III.18c à différents temps d'irradiation. Pour cela, le composé a été dissous dans du DMSO afin d'obtenir une concentration finale de 50 μM , puis l'échantillon a été placé sous une lampe UV à différents temps d'irradiation puis analysé (Figure III.24) (λ de la lampe UV : 370 nm). Un spectre d'absorbance du composé en solution, avant sa première irradiation a été réalisé afin de déterminer sa longueur d'onde maximale d'absorption. Celle-ci était de 353nm. Toutes les différentes études ont donc été effectuée à cette longueur

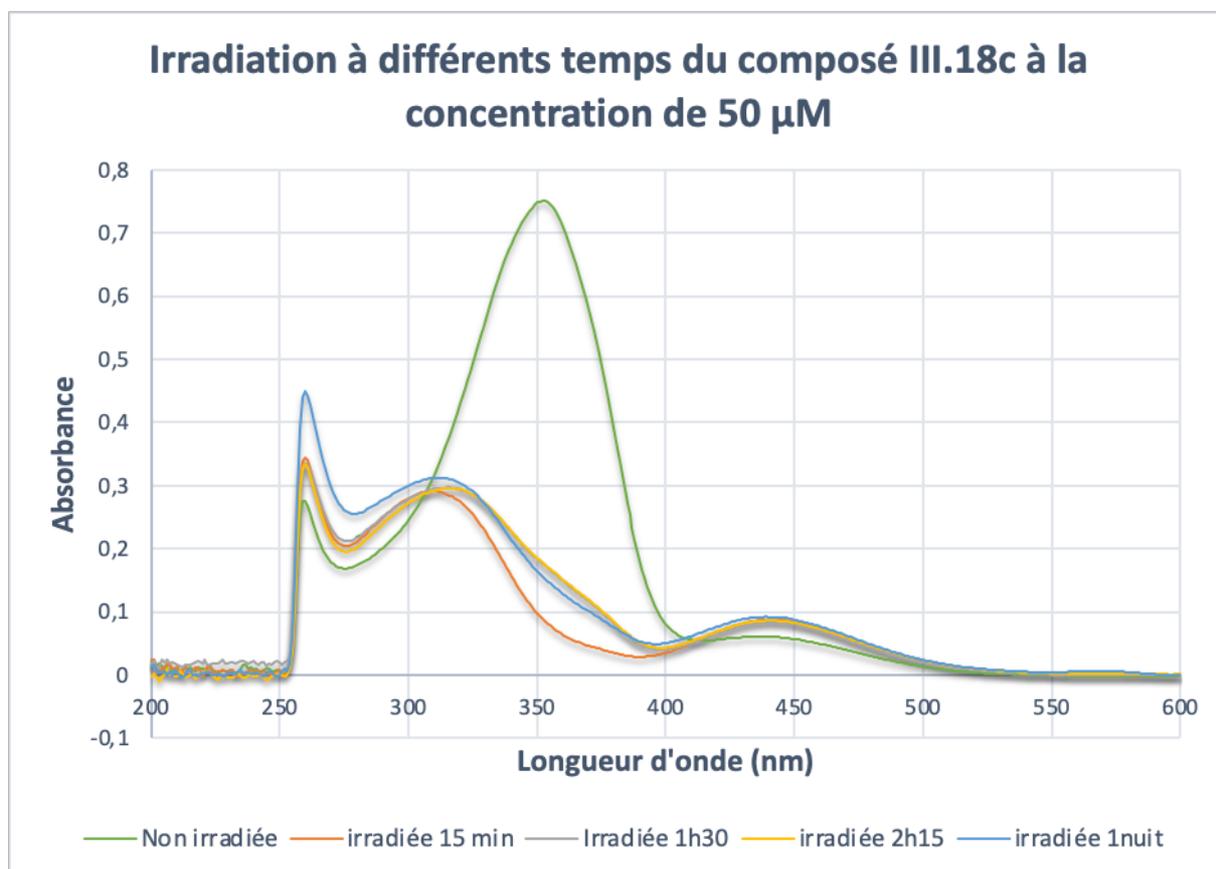


Figure III. 24: Études spectroscopiques du composé III.18c après différents temps d'irradiation.

d'onde.

Le composé fraîchement préparé, sans aucune irradiation préalable, est caractérisé par une large bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ très intense, dont l'absorbance maximale de 0,75. Sa deuxième bande d'absorption, correspondant à la transition $n \rightarrow \pi^*$ est beaucoup plus faible avec une absorbance maximale de 0,06.

Après une irradiation de 15 minutes, 1h30, 2h15 ou bien une nuit, on constate un shift de la longueur d'onde maximale d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$, dans le domaine du visible, à 310 nm ainsi qu'une diminution de son intensité, et dont la valeur de l'absorbance est d'environ 0,29. De plus, on constate que les bandes d'absorptions à 446 nm, correspondant à l'état de transition $n \rightarrow \pi^*$, augmentent après irradiation.

On peut également constater qu'une irradiation de 15 minutes est suffisante pour isomériser efficacement le composé III.18c.

V.2 Comportement à la lumière naturelle du composé III.18c (Figure III. 25)

Par la suite, nous avons étudié le comportement du composé III.18c laissé à la lumière naturelle. Pour cela, une nouvelle solution du composé III.18c, solubilisé dans du DMSO pour atteindre une concentration de 50 μM a été préparée. La solution est ensuite laissée sur la paillasse sèche une journée puis analysée.

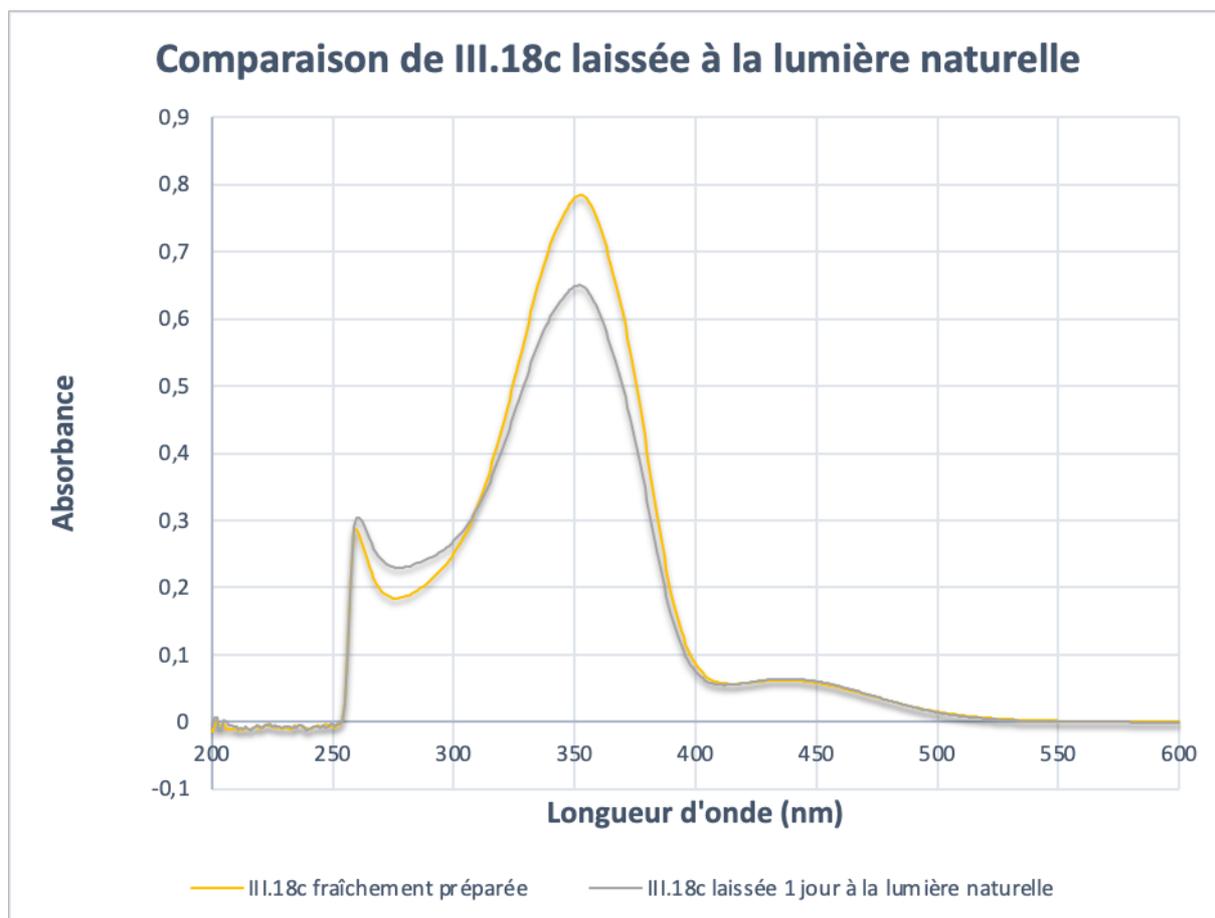


Figure III. 25: Comportement à la lumière naturelle du composé III.18c.

On remarque que la bande d'absorption maximale du composé III.18c préparée correspondant à la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ diminue après être resté une journée au contact de la lumière naturelle (spectre gris). Les valeurs sont de 0.77 et 0.64 respectivement pour le composé III.18c tout juste préparé et celui laissé au contact de la lumière naturelle. On observe également que la bande d'absorption $n \rightarrow \pi^*$ augmente légèrement. Ces résultats indiquent que notre composé III.18c est capable de s'isomériser lorsqu'il reste en contact prolongé avec la lumière naturelle.

V.3 Comportement du composé III.18c laissé dans le noir après 1 nuit d'irradiation (Figure III. 26).

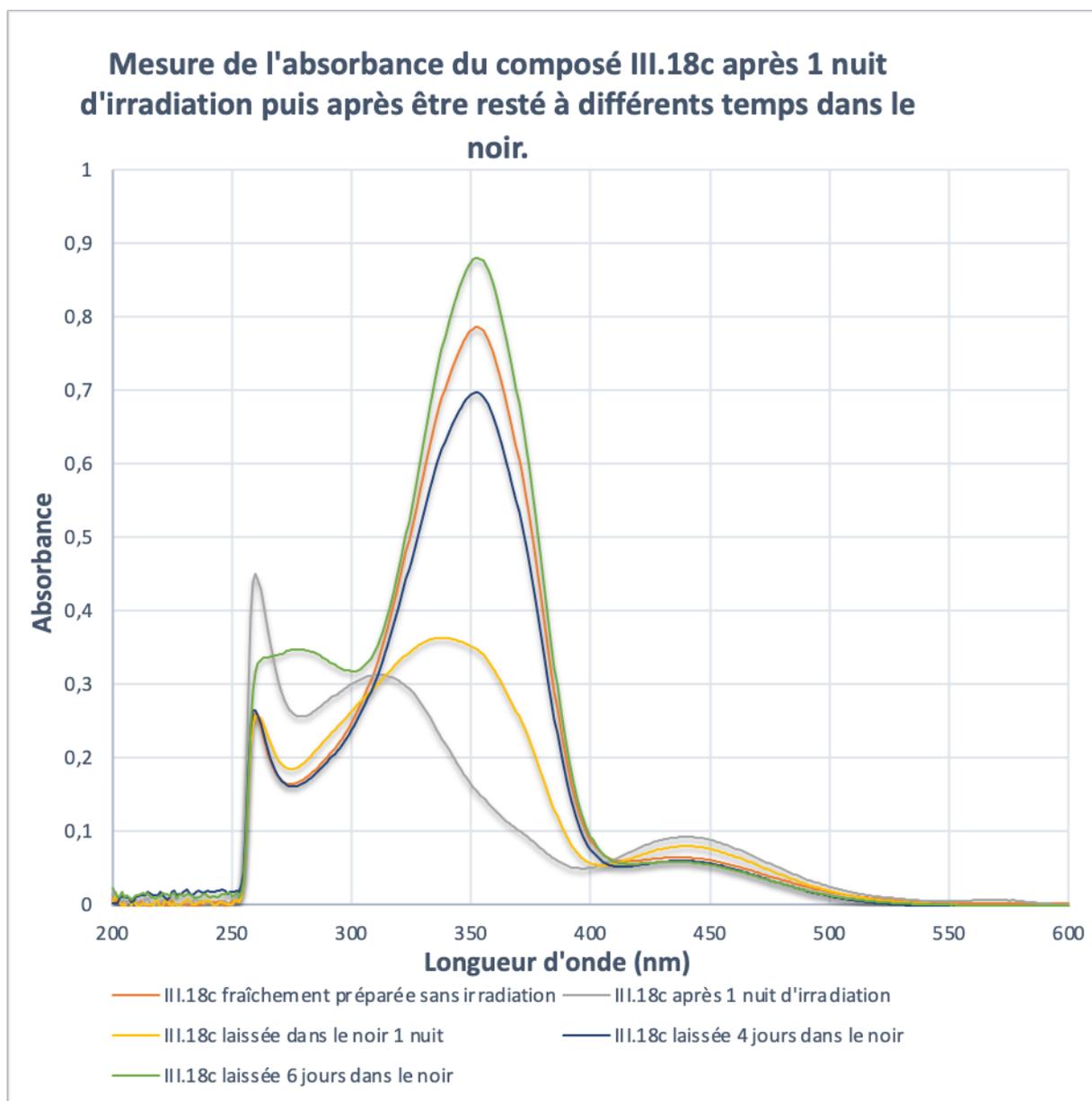


Figure III. 26: Spectres UV-Visible du composé III.18c après une nuit d'irradiation puis laissé à différents temps dans le noir.

Lorsque le composé III.18c est irradié (courbe grise), le même constat que la V-1 (Figure III.26) peut être fait. On remarque un décalage de la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ à de plus faible longueur

d'onde (309 nm) ainsi qu'une diminution de l'absorbance de 0.78 à 0.29. Une augmentation de la bande $n \rightarrow \pi^*$ est également constatée signe que la *trans* \rightarrow *cis* isomérisation a eu lieu. L'isomérisation réalisée, le composé III.18c a été laissée dans le noir complet pendant une nuit, 4 jours et enfin 6 jours.

Après une nuit (courbe jaune), un shift de la longueur d'onde d'absorption (de 309 nm à 344 nm) correspondant à la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ est observé. L'absorbance de la bande $n \rightarrow \pi^*$ décroît également, signe que la photo-réversion *cis* \rightarrow *trans* est en cours.

Après 4 jours (courbe bleu foncé), l'absorbance de la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ augmente significativement avec une valeur de 0.68 tandis que celle de la bande $n \rightarrow \pi^*$ continue de diminuer. La photo-réversion est donc toujours en cours même après 4 jours dans le noir.

Après 6 jours (courbe verte), l'absorbance de la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ est devenue plus élevée que celle de la solution initiale tout juste préparée (courbe orange) avec des valeurs respectives de 0.86 et 0.77. On peut conclure que lorsqu'un composé à base d'azobenzène est laissé dans le noir, l'isomère *trans* devient « quasiment » exclusif d'une part, et que la cinétique du composé III.18c est, dans notre cas, extrêmement lente.

C'est pourquoi, nous avons par la suite, réalisée un suivi cinétique du composé III.18c pour tenter de déterminer son temps de photo-réversion *cis* \rightarrow *trans* après irradiation.

V.4 Étude de la cinétique de photo-réversion du composé III.18c (Figure III. 27)

Après une 1h30 d'irradiation, le composé III.18c a été analysé par spectroscopie UV-Visible pendant 3 jours afin de réaliser un suivi cinétique de sa photo-réversion *cis* \rightarrow *trans*. Nous nous sommes inspirés des études de Gorostiza *et al.* qui étudient la cinétique de retour d'un photo-commutateur à base de glutamate qui modifie de manière covalente des protéines cibles¹⁷⁴.

¹⁷⁴ P. Gorostiza, M. Volgraf, R. Numano, S. Szobota, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 10865–10870.

Dans notre cas, même après trois jours, la photo-réversion n'est pas totale, la cinétique de retour du composé III.18c est donc extrêmement lente dans ces conditions d'expérience (T° ((25°C), concentration (50 μ M), solvant (DMSO) et de l'ordre de plusieurs jours comme nous avons pu le constater lors des études RMN (Figure III. 21).

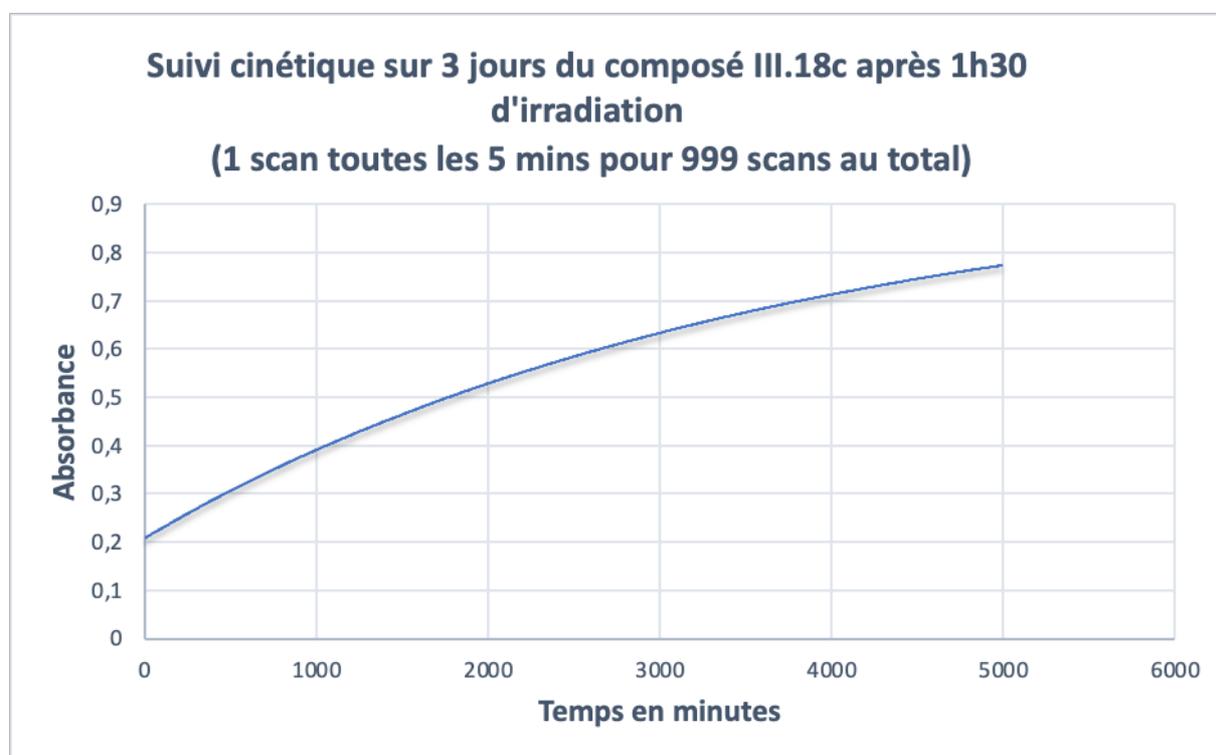


Figure III. 27: Suivi cinétique du composé III.18c.

Le fait d'avoir une cinétique de photo-réversion extrêmement lente du composé III.18c est une caractéristique intéressante pour la réalisation des tests biologiques avec le second isomère (composé Z) (patch-clamp et migration cellulaire). Compte tenu de ces résultats, nous pouvons donc envisager d'irradier le composé entre 15 et 60 minutes pour obtenir majoritairement le composé Z. Le temps de l'analyse par patch clamp (10 à 20 minutes) permettra de mesurer l'influence du composé Z sur le courant SK3. Ces études sont actuellement en cours. Notre hypothèse est que le composé Z beaucoup plus polaire au niveau de la partie lipidique pourrait ne pas s'intégrer à la membrane plasmique et donc n'avoir aucun effet sur les canaux ioniques SK3, ou alors s'y insérer mais ne pas développer les mêmes interactions supramoléculaires et ainsi limiter l'action sur les canaux SK3.

VI - Conclusion

Dans ce chapitre, 4 analogues de l'Ohmlin possédant un motif azobenzène au sein de la structure ont été synthétisés. Trois d'entre eux se sont avérés être de très bons inhibiteurs *vis-à-vis* de l'activité du canal SK3. Il s'agit à notre connaissance des trois premiers composés amphiphiles comportant un motif azobenzène qui s'avèrent être de puissants inhibiteurs des canaux SK3. Cependant, les études de sélectivité doivent encore être menées tout comme l'effet de l'isomérisation sur la modulation de l'activité des canaux SK3.

Les trois composés actifs possèdent le fragment azobenzène positionné en bout de chaîne lipidique. Ces travaux suggèrent que la modification de la chaîne lipidique à proximité immédiate de la partie glycérol est susceptible de réduire voire, comme pour le composé III.9, d'entraîner une perte totale de l'action d'inhibition des canaux SK3. À l'inverse, la fonctionnalisation de la chaîne lipidique en position ω (bout de la chaîne), ne perturbe pas, voire améliore l'effet de la modulation des canaux SK3. Ce résultat ouvre de nombreuses possibilités de modulation de la chaîne lipidique avec, par exemple, des composés aromatiques qui pourraient, d'une part, moduler l'effet du composé sur les propriétés biophysiques de la membrane, et d'autre part, générer des interactions spécifiques avec certains acides aminés présents dans la structure des protéines membranaires. Par ailleurs, la modification du motif azobenzène par des groupements électrodonneurs et/ou électroattracteurs serait susceptible de moduler la dynamique de l'isomérisation.

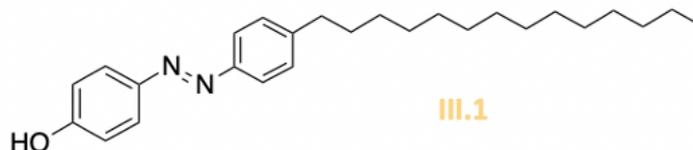
Des études RMN et UV-Visible sur le composé III.18c ont été entreprises et ont montré qu'une conversion « quasi-totale » en isomère *cis* peut être obtenue après seulement 15 minutes d'irradiation. La cinétique de retour de ce composé a également été étudiée et a montré que ce composé possède une cinétique de photo-réversion extrêmement lente de l'ordre de plusieurs jours.

Cette cinétique lente devrait faciliter l'étape d'évaluation de l'isomère *Z* pour la modulation des canaux SK3. Nous faisons l'hypothèse que l'isomère *Z* ne devrait pas avoir d'effet compte tenu de la polarité élevée de ce stéréoisomère qui devrait rendre plus difficile l'ancrage lipidique du composé dans la bicouche. Si tel était la conclusion de ces expériences en cours, nous aurions bien accès à un composé doté d'un interrupteur moléculaire

conduisant à générer un composé inhibiteur des canaux SK3 sous sa forme *E* et inactif sous sa forme *Z*.

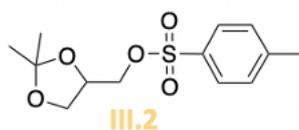
Experimental section

4-tetradecyl-(4'-hydroxy)azobenzene III.1



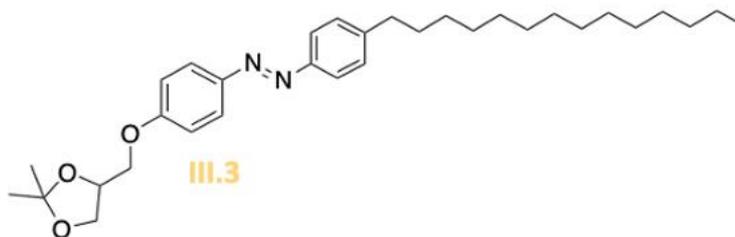
Concentrated HCl 37% (4.2 mL, 50.4 mmol, 3.6 Eq.) was added to the mixture of tetradecylaniline (4.00 g, 13.8 mmol, 1 Eq.), previously diluted in a mixture of 23 mL of acetone and 7 mL of water, and stirred during 30 minutes at room temperature. The mixture was cooled with an ice-bath until 0°C and sodium nitrite (960 mg, 13.8 mmol, 1 Eq.), previously diluted in 10 mL of water, was added slowly into the tetradecylbenzeneaminium chloride. The mixture was stirred at 0°C during 1h30. The solution turned pale yellow. In a second bottom flask, sodium carbonate (3.12 g, 27.6 mmol, 2 Eq.) and sodium hydroxide (1.10 g, 27.6 mmol, 2 Eq.) were added at 0°C, into a phenol (2.60 g, 27.6 mmol, 2 Eq.) previously diluted in 20 mL of water. The mixture was stirred during 1h00 at 0°C. Then, the benzenediazonium salt was added dropwise in the phenolate solution always at 0°C (the pH of the solution was between 5-6 after the addition of the salt). The solution turned dark orange and the mixture was stirred during one night between 0-5°C thanks to a cryostat. The mixture was extract with ethyl acetate and the organic phase was dried over MgSO₄ and the crude compound was purified thanks to a kugelrohr (80°C – 2,5.10⁻² mbar) to obtained compound III.1 as orange crystals in 89% yield (4.8g). Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (9/1)): 0.22; Melting point: 90-91°C; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ (ppm) 7.85 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.4 Hz); 7.79 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.0 Hz); 7.29 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.4 Hz); 6.93 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.8 Hz); 5.30 (1H, OH); 2.66 (t, 2H, CH₂ α azo, J_{HH}= 7.6 Hz); 1.63 (m, 4H, CH₂ β and γ fatty chain); 1.31 (m, 26H, CH₂ fatty chain); 0.88 (t, 3H, CH₃ fatty chain, J_{HH}= 6.8 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): δ (ppm) 158.3-146.12 C_q, 129.23, 124.96, 122.71, 115.94 (CH azo); 129.4 (C_q); 36.03, 32.09, 31.49, 29.83, 29.66, 29.53, 29.5, 22.86 (Ch fatty chain); 14.3 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 394.298 found [M+H]⁺ 395.393.

(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl-4-methylbenzenesulfonate III.2



NaH (1.0 g, 41.6 mmol, 1.1 Eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 10 mL of anhydrous THF were added. Solketal (5 g, 4.7 mL, 37.8 mmol, 1 Eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Tosyle chloride (8.7 g, 45.4 mmol, 1.2 Eq.) was slowly added without solvent and the mixture was stirred one night at room temperature. The reaction was quenched by few mL of MeOH and sodium hydrogenocarbonate. The organic phase was washed with water and brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to give the crude compound **III.2** as a clear yellow oil in 86% yield (9.3g) and was used in the next step without further purification. Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (8/2)): 0.3; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.81 (d, 1H, H_{ar} , J_{HH} = 8.2 Hz); 7.31 (d, 2H, H_{ar} , J_{HH} = 8.2 Hz); 4.24 (m, 1H, *sn*-2); 3.95 (m, 3H, *sn*-1 + *sn*-3b); 1.55 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ O); 1.33 (s, 3H, CH_3 solketal); 1.30 (s, 3H, CH_3 solketal).

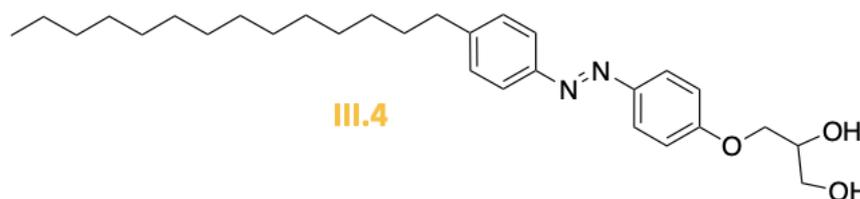
1-(4-((2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)-2-(4-tetradecylphenyl)diazene III.3



Cesium carbonate (6.2g, 19.0 mmol, 3 Eq.) was added on **III.1** (2.5g, 6.33 mmol, 1 Eq.) previously diluted in 20 mL of DMF. The mixture was reflux and stirred during 1h. After that, compound **III.2** (9.1g, 31.7 mmol, 5 Eq.) was slowly added in the phenolate and the mixture was stirred at reflux during two days. The solvent was evaporated and the crude compound was diluted in CH_2Cl_2 , extracted with H_2O and washed with brine. The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to give the crude compound **III.3**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate

(85/15)) to give the pure compounds **III.3** as an orange powder with 66% yield (2.1g). Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (85/15)): 0.8; Melting point: 67-68°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.90 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz); 7.80 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz); 7.29 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz); 7.03 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz); 4.52 (qt, 1H, $sn-2$, $J_{\text{HH}} = 4.0$ Hz, $J_{\text{HH}} = 12$ Hz); 4.16 (m, 1H, $sn-1b$); 4.12 (m, 1H, $sn-1b$); 4.03 (m, 1H, $sn-3a$); 3.93 (m, 1H $sn-3b$); 2.67 (t, 2H, CH_2 α azo, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz); 1.65 (m, 4H, CH_2 β and γ fatty chain); 1.58 (s, 3H, CH_3 solketal); 1.48 (s, 3H, CH_3 solketal); 1.33 (m, 26H, CH_2 fatty chain); 0.88 (t, 3H, CH_3 fatty chain, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): δ (ppm) 160.85, 151.11, 147.50, 146.12 (C_q azo), 129.19, 124.67, 122.69, 114.88 (CH azo); 110.03 (C_q solketal); 74.06 (CH $sn-2$); 69.15 (CH_2 $sn-1$); 66.92 (CH_2 $sn-3$); 36.00, 32.06, 31.46, 29.79, 29.63, 29.49, 29.41, 22.83 (CH fatty chain); 14.26 (CH_3 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 508.366 found $[\text{M}+\text{H}]^+$ 509.553.

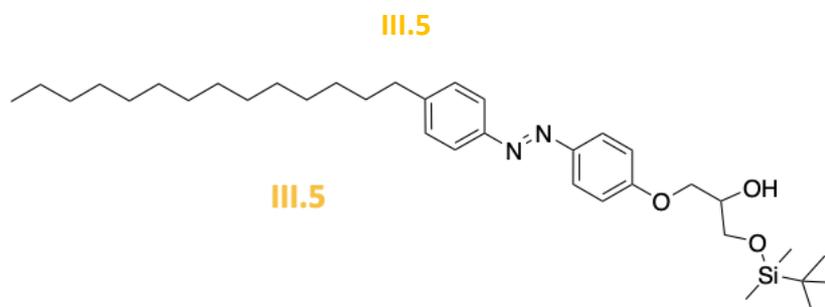
3-(4-((4-tetradecylphenyl)diazenyl)phenoxy)propane-1,2-diol **III.4**



HCl 37% (10 mL), 20 mL of H_2O and 100 mL of THF were added to **III.3** (11.8g, 3.6 mmol, 1 Eq.). The mixture was stirred for 8 hours at room temperature. The mixture was extracted with ethyl acetate. (400 mL) and the organic phase was washed with water (3*300 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to produce compound **III.4** in 95% yield as yellow powder (1.5g). This compound was used in the next step without further purification. Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (1/1)): 0.26; Melting point: 115°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.92 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz); 7.82 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz); 7.30 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz); 7.02 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz); 4.14 (m, 3H, $sn-2 + sn-1$); 4 3.89-3.76 (m, 2H, $sn-3$); 2.67 (t, 2H, CH_2 α azo, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz); 2.23 (bs, 2H, OH) 1.63 (m, 4H, CH_2 β and γ fatty chain); 1.25 (m, 26H, CH_2 fatty chain); 0.88 (t, 3H, CH_3 fatty chain, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): δ (ppm) 160.67, 151.11, 147.59, 146.22 (C_q azo), 129.22, 124.75, 122.74, 114.90 (CH azo); 70.69 (CH $sn-2$); 69.57 (CH_2 $sn-1$); 63.71 (CH_2 $sn-3$); 36.03, 32.08,

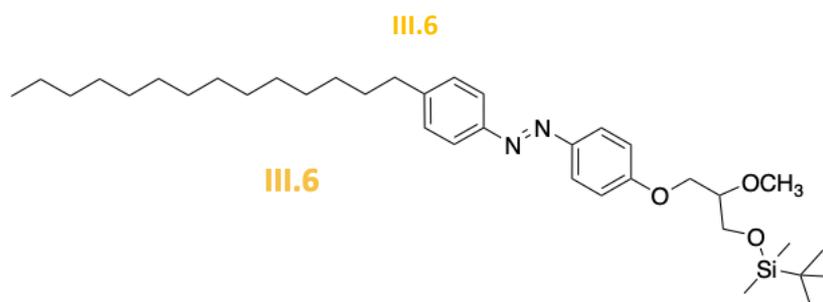
31.47, 29.82, 29.65, 29.51, 29.44, 22.85 (CH fatty chain); 14.27 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 468.335 found [M+H]⁺ 469.451.

1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-(4-((4-tetradecylphenyl)diazenyl)phenoxy)propan-2-ol



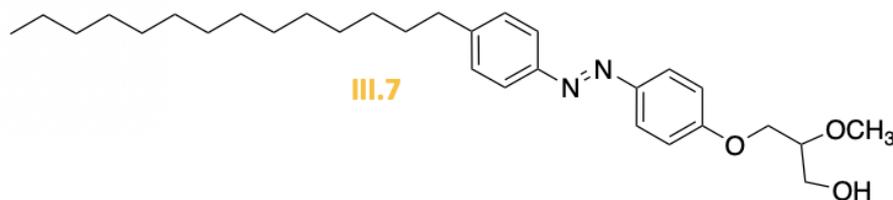
A solution of *tert*-Butyl(chloro)dimethylsilane (530 mg, 3.52 mmol, 1.1 Eq.) and imidazole (530 mg, 8.60 mmol, 2.5 Eq.) previously mixed in anhydrous CH₂Cl₂ (40 mL) were added in solution of **III.4** (1.5 g, 3.2 mmol, 1 Eq.) in CH₂Cl₂ (20 mL). The mixture was stirred for 2 hours at 40°C. The mixture was poured into water (300 mL) and extracted with Et₂O. The combined ether extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give the crude compounds **III.5** as orange wax in quantitative yield (1.8 g). This compound was used in the next step without further purification. R_f TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (95/5)): 0.25; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ (ppm) 7.90 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.0 Hz); 7.80 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.4 Hz); 7.30 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.8 Hz); 7.02 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.8 Hz); 4.08 (m, 3H, *sn*-2 + *sn*-1); 3.81 (m, 2H, *sn*-3); 2.67 (t, 2H, CH₂ α azo, J_{HH}= 8.0 Hz); 1.61 (m, 4H, CH₂ β and γ fatty chain); 1.27 (m, 26H, CH₂ fatty chain); 0.88 (m, 12H, CH₃ fatty chain + CH₃ Si-*t*-Bu); 0.069 (m, 6H, CH₃ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): δ (ppm) 160.90, 151.07, 147.38, 146.01 (C_q azo), 129.3, 123.3, 120.3, 114.32 (CH azo); 70.17 (CH *sn*-2); 68.8 (CH₂ *sn*-1); 63.73 (CH₂ *sn*-3); 36.03, 32.08, 31.47, 29.82, 29.65, 29.51, 29.44, 22.85 (CH fatty chain); 25.93 (CH₃ Si-*t*-Bu); 14.19 (CH₃ fatty chain); -5.33 (CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 583,429 found M⁺• 583.654.

1-(4-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methoxypropoxy)phenyl)-2-(4-tetradecylphenyl)diazene



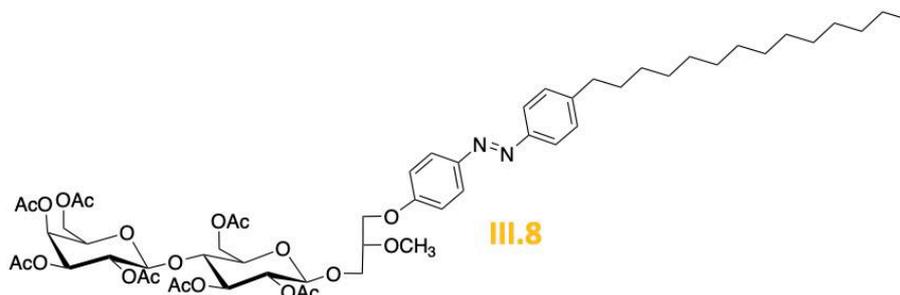
To a stirred solution of **III.5** (1.8g, 3.1 mmol, 1 Eq.) previously diluted in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) and placed under nitrogen atmosphere, were added silver oxide (3.6 g, 15.4 mmol, 5 Eq.) and molecular sieves (~ 2 g). Iodomethane (1.9 mL, 31 mmol, 10 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred for 3 days at room temperature and filtered on Celite. The celite pad was washed with dichloromethane. The filtrate was concentrated to produce **III.6** as orange wax in quantitative yield (1.84 g). These compounds were used in the next step without further purification. Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (95/5)): 0.67; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.90 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz); 7.80 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz); 7.28 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz); 7.03 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz); 4.24 (m, 1H, *sn-3a*); 4.12 (m, 1H, *sn-3b*); 3.81 (m, 2H, *sn1a + sn-2*); 3.64 (m, 1H, *sn-1b*); 3.53 (m, 3H, OCH_3); 2.67 (t, 2H, CH_2 α azo, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz); 1.61 (m, 4H, CH_2 β and γ fatty chain); 1.27 (m, 26H, CH_2 fatty chain); 0.88 (m, 12H, CH_3 fatty chain + CH_3 Si-*t-Bu*); 0.069 (m, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): δ (ppm) 161.19, 151.12, 147.27, 145.92 (Cq azo), 129.12, 124.6, 122.6, 114.9 (CH azo); 80.2 (CH *sn-2*); 67.7 (CH_2 *sn-1*); 61.9 (CH_2 *sn-3*); 58.4 (OCH_3); 35.96, 32.03, 31.42, 29.77, 29.60, 29.46, 29.38, 22.79 (CH fatty chain); 25.97 (CH_3 Si-*t-Bu*); 14.22 (CH_3 fatty chain); -5.33 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 596.437 found $[\text{M}+\text{H}]^+$ 597.575.

2-methoxy-3-(4-((4'-tetradecylphenyl)diazenyl)phenoxy)propan-1-ol III.7



Tetra-n-butylammonium fluoride (2.5 mL, 2.5 mmol, 1.4 Eq.) was added to a stirred solution of **III.6** (1.6g, 1.7 mmol, 1 Eq.) diluted in dry THF (15 mL) previously placed under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred at room temperature overnight. The solution was quenched by addition of water (10 mL) and extracted with Et₂O (3*30 mL). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give the crude compound **III.7**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (6/4)) to give the pure compound **III.7** as a yellow powder in 67% yield (550 mg). R_f TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (6/4)): 0.45; Melting point: 76°C; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ (ppm) 7.91 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.0 Hz); 7.81 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.4 Hz); 7.29 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.8 Hz); 7.02 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.8 Hz); 4.16 (m, 2H, *sn*-1); 3.91 (m, 1H, *sn*-3a); 3.78 (m, 2H, *sn*3a + *sn*-2); 3.56 (m, 3H, OCH₃); 2.67 (t, 2H, CH₂ α azo, J_{HH}= 8.0 Hz); 1.97 (*brs* OH); 1.63 (m, 4H, CH₂ β and γ fatty chain); 1.30 (m, 26H, CH₂ fatty chain); 0.88 (t, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): δ (ppm) 160.97, 150.98, 147.34, 146.20 (C_q azo), 129.22, 124.8, 122.7, 114.9 (CH azo); 79.8 (CH *sn*-2); 67.5 (CH₂ *sn*-1); 62.07 (CH₂ *sn*-3); 58.4 (OCH₃); 35.96, 32.07, 31.47, 29.77, 29.64, 29.46, 29.38, 22.79 (CH fatty chain); 14.27 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 482.351 found [M+H]⁺ 483.538.

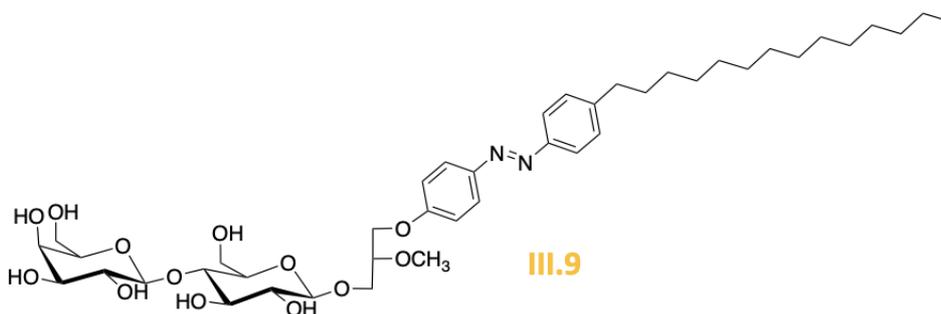
1-O-(4'-tetradecylphenyl)diazenyl-(4-phenoxy)-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside III.8



Peracetylated lactose trichloroacétimidate **II.16** (880 mg, 1.13 mmol, 1.02 Eq.) solubilized in dry CH_2Cl_2 (20 mL) was added dropwise to a solution of **III.7** (520 mg, 1.11 mmol, 1 Eq.) in CH_2Cl_2 (15 mL). The mixture was stirred with molecular sieves (~ 2 g) during one hour under nitrogen atmosphere. At 0°C , boron trifluoride diethyl etherate (0.8 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at RT under inert atmosphere. The mixture was quenched by addition of water (20 mL). The organic layer was washed with aqueous saturated NaHCO_3 solution and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered, concentrated to give the crude compounds **III.8**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane / ethyl acetate (6/4)) to give the pure compounds **III.8** as white foam in 64% yield (780 mg). Rf TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/2)): 0.3; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.133 MHz): δ (ppm) 7.88 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz); 7.78 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz); 7.27 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz); 6.99 (d, 2H, H_{ar} , $J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz); 5.34 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$); 5.18-5.14 (m, 1H, H_3); 5.11-5.07 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$); 4.98-4.92 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$); 4.91-4.81 (m, 1H, H_2); 4.48-4.43 (m, 3H, $\text{H}_{6\text{a}} + \text{H}_1 + \text{H}_{1'}$); 4.1-4.02 (m, 3H, $\text{H}_{6'\text{a}} + \text{H}_{6'\text{b}} + \text{H}_{6\text{b}}$); 3.88-3.50 (m, 2H, $\text{sn-3}_\text{b} + \text{H}_5' + \text{H}_4 + \text{sn-3}_\text{a} + \text{H}_5 + \text{sn-2} + \text{CH}_2 \text{sn-1} + \text{CH}_2 \alpha$ Solketal); 3.49 (m, 3H, $-\text{OCH}_3$); 2.66 (t, 2H, $J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $\text{CH}_2 \alpha$ azo); 2.17-1.95 (m, 21H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$ Lactose); 1.90 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ azo); 1.53-1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ solketal); 1.45-1.39 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma$ azo); 1.32 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma$ solketal); 1.23 (m, 26H, fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.771 MHz): δ (ppm) 170.42 (CO); 170.37 (CO); 170.34 (CO); 170.27 (CO); 170.23 (CO); 170.14 (CO); 170.01 (CO); 160.97, 150.98, 147.34, 146.20 (C_q azo), 128.91, 124.8, 122.7, 114.9 (CH azo); 104.68 ($\text{C}_{1'}$); 102.85 + 102.32 ($\text{C}_1 \beta$ anomere); 79.56 + 78.94 ($\text{C}_{\text{sn-2}}$ - two diastereoisomers); 76.18 (C_4); 72.67 (C_3); 72.19 (C_5); 71.65 (C α Solketal); 71.21 ($\text{C}_{5'}$); 70.78 (C_2); 70.41 ($\text{C}_{3'}$); 70.06 (C sn-3_a - two diastereoisomers); 69.70 + 69.67 (C sn-1 - two diastereoisomers); 68.99 ($\text{C}_{2'}$); 68.53 (C sn-3_b - two diastereoisomers);

66.47 (C_{4'}); 61.87 (C₆); 60.68 (C_{6'}); 58.23 + 57.98 (C –OMe); 35.35 (CH₂ α azo); 31.70 (CH₂ β azo); 29.58 + 29.36 + 29.23 (CH₂ fatty chain); 25.85 (CH₂ fatty chain); 23.94 + 22.78 + 21.13 (C –OAc Lactose); 14.77 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 1100.530 found [M+Na]⁺ 1123.454 and [M+K]⁺ 1139.423, theoretical values for [M+Na]⁺ 1123.313 and [M+K]⁺ 1139.347.

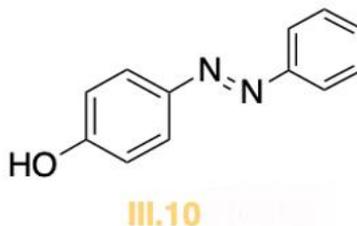
1-O-(4'-tetradecylphenyl)diazenyl-(4-phenoxy)-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside III.9



Potassium carbonate (0.5 eq) was added to a stirred solution of **III.9** (630 mg, 0.57 mmol, 1 Eq.) diluted in anhydrous MeOH (15 mL). The mixture was stirred for 6 hours at RT. The mixture is quenched by addition of a little amount of Amberlite (IR120H) (~ 300 mg) and the solution was stirred for 30 minutes. Then, the solution was diluted with CHCl₃ and MeOH until the compound **III.9** was solubilized, the amberlite was removed by filtrated and the solvent was evaporated to produce **III.9** with 28% yield as orange powder (160 mg). ¹H NMR (DMSO, 500.253 MHz): δ (ppm) 7.87 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.0 Hz); 7.76 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.4 Hz); 7.38 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.8 Hz); 7.15 (d, 2H, H_{ar}, J_{HH}= 8.8 Hz); 5.22-4.52 (m, 5H, OH); 4.35-4.18 (m, 4H, H₁ + H_{1'} + H_{6a} + CH₂ *sn*-3_a); 3.86-3.32 (m, 25H, H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH₃ – OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-3_b + CH₂ *sn*-1); 3.11 (t, 1H, J_{HH} = 7.8 Hz, H₂); 2.67 (t, 2H, J_{HH}= 7.8 Hz, CH₂ α azo); 1.60 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.22 (m, 24H, CH₂ fatty chain); 0.84 (t, J_{HH}= 8.0 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.804 MHz): δ (ppm) 161.09, 150.29, 146.27, 145.78 (C_q azo), 129.25, 124.41, 122.3, 115.2 (CH azo); 103.88 (C_{1'}); 103.04 + 103.01 (C₁ β anomere – two diastereoisomers); 80.74 (C₄); 78.03 + 77.85 (C *sn*-2 – two diastereoisomers); 75.55 + 74.94 + 73.26 + 73.17 (C₃ + C₅ + C_{2'} + C_{3'}); 70.6 (C₂); 68.17 (C α Solketal); 68.27 (C_{5'}); 67.99 + 67.65 (C *sn*-1 + *sn*-3); 68.17 (C_{4'}); 60.47 (C₆); 60.43 (C_{6'}); 57.31 + 57.29 (C –OMe); 32.60 (CH₂ α azo); 34.96 (CH₂ β azo); 31.31 +

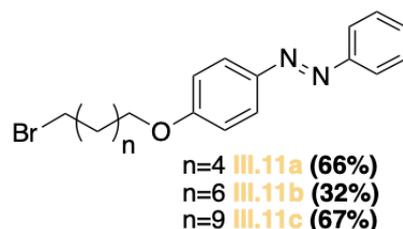
30.72 + 29.02 + 28.80 + 28.92 + 28.71 + 28.59 + 22.11 (CH₂ fatty chain); 13.98 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 806.456 found [M+Na]⁺ 829.705 and [M+K]⁺ 845.654, theoretical values for [M+Na]⁺ 829.446, and [M+K]⁺ 845.437.

4-(phenyldiazenyl)phenol III.10



Concentrated HCl 37% (13.1 mL, 157 mmol, 3.7 Eq.) was added to the mixture of aniline (4.00 g, 42.9 mmol, 1 Eq.), previously diluted in a mixture of 72 mL of acetone and 22 mL of water, and stirred during 30 minutes at room temperature. The mixture was cooled with an ice-bath until 0°C and sodium nitrite (2.96g, 42.9 mmol, 1 Eq.), previously diluted in 10 mL of water, was added slowly into the benzenaminium chloride and the mixture was stirred at 0°C during 1h30. The solution turned pale yellow. In a second bottom flask, sodium carbonate (9.1g, 85.9 mmol, 2 Eq.) and sodium hydroxide (3.44g, 85.9 mmol, 2 Eq.) were added at 0°C, into a phenol (8.1g, 85.9 mmol, 2 Eq.) previously diluted in 60 mL of water. The mixture was stirred during 1h00 at 0°C. Then, the benzenediazonium salt was added dropwise in the phenolate solution always at 0°C (the pH of the solution was between 5-6 after the addition of the salt). The solution turned dark orange and the mixture was stirred during one night between 0-5°C thanks to a cryostat. The mixture was extract with ethyl acetate and the organic phase was dried over MgSO₄ and the crude compound was purified thanks to a kugelrohr (80°C – 2,5.10⁻² mbar) to obtained compound III.1 as orange crystals in quantitative yield (8.5g). R_f TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (8/2)): 0.6; Melting point: 115°C; ¹H NMR (CDCl₃, 399.902 MHz): δ (ppm) 7.89 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 6.93 (d, 2H, H_{ar}); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 130.44, 129.16, 124.88, 122.66, 114.83 (CH azo); MALDI TOF *m/z* calculated 198.079 found [M+H]⁺ 199.128.

General procedure for the insertion of the dibromoalcanes (Compounds III.11a-c):



III.10 (1.98 g, 10 mmol, 1 Eq.) was added to a solution of dibromoalcanes (20 mmol, 2 Eq.) and K_2CO_3 (4.14 g, 30 mmol, 3 Eq.) in 150 mL acetone. The reaction mixture was refluxed for 24 hours, and then acetone was evaporated under vacuum. The residue was dissolved in chloroform and filtered. After removing chloroform, the resulting orange or yellow solid was purified by recrystallization with few mL of methylcyclohexane to give the pure compounds **III.11a-c** as orange or yellow solid or yellow wax between 32 and 67%.

1-(4-((6-bromohexyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene (III.11a)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.11a** was prepared in 66% yield (1.2g). Rf (Eluent : petroleum ether / ethyl acetate (95/5)) : 0.45; Melting point: 72°C ($Mp_{litt} = 71,2^\circ C$); 1H NMR ($CDCl_3$, 399.902 MHz): δ (ppm) 7.90 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.05 (t, 2H, $CH_2 \alpha$ O azo); 3.44 (t, 2H, $CH_2 \alpha$ Br); 1.92 (m, 2H $CH_2 \beta$ Br); 1.83 (m, $CH_2 \beta$ O azo); 1.25 (m, 4H, CH_2 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 360.084 found $[M+H]^+$ 361.179.

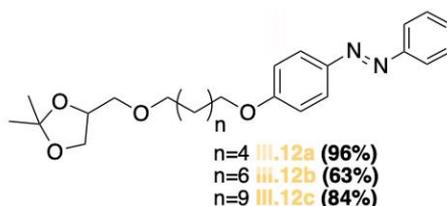
1-(4-((8-bromooctyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene (III.11b)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.11b** was prepared in 39% yield (1.5g). Rf (Eluent : petroleum ether / ethyl acetate (95/5)) : 0.5; Melting point: 95-96°C; 1H NMR ($CDCl_3$, 399.902 MHz): δ = 7.90 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 4.04 (t, 2H, $CH_2 \alpha$ O azo); 3.41 (t, 2H, $CH_2 \alpha$ Br); 1.84 (m, 4H $CH_2 \beta$ Br + $CH_2 \beta$ OH); 1.41 (m, 8H, CH_2 fatty chain); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 399.901 ppm): δ = 130.45, 129.15, 124.88, 122.66, 114.80 (CH azo); 68.18 ($CH_2 \alpha$ O azo), 33.91 ($CH_2 \alpha$ Br), 32.78 + 29.15 + 28.03 + 25.40 (CH_2 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 388.115 found $[M+H]^+$ 389.264.

1-(4-((11-bromoundecyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene (III.11c)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.11c** was prepared in 67% yield (2.2g). Rf (Eluent : hexane / ethyl acetate (6/4)) : 0.55; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.902 MHz): δ (ppm) 7.92 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.05 (t, 2H, CH_2 α O azo); 3.42 (t, 2H, CH_2 α Br); 1.93-1.49 (m, 4H CH_2 β Br + CH_2 β O azo); 1.25 (m, 14H, CH_2 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 430.162 found M^+ 431.371.

General procedure for the insertion of the 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (Compounds III.12a-c):



NaH (5.5 eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 10 mL of toluene were added. Solketal (5 Eq.) was added and the mixture was refluxed for 1 h. At room temperature, **III.11a-c** (1eq.) was slowly added without solvent. NaI was equally added without solvent (1 Eq.) and the mixture was then refluxed for 1 days. The reaction was quenched by few mL of MeOH and the solution was extracted with Et_2O . The organic phase was washed with water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to give the crude compounds **III.12a-c**. The products were purified by chromatography on silica gel (Eluent gradient: hexane 100% - hexane / ethyl acetate (95:5) + 0.2% MeOH – hexane / ethyl acetate (1/1)) to give the pure compounds **III.12b** with 63% yield. The compounds **III.12a** (96%) and **III.12c** (84%) were used in the next step without further purification and were obtained as orange solid or orange wax.

1-(4-((6-((2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)hexyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene III.12a

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.12a** was prepared in 96% yield (860mg). Rf (Eluent : hexane / ethyl acetate (6/4)) : 0.85; Melting point: 51-52°C; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.902 MHz): δ (ppm) 7.92 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.27 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{sn-2}}$); 4.05 (m, 3H, CH_2 α O azo + CH_a sn-3); 3.73 (m, 1H, CH_b sn-3); 3.55-3.42 (m, 4H, CH_2 sn-1 + CH_2 α O solketal); 1.85-1.80 (m, 2H, CH_2 β azo); 1.63

(m, 2H, CH₂ γ azo); 1.56-1.37 (m, 10H, CH₂ fatty chain + CH₃ solketal); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 161,76 + 152.90 + 146.06 (C_q azo), 130.40, 129.15, 124.88, 122.66, 114.80 (CH azo); 109.50 (C_q solketal); 74.87 (CH *sn*-2); 71.99 + 71.78 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 68.31 + 67.01 (CH₂ *sn*-3 + CH₂ α O azo); 32.77 + 29.61 (CH₂ fatty chain); 26.89 (CH₃ solketal); 26.01 (CH₂ fatty chain); 25.53 (CH₃ solketal); MALDI TOF *m/z* calculated 412.236 found [M+H]⁺ 413.430.

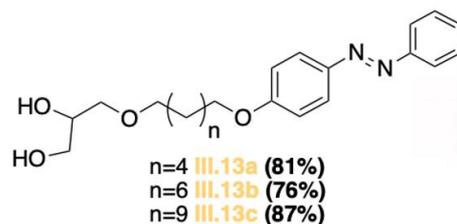
1-(4-((8-((2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)octyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene III.12b

Using the aforementioned general procedure, the compound III.12b was prepared in 63% yield (1g) as orange solid. R_f (Eluent : hexane / ethyl acetate (95/5)) : 0.4; Melting point = 76°C; ¹H NMR (CDCl₃, 500.133 MHz): δ (ppm) 7.92 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.26 (m, 1H, CH *sn*-2); 4.05 (m, 3H, CH₂ α O azo + CH_a *sn*-3); 3.73 (m, 1H, CH_b *sn*-3); 3.55-3.42 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 1.85-1.80 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.63 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.56-1.37 (m, 14H, CH₂ fatty chain + CH₃ solketal); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 161,76 + 152.90 + 146.06 (C_q azo), 130.39, 129.12, 124.84, 122.62, 114.78 (CH azo); 74.86 (CH *sn*-2); 71.94 + 71.78 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 68.41 + 67.02 (CH₂ *sn*-3 + CH₂ α O azo); 32.77 + 29.61 (CH₂ fatty chain); 26.89 (CH₃ solketal); 26.01 (CH₂ fatty chain); 25.53 (CH₃ solketal); MALDI TOF *m/z* calculated 440.268 found [M+H]⁺ 441.119; found [M+Na]⁺ 463.398 Theoretical value for [M+Na]⁺ 463.257.

1-(4-((11-((2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)undecyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene III.12c

Using the aforementioned general procedure, the compound III.12c was prepared in 84% yield (1.97g) as orange wax. R_f (Eluent : hexane / ethyl acetate (6/4)) : 0.8; ¹H NMR (CDCl₃, 399.902 MHz): δ (ppm) 7.92 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.25 (m, 1H, CH *sn*-2); 4.05 (m, 3H, CH₂ α O azo + CH_a *sn*-3); 3.73 (m, 1H, CH_b *sn*-3); 3.55-3.42 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 1.85-1.80 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.63 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.56-1.37 (m, 20H, CH₂ fatty chain + CH₃ solketal); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): δ (ppm) 161,70 + 152.76 + 146.82 (C_q azo), 130.24, 128.96, 124.74, 122.55, 114.18 (CH azo); 74.75 (CH *sn*-2); 71.82 + 71.80 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 68.28 + 66.82 (CH₂ *sn*-3 + CH₂ α O azo); 33.79 + 29.55 + 29.44 + 29.36 + 29.17 (CH₂ fatty chain); 26.78 (CH₃ solketal); 26.05 (CH₂ fatty chain); 25.44 (CH₃ solketal); MALDI TOF *m/z* calculated 482.314 found [M+H]⁺ 483.477.

General procedure for the acetal function deprotection (Compounds III.13a-c)



HCl 37% (96 mmol), 15 mL of H₂O and 60 mL of THF were added to **III.12a-c** (1 Eq.). The mixture was stirred for one night at room temperature. The mixture was extracted with Et₂O and the organic phase was washed with water (3*300 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated to produce compound **III.13a-c** between 76% and 87% yield as yellow powder or yellow wax. These compounds were used in the next step without further purification.

3-((6-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)hexyl)oxy)propane-1,2-diol **III.13a**

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.13a** was prepared in 81% yield (890mg) as yellow powder. R_f TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (1/1)): 0.15; ¹H NMR (CDCl₃, 399.902 MHz): δ (ppm) 7.92 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.05 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.87 (m, 1H, CH *sn*-2); 3.71 (m, 2H, CH₂ *sn*-3); 3.54-3.48 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 1.83 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.65 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.56-1.43 (m, 4H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 161.76 + 152.93 + 147.04 (C_q azo), 130.45, 129.15, 124.88, 122.67, 114.83 (CH azo); 72.66 + 71.77 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 70.59 (CH *sn*-2); 68.31 (CH₂ α O azo); 64.40 (CH₂ *sn*-3); 29.64 + 29.26 + 26.02 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 372.205 found [M+H]⁺ 373.359.

3-((8-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)octyl)oxy)propane-1,2-diol **III.13b**

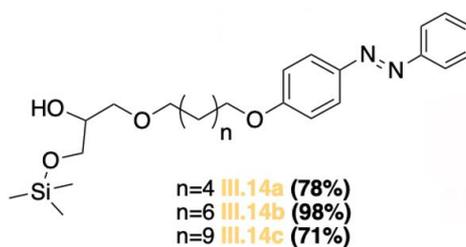
Using the aforementioned general procedure, the compound **III.13b** was prepared in 76% yield (700mg) as yellow powder. R_f TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (85/15)): 0.15; Melting Point: 102-103°C; ¹H NMR (CDCl₃, 399.902 MHz): δ (ppm) 7.92 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.02 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.84 (m, 1H, CH *sn*-2); 3.71 (m, 2H, CH₂ *sn*-3); 3.53-3.48 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 1.83 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.65 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.53-1.40 (m, 8H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 161.76 + 152.93 + 146.96 (C_q azo), 130.38, 129.11, 124.83, 122.62, 114.80 (CH azo); 72.62 + 71.94 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 70.59 (CH *sn*-2); 68.46 (CH₂ α O

azo); 64.40 (CH₂ *sn*-3); 29.62 + 29.53 + 29.44 + 29.28 + 26.18 + 26.10 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 400.236 found [M+H]⁺ 401.406; found [M+Na]⁺ 423.388, Theoretical value for found [M+Na]⁺ 423.205.

3-((11-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)undecyl)oxy)propane-1,2-diol **III.13c**

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.13c** was prepared in 87% yield (1.55g) as yellow wax. R_f TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (8/2)): 0.2; δ (ppm) 7.92 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.02 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.84 (m, 1H, CH *sn*-2); 3.71 (m, 2H, CH₂ *sn*-3); 3.53-3.48 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 1.83 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.65 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.56-1.43 (m, 14H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 161.76 + 152.93 + 146.96 (C_q azo), 130.38, 129.11, 124.83, 122.62, 114.80 (CH azo); 72.62 + 71.94 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 70.59 (CH *sn*-2); 68.46 (CH₂ α O azo); 64.40 (CH₂ *sn*-3); 29.62 + 29.53 + 29.44 + 29.28 + 26.18 + 26.10 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 442.283 found [M+H]⁺ 443.428.

General procedure for the primary alcohol protection with *tert*-Butyldimethylsilyle chloride (**compounds III.14a-c**)



A solution of *tert*-Butyl(chloro)dimethylsilane (1.1 Eq.) and imidazole (2.5 Eq.) previously mixed in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) were added in solution of **III.13a-c** (1 Eq.) in CH₂Cl₂ (20 mL). The mixture was stirred for 2 hours at 40°C. The mixture was poured into water (300 mL) and extracted with Et₂O. The combined ether extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give the crude compounds **III.14a-c** as yellow wax between 78% and quantitative yield. These compounds were used in the next step without further purification.

1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-((6-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)kxyloxy)propan-2-ol

III.14a

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.14a** was prepared in 78% yield (890mg). Rf TLC (Eluent: toluene / ethyl acetate (95/5)): 0.5; ¹H NMR (CDCl₃, 500.130 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.02 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.84 (m, 1H, CH *sn*-2); 3.71 (m, 2H, CH₂ *sn*-3); 3.53-3.48 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 2.45 (s, 1H, OH); 1.83 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.65 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.56-1.43 (m, 4H, CH₂ fatty chain); 0.88 (s, 9H, CH₃ Si-*t*-Bu); 0.04 (s, 6H, CH₃ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 161.64 + 152.75 + 146.82 (C_q azo), 130.24, 128.96, 124.83, 122.62, 114.80 (CH azo); 71.55 + 71.39 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 70.60 (CH *sn*-2); 68.27 (CH₂ α O azo); 64.01 (CH₂ *sn*-3); 29.62 + 29.53 + 29.44 + 29.28 + 26.18 + 26.10 (CH₂ fatty chain); 25.59 (CH₃ Si-*t*-Bu); -5.46 (CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 486.291 found [M+H]⁺ 487.438, found [M+Na]⁺ 509.426, theoretical value for [M+Na]⁺ 509.357.

1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-((8-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)octyl)oxy)propan-2-ol

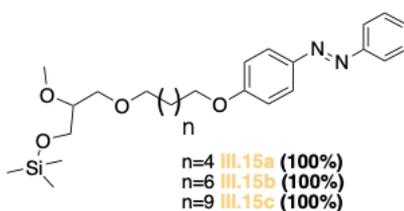
III.14b

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.14b** was prepared in quantitative yield (820mg). Rf TLC (Eluent: toluene / ethyl acetate (95/5)): 0.5; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.03 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.86 (m, 1H, CH *sn*-2); 3.71 (m, 2H, CH₂ *sn*-3); 3.53-3.48 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 2.45 (s, 1H, OH); 1.84 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.65 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.57-1.43 (m, 8H, CH₂ fatty chain); 0.88 (s, 9H, CH₃ Si-*t*-Bu); 0.05 (s, 6H, CH₃ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 161.24 + 152.74 + 146.82 (C_q azo), 130.24, 128.96, 124.83, 122.62, 114.80 (CH azo); 71.55 + 71.39 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 70.60 (CH *sn*-2); 68.27 (CH₂ α O azo); 64.01 (CH₂ *sn*-3); 29.62 + 29.53 + 29.44 + 29.28 + 26.18 + 26.10 (CH₂ fatty chain); 25.59 (CH₃ Si-*t*-Bu); -5.42 (CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 514.323 found [M+H]⁺ 515.495, found [M+Na]⁺ 537.478, theoretical value for [M+Na]⁺ 537.352.

1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-((11-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)undecyl)oxy)propan-2-ol III.14c

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.14c** was prepared in 71% yield (1.3g). Rf TLC (Eluent: toluene / ethyl acetate (95/5)): 0.4; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ = 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.03 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.86 (m, 1H, CH *sn*-2); 3.71 (m, 2H, CH₂ *sn*-3); 3.53-3.48 (m, 4H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 1.84 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.65 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.57-1.43 (m, 14H, CH₂ fatty chain); 0.88 (s, 9H, CH₃ Si-*t*-Bu); 0.05 (s, 6H, CH₃ Si); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ = 161.76 + 152.83 + 146.89 (C_q azo), 130.31, 129.03, 124.80, 122.61, 114.73 (CH azo); 71.67 + 71.52 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O solketal); 70.72 (CH *sn*-2); 68.36 (CH₂ α O azo); 64.16 (CH₂ *sn*-3); 30.91-25.96 (CH₂ fatty chain); 25.75 (CH₃ Si-*t*-Bu); -5.34 (CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 556.370 found [M+H]⁺ 557.599, found [M+Na]⁺ 579.576, theoretical value for [M+Na]⁺ 579.516.

General procedure for the methylation reaction (compounds III.15a-c)



To a stirred solution of **III.15a-c** (1eq.) previously diluted in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) and placed under nitrogen atmosphere, were added silver oxide (5 eq.) and molecular sieves (~ 2 g). Iodomethane (10 eq.) was added dropwise. The mixture was refluxed for 2 days and filtered on Celite. The celite pad was washed with dichloromethane. The filtrate was concentrated to produce **III.15a-c** as orange wax in quantitative yield. These compounds were used in the next step without further purification.

1-(4-((6-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methoxypropoxy)hexyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene III.15a

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.15a** was prepared in quantitative yield (930mg). Rf TLC (hexane / ethyl acetate (9/1)): 0.5; ¹H NMR (CDCl₃,

300.133 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.05 (t, 2H, $CH_2 \alpha$ O azo); 3.67 (m, 2H, $CH_2 sn-3$); 3.58-3.34 (m, 8H, CH $sn-2$ + $CH_2 sn-1$ + $CH_2 \alpha$ O solkétal + OCH_3); 1.86 (m, 2H, $CH_2 \beta$ azo); 1.63 (m, 2H, $CH_2 \gamma$ azo); 1.56-1.43 (m, 4H, CH_2 fatty chain); 0.91 (s, 9H, CH_3 Si-*t-Bu*); 0.07 (s, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474 MHz): δ (ppm) 161,70 + 152.81 + 146.89 (C_q azo), 130.28, 129.00, 124.76, 122.57, 114.70 (CH azo); 81.10 (CH $sn-2$); 71.50 + 70.23 ($CH_2 sn-1$ + $CH_2 \alpha$ O solketal); 68.22 ($CH_2 \alpha$ O azo); 62.46 ($CH_2 sn-3$); 58.10 (OCH_3); 29.61 + 29.18 + 25.94 (CH_2 fatty chain); 25.90 (CH_3 Si-*t-Bu*); -5.33 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 574.384 found $[M+H]^+$ 501.517; theoretical value for $[M+H]^+$ 500.307.

1-(4-((8-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methoxypropoxy)octyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene III.15b

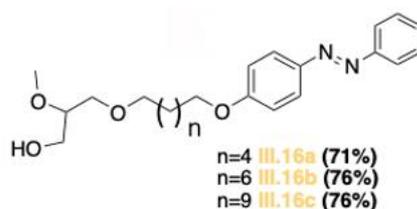
Using the aforementioned general procedure, the compound **III.15b** was prepared in quantitative yield (840mg). Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (7/3)): 0.9; 1H NMR ($CDCl_3$, 399.902 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.03 (m, 2H, $CH_2 \alpha$ O azo); 3.65 (m, 2H, $CH_2 sn-3$); 3.58-3.34 (m, 8H, CH $sn-2$ + $CH_2 sn-1$ + $CH_2 \alpha$ O solketal + OCH_3); 1.86 (m, 2H, $CH_2 \beta$ azo); 1.63 (m, 2H, $CH_2 \gamma$ azo); 1.56-1.43 (m, 8H, CH_2 fatty chain); 0.91 (s, 9H, CH_3 Si-*t-Bu*); 0.07 (s, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474 MHz): δ (ppm) 161,82 + 152.92 + 146.98 (C_q azo), 130.39, 129.13, 124.85, 122.64, 114.81 (CH azo); 81.19 (CH $sn-2$); 71.77 + 70.31 ($CH_2 sn-1$ + $CH_2 \alpha$ O solketal); 68.45 ($CH_2 \alpha$ O azo); 62.55 ($CH_2 sn-3$); 58.24 (OCH_3); 29.75 + 29.52 + 29.45 + 29.30 + 28.88 + 26.06 (CH_2 fatty chain); 26.02 (CH_3 Si-*t-Bu*); -5.26 (CH_3 Si); MALDI TOF m/z calculated 528.338 found $[M+H]^+$ 529.459.

1-(4-((11-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methoxypropoxy)undecyl)oxy)phenyl)-2-phenyldiazene III.15c

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.15c** was prepared in quantitative yield (1.33g). Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (9/1)): 0.6; 1H NMR ($CDCl_3$, 300.131 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.04 (m, 2H, $CH_2 \alpha$ O azo); 3.65 (m, 2H, $CH_2 sn-3$); 3.58-3.34 (m, 8H, CH $sn-2$ + $CH_2 sn-1$ + $CH_2 \alpha$ O solkétal + OCH_3); 1.86 (m, 2H, $CH_2 \beta$ azo); 1.63 (m, 2H, $CH_2 \gamma$ azo); 1.56-1.43 (m, 14H, CH_2 fatty chain); 0.89 (s, 9H, CH_3 Si-*t-Bu*); 0.07 (s, 6H, CH_3 Si); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474 MHz): δ (ppm) 161,76 + 152.84 + 146.90 (C_q azo), 130.29, 129.02, 124.80, 122.60, 114.72 (CH azo);

81.14 (*CH sn-2*); 71.73 + 70.72 (*CH₂ sn-1* + *CH₂ α O solketal*); 68.36 (*CH₂ α O azo*); 62.55 (*CH₂ sn-3*); 58.13 (*OCH₃*); 29.71 + 29.60 + 29.44 + 29.25 + 26.19 + 26.07 + 26.02 (*CH₂ fatty chain*); 25.98 (*CH₃ Si-*t*-Bu*); -5.35 (*CH₃ Si*); MALDI TOF *m/z* calculated 570.385 found [*M+H*]⁺ 571.594.

General procedure for the deprotection of the *tert*-Butyl-dimethylsilyle protecting group (compounds **III.16a-c):**



Tetra-*n*-butylammonium fluoride (5 Eq.) was added to a stirred solution of **III.12a-c** (1 Eq.) diluted in dry THF (15 mL) previously placed under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred at room temperature overnight. The solution was quenched by addition of water (10 mL) and extracted with Et₂O (3*30 mL). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give the crude compound **III.13a-c**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/7)) to give the pure compound **III.13a-c** as a yellow wax or yellow solid between 51% and 93% yield.

2-methoxy-3-((6-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)hexyl)oxy)propan-1-ol **III.16a**

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.16a** was prepared in 71% yield (510mg). Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (6/4)): 0.4; ¹H NMR (CDCl₃, 399.902 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.05 (t, 2H, *CH₂ α O azo*); 3.79-3.67 (m, 2H, *CH₂ sn-3*); 3.58-3.34 (m, 8H, *CH sn-2* + *CH₂ sn-1* + *CH₂ α O solketal* + *OCH₃*); 1.83 (m, 2H, *CH₂ β azo*); 1.63 (m, 2H, *CH₂ γ azo*); 1.56-1.43 (m, 4H, *CH₂ fatty chain*); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): δ (ppm) 161,71 + 152.83 + 146.92 (C_q azo), 130.36, 129.07, 124.80, 122.59, 114.74 (*CH azo*); 80.02 (*CH sn-2*); 71.72 + 70.61 (*CH₂ sn-1* + *CH₂ α O solketal*); 68.24 (*CH₂ α O azo*); 62.58 (*CH₂ sn-3*) 57.82 (*OCH₃*); 29.56 + 29.17 + 25.91 (*CH₂ fatty chain*); MALDI TOF *m/z* calculated 386.221 found [*M+H*]⁺ 387.468.

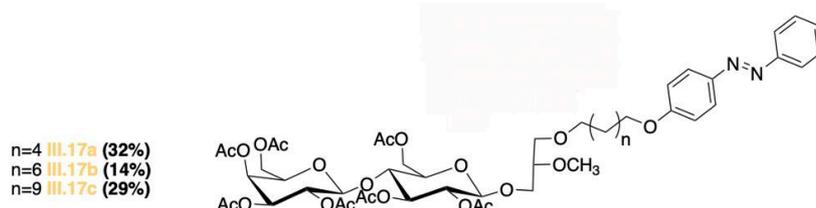
2-methoxy-3-((8-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)octyl)oxy)propan-1-ol III.16b

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.16b** was prepared in 76% yield (590 mg). Rf TLC (Eluent: pentane / ethyl acetate (1/1)): 0.35; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ = 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.05 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ O azo); 3.79-3.67 (m, 2H, CH_2 *sn*-3); 3.58-3.34 (m, 8H, CH *sn*-2 + CH_2 *sn*-1 + $\text{CH}_2 \alpha$ O solkétal + OCH_3); 1.83 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ azo); 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma$ azo); 1.56-1.43 (m, 8H, CH_2 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): δ = 161.83 + 152.94 + 147.00 (C_q azo), 130.43, 129.09, 124.88, 122.66, 114.83 (CH azo); 79.94 (CH *sn*-2); 72.01 + 70.79 (CH_2 *sn*-1 + $\text{CH}_2 \alpha$ O solketal); 68.45 ($\text{CH}_2 \alpha$ O azo); 62.83 (CH_2 *sn*-3); 57.92 (OCH_3); 29.71- 26.10 (CH_2 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 456.299 found $[\text{M}+\text{H}]^+$ 457.497.

2-methoxy-3-((11-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)undecyl)oxy)propan-1-ol III.16c

Using the aforementioned general procedure, the compound **II.13c** was prepared in 76% yield (810mg). Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (1/1)): 0.5; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 4.05 (t, 2H, $\text{CH}_2 \alpha$ O azo); 3.79-3.67 (m, 2H, CH_2 *sn*-3); 3.62-3.34 (m, 8H, CH *sn*-2 + CH_2 *sn*-1 + $\text{CH}_2 \alpha$ O solkétal + OCH_3); 1.83 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ azo); 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma$ azo); 1.56-1.43 (m, 14H, CH_2 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): δ (ppm) 161.74 + 152.80 + 146.85 (C_q azo), 130.30, 129.02, 124.77, 122.56, 114.71 (CH azo); 80.03 (CH *sn*-2); 71.90 + 70.56 (CH_2 *sn*-1 + $\text{CH}_2 \alpha$ O solketal); 68.36 ($\text{CH}_2 \alpha$ O azo); 62.55 (CH_2 *sn*-3); 57.77 (OCH_3); 29.56 + 29.47 + 25.39 + 29.21 + 26.10 + 26.03 MALDI TOF m/z calculated 456.299 found $[\text{M}+\text{H}]^+$ 457.497.

General procedure for the glycosylation reaction (compounds III.17a-c)



Peracetylated lactose trichloroacétimidate **II.16** (1.2 Eq.) solubilized in dry CH_2Cl_2 (20 mL) was added dropwise to a solution of **III.16a-c** (1 Eq.) in CH_2Cl_2 (15 mL). The mixture was

stirred with molecular sieves (~ 2 g) during one hour under nitrogen atmosphere. At 0°C, boron trifluoride diethyl etherate (0.8 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at RT under inert atmosphere. The mixture was quenched by addition of water (20 mL). The organic layer was washed with aqueous saturated NaHCO₃ solution and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, concentrated to give the crude compounds **III.17a-c**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/2)) to give the pure compounds **III.17a-c** as orange foam between 14% and 32% yield.

1-O-hexylazobenzene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (III.17a)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.17a** was prepared in 32% yield (423 mg). R_f TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (1/1)): 0.5; ¹H NMR (CDCl₃, 500.253 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 5.34 (m, 1H, H_{4'}); 5.19 (t, 1H, H₃); 5.10 (m, 1H, H_{2'}); 4.96 (m, 1H, H_{3'}); 4.91-4.86 (m, 1H, H₂); 4.54-4.46 (m, 3H, H_{6a} + H₁ + H_{1'}); 4.14-4.03 (m, 3H, H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b}); 3.86-3.78 (m, 2H, *sn*-3_b + H_{5'}); 3.78 (t, 1H, H₄); 3.47-3.45 (m, 2H, *sn*-3_a + H₅); 3.43 (m, 9H, -OCH₃ + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1 + CH₂ α Solketal); 2.14-1.96 (m, 21H, CH₃-OAc Lactose); 1.82 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.63 (m, 2H, CH₂ γ azo); 1.56-1.43 (m, 4H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 171.28 (CO); 170.48 (CO); 170.27 (CO); 170.19 (CO); 169.90 (CO); 169.68 (CO); 169.20 (CO); 161.76 + 152.89 + 146.98 (C_q azo), 130.42, 129.14, 124.86, 122.64, 114.80 (CH azo); 101.18 (C_{1'}); 101.03 + 100.97 (C₁ β anomere); 79.48 + 79.10 (C_{*sn*-2} – two diastereoisomers); 76.40 + 76.36 (C₄ + C₃); 72.88 (C₅); 71.80 (C_{5'}); 71.72 (C₂); 71.12 (C α Solketal); 70.10 (C_{3'}); 70.38 (C *sn*-3_a - two diastereoisomers); 69.22 (C_{2'}); 68.78 (C *sn*-3_b - two diastereoisomers); 68.32 (C α azo); 66.71 (C_{4'}); 62.12 (C₆); 60.90 (C_{6'}); 58.40 + 58.04 (C -OMe); 29.81 + 29.63 + 29.26 (CH₂ fatty chain); 23.94 (CH₂ fatty chain); 21.16 + 20.98 + 20.93 (C -OAc Lactose); MALDI TOF *m/z* calculated 1004.400 found [M+Na]⁺ 1027.488, theoretical value for [M+Na]⁺ 1027.367, found [M+K]⁺ 1043.440, theoretical value for [M+K]⁺ 1043.270.

1-O-octylazobenzene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (III.17b)

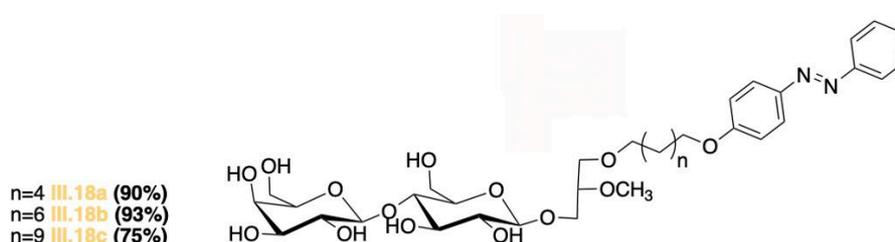
Using the aforementioned general procedure, the compound **III.17b** was prepared in 14% yield (196mg). Rf TLC (Eluent: hexane/ ethyl acetate (6/4)): 0.3; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.131 MHz): δ (ppm) 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 5.34 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$); 5.19 (t, 1H, H_3); 5.10 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$); 4.96 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$); 4.91-4.86 (m, 1H, H_2); 4.54-4.46 (m, 3H, $\text{H}_{6\text{a}} + \text{H}_1 + \text{H}_{1'}$); 4.14-4.03 (m, 3H, $\text{H}_{6'\text{a}} + \text{H}_{6'\text{b}} + \text{H}_{6\text{b}}$); 3.86-3.78 (m, 2H, $\text{sn-3}_b + \text{H}_5$); 3.78 (t, 1H, H_4); 3.47-3.45 (m, 2H, $\text{sn-3}_a + \text{H}_5$); 3.43 (m, 9H, $-\text{OCH}_3 + \text{CH sn-2} + \text{CH}_2 \text{sn-1} + \text{CH}_2 \alpha$ Solketal); 2.14-1.96 (m, 21H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$ Lactose); 1.82 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ azo); 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma$ azo); 1.56-1.43 (m, 8H, CH_2 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): δ (ppm) 170.40 (CO); 170.20 (CO); 170.11 (CO); 169.82 (CO); 169.61 (CO); 169.13 (CO); 161.77 + 152.83 + 146.90 (C_q azo), 130.36, 129.08, 124.81, 122.59, 114.76 (CH azo); 101.13 ($\text{C}_{1'}$); 100.99 + 100.90 ($\text{C}_1 \beta$ anomere); 79.44 + 79.05 ($\text{C}_{\text{sn-2}}$ – two diastereoisomers); 76.33 (C_4); 72.83 (C_3); 72.68 (C_5); 71.81 (C α Solketal); 71.75 ($\text{C}_{5'}$); 71.05 (C_2); 70.74 ($\text{C}_{3'}$); 70.36 (C sn-3_a – two diastereoisomers); 70.04 + 69.92 (C sn-1 – two diastereoisomers); 69.18 (C_2'); 68.77 (C sn-3_b – two diastereoisomers); 68.37 (C α azo) ; 66.69 ($\text{C}_{4'}$); 62.08 (C_6); 60.87 ($\text{C}_{6'}$); 58.33 + 57.98 (C – OMe); 29.63 + 29.36 + 29.22 + 26.03 (CH_2 fatty chain); 20.87 + 20.56 (C –OAc Lactose); MALDI TOF m/z calculated 1032.431 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1055.392, theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1055.243.

1-O-undecylazobenzene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (III.17c)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.17c** was prepared in 29% yield (545mg). Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (6/4)): 0.7; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.902 MHz): δ = 7.91 (m, 4H, H_{ar}); 7.52 (m, 2H, H_{ar}); 7.45 (m, 1H, H_{ar}); 7.12 (d, 2H, H_{ar}); 5.35 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$); 5.19 (t, 1H, H_3); 5.10 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$); 4.96 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$); 4.91-4.86 (m, 1H, H_2); 4.54-4.46 (m, 3H, $\text{H}_{6\text{a}} + \text{H}_1 + \text{H}_{1'}$); 4.14-4.03 (m, 3H, $\text{H}_{6'\text{a}} + \text{H}_{6'\text{b}} + \text{H}_{6\text{b}}$); 3.86-3.78 (m, 2H, $\text{sn-3}_b + \text{H}_5$); 3.78 (t, 1H, H_4); 3.47-3.45 (m, 2H, $\text{sn-3}_a + \text{H}_5$); 3.40 (m, 9H, $-\text{OCH}_3 + \text{CH sn-2} + \text{CH}_2 \text{sn-1} + \text{CH}_2 \alpha$ Solketal); 2.14-1.96 (m, 21H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$ Lactose); 1.82 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ azo); 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2 \gamma$ azo); 1.56-1.43 (m, 14H, CH_2 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474 MHz): 170.39 (CO); 170.19 (CO); 170.09 (CO); 169.81 (CO); 169.60 (CO); 169.12 (CO); 161.78 + 152.85 + 146.90

(C_q azo), 130.34, 129.07, 124.79, 122.58, 114.76 (CH azo); 101.12 (C_{1'}); 100.99 + 100.89 (C₁ β anomere); 79.44 + 79.05 (C_{sn-2} – two diastereoisomers); 76.33 (C₄); 72.83 (C₃); 72.68 (C₅); 71.81 (C α Solketal); 71.75 (C_{5'}); 71.05 (C₂); 70.74 (C_{3'}); 70.38 (C *sn*-3_a – two diastereoisomers); 70.03 + 69.91 (C *sn*-1 – two diastereoisomers); 69.19 (C_{2'}); 68.82 (C *sn*-3_b – two diastereoisomers); 68.41 (C α azo) ; 66.70 (C_{4'}); 62.10 (C₆); 60.88 (C_{6'}); 58.31 + 57.97 (C – OMe); 29.58 + 29.51 + 29.42 + 25.42 + 26.12 (CH₂ fatty chain); 20.86 + 20.67 + 20.55 (C –OAc Lactose); MALDI TOF *m/z* calculated 1074.478 found [M+Na]⁺ 1097.472, theoretical value for [M+Na]⁺ 1097.319, found [M+K]⁺ 1113.443, theoretical value for [M+K]⁺ 1113.296.

General procedure for final deprotection of peracetylated lactose (**Compounds III.18a-c**)



Potassium carbonate (0.5 Eq.) was added to a stirred solution of **III.17a-c** (1 Eq.) diluted in anhydrous MeOH (15 mL). The mixture was stirred for 6 hours at RT. The mixture is quenched by addition of a little amount of Amberlite (IR120H) (~ 300 mg) and the solution was stirred for 30 minutes. Then, the solution was filtered on a sintered funnel and the solvent was evaporated to produce compounds **III.18a-c** between 75% and 90 % yield as yellow or orange powder.

1-O-hexylazobenzene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside (III.18a)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.18a** was prepared in 90% yield (271mg). ¹H NMR (DMSO, 500.253 MHz): δ (ppm) 7.89 (m, 4H, H_{ar}); 7.55 (m, 2H, H_{ar}); 7.14 (m, 2H, H_{ar}); 6.83 (s, 1H, CH Azo); 4.22 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 4.10 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.78-3.28 (m, 28H, H_{6a} + CH₂ *sn*-3_a + H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH₃ – OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH₂ α azo + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-3_b + CH₂ *sn*-1); 3.0 (t, 1H, J_{HH} = 7.8 Hz, H₂); 1.77 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.46-1.38 (m, 4H, CH₂ β solketal + CH₂ γ azo); 1.34-1.28 (m, 4H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.803 MHz): δ (ppm) 161,50 +

151.99 + 146.00 (C_q azo), 130.76, 129.36, 124.57, 122.20, 114.23 (CH azo); 103.84 (C_{1'}); 102.93 + 102.87 (C₁ β anomere); 80.75 (C₄); 78.72 + 78.66 (C_{sn-2} – two diastereoisomers); 75.48 + 74.96 + 74.83 + 73.20 + 73.00 (C₃ + C₅ + C_{2'} + C_{3'} + C₂); 70.51 (C_{5'}); 70.48 (C α Solketal); 69.81 (C *sn-1* - two diastereoisomers); 68.63 + 68.39 (C *sn-3* - two diastereoisomers); 68.11 (C_{4'}); 67.95 (C α azo); 60.48 (C₆); 60.36 (C_{6'}); 57.12 + 57.03 (C –OMe); 29.11 + 28.54 + 25.29 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 710.326 found [M+Na]⁺ 733.540, theoretical value for [M+Na]⁺ 733.324, found [M+K]⁺ 749.513, theoretical value for [M+Na]⁺ 749.346.

1-O-octylazobenzene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside (III.18b)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.18b** was prepared in 93% yield (130mg). ¹H NMR (DMSO, 500.253 MHz): δ (ppm) 7.89 (m, 4H, H_{ar}); 7.55 (m, 2H, H_{ar}); 7.14 (m, 2H, H_{ar}); 6.83 (s, 1H, CH Azo); 4.21 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 4.10 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.76-3.29 (m, 28H, H_{6a} + CH₂ *sn-3*_a + H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH₃ – OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH₂ α azo + CH *sn-2* + CH₂ *sn-3*_b + CH₂ *sn-1*); 3.0 (t, 1H, J_{HH} = 7.8 Hz, H₂); 1.77 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.44-1.36 (m, 4H, CH₂ β solketal + CH₂ γ azo); 1.34-1.28 (m, 8H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.803 MHz): δ (ppm) 161.51 + 151.98 + 146.02 (C_q azo), 130.74, 129.33, 124.56, 122.22, 114.21 (CH azo); 103.84 (C_{1'}); 102.91 + 102.87 (C₁ β anomere); 80.74 (C₄); 78.71 + 78.65 (C_{sn-2} – two diastereoisomers); 75.49 + 74.97 + 74.82 + 73.21 + 73.02 (C₃ + C₅ + C_{2'} + C_{3'} + C₂); 70.52 (C_{5'}); 70.50 (C α Solketal); 69.83 (C *sn-1* - two diastereoisomers); 68.62 + 68.37 (C *sn-3* - two diastereoisomers); 68.13 (C_{4'}); 67.95 (C α azo); 60.48 (C₆); 60.35 (C_{6'}); 57.14 + 57.05 (C –OMe); 29.13 + 28.57 + 25.27 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 738.358 found [M+Na]⁺ 761.560, theoretical value for [M+Na]⁺ 761.230, found [M+K]⁺ 777.528, theoretical value for [M+K]⁺ 777.346.

1-O-undecylazobenzene-2-O-methyl-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside (III.18c)

Using the aforementioned general procedure, the compound **III.18c** was prepared in 75% yield (300mg). ¹H NMR (DMSO, 500.253 MHz): δ (ppm) 7.89 (m, 4H, H_{ar}); 7.55 (m, 2H, H_{ar}); 7.14 (m, 2H, H_{ar}); 5.07 + 4.76 + 4.52 (m, 7H, OH); 4.20 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 4.09 (t, 2H, CH₂ α O azo); 3.75-3.28 (m, 28H, H_{6a} + CH₂ *sn-3*_a + H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH₃ – OMe (two diastereoisomers) + CH₂ α Solketal + CH₂ α azo + CH *sn-2* + CH₂ *sn-3*_b + CH₂

sn-1); 3.0 (t, 1H, $J_{HH} = 7.8$ Hz, H₂); 1.77 (m, 2H, CH₂ β azo); 1.44-1.36 (m, 4H, CH₂ β solketal + CH₂ γ azo); 1.34-1.28 (m, 14H, CH₂ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.803 MHz): δ (ppm) 161.48 + 151.97 + 145.98 (C_q azo), 130.74, 129.34, 124.54, 122.18, 114.22 (CH azo); 103.82 (C_{1'}); 102.92 + 102.85 (C₁ β anomere); 80.72 (C₄); 78.70 + 78.65 (C *sn*-2 – two diastereoisomers); 75.47 + 74.94 + 74.78 + 73.19 + 73.07 (C₃ + C₅ + C_{2'} + C_{3'} + C₂); 70.55 (C_{5'}); 70.49 (C α Solketal); 69.80 (C *sn*-1 - two diastereoisomers); 68.65 + 68.41 (C *sn*-3 - two diastereoisomers); 68.09 (C_{4'}); 67.96 (C α azo); 60.46 (C₆); 60.34 (C_{6'}); 57.10 + 57.01 (C – OMe); 29.15 + 28.97 + 28.93 + 28.83 + 28.70 + 28.53 . 25.61 + 25.41 (CH₂ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 780.404 found [M+Na]⁺ 803.472, theoretical value for [M+Na]⁺ 803.248.

Chapitre 4 :
Modulation de la
position s_{n-2}
de l'Ohmline.

Chapitre 4 : Modulation de la position *sn*-2 de l'Ohmline

I - Généralités - Objectifs

Dans le [chapitre I](#) qui concerne l'étude structure activité de l'Edelfosine et de ses analogues (voir [paragraphe III.4.4.5](#)), nous avons vu que la longueur de la chaîne lipidique de la position *sn*-1 avait un impact sur la modulation de l'activité du canal SK3 (voir [chapitre I figure I.23](#)). Celle-ci doit en effet comporter au minimum 14 atomes carbones pour moduler l'activité du canal. La position *sn*-3, quant à elle, est constituée d'une tête polaire de type lactose, qui s'est avérée être la meilleure de toutes celles qui ont été testées jusqu'à aujourd'hui (voir [chapitre I figure I.26](#)). Pour terminer, la position *sn*-2 a également été modulée par diverses fonctions chimiques telles qu'une fonction hydroxyle, benzyle, amide *etc.* mais ce, uniquement lorsque la tête polaire était de type phosphocholine (voir [chapitre I Figure I.25](#)). Nous avons également montré que le remplacement de la partie phosphocholine par une entité lactose réduit la toxicité du composé (Ohmline *versus* Edelfosine). Nous avons donc fait l'hypothèse que les composés possédant à la fois une tête polaire de type lactose ainsi que différents groupements en position *sn*-2, nous permettrait de conserver, à la fois une faible toxicité et des propriétés de modulation des canaux SK3, mais qui seront différentes selon la nature des substituants.

Ainsi, dans cette étude, nous avons retenu 6 groupements pour substituer le groupement méthoxy en position *sn*-2. Ces derniers sont présentés dans la [Figure IV. 1](#).

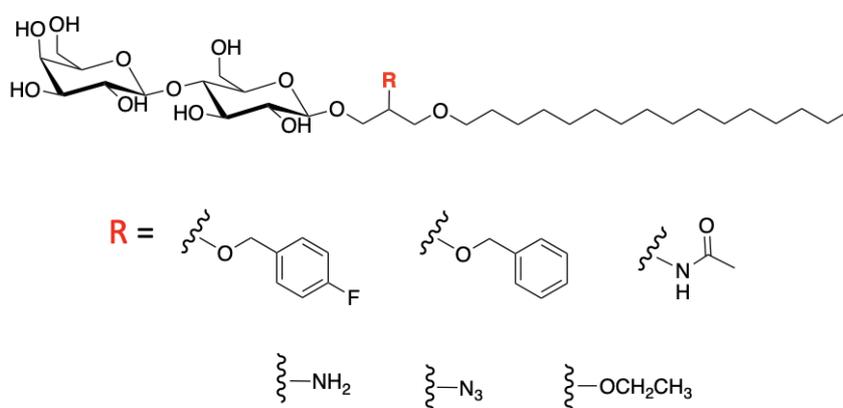


Figure IV. 1 : Structure des nouveaux analogues de l'Ohmline, dont la position *sn*-2 a été modulée.

Dans un premier temps nous avons cherché à allonger la chaîne alkyle pour y placer un groupe éthyle. Celui-ci ajoute une contrainte stérique plus importante que le groupe méthyle présent dans l'Ohmline, mais sans pour autant modifier la polarité de ce groupement (Figure IV. 2).

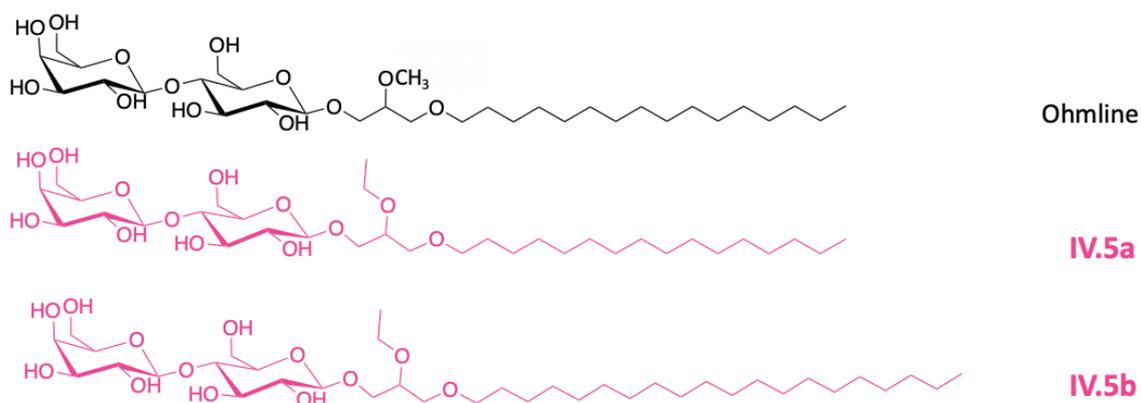


Figure IV. 2: Structure des composés comportant un groupement éthoxy en *sn*-2.

Ensuite, nous avons sélectionné le benzyle afin d'introduire un groupement aromatique qui peut induire différentes interactions avec les constituants des membranes ou des protéines membranaires (e.g. interactions π - π) tout en augmentant les contraintes stériques. Ce dernier a ensuite été modifié au niveau des propriétés électroniques, sans modification de la contrainte stérique, par l'ajout d'un atome de fluor (Figure IV. 3).

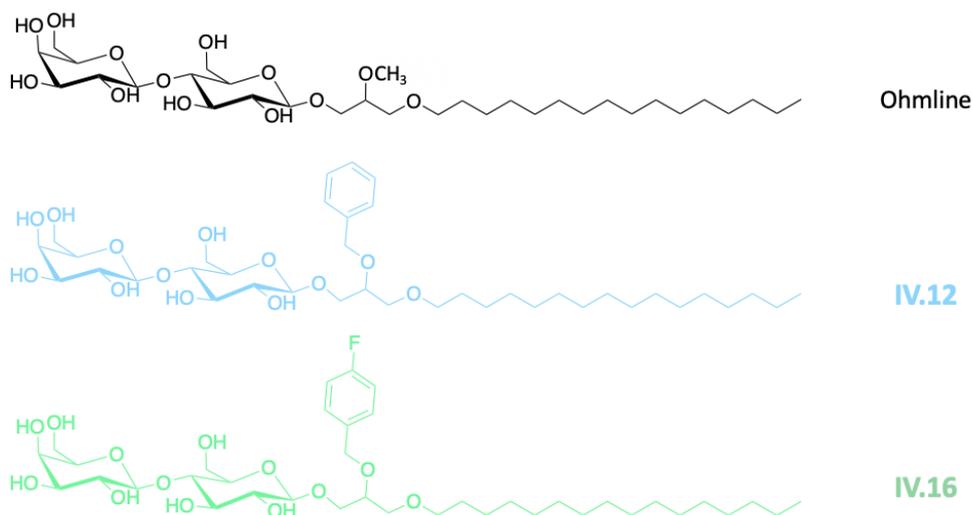


Figure IV. 3: Structure des analogues de l'Ohmline modulée en position *sn*-2 par un groupement benzyle et fluorobenzyle.

Par la suite, nous avons placé une fonction azotée correspondant soit à un azoture, une amine ou un acétamide (Figure IV. 4).

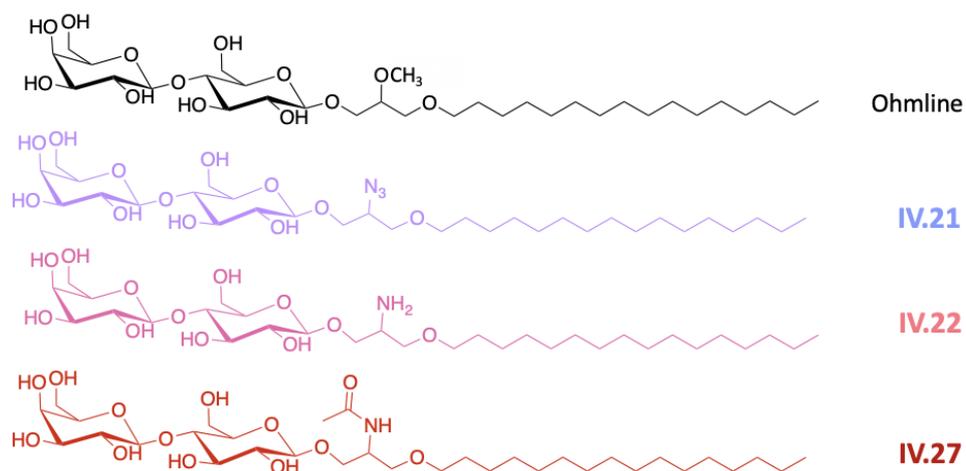


Figure IV. 4: structure des analogues de l'Ohmlin comportant une fonction azoture, amine et acétamide.

Des travaux antérieurs de l'équipe (non-publiés) avaient montré que le composé comportant un motif amide et une partie polaire de type phosphocholine est un composé activateur des canaux SK3 (Figure IV. 5).

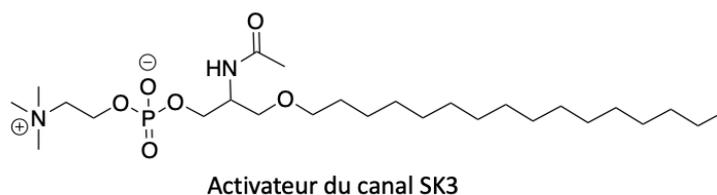


Figure IV. 5: Structure d'un analogue de l'Ohmlin, activateur du canal SK3 possédant une tête polaire de type phosphocholine et un groupement acétamide en position *sn-2*.

Le choix de ces fonctions azotées permet également de moduler à la fois les contraintes stériques et les contraintes électroniques.

II - Synthèse de nouveaux analogues de l'Ohmlin

II.1 Synthèse du 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-ethyl-*rac*-glycero-3- β -lactose [IV.5a](#) et du 1-*O*-icosyl-2-*O*-ethyl-*rac*-glycero-3- β -lactose [IV.5b](#)

La fonction méthoxy ayant conduit aux meilleurs résultats d'inhibition de l'activité du canal SK3 dans le cas de l'Ohmline, nous avons, dans un premier temps, décidé d'allonger la longueur de la chaîne alkyle d'une unité méthylène grâce à un groupement éthoxy.

De plus, dans la continuité des études menées au laboratoire sur les analogues de l'Ohmline, et plus particulièrement sur l'allongement de la longueur de la chaîne lipidique de la position *sn-1*, il a été décidé de synthétiser un autre analogue possédant un motif éthoxy en *sn-2*, mais dont la longueur de la chaîne en *sn-1* serait allongée de 16 (composé **IV.5a**) à 20 carbones (composé **IV.5b**). La synthèse du composé **IV.5b** suit exactement la même stratégie que pour l'obtention du composé **IV.5a**, seul l'alcool lipidique de départ a été modifié par l'icosanol. La synthèse est présentée à la [Figure IV. 6](#).

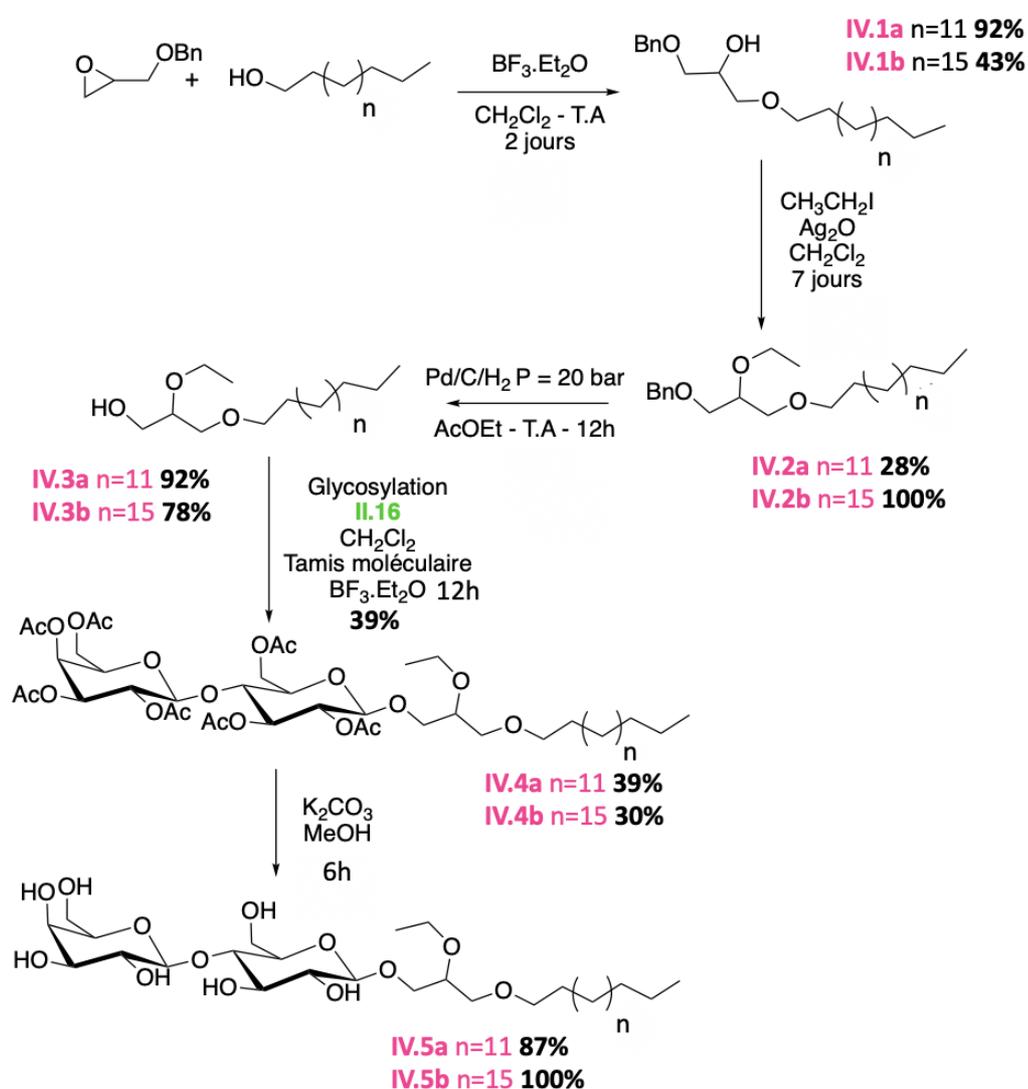


Figure IV. 6: Synthèse réactionnelle réalisée pour l'obtention des composés **IV.5a** **IV.5a** et **IV.5b**.

Pour chacun de ces dérivés, elle a débuté par une ouverture régiosélective d'un époxyde benzylé, grâce à l'utilisation de l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ et de l'alcool correspondant, afin d'obtenir les dérivés **IV.1a et b**.

Cette réaction nous a permis de réduire le nombre d'étapes réactionnelles initialement mis en place pour la synthèse des blocs aglycones, de 8 à 5 étapes réactionnelles. En effet, elle nous permet de nous affranchir de la réaction de substitution nucléophile de type 2 entre le solkétal et le bromoalcane correspondant, de la déprotection de la fonction acétal et de la protection de l'alcool primaire (Figure IV. 7).

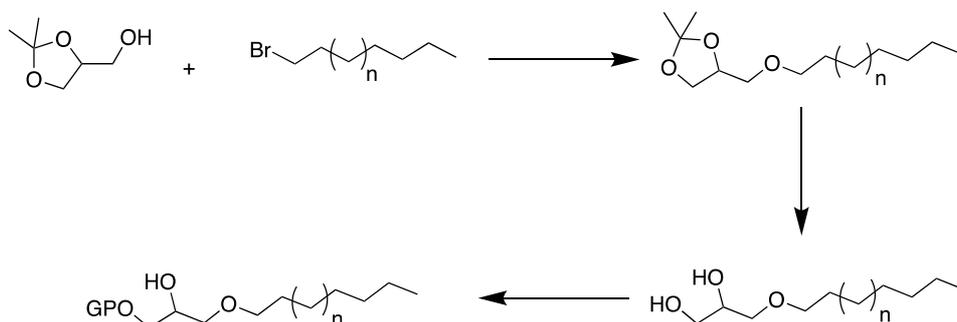


Figure IV. 7: Schéma réactionnel initialement mis en place pour la synthèse des blocs aglycones.

L'alkylation de l'alcool secondaire a été réalisée avec la méthode d'Irvine-Purdie¹²⁶ ($\text{Ag}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$) afin d'obtenir les dérivés **IV.2a et b**. L'hydrogénolyse, en présence de palladium sur charbon (5%) et sous haute pression de dihydrogène ($P = 20$ bars), permet la déprotection du groupement protecteur (benzyle) présent sur l'alcool primaire de la position *sn*-3 pour obtenir les composés **IV.3a et IV.3b**. La réaction de glycosylation est ensuite effectuée entre les composés **IV.3a. ou IV.5b** et le lactose activé par le trichloroacétimide **II.16** pour obtenir les composés **IV.4a et IV.4b**. Pour finir, la déprotection des fonctions alcools du disaccharide par du carbonate de potassium nous a permis d'obtenir les produits finaux **IV.5a et IV.5b** attendus. Tous deux sont de configuration exclusive β comme l'atteste leur spectre RMN respectif présentés à la Figure IV. 8.

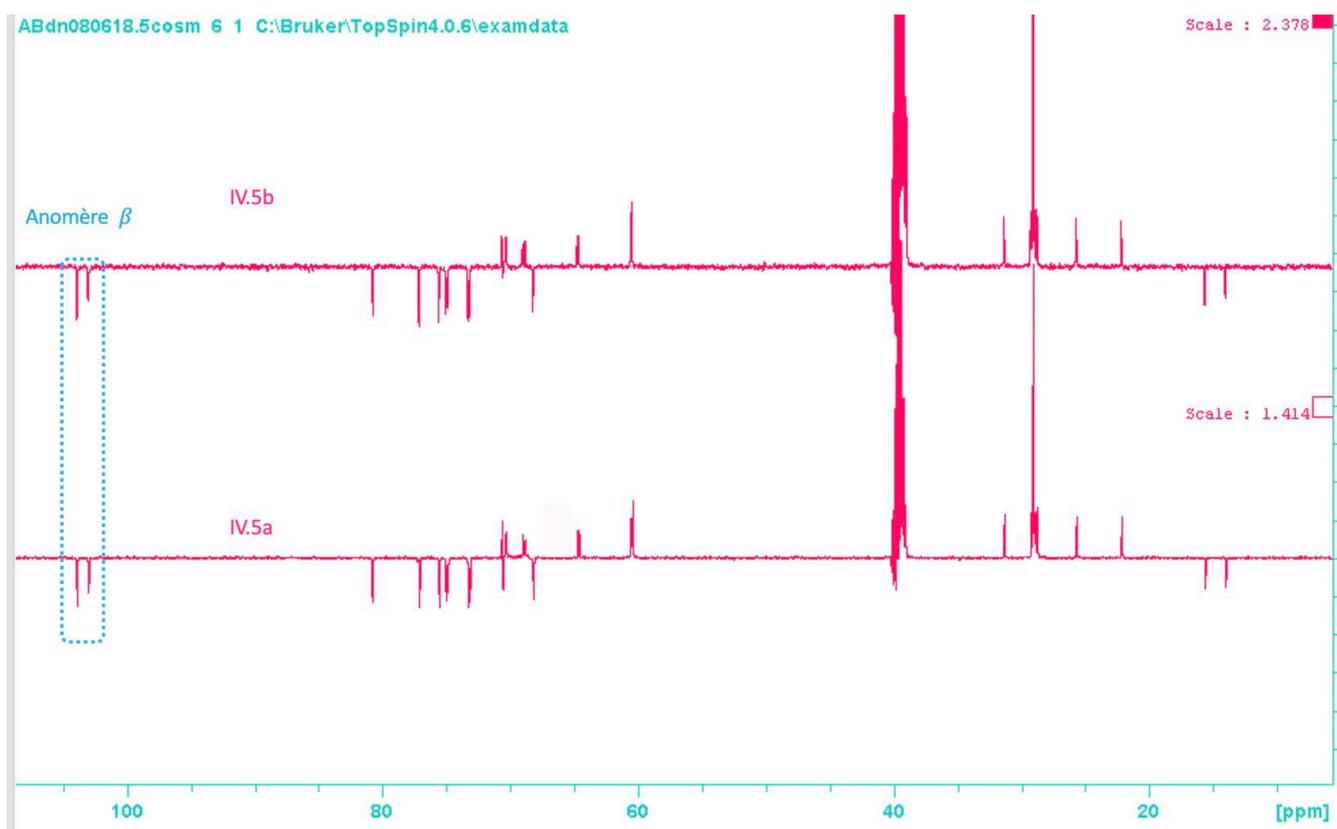


Figure IV. 8: Spectres RMN Jmod des composés IV.5a et IV.5b.

II.2 Synthèse du 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-benzyl-*rac*-glycero-3- β -lactose IV.12 et du 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-fluorobenzyl-*rac*-glycero-3- β -lactose IV.16 (Figure IV. 9)

Par la suite, la seconde série de composés modulés en position *sn*-2 s'est poursuivie avec la synthèse de nouveaux analogues de l'Ohmline possédant un groupement benzyle ou fluorobenzyle.

La synthèse des composés IV.12 et IV.16 débute par une S_N2 sur le bromohexane grâce à la formation de l'alcoolate par l'hydru de sodium, pour former le dérivé IV.6. Cette réaction a été favorisée par l'utilisation d'iodure de sodium. La fonction acétale du solkétal a ensuite été déprotégée par de l'acide chlorhydrique concentré afin d'obtenir le diol IV.7 correspondant. L'alcool primaire a ensuite été protégé grâce au chlorure de tert-butylidimethylsilane pour fournir le composé IV.8. Puis, l'alcool secondaire a été alkylé par le bromure de benzyle ou le bromure de fluorobenzyle pour fournir respectivement les composés IV.9 et IV.13.

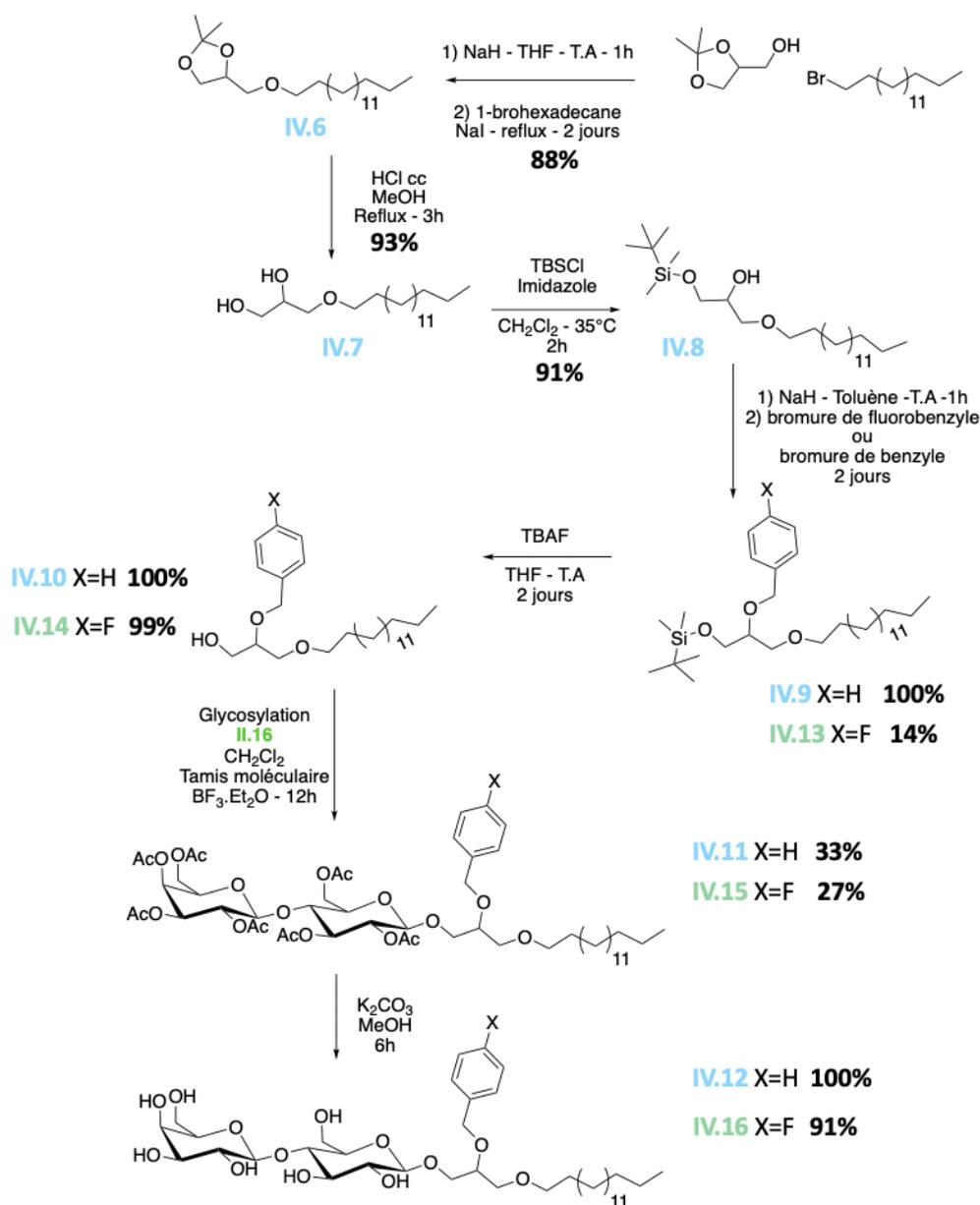


Figure IV. 9: Synthèse des composés IV.12 et IV.16.

La méthode de Irvine-Purdie¹²⁶, pour une raison que l'on ignore encore, n'a jamais fonctionné. Pourtant l'alkylation d'un alcool secondaire par l'oxyde d'argent et le bromure de benzyle est bien décrite¹⁷⁵. Pour contourner cette difficulté, nous avons appliqué la méthode utilisée lors de la synthèse de l'Ohmline pour l'obtention des 2 dérivés IV.9 et IV.13. Celle-ci qui consiste en une substitution nucléophile de type 2, grâce à la formation de l'alcoolate du composé IV.8 par l'hydrure de sodium, sur le bromure de benzyle ou le bromure de fluorobenzyle, pour fournir les dérivés IV.9 et IV.13 correspondants. Les blocs

¹⁷⁵ A. Bouzide, G. Sauvé, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5945–5948.

aglycones IV.10 et IV.14 ont ensuite été obtenus par la déprotection du groupement protecteur silylé par le fluorure de tétrabutylammonium permettant de réaliser la réaction de glycosylation et d'obtenir les composés IV.11 et IV.15. Les produits finaux IV.12 et IV.16 ont été obtenus par déprotection des fonctions hydroxyles de la tête polaire dissaccharidique grâce à l'utilisation du carbonate de potassium. Les rendements globaux de cette synthèse multi-étapes sont respectivement de 25% et de 3% pour les composés IV.12 et IV.16. Le très faible rendement obtenu pour la synthèse multi-étapes du composé IV.16 s'explique par la difficulté de séparation rencontrée lors de la réalisation de la colonne de chromatographie sur gel de silice, entre le composé IV.13 et le bromure de fluorobenzyle. Deux chromatographies sur colonnes auront été nécessaire pour isoler proprement le dérivé IV.13 (263 mg). Les deux analogues obtenus se retrouvent exclusivement sous la forme anomérique β avec des déplacements spectroscopiques de (103,01 et 102,87 ppm) et (103,02 et 102,90 ppm) respectivement pour IV.12 et IV.16. (Figure IV. 10).

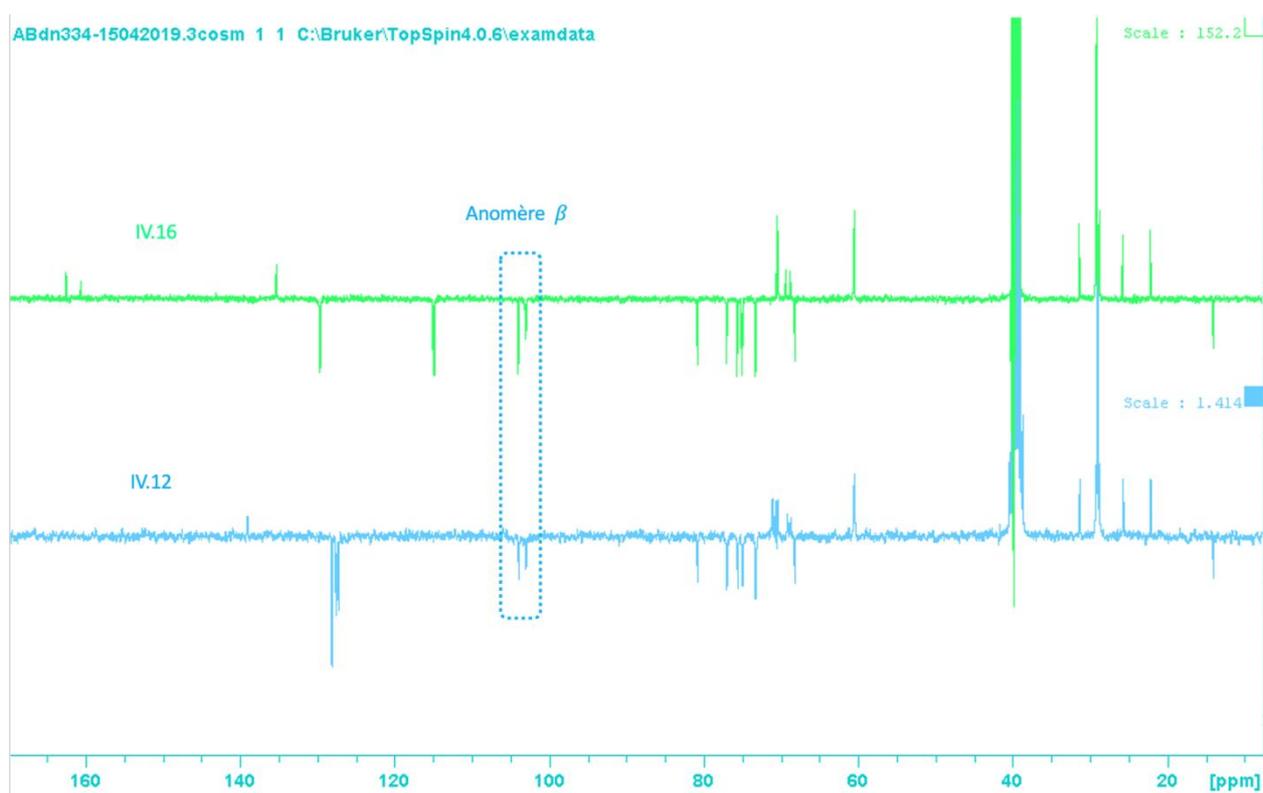


Figure IV. 10: Anomérie de la position anomérique des composés IV.12 et IV.16.

II.3 Synthèse du 1-*O*-hexadecyl-2-azido-*rac*-glycero-3- β -lactose [IV.21](#), du 1-*O*-hexadecyl-2-amino-*rac*-glycero-3- β -lactose [IV.22](#) et du 1-*O*-hexadecyl-2-acetamido-*rac*-glycero-3- β -lactose [IV.27](#)

La synthèse du composé [IV.27](#) qui comprend une fonction amide en position *sn*-2 passe par la formation d'un azoture puis d'une amine.

Ainsi, au cours de sa préparation, une fraction de chaque précurseur azoture ([IV.21](#)) et amine ([IV.22](#)) a été isolée pour réaliser les évaluations biologiques. Le dernier composé de cette série est le composé comprenant une fonction amide ([IV.27](#)). La synthèse de ces trois analogues est décrite dans la [Figure IV. 11](#). Il existe plusieurs méthodes pour former une amine à partir d'un alcool comme la réaction de Gabriel par exemple, qui utilise l'ion phthalimide, généré *in situ* par une base forte, ainsi qu'un halogénure d'alkyle¹⁷⁶, la réaction de Ritter¹⁷⁷ ou la méthode des azotures. C'est cette dernière que nous avons utilisée. Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Byun *et al.* et de Manzo *et al.* pour sa réalisation^{178, 179}.

À partir du dérivé [IV.8](#), l'alcool secondaire de la position *sn*-2 a été activé par le chlorure de mésyle pour former le dérivé [IV.17](#). Le mésylate [IV.17](#) est alors engagé dans une réaction de type SN₂ avec l'azoture de sodium. Lors de cette étape, deux précurseurs ont été isolés après purification : le précurseur [IV.18](#) qui correspond au composé attendu, et le précurseur [IV.19](#) qui lui correspond au dérivé azoture mais déprotégé au niveau de la fonction alcool primaire.

¹⁷⁶ M. S. Gibson, R. W. Bradshaw, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, 7, 919–930.

¹⁷⁷ A. Guérinot, S. Reymond, J. Cossy, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 19–28.

¹⁷⁸ H.-S. Byun, R. Bittman, P. Samadder, G. Arthur, *ChemMedChem* **2010**, 5, 1045–1052.

¹⁷⁹ E. Manzo, M. Carbone, E. Mollo, C. Irace, A. Di Pascale, Y. Li, M. L. Ciavatta, G. Cimino, Y.-W. Guo, M. Gavagnin, *Org. Lett.* **2011**, 13, 1897–1899.

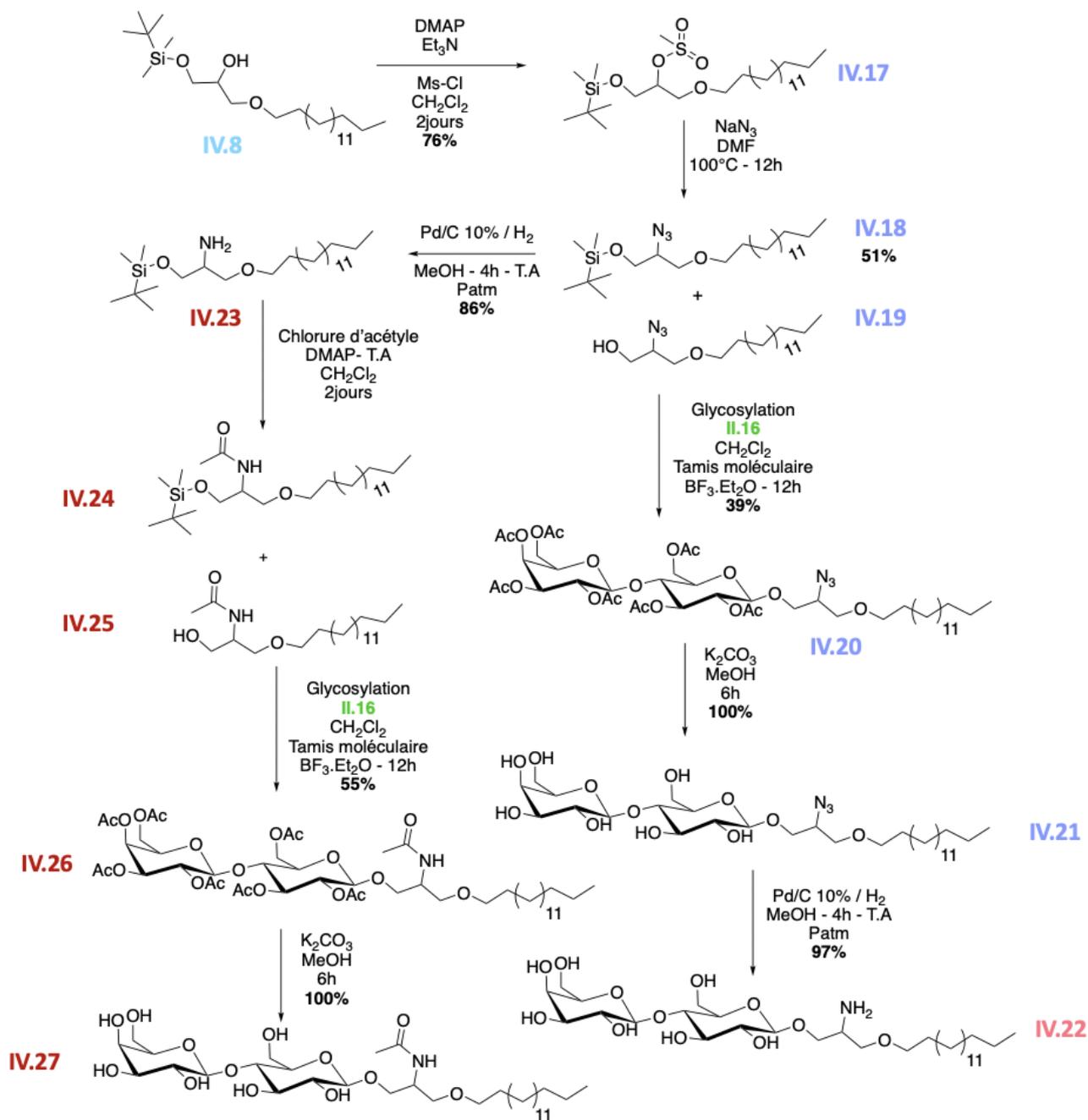


Figure IV. 11: Synthèses des composés IV.21, IV.22 et IV.27.

Ce dernier a pu être engagé dans une réaction de glycosylation pour obtenir le dérivé IV.20. Le premier produit final attendu IV.21 a été obtenu après déprotection par le carbonate de potassium, des fonctions acétates de la tête polaire.

Une petite fraction du produit IV.21 a été utilisée pour l'obtention du second produit final IV.22 souhaité par réduction par le dihydrogène à pression atmosphérique, en présence de palladium sur charbon (10%).

L'obtention du troisième analogue possédant une fonction amide en *sn-2* s'est faite à partir du précurseur IV.18. En présence de palladium sur charbon, sous pression atmosphérique de dihydrogène, la fonction azoture a pu être réduite et conduire au précurseur IV.23. Lors de cette étape, deux produits ont été isolés après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. Il s'agit des précurseurs IV.24 et du IV.25 correspondant respectivement au dérivé dont l'alcool primaire est toujours protégé par le groupement silylé ou bien déprotégé. Le précurseur déprotégé IV.25, obtenu en quantité suffisante, a été engagé dans une réaction de glycosylation pour obtenir le dérivé IV.26. Celui-ci a été déprotégé par le carbonate de potassium pour fournir le troisième analogue souhaité IV.27. Les trois analogues, comme tous ceux présentés dans ce manuscrit, sont également de configuration exclusive β (Figure IV. 12).

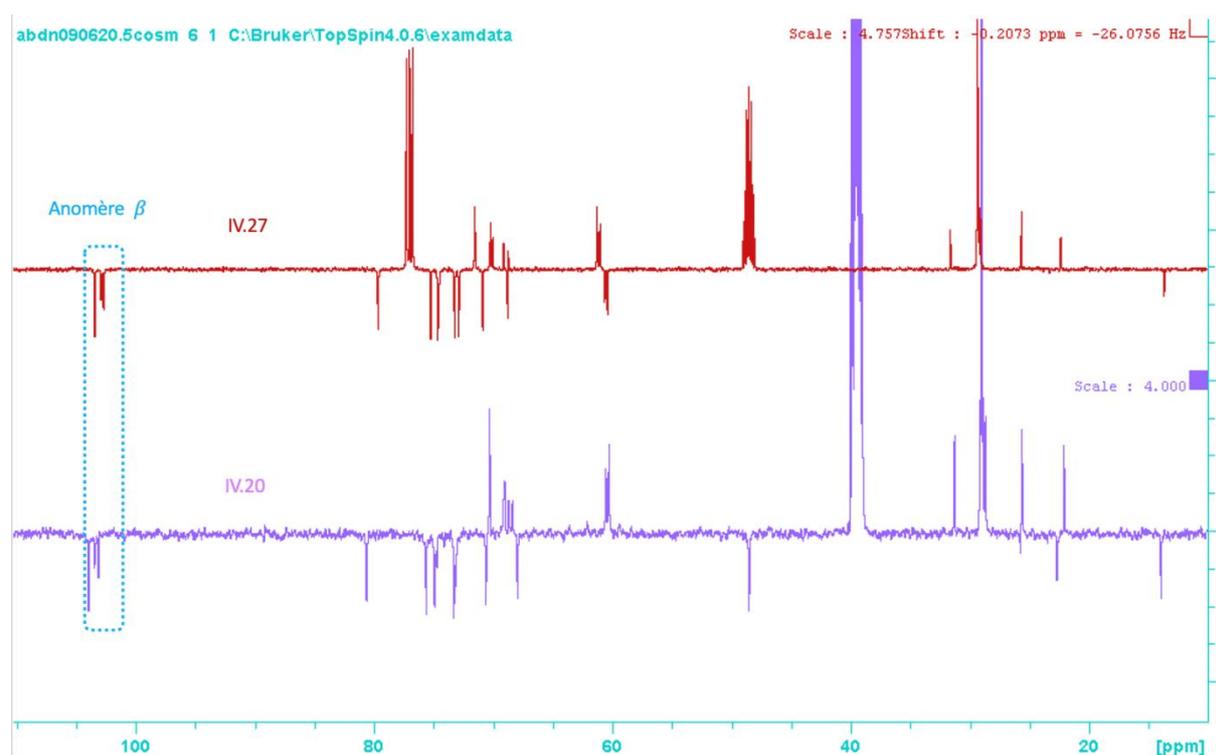


Figure IV. 12: Spectre RMN Jmod des composés IV.20 et IV.27 montrant la configuration exclusive β de ces composés.

Le spectre RMN du composé IV.22, n'est pas présenté dans ce manuscrit suite à des difficultés rencontrées lors de la solubilisation du composé, et ce, malgré plusieurs tentatives de solubilisation dans différents solvants deutérés (DMSO-d₆, CDCl₃, CDCl₃ /

MeOD en différentes proportions et DMSO-d6 / D₂O). L'attribution spectroscopique a tout de même pu être réalisée mais sans amélioration de la résolution spectrale.

Tous ces nouveaux analogues (IV.5a, IV.5b, IV.12, IV.16, IV.21, IV.22 et IV.27) (Figure IV. 13) ont été transmis à l'équipe du Pr. Christophe Vandier pour les études biologiques.

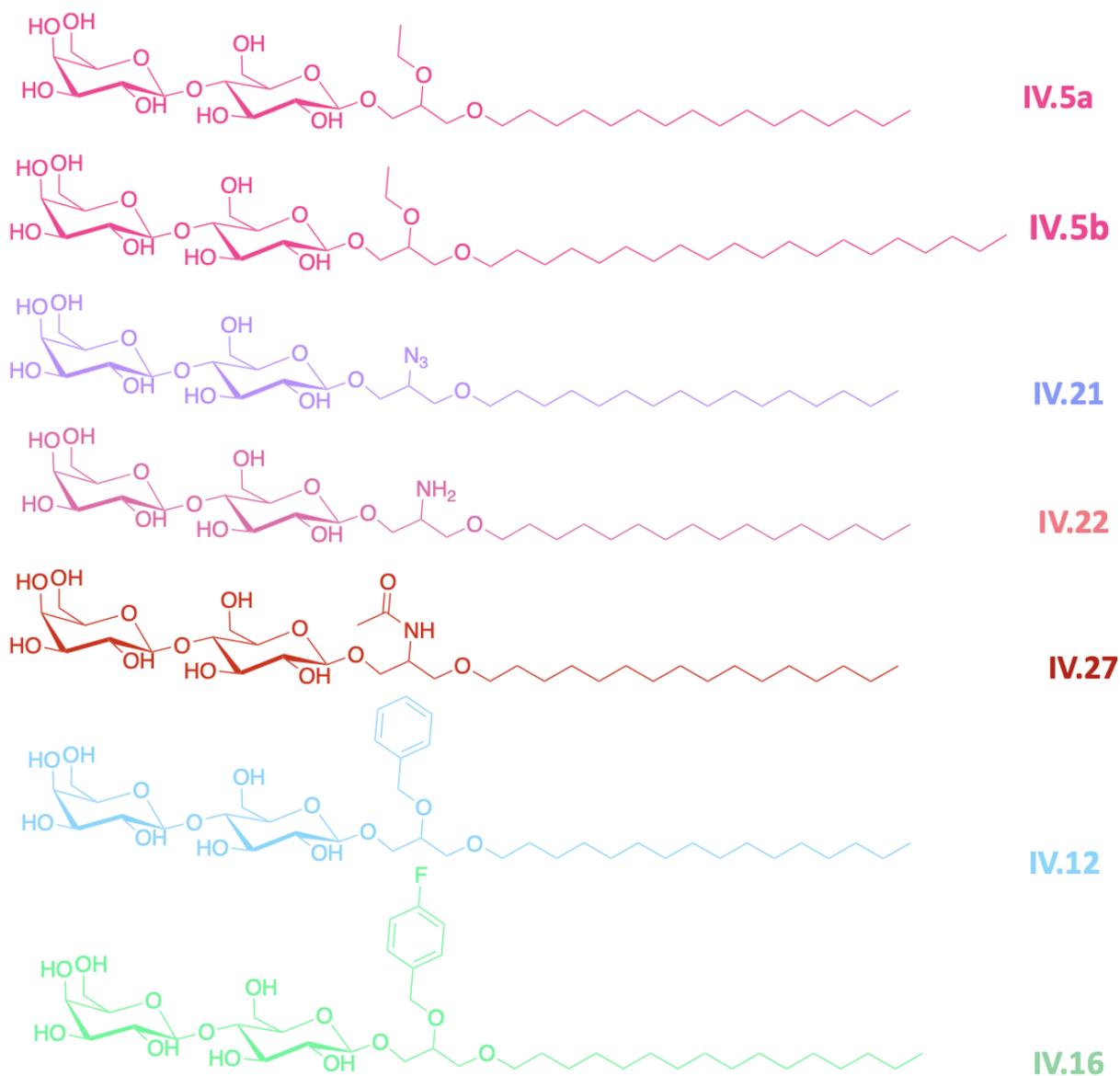


Figure IV. 13: structure des analogues modulés en position *sn*-2.

III -Évaluations par patch-clamp des nouveaux analogues

En ce qui concerne l'évaluation de nos analogues modifiés en position *sn-2*, ils ont, tout comme nos analogues présentés au [chapitre 3](#), été testés sur les cellules HEK293T-SK3, dont le plasmide de la protéine SK3 code pour le gène [humain \(hSK3\)](#). Les courants mesurés sont présentés dans la [Figure IV. 14](#).

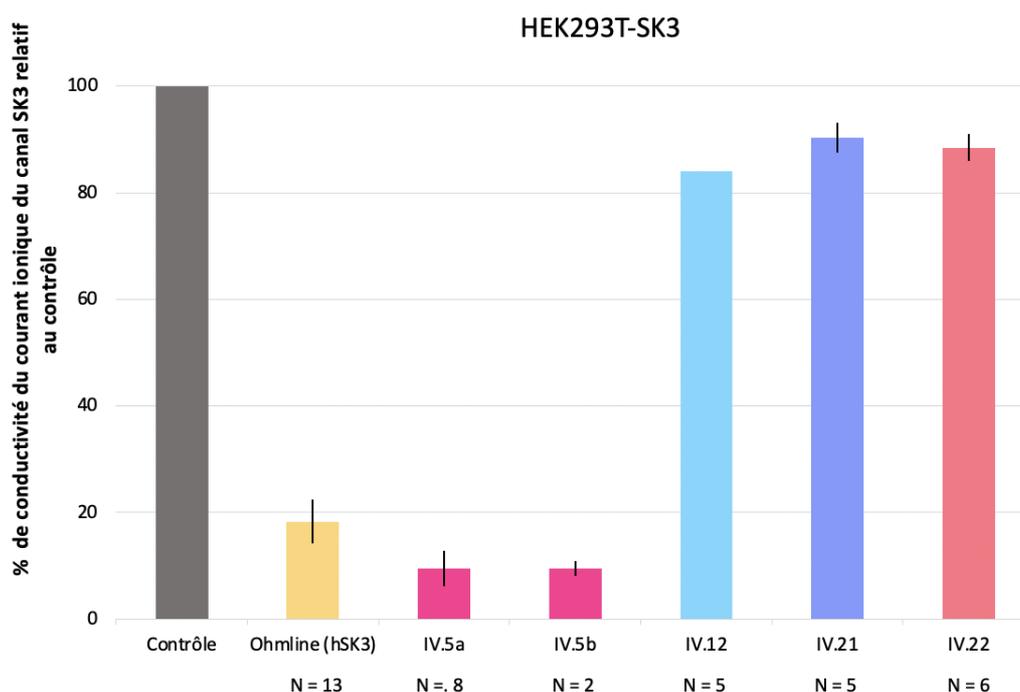


Figure IV. 14: Mesure de l'inhibition du courant ionique dépendant du canal SK3 par la technique de patch-clamp.

Ainsi, on peut constater que les analogues [IV.5a](#) et [IV.5b](#) inhibent fortement le courant ionique dépendant du canal SK3 et ce, de façon plus importante que l'Ohmline ($-81,7 \pm 3,9\%$), avec des valeurs d'inhibition respectives de $-90,55 \pm 3,13\%$ et $-90,5 \pm 1,2\%$. Ces deux analogues, que l'on peut uniquement différencier par leur longueur de chaîne lipidique qui est de 16 carbones pour [IV.5a](#) et de 20 carbones pour [IV.5b](#), modulent de façon identique le courant ionique. On peut donc en conclure que l'allongement de 4 unités méthylène de la chaîne lipidique n'entraîne pas de modification de l'action sur les canaux SK3.

En ce qui concerne les composés [IV.12](#), [IV.21](#) et [IV.22](#), aucun d'entre eux n'a d'effet sur l'inhibition du courant avec pour valeur respective -16% , $-9,7 \pm 2,6\%$ et $-11,5 \pm 2,4\%$. Le nombre de répliquas pour l'étude du composé [IV.12](#) n'étant pas assez suffisant (N=2 contre au minimum N=5 pour les composés [IV.12](#) et [IV.21](#)), d'autres mesures doivent être réalisées

avec ce composé pour envisager d'obtenir une moyenne de modulation (haute et basse) fiable.

Les études des analogues [IV.16](#) et [IV.27](#) sont, quant à elles, en cours.

Les analogues [IV.5a](#) et [IV.5b](#) sont donc, pour le moment, les seuls à être capable d'inhiber fortement le courant ionique dépendant du canal SK3. Des études complémentaires doivent être mis en place pour montrer que la modulation de l'activité des canaux SK3 est corrélée à une modulation de la concentration calcique cytosolique. Si cette corrélation est observée, des études de migration cellulaire pourront être effectuées ainsi que des études de toxicité. En ce qui concerne les autres analogues, il apparaît que la position *sn-2* est une position très sensible pour l'activité des composés. La présence d'une fonction azoté (azoture ou amine) ou encore d'un groupement benzyle, entraîne une perte d'activité. Dans le cas du composé aminé, il est à noter que, dans les conditions physiologique, celle-ci est probablement protonée. La présence d'une charge serait susceptible de modifier les interactions moléculaires et pourrait expliquer ce résultat.

IV - Conclusion

Dans ce chapitre, sept nouveaux analogues de l'Ohmlin, ayant une structure modulée en position *sn-2*, ont été synthétisés. Les deux analogues comportant une fonction éthoxy se sont avérés être de puissants inhibiteurs du canal SK3. Des études complémentaires permettront de montrer si cette très forte modulation des canaux SK3 est corrélée à une diminution de la concentration cytosolique en ions calciques. Néanmoins, au regard de leurs action inhibitrice des canaux SK3, ces analogues font partie des composés inhibiteurs les plus puissants conçus dans notre laboratoire.

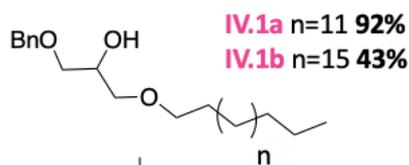
En ce qui concerne les analogues comprenant une fonction, benzyle, azoture ou amine, aucun d'entre eux ne module le courant ionique dépendant du canal SK3.

Cette position joue donc un rôle cruciale dans la modulation de ce dernier, comme cela l'avait déjà été indiqué au [Chapitre I](#).

Finalemment, l'ajout d'une unité méthylène en position *sn-2* est celle qui a permis une modulation des canaux SK3 plus importante. Ces résultats nous ont incité à poursuivre les modulations de cette position avec la synthèse de nouveaux analogues dont la chaîne alkyle serait de nouveau allongée par un groupement propyle, butyle *etc.*

Experimental section

1-(benzyloxy)-3-(hexadecyloxy)propan-2-ol IV.1a



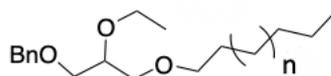
$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (cat) and hexadecanol (3.9g, 12.04 mmol, 1 Eq.) were added to a solution of compound benzyl glycidyl ether (3.8 mL, 24.7 mmol, 2 Eq.) in CH_2Cl_2 (20 mL). The mixture was stirring during 2 days at room temperature. The solution was neutralized by NaHCO_3 and washed with brine. The organic layer was evaporated under reduced pressure and the resulting residue was purified by silica gel chromatography using petroleum ether and ethyl acetate (95/5) as eluent to obtained the pure compound **IV.1b** as white oil in 43% yield (1.2g). Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (4/1)): 0.7; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.31 (m, 5H, H_{ar}); 4.52 (m, 2H, CH_2 benzyl); 3.99-3.36 (m, 7H, $sn-2 + sn-3 + sn-1 + \text{CH}_2 \alpha \text{ O}$); 1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{ O}$); 1.32-1.27 (m, 26H); 0.88 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz; CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (75.474 MHz): δ (ppm) 137.80 (C_q); 128.44 + 127.77 + 127.60 (CH_{ar} benzyle), 74.15 (CH_2 , $sn-3$); 73.34 ($\text{CH}_2 \alpha$ benzyle), 73.14 ($\text{CH}_2 sn-1$); 71.18 ($\text{CH}_2 \alpha \text{ O}$); 69.62 (CH , $sn-2$), 31.9 + 29.6 + 29.4 + 26.0 (CH_2 fatty chain); 14.3 (CH_3 , fatty chain).

1-(benzyloxy)-3-(icosyloxy)propan-2-ol IV.1b

$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (cat) and icosanol (1.8g, 6.03 mmol, 1 Eq.) were added to a solution of compound benzyl glycidyl ether (1.84 mL, 12.06 mmol, 2 Eq.) in CH_2Cl_2 (20 mL). The mixture was stirring during 2 days at room temperature. The solution was neutralized by NaHCO_3 and washed with brine. The organic layer was evaporated under reduced pressure and the resulting residue was purified by silica gel chromatography using petroleum ether and ethyl acetate (95/5) as eluent to obtained the pure compound **IV.1b** as white oil in 43% yield (1.2g). Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (95/5)): 0.24; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.32 (m, 5H, H_{ar}); 4.46 (s, 2H, CH_2 benzyl); 3.98 (m, 1H, $sn-2$); 3.55 (m, 6H, $sn-3 + sn-1$

+ CH₂ α O); 1.55 (m, 2H, CH₂ β O); 1.32-1.26 (m, 34H); 0.88 (t, 3H, J_{HH} = 7.0 Hz; CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (75.474 MHz): 137.80 (C_q); 128.52 + 127.82 (CH_{ar} benzyle), 73.56 (CH₂, *sn*-3); 71.95 + 71.81 + 71.56 (CH₂ α benzylé + CH₂ *sn*-1 + CH₂ α O); 69.66 (CH, *sn*-2), 31.9 + 29.6 + 29.4 + 26.0 + 22.6 (CH₂ fatty chain); 14.23 (CH₃, fatty chain).

General procedure for ethylation reaction (compounds **IV.2a** and **b**)



IV.2a n=11 28%

IV.2b n=15 100%

To a stirred solution of **IV.1a-b** (1 Eq.) previously diluted in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) and placed under nitrogen atmosphere, were added silver oxide (5 Eq.) and molecular sieves (~ 2 g). Iodoethane (10 Eq.) was added dropwise. The mixture was refluxed for 2 days and filtered on Celite. The celite pad was washed with dichloromethane. The filtrate was concentrated to produce **IV.2a-b** as a colorless oil or wax in 28% yield (**IV.2a**) or 92% yield (**IV.2b**). Compound **IV.2a** was purified by silica gel column chromatography (petroleum ether / ethyl acetate (1/100)) and compound **IV.2b** was used without further purification.

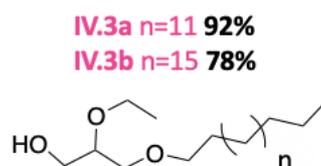
((2-ethoxy-3-(hexadecyloxy)propoxy)methyl)benzene IV.2a

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.2a** was prepared in 28% yield (1.5g) as a colorless liquid. R_f TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl. acetate (100/1)): 0.15; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): 7.29 (m, 5H, H_{ar}); 4.56 (s, 2H, CH₂ benzyl); 3.67-3.50 (m, 7H, *sn*-2 + *sn*-3 + *sn*-1 + CH₂ OEt); 3.47 (t, 2H, J_{HH} = 7.0 Hz CH₂ α O); 1.54 (m, 2H, CH₂ β O); 1.32-1.27 (m, 26H); 1.18 (m, 3H, CH₃ OEt); 0.88 (t, 3H, J_{HH} = 7.0 Hz; CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (75.474 MHz): 138.36 (C_q); 128.04 + 127.29 + 127.22 (CH_{ar} benzyle); 77.68 (CH, *sn*-2); 73.16 (CH₂ α benzyle); 71.41 + 70.69 + 70.21 (*sn*-3 + *sn*-1 + CH₂ α O); 32.2 + 29.6 + 29.4 + 26.0 (CH₂ fatty chain); 15.48 (CH₃ OEt); 13.94 (CH₃, fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 434.376 found [M+Na]⁺ 457.538; theoretical value for [M+Na]⁺ 457.453.

((2-ethoxy-3-(icosyloxy)propoxy)methyl)benzene IV.2b

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.2b** was prepared in 92% yield (940 mg) as a white wax. Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl. acetate (8/2)): 0.36; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): 7.28 (m, 5H, H_{ar}); 4.56 (s, 2H, CH_2 benzyl); 3.67-3.38 (m, 9H, $sn-2 + sn-3 + sn-1 + \text{CH}_2$ OEt + CH_2 α O); 1.56 (m, 2H, CH_2 β O); 1.21 (m, 44H); 1.19 (m, 3H, CH_3 OEt); 0.86 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz; CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (75.474 MHz): 138.51 (C_{q}); 128.34 + 127.61 + 127.53 (CH_{ar} benzyle); 77.82 (CH, $sn-2$); 73.42 (CH_2 α benzyle); 71.71 + 70.84 + 70.38 ($sn-3 + sn-1 + \text{CH}_2$ α O); 32.04 + 29.9 + 29.5 + 22.8 (CH_2 fatty chain); 15.70 (CH_3 OEt); 14.17 (CH_3 , fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 490.439 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 513.647; theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 513.534.

General procedure for the debenylation (compounds IV.3a-b)



In the hydrogenation cell was added Palladium on carbon (5%) (1.5 Eq.) and **IV.2a-b** (1 Eq.) previously diluted in 20 mL of ethyl acetate. Then, the hydrogenation cell was placed under dihydrogen pressure ($P = 20$ bar) and the mixture was stirred during 12h. The solution was filtered and concentration to give the compounds IV.3a-b with 78% and 92% yield as a white wax. These compounds were used without further purification.

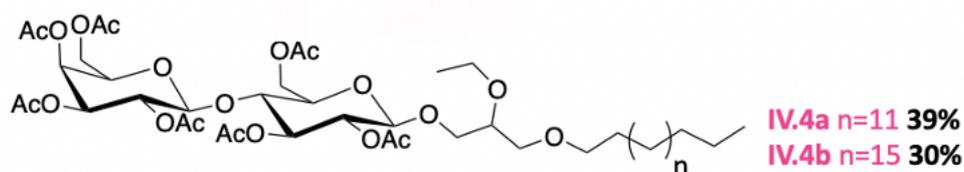
2-ethoxy-3-(hexadecyloxy)propan-1-ol IV.3a

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.3a** was prepared in 92% yield (1.1g) as a white wax. Rf TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl. acetate (8/2)): 0.25; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 3.66 - 3.37 (m, 7H, $sn-2 + sn-3 + sn-1 + \text{CH}_2$ OEt); 3.35 (t, 2H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz CH_2 α O); 1.51 (m, 2H, CH_2 β O); 1.14 (m, 26H); 1.16 (m, 3H, CH_3 OEt); 0.83 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz; CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (75.474 MHz): δ (ppm) 77.53 (CH, $sn-2$); 71.87 (CH_2 α O); 70.95 (CH_2 , $sn-1$); 65.69 (CH_2 , OEt); 62.98 (CH_2 , $sn-3$); 32.01 + 29.7 + 29.4 + 29.03 + 22.75 + 19.24 (CH_2 fatty chain); 15.61 (CH_3 OEt); 14.13 (CH_3 , fatty chain);

2-ethoxy-3-(icosyloxy)propan-1-ol IV.3b

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.3b** was prepared in 78% yield (1.1g) as a white wax. R_f TLC (Eluent: petroleum ether / ethyl. acetate (8/2)): 0.25; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ (ppm) 3.74 - 3.44 (m, 7H, *sn*-2 + *sn*-3 + *sn*-1 + CH₂ OEt); 3.38 (m, 2H, CH₂ α O); 1.56 (m, 2H, CH₂ β O); 1.14 (m, 27H); 1.18 (m, 3H, CH₃ OEt); 0.85 (t, 3H, J_{HH} = 7.0 Hz; CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (75.474 MHz): δ (ppm) 78.47 (CH, *sn*-2); 71.81 (CH₂ α O); 70.92 (CH₂, *sn*-1); 65.55 (CH₂, OEt); 62.86 (CH₂, *sn*-3); 32.00 + 29.79 + 29.7 + 29.45 + 26.16 + 22.74 (CH₂ fatty chain); 15.58 (CH₃ OEt); 14.10 (CH₃, fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 400.392 found [M+H]⁺ 401.238 and [M+Na]⁺ 423.515; theoretical value for [M+Na]⁺ 423.413.

General procedure for the glycosylation reaction (compounds IV.4a-c)



Peracetylated lactose trichloroacétimidate **II.16** (1.2 Eq.) solubilized in dry CH₂Cl₂ (20 mL) was added dropwise to a solution of **IV.3a-b** (1 Eq.) in CH₂Cl₂ (25 mL). The mixture was stirred with molecular sieves (~ 2 g) during one hour under nitrogen atmosphere. At 0°C, boron trifluoride diethyl etherate (0.8 Eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at RT under inert atmosphere. The mixture was quenched by addition of water (40 mL). The organic layer was washed with aqueous saturated NaHCO₃ solution and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, concentrated to give the crude compounds **IV.4a-c**. The product was purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/2)) to give the pure compounds **IV.4a-c** as white foam between 39% and 30% yield.

**1-O-hexadecyl-2-O-ethyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-
2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside IV.4a**

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.4a** was prepared in 39% yield (1.2 g). Rf TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (7/3)): 0.15; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.253 MHz): δ (ppm) 5.26 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$); 5.12-5.10 (m, 1H, H_3); 5.11-5.07 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$); 4.96-4.93 (m, 1H, H_3); 4.91-4.86 (m, 1H, H_2); 4.51-4.43 (m, 3H, $\text{H}_{6a} + \text{H}_1 + \text{H}_{1'}$); 4.09-4.01 (m, 3H, $\text{H}_{6'a} + \text{H}_{6'b} + \text{H}_{6b}$); 3.88-3.70 (m, 3H, $\text{sn-3}_b + \text{H}_{5'} + \text{H}_4$); 3.61-3.32 (m, 9H, $\text{sn-3}_a + \text{H}_5 + \text{OCH}_2\text{CH}_3 + \text{CH sn-2} + \text{CH}_2 \text{sn-1} + \text{CH}_2 \alpha \text{ Solketal}$); 2.06-1.88 (m, 21H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$ Lactose); 1.46 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{ solketal}$); 1.23 (m, 26H, fatty chain); 1.09 (m, 3H, $\text{CH}_3 \text{ OEt}$); 0.81 (CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.771 MHz): δ (ppm) 170.10 (CO); 170.08 (CO); 169.90 (CO); 169.79 (CO); 169.52 (CO); 169.28 (CO); 168.83 (CO); 101.73 ($\text{C}_{1'}$); 100.62 + 100.58 ($\text{C}_1 \beta$ anomere); 77.37 + 77.16 ($\text{C}_{\text{sn-2}}$ – two diastereoisomers); 75.99 (C_4); 72.61 + 72.58 ($\text{C}_3 + \text{C}_5$); 71.41 (C α Solketal); 70.73 (C_2); 70.38 ($\text{C}_{3'} + \text{C}_{5'}$); 70.16 + 70.05 + 69.92 (C sn-3_a – two diastereoisomers + sn-1 – two diastereoisomers); 68.97 (C_2); 66.66 (C_4); 65.66 + 65.29 ($\text{CH}_2 \text{ OEt}$, two diastereoisomers); 60.71 (C_6); 60.04 (C_6'); 31.65 + 29.40 + 29.20 + 29.08 + 25.83 + 22.40 (CH_2 fatty chain); 20.65 + 20.48 + 20.27 + 20.15 (C –OAc Lactose); 15.30 ($\text{CH}_3 \text{ OEt}$); 13.89 (CH_3 fatty chain);

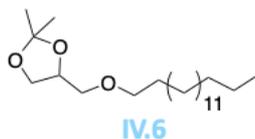
**1-O-icosyl-2-O-ethyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-
2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside IV.4b**

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.4b** was prepared in 30% yield (453 mg). Rf TLC (Eluent: pentane/ ethyl acetate (6/4)): 0.46; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.130 MHz): δ (ppm) 5.35 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$); 5.18 (t, 1H, $J_{\text{HH}} = 9.0 \text{ Hz}$, H_3); 5.12-5.08 (m, 1H, $\text{H}_{2'}$); 4.96-4.92 (m, 1H, H_3); 4.91-4.87 (m, 1H, H_2); 4.56-4.46 (m, 3H, $\text{H}_{6a} + \text{H}_1 + \text{H}_{1'}$); 4.14-4.05 (m, 3H, $\text{H}_{6'a} + \text{H}_{6'b} + \text{H}_{6b}$); 3.89-3.76 (m, 3H, $\text{sn-3}_b + \text{H}_{5'} + \text{H}_4$); 3.63-3.38 (m, 9H, $\text{sn-3}_a + \text{H}_5 + \text{OCH}_2\text{CH}_3 + \text{CH sn-2} + \text{CH}_2 \text{sn-1} + \text{CH}_2 \alpha \text{ Solketal}$); 2.14-1.96 (m, 21H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$ Lactose); 1.60-1.51 (m, 4H, $\text{CH}_2 \beta + \gamma \text{ solketal}$); 1.27 (m, 30H, fatty chain); 1.15 (m, 3H, $\text{CH}_3 \text{ OEt}$); 0.86 (CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.771 MHz): δ (ppm) 170.35 (CO); 170.14 (CO); 170.06 (CO); 169.76 (CO); 169.54 (CO); 169.06 (CO); 101.09 ($\text{C}_{1'}$); 100.84 + 100.79 ($\text{C}_1 \beta$ anomere); 77.69 ($\text{C}_{\text{sn-2}}$); 76.30 (C_4); 72.87 (C_3); 72.58 (C_5); 71.78 (C α Solketal); 71.71 ($\text{C}_{5'}$); 70.98 (C_2); 70.67 ($\text{C}_{3'}$); 70.61 + 70.40 + 70.23 (C sn-3_a – two diastereoisomers + sn-1 – two diastereoisomers); 69.18 (sn-3_b , two diastereoisomers); 69.08 (C_2); 66.58 (C_4); 66.60 (C_2); 66.06 + 65.64 ($\text{CH}_2 \text{ OEt}$, two

1-O-icosyl-2-O-ethyl-*rac*-glycer3l-yl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside IV.5b

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.5b** was prepared in quantitative yield (333 mg). ^1H NMR (DMSO, 500.253 MHz): δ (ppm) 5.11 (m, 2H, OH); 4.77-4.51 (m, 5H, OH); 4.20-4.17 (m, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_{1'}$); 3.74-3.25 (m, 20H, $\text{H}_{6a} + \text{CH}_2 \text{sn-3}_a + \text{H}_3 + \text{H}_4 + \text{H}_5 + \text{H}_{6b} + \text{H}_{2'} + \text{H}_{3'} + \text{H}_{4'} + \text{H}_{5'} + \text{H}_{6'a} + \text{H}_{6'b} + \text{CH}_2 - \text{OEt}$ (two diastereoisomers) + $\text{CH}_2 \alpha$ Solketal + $\text{CH sn-2} + \text{CH}_2 \text{sn-3}_b + \text{CH}_2 \text{sn-1}$); 2.99 (m, 1H, H_2); 1.45 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta$ solketal); 1.22 (m, 36H, CH_2 fatty chain); 1.07 (t, 3H; $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH_3 OEt); 0.84 (t, 3H; $J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (DMSO, 125.804 MHz): δ (ppm) 103.87 ($\text{C}_{1'}$); 102.98 ($\text{C}_1 \beta$ anomere – two diastereoisomers); 80.72 + 77.10 + 77.04 + 75.56 + 74.88 + 74.81 + 73.27 + 73.1 ($\text{C}_4 + \text{C sn-2}$ – two diastereoisomers + $\text{C}_3 + \text{C}_5 + \text{C}_{2'} + \text{C}_{3'} + \text{C}_2$); 70.55 (C α Solketal); 70.58 (C_5'); 70.35 + 70.27 (C $\text{sn-1}_a + \text{C sn-3}_a$ – two diastereoisomers); 68.99 + 68.79 (C $\text{sn-3}_b + \text{C sn-1}_b$ – two diastereoisomers); 68.19 (C_4'); 64.72 + 64.60 (CH_2 OEt); 60.52 (C_6); 60.46 (C_6'); 31.26 + 29.61 + 29.17 + 29.0 + 28.82 + 28.65 + 25.61 + 22.07 (CH_2 fatty chain); 15.57 (CH_3 OEt); 13.93 (CH_3 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 724.497 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 747.593, theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 747.657.

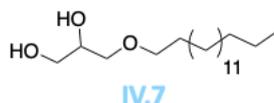
4-((hexadecyloxy)methyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane IV.6



NaH (3.2g, 132.4 mmol, 3.5 Eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 60 mL of THF were added. Solketal (15g, 113.5 mmol, 3 Eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then bromohexadecane (11.6g, 37.83 mmol, 1 Eq.) was slowly added without solvent. NaI was equally added without solvent (1 Eq.) and the mixture was then refluxed for 1 day. The reaction was quenched by few mL of MeOH and the solution was extracted with Et_2O . The organic phase was washed with water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to give the crude compounds **IV.6**. The products were purified by chromatography on silica gel (Eluent gradient: petroleum ether 100% to give the pure compound **IV.6** with 88% yield (12g) as colorless liquid. R_f TLC (hexane 100%): 0.6; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 4.12 (m, 1H, sn-2); 3.86 (m, 1H, sn-3_a); 3.65 (m; 3H, sn-

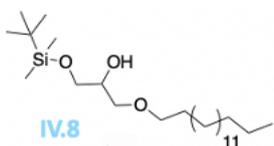
3b + *sn*-1); 3.42 (t, 2H, CH₂ α O); 1.55 (m, 2H, CH₂ β O); 1.33 (s, 3H, CH₃ solketal); 1.30 (s, 3H, CH₃ solketal); 1.22 (m, 26H, CH₂ fatty chain); 0.88 (m, 3H, CH₃ fatty chain).

3-(hexadecyloxy)propane-1,2-diol IV.7



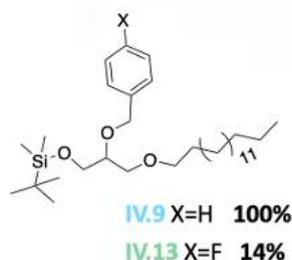
HCl cc 37% (10 mL) was slowly added to **IV.6** (13g, 33.4 mmol, 1 Eq) previously diluted in 30 mL of methanol. The mixture was stirred at reflux during 3h. The mixture was extracted with CHCl₃, washed with water, and saturated potassium carbonate. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give the compound **IV.7** with 93% yield (9.9g) as a white powder. This compound was used without further purification. Rf TLC (hexane / ethyl acetate (1/1)): 0.33; ¹H NMR (CDCl₃, 399.220 MHz): δ (ppm) 3.85 (m, 1H, *sn*-2); 3.73-3.62 (m, 4H, *sn*-3a + *sn*-1a + CH₂ α O); 2.12 (s, 1H, OH); 1.57 (m, 2H, CH₂ β O); 1.24 (s, 28H, CH₃ solketal); 0.87 (m, 3H, CH₃ fatty chain).

1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-(hexadecyloxy)propan-2-ol IV.8



A solution of *tert*-Butyl(chloro)dimethylsilane (1.3 Eq.) and imidazole (2.5 Eq.) previously mixed in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) were added in solution of **IV.7** (2g, 6.3 mmol, 1 Eq.) in CH₂Cl₂ (20 mL). The mixture was stirred for 2 hours at 40°C. Then, the mixture was poured into water (150 mL) and extracted with Et₂O. The combined ether extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give the crude compounds **IV.8** as yellow oil with 92% yield (2.5g). This compound was used in the next step without further purification. Rf TLC (petroleum ether / ethyl acetate (95/5)): 0.5; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ (ppm) 3.78 (m, 1H, *sn*-2); 3.63 (m, 2H, *sn*-3a + *sn*-1a); 3.44 (m, 4H, *sn*-3b + *sn*-1b + CH₂ α O); 1.56 (m, 2H, CH₂ β O); 1.25 (m, 30H, CH₂ fatty chain); 0.89 (m, 14H, CH₃ fatty chain + *t*-bu Si); 0.06 (m, 6H, CH₃ Si).

(2-(benzyloxy)-3-(hexadecyloxy)propoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane IV.9



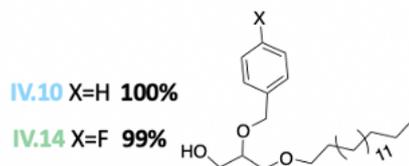
NaH (250mg, 10.3 mmol, 1.2 Eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 30 mL of THF were added. **IV.8** (3.7g, 8.6 mmol, 1 Eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then, benzyl bromide (1.9g, 11.2 mmol, 1.3 Eq.) was slowly added without solvent. The mixture was stirred for 1 day at room temperature. The reaction was quenched by few mL of MeOH and the solution was extracted with Et₂O. The organic phase was washed with water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give the crude compounds **IV.9a**. This compound was used without further purification and was obtained with quantitative yield (4.6g) as yellow oil. R_f TLC (petroleum ether / ethyl acetate (95/5)): 0.7; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922 MHz): δ (ppm) 7.40-7.26 (m, 5H, Benzyle); 4.70 (s; 1H, CH_{2a} benzyle); 4.50 (s; 1H, CH_{2b} benzyle); 3.76-3.47 (m, 5H, *sn*-2 + *sn*-3 + *sn*-1); 3.42 (t, 2H, J_{HH} = 7.0 Hz, CH₂ α O); 1.86-1.84 (m, 1H); 1.56 (m, 2H, CH₂ β O); 1.25 (m, 26H, CH₂ fatty chain); 0.87 (m, 14H, CH₃ fatty chain + *t*-*bu* Si); 0.07 (m, 6H, CH₃ Si). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): δ (ppm) 139.0 (C_q Bn); 128.23 + 127.69 + 127.52 (CH bn); 78.91 (CH *sn*-2); 72.25 + 71.65 + 70.79 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α bn + CH₂ α O); 63.23 (CH₂ *sn*-3); 31.99 + 29.77 + 29.57 + 29.43 (CH₂ fatty chain); 25.94 (CH₃ *t*-*bu* Si); 14.16 (CH₃ fatty chain); -5.40 (CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 520.432 found [M+H]⁺ 521.479.

tert-butyl(2-((4-fluorobenzyl)oxy)-3-(hexadecyloxy)propoxy)dimethylsilane IV.13

NaH (100mg, 4.2 mmol, 1.2 Eq.) was placed under nitrogen in a three-neck-round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel. 15 mL of THF were added. **IV.8** (1.5g, 3.5 mmol, 1 Eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then, fluorobenzyle bromide (1.1g, 11.2 mmol, 1.3 Eq.) was slowly added without solvent. The mixture was stirred for 1 day at room temperature. The reaction was quenched by few

mL of MeOH and the solution was extracted with Et₂O. The organic phase was washed with water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give the crude compounds **IV.9b**. This compound was purified by silica gel column chromatography with eluant gradient hexane 100% to hexane / ethyl acetate (95/5) to obtained the pure compound IV.9b with 14% yield (263mg) as colorless liquid. R_f TLC (hexane / ethyl acetate (95/5)): 0.5; ¹H NMR (CDCl₃, 500.253 MHz): δ (ppm) 7.34-7.31 (m, 2H, CH_{ar} β fluor); 7.02-6.98 (CH_{ar} α fluor); 4.65 (s; 2H, CH₂ fluorobenzyle); 3.67 (m, 2H, *sn*-1); 3.60 (m, 1H, *sn*-2); 3.55 (m, 1H, *sn*3-a); 3.46 (m, 1H, *sn*-3b); 3.41 (m, 2H, CH₂ α O); 1.56 (m, 4H, CH₂ β + γ O); 1.25 (m, 28H, CH₂ fatty chain); 0.87 (m, 12H, CH₃ fatty chain + *t*-*bu* Si); 0.04 (m, 6H, CH₃ Si). ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 163.33 (C_q F); 134.82 (C_q Bn); 129.54 + 129.47 (CH_{Ar} α F-bn); 115.25 + 115.08 (CH_{Ar} β F-bn); 79.05 (CH *sn*-2); 71.79 + 71.68 + 70.93 (CH₂ *sn*-1 + CH₂ α bn + CH₂ α O); 63.34 (CH₂ *sn*-3); 32.04 + 29.81 + 29.75 + 29.43 (CH₂ fatty chain); 26.00 (CH₃ *t*-*bu* Si); 14.23 (CH₃ fatty chain); -5.28 + -5.33 (CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 538.422 found [M+Na]⁺ 561.583 and [M+K]⁺ 577.547, theoretical values for [M+Na]⁺ 561.239 and [M+K]⁺ 577.368.

General procedure for the deprotection of the *tert*-Butyl-dimethylsilyle protecting group (compounds **IV.10 et **IV.14**):**



Tetra-*n*-butylammonium fluoride (1.3 Eq.) was added to a stirred solution of **IV.9** or **IV.13** (1 Eq.) diluted in dry THF (15 mL) previously placed under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred at room temperature overnight. The solution was quenched by addition of water (10 mL) and extracted with Et₂O (3*30 mL). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give the crude compounds **IV.10** and **IV.14**. The product **IV.10** was purified by chromatography on silica gel (Eluent: hexane / ethyl acetate (4/1)) to give the pure compound **IV.10** as a colorless oil with 39% yield (1.4g). The pure compound **IV.14** was obtained with 99% yield (190mg) after reduced pressure distillation with a kugelrohr (90°C – 2.0*10⁻² mbar).

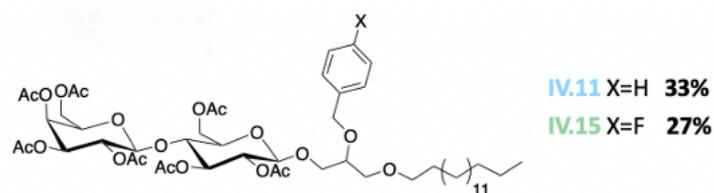
2-(benzyloxy)-3-(hexadecyloxy)propan-1-ol IV.10

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.10** was prepared in 39% yield (1.4g). Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (4/1)): 0.26; ^1H NMR (CDCl_3 , 399.922 MHz): δ (ppm) 7.36-7.27 (m, 5H, CH_{ar} Bn); 4.73-4.61 (m, 2H, CH_2 benzyle); 3.77 (m, 1H, *sn*-2); 3.69 (m, 2H, *sn*-1); 3.60 (m, 1H, *sn*3-a); 3.53 (m, 1H, *sn*-3b); 3.44 (m, 2H, CH_2 α O); 1.56 (m, 2H, CH_2 β O); 1.25 (m, 28H, CH_2 fatty chain); 0.88 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.803 MHz): δ (ppm) 138.43 (C_q Bn); 128.45 + 127.82 + 127.77 (CH_{Ar} Bn); 78.00 (CH *sn*-2); 72.13 + 71.89 + 71.13 (CH_2 *sn*-1 + CH_2 α bn + CH_2 α O); 63.00 (CH_2 *sn*-3); 32.82 + 29.74 + 29.42 + 29.43 + 26.17 + 22.74 (CH_2 fatty chain); 14.16 (CH_3 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 406.345 found $[\text{M}+\text{H}]^+$ 407.419.

2-((4-fluorobenzyl)oxy)-3-(hexadecyloxy)propan-1-ol IV.14

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.14** was prepared in 99% yield (190mg). Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (4/1)): not detected; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.253 MHz): δ (ppm) 7.34-7.31 (m, 2H, CH_{ar} β fluor); 7.05-7.00 (CH_{ar} α fluor); 4.68-4.58 (m; 2H, CH_2 fluorobenzyle); 3.77 (m, 1H, *sn*-2); 3.65 (m, 2H, *sn*-1); 3.56 (m, 1H, *sn*3-a); 3.53 (m, 1H, *sn*-3b); 3.43 (m, 2H, CH_2 α O); 1.56 (m, 2H, CH_2 β O); 1.25 (m, 28H, CH_2 fatty chain); 0.87 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.564 MHz): δ (ppm) 129.71 + 129.63 (CH_{Ar} α F-bn); 115.55 + 115.34 (CH_{Ar} β F-bn); 77.93 (CH *sn*-2); 72.04 + 71.51 + 71.35 (CH_2 *sn*-1 + CH_2 α bn + CH_2 α O); 63.22 (CH_2 *sn*-3); 32.05 + 29.82 + 29.75 + 29.43 + 26.24 (CH_2 fatty chain); 14.26 (CH_3 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 424.335 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 447.463 and $[\text{M}+\text{K}]^+$ 463.422, theoretical values for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 447.279 and $[\text{M}+\text{K}]^+$ 463.259.

General procedure for the glycosylation reaction (compounds **IV.11** and **IV.15**)



Peracetylated lactose trichloroacétimidate **II.16** (1.2 Eq.) solubilized in dry CH_2Cl_2 (20 mL) was added dropwise to a solution of **IV.11** or **IV.15** (1 Eq.) in CH_2Cl_2 (15 mL). The mixture was stirred with molecular sieves (~ 2 g) during one hour under nitrogen atmosphere. At 0°C , boron trifluoride diethyl etherate (0.8 Eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at RT under inert atmosphere. The mixture was quenched by addition of water (20 mL). The organic layer was washed with aqueous saturated NaHCO_3 solution and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered, concentrated to give the crude compounds **IV.11** and **IV.15**. These products were purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane/ ethyl acetate (3/2)) to give the pure compounds **IV.11** and **IV.15** as white foam with respectively 33% yield (1.1g) and 27% (134mg).

1-*O*-hexadecyl-2-*O*-benzyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **IV.11**

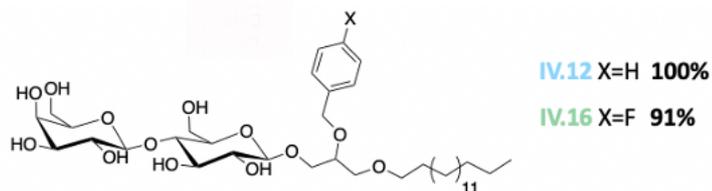
Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.11** was prepared in 33% yield (1.1g). R_f TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (4/1)): 0.46; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.133 MHz): δ (ppm) 7.34-7.26 (m, 5H, CH_{ar} Bn); 5.54 (m, 1H, H_4'); 5.20-5.16 (m, 1H, H_3); 5.12-5.08 (m, 1H, H_2'); 4.95-4.88 (m, 2H, $\text{H}_3' + \text{H}_2$); 4.64 (m, 2H, CH_2 benzyle); 4.55-4.50 (m, 1H, H_1); 4.48-4.44 (m, 2H, $\text{H}_1' + \text{H}_{6a}$); 4.14-4.05 (m, 3H, $\text{H}_{6'a} + \text{H}_{6'b} + \text{H}_{6b}$); 3.95-3.84 (m, 2H, $\text{H}_5' + sn-3a$); 3.79 (m, 1H, H_4); 3.75-3.54 (m, 3H, $sn-2 + \text{H}_5 + sn-1a$); 3.48-3.44 (m, 2H, $sn-3b + sn-1b$); 3.41-3.37 (m, 2H, $\text{CH}_2 \alpha \text{ O}$); 2.16-1.95 (m, 21H, -OAc); 1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{ O}$); 1.25 (m, 28H, CH_2 fatty chain); 0.89 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.803 MHz): δ (ppm) 170.49 + 170.28 + 170.20 + 169.89 + 169.75 + 169.72 + 169.19 (CO -OAc); 138.73 + 138.66 (C_q Bn); 128.50 + 128.48 + 127.86 + 127.75 + 127.71 (CH_{Ar} Bn); 101.25 + 101.23 ($\text{C}_1 \beta$ anomer two diastereoisomers); 100.94 (C_1'); 77.33 (CH $sn-2$); 76.43 (C_4); 73.02 + 72.78 (C_3);

72.72 (C_{5'}); 72.66 + 72.24 (CH₂ OBn + *sn*-1*a*); 71.93 (CH₂ α O); 71.87 (C₅); 71.14 (C₂); 70.82 (C_{3'}); 70.69 + 70.56 (*sn*3*a* + *sn*-1*b*); 69.60 (*sn*-3*b*); 69.24 (C_{2'}); 66.74 (C_{4'}); 62.15 (C₆); 60.93 (C_{6'}); 32.06 + 29.84 + 29.79 + 29.64 + 26.27 + 22.83 (CH₂ fatty chain); 20.99 + 20.95 + 20.82 + 20.78 + 20.65 (CH₃ -OAc); 14.26 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 1024.524 found [M+Na]⁺ 1047.613, and [M+K]⁺ 1063.378, theoretical values for [M+Na]⁺ 807.393 and [M+K]⁺ 1063,428.

1-O-hexadecyl-2-O-fluorobenzyl-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside IV.15

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.15** was prepared in 27% yield (134mg). Rf TLC (Eluent: hexane / ethyl acetate (3/2)): 0.3; ¹H NMR (CDCl₃, 500.250 MHz): ¹H NMR (CDCl₃, 500.133 MHz): 7.32-7.28 (m, 2H, CH_{ar} β FBn); 7.03-6.98 (m, 2H, CH_{ar} α FBn); 5.34 (m, 1H, H_{4'}); 5.20-5.18 (m, 1H, H₃); 5.12-5.08 (m, 1H, H_{2'}); 4.95-4.88 (m, 2H, H_{3'} + H₂); 4.60 (m, 2H, CH₂ benzyle); 4.54-4.51 (m, 1H, H₁); 4.49-4.46 (m, 2H, H_{1'} + H_{6a}); 4.14-4.05 (m, 3H, H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b}); 3.94-3.84 (m, 2H, H_{5'} + *sn*-3*a*); 3.79 (m, 1H, H₄); 3.73-3.56 (m, 3H, *sn*-2 + H₅ + ^{sn-1a}); 3.47-3.43 (m, 2H, *sn*-3*b* + *sn*-1*b*); 3.41-3.37 (m, 2H, CH₂ α O); 2.14 - 1.95 (m, 21H, -OAc); 1.54 (m, 2H, CH₂ β O); 1.24 (m, 28H, CH₂ fatty chain); 0.89 (t, 3H, J_{HH} = 7.2 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): 170.47 + 170.28 + 170.20 + 169.88 + 169.69 + 169.19 (CO -OAc); 163.41 + 163.28 + 161.47 + 161.43 (C_q F); 134.44 (C_q Bn); 129.61 + 129.54 + 129.48 + 129.42 (CH_{Ar} β BnF); 115.39 + 115.36 + 115.22 + 115.19 (CH_{Ar} α BnF); 101.22 + 101.23 (C_{1'}); 100.94 (C₁ β, two diastereoisomers); 77.27 (CH *sn*-2); 76.38 (C₄); 72.97 + 72.90 (C₃); 72.75 (C_{5'}); 71.93 (CH₂ α O); 71.82 (C₅); 71.56 (CH₂ OBn); 71.11 (C₂); 70.89 (*sn*-3*a*); 70.81 (C_{3'}); 70.71 + 70.62 (*sn*-1*a* + *sn*-1*b*); 69.72 (*sn*-3*b*); 69.22 (C_{2'}); 66.72 (C_{4'}); 62.08 (C₆); 60.91 (C_{6'}); 32.04 + 29.83 + 29.77 + 29.62 + 26.26 + 22.82 (CH₂ fatty chain); 20.99 + 20.97 + 20.932 + 20.77 + 20.63 (CH₃ -OAc); 14.24 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 1042.515 found [M+Na]⁺ 1065.544, [M+K]⁺ 1081.496 theoretical value for [M+Na]⁺ 1065.379 and [M+K]⁺ 1081.346.

General procedure for final deprotection of peracetylated lactose (compounds **IV.12 and **IV.16**)**



Potassium carbonate (0.5 Eq.) was added to a stirred solution of **IV.12** or **IV.16** (1 Eq.) diluted in anhydrous MeOH (15 mL). The mixture was stirred for 6 hours at RT. The mixture is quenched by addition of a little amount of Amberlite (IR120H) (~ 300 mg) and the solution was stirred for 30 minutes. Then, the solution was filtered on a sintered funnel and the solvent was evaporated to produce compounds **IV.12** or **IV.16** with quantitative and 91% yield respectively, as yellow or white powder.

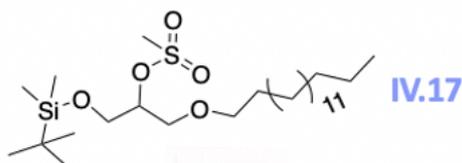
1-O-hexadecyl-2-O-benzyl-*rac*-glycer-3-yl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside
IV.12

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.12** was prepared in quantitative yield as a white powder (700 mg). ^1H NMR (DMSO, 399.922 MHz): δ (ppm) 7.33-7.23 (m, 2H, CH_{ar} Bn); 4.65-4.55 (m, 2H, CH_2 benzyle); 4.21-4.16 (m, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_1'$); 3.80-3.13 (m, 19H, $\text{H}_4' + \text{H}_3 + \text{H}_2' + \text{H}_3' + \text{H}_2 + \text{H}_{6\text{a}} + \text{H}_{6'\text{a}} + \text{H}_{6'\text{b}} + \text{H}_{6\text{b}} + \text{H}_5 + \text{sn-3a} + \text{H}_4 + \text{sn-2} + \text{H}_5 + \text{sn-1a} + \text{sn-3b} + \text{sn-1b} + \text{CH}_2 \alpha \text{ O}$); 3.0 (m, 1H, H_2); 1.44 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{ O}$); 1.20 (m, 28H, CH_2 fatty chain); 0.82 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 7.8 \text{ Hz}$, CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (DMSO, 75.474 MHz): δ (ppm) 138.93 (C_q Bn); 128.03 + 127.50 + 127.41 + 127.18 (CH_{Ar} Bn); 103.82 (C_1'); 102.95 + 102.89 ($\text{C}_1 \beta$ anomer, two diastereoisomers); 80.69 + 76.91 + 75.48 + 74.96 + 74.83 + 73.20 + 73.12 + 68.10 ($\text{sn-2} + \text{C}_4 + \text{C}_3 + \text{C}_5' + \text{C}_5 + \text{C}_2 + \text{C}_3' + \text{C}_4'$); 71.1 + 70.95 + 70.55 + 70.32 + 69.10 + 68.62 ($\text{CH}_2 \alpha \text{ O} + \text{CH}_2 \text{OBn} + \text{sn-3a} + \text{sn-1a} + \text{sn-1b} + \text{sn-3b}$); 60.51 + 60.36 ($\text{C}_6 + \text{C}_6'$); 31.25 + 29.17 + 28.98 + 28.82 + 28.65 + 25.63 + 22.05 (CH_2 fatty chain); 13.92 (CH_3 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 730.450 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 753.453, theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 753.269.

1-O-hexadecyl-2-O-fluorobenzyl-*rac*-glycer-3-yl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside IV.16

Using the aforementioned general procedure, the compound **IV.16** was prepared in 91% yield (85 mg) as yellow powder. ^1H NMR (CDCl_3 , 500.133 MHz): δ (ppm) 7.38-7.36 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Ar}} \beta$ BnF); 7.15-7.11 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Ar}} \alpha$ BnF); 4.66-4.55 (m, 2H, CH_2 benzyle); 4.23-4.18 (m, 2H, $\text{H}_1 + \text{H}_1'$); 3.82-3.26 (m, 19H, $\text{H}_4' + \text{H}_3 + \text{H}_2' + \text{H}_3' + \text{H}_2 + \text{H}_{6\text{a}} + \text{H}_{6'\text{a}} + \text{H}_{6'\text{b}} + \text{H}_{6\text{b}} + \text{H}_5' + \text{sn-3a} + \text{H}_4 + \text{sn-2} + \text{H}_5 + \text{sn-1a} + \text{sn-3b} + \text{sn-1b} + \text{CH}_2 \alpha \text{ O}$); 3.02 (m, 1H, H_2); 1.45 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{ O}$); 1.21 (m, 28H, CH_2 fatty chain); 0.83 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR (DMSO, 125.803 MHz): δ (ppm) 162.42 + 169.49 (C_q BnF); 135.21 (C_q Bn); 129.66 + 129.59 + 129.55 + 129.49 ($\text{CH}_{\text{Ar}} \beta$ BnF); 114.92 + 114.90 + 114.76 + 114.73 ($\text{CH}_{\text{Ar}} \alpha$ BnF); 103.89 (C_1'); 103.02 + 102.90 ($\text{C}_1 \beta$ anomer, two diastereoisomers); 80.72 + 76.93 + 75.56 + 75.01 + 74.90 + 73.28 + 73.19 + 68.11 ($\text{sn-2} + \text{C}_4 + \text{C}_3 + \text{C}_5' + \text{C}_5 + \text{C}_2 + \text{C}_3' + \text{C}_4'$); 70.61 + 70.57 + 70.38 + 70.32 + 70.24 + 69.27 + 68.71 ($\text{CH}_2 \alpha \text{ O} + \text{CH}_2 \text{ OBn} + \text{sn-3a} + \text{sn-1a} + \text{sn-1b} + \text{sn-3b}$); 60.53 + 60.39 ($\text{C}_6 + \text{C}_6'$); 31.31 + 29.21 + 29.04 + 28.87 + 28.71 + 25.68 + 22.11 (CH_2 fatty chain); 13.98 (CH_3 fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 748.441 found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 771.554, $[\text{M}+\text{K}]^+$ 787.486, theoretical value for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 771.354 and $[\text{M}+\text{K}]^+$ 787.286.

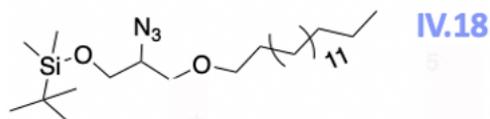
1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-(hexadecyloxy)propan-2-yl methanesulfonate IV.17



Under nitrogen atmosphere, dimethylaminopyridine (cat) was added to a solution of **IV.8** (1.8 g, 4.13 mmol, 1 Eq.) in CH_2Cl_2 (15 mL). Then, triethylamine (6.20 mmol, 0.87 mL, 1.5 Eq.) and mesyl chloride (570mg, 4.96 mmol, 0.4 mL, 1.2 Eq.) were added slowly thanks to a syringe into the solution. The solution turned light yellow. The reaction mixture was stirred over night at room temperature. The solution was washed with water and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to give the crude compound **IV.17** as 76% yield (1.6g). This compound was used in the next step without further purification. R_f TLC (petroleum ether/ diethyl ether (95/5)): 0.5; ^1H -NMR (CDCl_3 , 399.902 MHz): δ (ppm) 4.70 (m, 1H; sn-2), 3.82-3.80 (dd, 2H, $J_{\text{HH}} = 3.3, 10.7$ Hz, sn-3), 3.62 (m, 2H, sn-1); 3.07 (s, 3H,

Me-S), 1.53 (m, 2H, CH₂ α O), 1.32-1.25 (m, 26H, fatty chain), 0.89 (m, 12H, CH₃ + *t*-bu Si); 0.08 (m, 6H, CH₃ Si); ¹³C-NMR (75.474 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 81.83 (*sn*-2), 71.62 + 69.60 + 62.65 (*sn*-1 + *sn*-3 + CH₂ α O); 38.16 (CH₃ Ms); 31.86 (CH₂), 29.61 + 29.34 + 26.01 + 25.72 (CH₂ fatty chain); 22.60 (CH₃ *t*-bu Si); 14.02 (CH₃ fatty chain); -5.62 (CH₃ Si).

(2-azido-3-(hexadecyloxy)propoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane IV.18



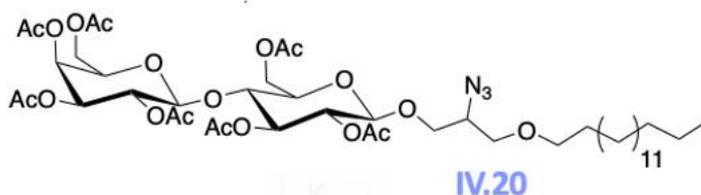
Sodium azide (1 g, 15.63 mmol, 5 Eq.) was added to a solution of compound **IV.17** (1.6 g, 3.15 mmol, 1 Eq.) in DMF (15 mL), and the resulting mixture was stirred at reflux for one night. The solvent was removed and the product was diluted in CH₂Cl₂, extracted with H₂O (3*100 mL), NaHCO₃ sat (1*30 mL) and brine (2*30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give the crude compound **IV.18**. **IV.18** was purified by silica-gel column chromatography with eluent gradient (hexane / ethyl acetate (95:5), (90/10) and 100% ethyl acetate) to give the pure compound **IV.18** with 51% yield (730 mg) as a colorless liquid and **IV.19** as a yellow wax (320 mg): R_f TLC (hexane /ethyl acetate (95:5)): 0.9; IR (cm⁻¹): 2923; 2853; 2096.8; 1463.8; 1523.26; 1114.8; 835; 776; ¹H-NMR (CDCl₃, 399.902 MHz): δ (ppm) 3.75-3.67 (m, 2H; *sn*-2 + *sn*-3a), 3.54-3.45 (m, 3H, *sn*-1 + *sn*-3a); 3.44 (m, 2H, CH₂ α O); 1.52 (m, 2H, CH₂ βO); 1.32-1.25 (m, 26H, fatty chain), 0.89 (m, 12H, CH₃ + *t*-bu Si); 0.08 (m, 6H, CH₃ Si); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75.474 MHz): δ (ppm) 72.39 (*sn*-1); 71.06 (CH₂ α O); 63.27 (*sn*-3); 62.28 (*sn*-2); 31.99 (CH₂), 29.61 + 29.34 + 26.01 + 25.72 (CH₂ fatty chain); 22.73 (CH₃ *t*-bu Si); 14.11 (CH₃ fatty chain); -5.59 (CH₃ Si).

2-azido-3-(hexadecyloxy)propan-1-ol IV.19



IV.19 (320 mg) was obtained as a yellow wax after purification by silica-gel column chromatography of **IV.18**. R_f TLC (hexane /ethyl acetate (90:10)): 0.3; IR (cm^{-1}): 3383; 2916; 2842; 2129; 2094; 1781; 1467; 1270; 1119; 948; 721; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 399.902 MHz): δ (ppm) 3.72-3.55 (m, 5H; $sn-2 + sn-3a + sn-1 + sn-3a$); 3.44 (m, 2H, $\text{CH}_2 \alpha \text{O}$); 1.55 (m, 2H, $\text{CH}_2 \beta \text{O}$); 1.32-1.25 (m, 26H, fatty chain), 0.85 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 9 \text{ Hz}$; CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.474 MHz, CDCl_3): δ (ppm) δ 71.92 ($sn-1$); 70.88 ($\text{CH}_2 \alpha \text{O}$); 62.82 ($sn-3$); 62.43 ($sn-2$); 31.99 (CH_2), 29.61 + 29.34 + 26.03 + 25.72 (CH_2 fatty chain); 14.13 (CH_3 fatty chain).

1-O-hexadecyl-2-O-azido-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside IV.20

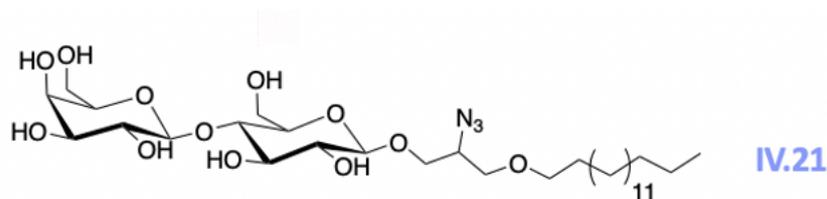


Peracetylated lactose trichloroacétimidate **II.16** (1.1 g, 1.41 mmol, 1.5 Eq.) solubilized in dry CH_2Cl_2 (20 mL) was added dropwise to a solution of **IV.19** (320 mg, 0.94 mmol, 1 Eq.) in CH_2Cl_2 (15 mL). The mixture was stirred with molecular sieves ($\sim 2 \text{ g}$) during one hour under nitrogen atmosphere. At 0°C , boron trifluoride diethyl etherate (0.8 Eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at RT under inert atmosphere. The mixture was quenched by addition of water (20 mL). The solution was filtered and washed with aqueous saturated NaHCO_3 solution and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered, concentrated to give the crude compounds **IV.20**. The product was purified by silica-gel column chromatography (Eluent: hexane / ethyl acetate (3/2) and (4/6)) to give the pure compounds **IV.20** as white foam with 39% yield (350mg). IR (cm^{-1}): 2923.5; 2853.60; 2133; 2093.73; 1744.6; 1367.95; 1213.66; 1043.88; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500.250 MHz): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500.253 MHz): δ (ppm) 5.33 (m, 1H, H_4'); 5.20-5.15 (m, 1H, H_3); 5.11-5.07 (m, 1H, H_2'); 4.95-

4.86 (m, 2H, H_{3'} + H₂); 4.52-4.46 (m, 3H, H_{1'} + H₁ + H_{6a}); 4.13-4.04 (m, 3H, H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b}); 3.94-3.84 (m, 2H, H_{5'} + *sn-3a*); 3.82-3.77 (m, 1H, H₄); 3.73-3.58 (m, 3H, *sn-2* + H₅ + *sn-1a*); 3.57-3.38 (m, 4H, *sn-3b* + *sn-1b* + CH₂ α O); 2.15 - 1.94 (m, 21H, -OAc); 1.54 (m, 2H, CH₂ β O); 1.24 (m, 28H, CH₂ fatty chain); 0.86 (t, 3H, J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803 MHz): δ (ppm) 170.15 + 169.97 + 169.84 + 169.59 + 169.37 + 168.91 (CO -OAc); 101.20 + 101.23 (C_{1'}); 100.88 + 100.62 (C₁ β, two diastereoisomers); 76.03 (C₄); 72.66 + 72.57 (C₃ + C₅); 71.57 + 71.39 (CH₂ α O + *sn-1*); 70.82 (C₂); 71.08 + 70.80 (C_{5'} + C_{3'}); 70.18 + 70.07 *sn-1b* + *sn-3b*); 69.21 (C_{2'}); 69.03 (*sn-3a*); 66.58 (C_{4'}); 62.01 + 61.94 (C₆); 60.91 (C_{6'}); 60.52 + 60.21 (CH *sn-2*); 32.04 + 29.83 + 29.77 + 29.62 + 26.26 + 22.82 (CH₂ fatty chain); 20.99 + 20.97 + 20.92 + 20.77 + 20.63 (CH₃ -OAc); 14.16 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 959.484 found M⁺ 959.750, [M+Na]⁺ 982.580 and [M+K]⁺ 998.551.

1-*O*-hexadecyl-2-*O*-azido-*rac*-glycer-3-yl-β-*D*-galactopyranosyl-(1-4)-β-*D*-glucopyranoside

IV.21

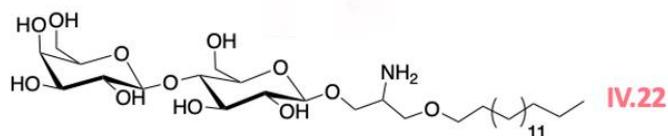


Potassium carbonate (0.5 Eq.) was added to a stirred solution of **IV.20** (350mg, 0.364 mmol, 1 Eq.) diluted in anhydrous MeOH (15 mL). The mixture was stirred for 6 hours at RT. The mixture is quenched by addition of a little amount of Amberlite (IR120H) (~ 300 mg) and the solution was stirred for 30 minutes. Then, the solution was filtered on a sintered funnel and the solvent was evaporated to produce compound **IV.21** with quantitative yield (242 mg) as light pink powder. IR (cm⁻¹): 3377; 2916.7; 2849.5; 2531; 2134.9; 2090; 1114; 1059; 1022.5; ¹H NMR (DMSO, 500.253 MHz): δ (ppm) 4.34-4.28 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 3.95-3.30 (m, 29H, H_{4'} + H₃ + H_{2'} + H_{3'} + H₂ + H_{6a} + H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b} + H_{5'} + *sn-3a* + H₄ + *sn-2* + H₅ + *sn-1a* + *sn-3b* + *sn-1b* + CH₂ α O + H₂); 1.55 (m, 2H, CH₂ β O); 1.24 (m, 28H, CH₂ fatty chain); 0.85 (t, 3H, J_{HH} = 7.8 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.787 MHz): δ (ppm) 103.65 (C_{1'}); 103.12 + 102.91 (C₁ β anomer, two diastereoisomers); 80.69 (C₄); 75.49 + 74.89 (C₃ + C₅); 72.19 + 73.02 (C₂ + C_{2'}); 70.48 + 69.99 + 69.97 + 68.16 + 67.98 (CH₂ α O + *sn-3a* + *sn-1a* + *sn-1b* + *sn-*

3b); 68.09 (C_{5'}); 60.45 + 60.35 (C₆ + C_{6'}); 60.31 + 60.18 (*sn*-2 + C_{4'}); 31.26 + 29.10 + 28.99 + 28.79 + 28.65 + 25.63 + 22.07 (CH₂ fatty chain); 13.93 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 665.410 found [M+Na]⁺ 688.598 and [M+K]⁺ 704.561, theoretical values for [M+Na]⁺ 688.402 and [M+K]⁺ 704.357.

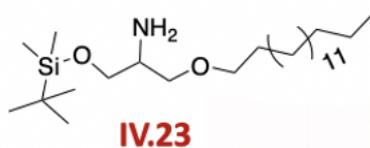
1-O-hexadecyl-2-O-amino-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside

IV.22



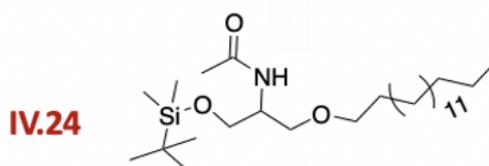
The compound **IV.21** (140 mg, 0.210 mmol, 1 Eq.), diluted in MeOH (10 mL), was hydrogenated in the presence of 10% Pd-C (0.142 mmol) at room temperature and at atmospheric pressure. After 4h, the reaction mixture was filtered through a pad of celite and the solvent was removed to give final compound **IV.22** with 97% yield (130 mg) as white powder. IR (cm⁻¹): 3345; 2917.9; 2850; 1749; 1593; 1373; 1230; 1072; 1031; ¹H-NMR (DMSO, 500.130 MHz): δ (ppm) 5.28-3.32 (m, H₁ + H_{1'} + H_{4'} + H₃ + H_{2'} + H_{3'} + H₂ + H_{6a} + H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b} + H_{5'} + *sn*-3a + H₄ + *sn*-2 + H₅ + *sn*-1a + *sn*-3b + *sn*-1b + CH₂ α O + H₂); 1.46 (m, 2H, CH₂ β O); 1.22 (m, 28H, CH₂ fatty chain); 0.80 (t, 3H, J_{HH} = 7.8 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C-NMR (DMSO 125.757 MHz): δ (ppm) 103.55 (C_{1'}); 103.13 + 103.04 (C₁ β anomer, two diastereoisomers); 79.27 + 75.41 + 74.93 + 73.24 + 70.98 + 70.67 + 69.06 + 69.29 (C₄ + C₃ + C_{5'} + C₂ + C_{2'} + C_{5'} + C_{4'} + C_{3'}); 71.82 + 71.75 (*sn*-1 + CH₂ α O); 61.50 + 60.89 (C₆ + C_{6'}); 50.99 + 50.56 (*sn*-2); 31.93 + 29.75 + 26.06 + 22.69 (CH₂ fatty chain); 14.06 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 639.419 found [M+Na]⁺ 662.599, theoretical value for [M+Na]⁺ 662.472.

1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-(hexadecyloxy)propan-2-amine **IV.23**



The compound **IV.18** (1.5 g, 3.22 mmol, 1 Eq.), diluted in MeOH (10 mL), was hydrogenated in the presence of 10% Pd-C (0.322 mmol) at room temperature and at atmospheric pressure. After 4h, the reaction mixture was filtered through a pad of celite and the solvent was removed to give the compound **IV.23**. **IV.23** was used without further purification in the next step. **IV.23** was obtained with 86% yield (1.2 g) as colorless liquid. R_f TLC (light petroleum ether / diethyl ether (8:2)): 0.6; IR (cm^{-1}): 2916; 2850; 1585; 1467; 1366; 1114; 1069; 721; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 399.900 MHz): δ (ppm) 3.65 – 3.62 (m, 1H, *sn*-3a); 3.56-3.52 (m, 1H, *sn*-3b); 3.46-3.39 (m, 3H, *sn*-1a + CH_2 α O); 3.35-3.30 (m, 1H, *sn*-1b); 3.05 (m, 1H, *sn*-2); 1.55 (m, 2H, CH_2 β O); 1.25 (m, 26H, fatty chain), 0.89 (m, 12H, CH_3 + *t*-bu Si); 0.06 (m, 6H, CH_3 , Si); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.565 MHz): δ (ppm) 72.89 (*sn*-1); 71.53 (CH_2 α O); 65.34 (*sn*-3); 52.81 (*sn*-2); 31.99 (CH_2), 29.61 + 29.34 + 26.01 + 25.72 (CH_2 fatty chain); 21.66 (CH_3 *t*-bu Si); 14.2 (CH_3 fatty chain); -5.40 (CH_3 Si).

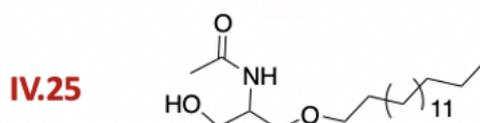
N-(1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-(hexadecyloxy)propan-2-yl)acetamide **IV.24**



Acetyl chloride (0.440 g, 5.58 mmol, 2 Eq.) and DMAP (341mg, 2.79 mmol, 1 Eq.) were added to a solution compound **IV.23** (1.2g, 2.79 mmol) in CHCl_3 (30 mL). The mixture was stirred for 48 h at room temperature. After solvent evaporation, the crude solid was purified on silica-gel column chromatography (petroleum ether / ethyl acetate (1/1) + 0.2% MeOH) to give pure compound **IV.24** as a yellow oil with 11% yield (146mg). R_f TLC 0.01 (petroleum ether / ethyl acetate (1/1)): 0.9; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300.131): δ (ppm) 5.76 (m, 1H, NH); 4.08 (m, 1H, *sn*-2), 3.72 (m, 1H, *sn*-3a), 3.57 (m, 2H, *sn*-3b + *sn*-1a), 3.47-3.33 (m, 3H, *sn*-1b + CH_2 α O),

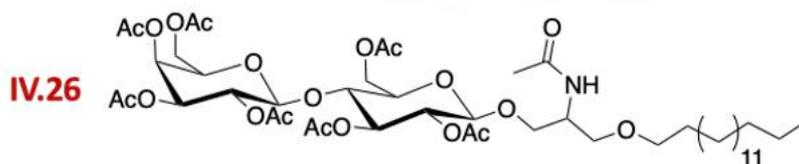
1.98 (s, 3H, CH₃ NHCO) 1.58 (m, 4H, CH₂ β + γ O), 1.25 (m, 24H fatty chain), 0.89 (t, 13H, CH₃ + *t*-bu Si); 0.06 (m, 6H, , CH₃ Si); ¹³C- NMR (CDCl₃, 100.353): δ (ppm) 161.13 (CH, NHCO), 72.13 (CH₂ α O), 71.5 (CH₂, *sn*-1), 64.29 (CH₂, *sn*-3), 49.6 (CH, *sn*-2), 31.8 + 29.8 + 29.7 + 26.03 + 22.6 (CH₂ fatty chain), 23.31 (CH₃, acetimidate); 21.71 (CH₃ *t*-bu Si); 14.13 (CH₃, fatty chain); -5.36(CH₃ Si); MALDI TOF *m/z* calculated 471.411 found [M+Na]⁺ 494.608, theoretical value for [M+Na]⁺ 494.501.

***N*-(1-(hexadecyloxy)-3-hydroxypropan-2-yl)acetamide IV.25**



IV.25 (146mg) was obtained as a white solid after purification by silica-gel column chromatography of **IV.24**. *R_f* TLC 0.01 (petroleum ether / ethyl acetate (1/1)): 0.15; ¹H-NMR (CDCl₃, 100.131 MHz): δ (ppm) 6.20 (bs, 1H, NHCHO), 4.06 (m, 1H, *sn*-2), 3.86 (m, 1H, *sn*-3a), 3.71-3.59 (m, 3H, *sn*-3b + *sn*-1), 3.42 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂ α O), 2.02 (s, 3H, CH₃, NHCO); 1.57 (m, 2H, CH₂ β O), 1.25 (m, 26H, fatty chain), 0.88 (m, 12H, *t*-bu Si + CH₃ fatty chain); 0.05 (m, 6H, CH₃ Si); ¹³C- NMR (CDCl₃,100.353): δ (ppm) 161.13 (CH, NHCO), 72.13 (CH₂ α O), 71.5 (CH₂, *sn*-1), 64.29 (CH₂, *sn*-3), 49.6 (CH, *sn*-2), 31.8 + 29.8 + 29.7 + 26.03 + 22.6 (CH₂ fatty chain), 23.31 (CH₃, acetimidate); 14.13 (CH₃, fatty chain). MALDI TOF *m/z* calculated 357.384 found [M+Na]⁺ 380.503, theoretical value for [M+Na]⁺ 380.421.

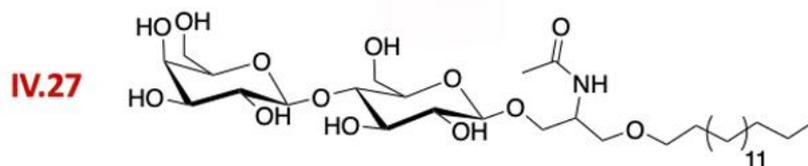
1-*O*-hexadecyl-2-*O*-acetamido-*rac*-glycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-*D*-glucopyranoside IV.26



Peracetylated lactose trichloroacétimidate **II.16** (0.325 g, 0.416 mmol, 1.02 Eq.) solubilized in dry CH₂Cl₂ (20 mL) was added dropwise to a solution of **IV.25** (146mg, 0.408 mmol, 1 Eq.) in

CH₂Cl₂ (15 mL). The mixture was stirred with molecular sieves (~ 2 g) during one hour under nitrogen atmosphere. At 0°C, boron trifluoride diethyl etherate (0.8 Eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight at RT under inert atmosphere. The mixture was quenched by addition of water (20 mL). The solution was filtered and washed with aqueous saturated NaHCO₃ solution and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, concentrated to give the crude compounds **IV.26**. The product was purified by silica-gel column chromatography (Eluent: petroleum ether / ethyl acetate (3/7) to give the pure compounds **IV.26** as white foam with 55% yield (220mg). R_f TLC (petroleum ether / ethyl acetate (3/7)): 0.5; ¹H-NMR (CDCl₃, 500.133 MHz): δ (ppm) 5.83 (d, 0.5 H, J_{HH} = 8 Hz, NH); 5.74-5.73 (d, 0.5 H, J_{HH} = 8 Hz, NH); 5.33 (m, 1H, H_{4'}); 5.19-5.15 (m, 1H, H₃); 5.11-5.07 (m, 1H, H_{2'}); 4.95-4.84 (m, 2H, H_{3'} + H₂); 4.48-4.44 (m, 3H, H_{1'} + H₁ + H_{6a}); 4.14-4.04 (m, 3H, H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b}); 3.86-3.31 (m, 10H, H_{5'} + *sn*-3*a* + H₄ + *sn*-2 + H₅ + *sn*-1*a* + *sn*-3*b* + *sn*-1*b* + CH₂ α O); 2.15 - 1.94 (m, 24H, -OAc + CH₃ acetamide); 1.52 (m, 2H, CH₂ β O); 1.24 (m, 28H, CH₂ fatty chain); 0.87 (t, 3H, J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.771 MHz): 170.37 + 170.15 + 170.08 + 169.69 + 169.05 (CO -OAc); 101.11 + 101.08 (C_{1'}); 100.84 + 100.77 (C₁ β, two diastereoisomers); 76.22 + 76.17 (C₄); 72.77 + 72.72 (C₃); 72.63 (C₅); 69.70 (C₂); 68.63 + 68.37 + 68.29 + 68.11 (*sn*-1*a* + *sn*-1*b* + *sn*-3*a* + *sn*-3*b*, two diastereoisomers); 66.62 (C_{4'}); 61.95 + 61.92 (C₆); 60.81 (C_{6'}); 48.45 + 48.25 (CH *sn*-2, two diastereoisomers); 31.94 + 29.83 + 29.77 + 29.62 + 26.26 + 22.82 (CH₂ fatty chain); 20.99 + 20.97 + 20.92 + 20.77 + 20.63 (CH₃ -OAc); 14.21 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF *m/z* calculated 975.504 found [M+Na]⁺ 998.761 and [M+K]⁺ 1014.729, theoretical values for [M+Na]⁺ 998.562 and [M+K]⁺ 1014.520.

1-O-hexadecyl-2-O-acetamido-*rac*-glycer-3-yl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside IV.27



Potassium carbonate (0.5 Eq.) was added to a stirred solution of **IV.26** (220mg, 0.23 mmol, 1 Eq.) diluted in anhydrous MeOH (15 mL). The mixture was stirred for 6 hours at RT. The mixture is quenched by addition of a little amount of Amberlite (IR120H) (~ 300 mg) and the

solution was stirred for 30 minutes. Then, the solution was filtered on a sintered funnel and the solvent was evaporated to produce compound **IV.26** with quantitative yield (153 mg) as light pink powder. ¹H-NMR (DMSO, 500.133 MHz): δ (ppm) 7.78 (d, 0.5 H, J_{HH} = 8 Hz, NH); 7.74 (d, 0.5 H, J_{HH} = 8 Hz, NH); 4.19-4.16 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 3.98 (m, 1H, *sn*-2); 3.78-3.28 (m, 17H, H_{4'} + H₃ + H_{2'} + H_{3'} + H_{6a} + H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b} + H_{5'} + *sn*-3a + H₄ + H₅ + *sn*-1a + *sn*-3b + *sn*-1b + CH₂ α O); 3.02 (m, 1H, H₂); 1.81 (2s, 3H, CH₃ acetamide); 1.46 (m, 2H, CH₂ β O); 1.23 (m, 28H, CH₂ fatty chain); 0.85 (t, 3H, J_{HH} = 7.8 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO, 125.787 MHz): 168.7 (CONH); 103.96 (C_{1'}); 103.45 + 103.13 (C₁ β anomer, two diastereoisomers); 80.63 (C₄); 75.62 + 74.90 + 74.23 + 73.29 + 73.19 + 73.11 + 70.61 (C₅ + C_{3'} + C₃ + C_{5'} + C₂ + C_{2'}); 70.31 (CH₂ α O); 69.12 + 69.03 + 68.71 + 68.39 (*sn*-3a + *sn*-1a + *sn*-1b + *sn*-3b); 68.09 (C_{5'}); 60.55 + 60.28 (C₆ + C_{6'}); 67.96 (C_{4'}); 48.54 (*sn*-2); 31.29 + 29.15 + 28.90 + 28.70 + 28.65 + 25.73 + 22.09 (CH₂ fatty chain); 22.69 (CH₃ acetamide); 13.96 (CH₃ fatty chain); MALDI TOF m/z calculated 681.430 found [M+Na]⁺ 720.470, theoretical value for [M+Na]⁺ 720.200.

Chapitre 5 :
Modulation de
l'oxygène
de la position sn-1 par
un motif thioéther,
sulfoxyde ou sulfone

Chapitre 5 : Modulation de l'oxygène de la position *sn-1* par un thioéther, un sulfoxyde ou une sulfone.

I - Généralités

Comme énoncé dans le [chapitre I](#), l'Ohmline est la première molécule de nature glyco-glycéro-lipidique à inhiber efficacement, sans générer aucun effet secondaire à sa concentration active, le développement des métastases osseuses issus d'un cancer primaire du sein, sur un modèle murin de xénogreffe orthotopique. Ces résultats prometteurs obtenus par l'équipe du Pr. Christophe Vandier l'a conduite à étudier son incorporation et sa métabolisation au sein de plusieurs tissus, tumoraux ou non, et à les quantifier. Il en ressort que l'Ohmline s'accumule dans tous les tissus testés, y compris dans les tumeurs primaires, mais qu'elle réduit préférentiellement le développement des métastases osseuses et n'a aucun effet sur le développement de la tumeur primaire (voir [Figure I.33b chapitre I](#))⁵⁷. En ce qui concerne sa métabolisation, le composé est retrouvé en quantité importante dans les tissus plusieurs semaines après la dernière injection réalisée, montrant une métabolisation de la molécule extrêmement lente.

II - Études de l'incorporation de l'Ohmline dans les tissus tumoraux

Lors des études de xénogreffes orthotopiques, plusieurs tissus des souris traitées avec l'Ohmline ont été prélevés puis analysés ([Figure V.1](#)).

Il s'avère que l'Ohmline est retrouvé dans tous les tissus testés à savoir : le cœur, les reins, l'estomac, le cerveau, le foie, les intestins et les poumons ([Figure V.1](#)).

Cependant, une incorporation bien plus importante dans le cerveau que pour les autres tissus est observé. La molécule de l'Ohmline est donc capable de passer, sans difficulté, la barrière hémato-encéphalique (ou BHE) ([Figure V.1](#)).

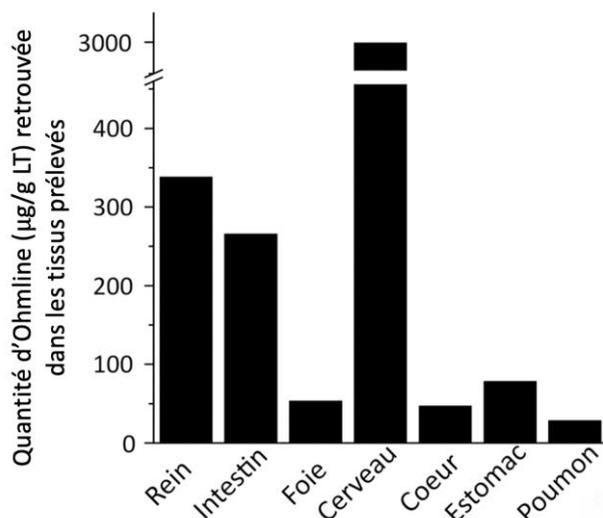


Figure V.1: Quantification de l'incorporation de l'Ohmlin dans les tissus prélevés chez 4 lots différents de souris issus du modèle de xénotransgreffe orthotopique.

II.1 La barrière hémato-encéphalique

La BHE est l'une des structures régulatrices les plus importantes du système nerveux central (SNC) qui est caractérisée par sa très faible perméabilité. Elle constitue une barrière métabolique puissante et régule étroitement les échanges entre le système sanguin et le système cérébral. Elle est responsable, entre autres, du maintien de l'homéostasie cérébrale, de l'alimentation en oxygène et autres nutriments (glucose, AA, vitamines etc.) du sang vers le SNC, ou encore de l'élimination des déchets^{180a, b}. Elle est constituée de cellules endothéliales cérébrales (CEC) qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux et qui sont reliées entre elles par des jonctions serrées (Figure V.2).

¹⁸⁰ a) N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof, D. J. Begley, *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13–25. b) N. Weiss, F. Miller, S. Cazaubon, P.-O. Couraud, *Rev. Neurol. (Paris)* **2009**, *165*, 863–874.

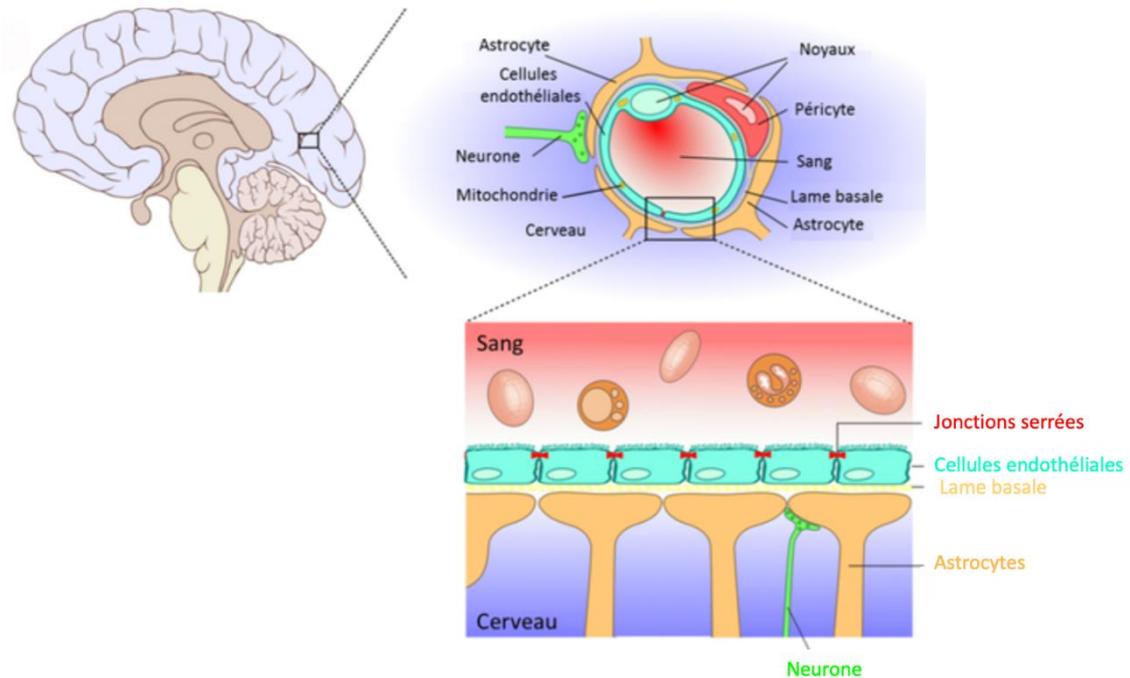


Figure V.2: Schéma représentant la barrière hémato-encéphalique.

La présence de ces jonctions serrées entre les CEC et l'expression de multiples transporteurs (tels que la P-glycoprotéine, protéine membranaire exprimée au sein de la BHE, connue pour limiter l'entrée des médicaments dans le cerveau par exemple¹⁸¹) constituent une barrière de protection unique à l'encontre de nombreux agents pathogènes toxiques tels que les xénobiotiques. Cependant, dans certains cas, la BHE peut être impliquée dans la physiologie de multiples maladies neurologiques tant vasculaires (accidents vasculaires cérébraux (AVC)), tumorales, inflammatoires (sclérose en plaque (SEP)), infectieuses (méningites, encéphalites) que neurodégénératives (Alzheimer)¹⁸², et son imperméabilité élevée s'avère être l'un des obstacles majeur à la délivrance des traitements médicamenteux.

II.2 Canaux SKCa et le SNC

Dans le cas des canaux SKCa (voir Figure I.7 – chapitre I), les canaux SK1 (KCa.2.1), SK2 (KCa.2.2) et SK3 (KCa.2.3) sont localisés de façon importante au sein du SNC, et de multiples

¹⁸¹ S. Dauchy, N. Tournier, S. Yousif, A. Jacob, X. Declèves, *Réanimation* **2008**, *17*, 664–669

¹⁸² N. Weiss, F. Miller, S. Cazaubon, P.-O. Couraud, *Rev. Neurol. (Paris)* **2009**, *165*, 1010–1022.

études ont montré leur implication dans le développement de maladies neurologiques. Les revues très complètes de Thomas Blank et al.¹⁸³ et de Susan I.V. Judge¹⁸⁴ reprennent les diverses implications des canaux potassiques dans le développement de maladies et le cas échéant, les traitements utilisés pour palier à ces dernières. Ainsi, les canaux SKCa seraient impliqués dans les phénomènes d'épilepsie, de convulsions, de démence, d'ischémie cérébrale, d'anxiété, de dépression etc.¹⁸⁴. Comme modulateurs potentiels, les toxines peptidiques telles que l'Apamine et la scyllatoxine, ainsi que des composés organiques tels que les sels quaternaires de bicuculline, de dequalinium, UCL 1684 et UCL 1848 sont utilisés mais servent de bloqueurs non spécifiques de canaux SKCa^{183, 185}.

Pour rappel, les seules exceptions de modulateurs sélectifs connues à ce jour sont la toxine issue du venin de scorpion appelée la tamapine^{186, 187} et l'inhibiteur peptidique le Lei-Dab7⁵⁸, qui se lie préférentiellement au canal SK2.

Ainsi, la difficulté qui subsiste toujours aujourd'hui dans la mise en place d'un traitement thérapeutique ciblé / adapté, est l'utilisation d'un modulateur qui soit à la fois efficace et sélectif du canal potassique responsable de la pathologie que l'on souhaite traiter.

L'Ohmlin étant un composé qui possède à la fois ces deux caractéristiques *vis-à-vis* du canal SK3, et qui plus est, est également capable de passer la BHE, pourrait s'avérer être un bon candidat pour la réalisation d'étude sur des maladies neurologiques dans lesquelles le canal SK3 serait impliqué.

De plus, il est important de noter que, lors des études portant sur la quantification de l'Ohmlin dans les tissus cancéreux où une concentration élevée d'Ohmlin au sein du SNC a été observé (Figure V.1), aucun effet neurologique chez les souris traités n'a été constaté⁵⁷. Cette piste ne serait donc pas à négliger.

¹⁸³ T. Blank, I. Nijholt, M.-J. Kye, J. Spiess, *Curr. Drug Target -CNS Neurol. Disord.* **2004**, *3*, 161–167.

¹⁸⁴ S. Judge, P. Smith, P. Stewart, C. Bever Jr., *Recent Patents CNS Drug Discov.* **2007**, *2*, 200–228.

¹⁸⁵ J. Liegeois, F. Mercier, A. Graulich, F. Graulich-Lorge, J. Scuvee-Moreau, V. Seutin, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 625–647.

¹⁸⁶ P. Pedarzani, D. D'hoedt, K. B. Doorty, J. D. F. Wadsworth, J. S. Joseph, K. Jeyaseelan, R. M. Kini, S. V. Gadre, S. M. Sapatnekar, M. Stocker, P. N. Strong, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 46101–46109.

¹⁸⁷ M. Mayorga-Flores, A. Chantôme, C. M. Melchor-Meneses, I. Domingo, G. A. Titau-Delgado, R. Galindo-Murillo, C. Vandier, F. del Río-Portilla, *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1627–1633.

III -Métabolisation de l'Ohmline

Suite aux études de toxicité réalisées avec l'Ohmline, l'équipe du Pr. Christophe Vandier s'est intéressée à quantifier la quantité d'Ohmline restante plusieurs semaines après la dernière injection de la molécule, chez les souris non cancéreuses (Figure V.3). Cette quantification est également un indicateur de la métabolisation de la molécule au sein de l'organisme.

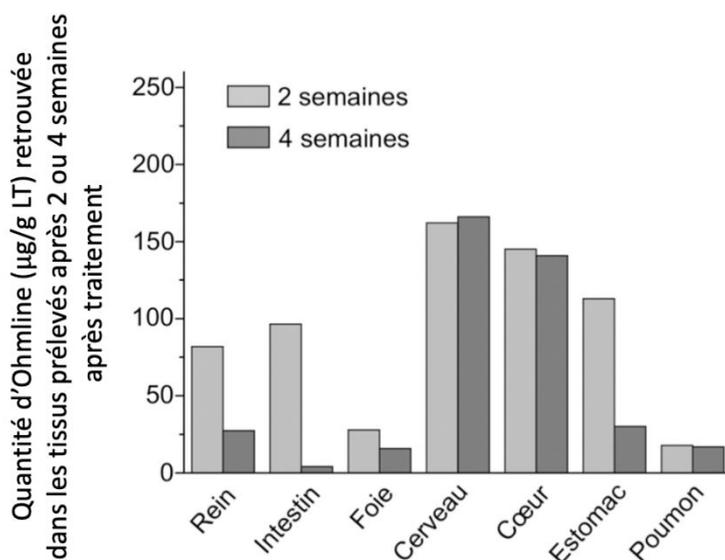


Figure V.3: Quantification d'Ohmline restante dans les tissus non tumoraux 2 et 4 semaines après la dernière injection de 15mg/kg. Adapté d'après la thèse de A. Girault (2011).

On entend par métabolisation d'une molécule, sa transformation par la biais de réactions enzymatiques, en un ou plusieurs autres composés appelés métabolites. Ces derniers peuvent devenir plus actifs que le composé originel, inactifs, ou bien toxiques.

Ainsi, d'après la Figure V.3, on constate que 2 semaines après la dernière injection, la molécule est retrouvée en grande quantité dans les reins, les intestins et l'estomac tandis qu'après 1 mois, une forte diminution est observée. De plus, on remarque que l'Ohmline reste en quantité importante dans le cerveau et le cœur et ce, que ce soit après 2 ou 4 semaines suivant la dernière injection. Le fait de retrouver l'Ohmline en quantité variable en fonction des tissus est la preuve qu'elle est éliminée (rein, intestin, estomac) ou qu'elle se métabolise lentement au sein de certains tissus (cœur, cerveau, poumon). Cette cinétique

de métabolisation peut être liée à la présence de fonctions éthers très stables (voir chapitre I – paragraphe III.4.3).

On peut également en déduire que son action thérapeutique, *vis-à-vis* du canal SK3, est due à sa structure originelle et non pas à un métabolite issu de sa métabolisation dans l'organisme.

Ces résultats ont incité l'équipe Brestoïse à se pencher sur la synthèse de nouveaux analogues de l'Ohmline qui soient plus efficaces mais également plus rapidement métabolisables afin d'éviter une accumulation dans certains tissus.

Pour cela, l'équipe a décidé de substituer l'oxygène de la position *sn-1* par un motif thioéther. En effet, la chimie du soufre est très riche et cet élément est connu pour ses nombreux degré d'oxydation qui le place au centre d'un grand nombre de réaction d'oxydoréduction. De plus, comme le phosphore, l'azote, l'hydrogène, l'oxygène et le carbone, il est un élément structural essentiel à tous les êtres vivants. On le retrouve notamment dans la constitutions de deux AA, la cystéine et la méthionine, qui entre elles même dans la constitution des protéines.

Ainsi, de nouveaux analogues de l'Ohmline possédant un motif thioéther (S), sulfone (SO₂) ou bien encore sulfoxyde (SO) ont été synthétisés au laboratoire par le Dr. Charlotte Sevrain (Figure V. 4). Afin de compléter cette étude, la synthèse d'un nouvel analogue soufré de l'Ohmline a été réalisée, où nous avons substitué le groupement méthoxy de la position *sn-2* par un groupement éthoxy (Figure V. 4).

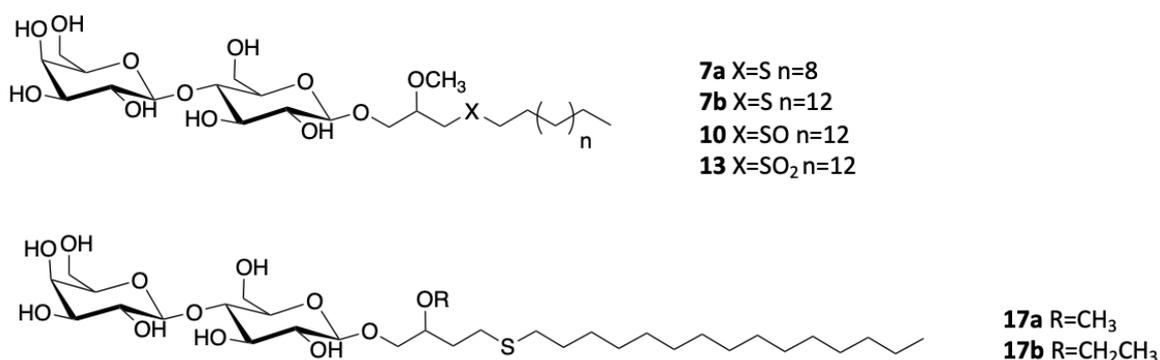


Figure V. 4: Structures des nouveaux analogues de l'Ohmline possédant un motif soufré en position *sn-1*.

La synthèse de ces nouveaux analogues, les résultats biologiques obtenus ainsi que les conséquences de ces nouvelles modulations structurales sont répertoriés dans l'article

intitulé « *Introduction of a thio-ether on glycolipid amphiphilic compounds reveals a potent activator of SK3 Channel with vasorelaxation effect.* » présenté au [paragraphe V](#).

IV - Résumé de l'article

Afin d'étudier plus en détail les conséquences des modifications structurales de l'Ohmlin sur la modulation des canaux SK3, une série de composés dans laquelle l'atome d'oxygène en position *sn-1* du groupement glycérol est remplacé par un thioéther, un sulfoxyde ou une sulfone, ont été synthétisés. La présence de la fonction thioéther (pour les composés 7 et 17a) a généré, pour la première fois, l'obtention de puissants activateurs (déterminé par patch clamp) du canal SK3 tandis que l'introduction, sur la même position, d'une fonction sulfoxyde (composé 10) ou bien sulfone (composé 13) n'a présentée aucun effet sur la modulation du courant ionique dépendant du canal SK3. Après ces tests aigües (10µM, analyse par patch clamp, durée de l'analyse quelques minutes), l'effet sur la migration cellulaire a été étudié (test chronique, durée 24h, concentration 300nM). Il apparait que les composés activateurs ou inhibiteur en patch clamp n'ont pas d'effet sur la migration cellulaire, ce qui suggèrerait une métabolisation des composés en 24h.

Puisque l'activation du canal SK3 entraîne un efflux important d'ions potassium, qui est généralement compensée par des entrées d'ions calcium, la concentration cytosolique en ions calciques a été quantifiée par imagerie calcique à trois temps distincts (13 minutes, 1h et 24h). Les composés activateurs 7b et 17a ont entraîné une augmentation de la concentration en Ca²⁺ au temps court (13 minutes) sur deux lignées cellulaires (HT116 et PC3). En revanche pour le composé inhibiteur 17b aucun effet au temps court (13 minutes) n'a été observé sur la concentration calcique (lignée HT116). Ce résultat suggère un effet non spécifique du composé 17b. En ce qui concerne le composé activateur 7b, l'imagerie calcique a été réalisée après 1h et 24h. Dans le premier cas, il n'y a plus aucun effet significatif de ce composé sur la concentration en calcium cytosolique. Dans le second cas, après 24h, une diminution de la concentration en calcium a été cette fois-ci observée. Ce résultat peut suggérer que le composé 7b puisse être initialement un activateur du canal SK3, puis, après 24h, suite à une probable métabolisation dans l'organisme, générer des métabolites qui seraient des inhibiteurs du canal SK3.

Dans un second temps, les composés 7b et 17a ont été testés pour induire une vasorelaxation SK3 dépendante.

Les endothéliums vasculaires sont des tissus qui expriment les canaux SK3. L'activation de ces canaux ioniques contribue à l'hyperpolarisation des cellules endothéliales. Ceci se traduit alors, selon une cascade métabolique complexe, et impliquant de nombreux médiateurs, par l'hyperpolarisation du muscle lisse et conduit à sa relaxation et donc à une vasodilatation¹⁸⁸. Ce processus est connu sous le terme d'EDH (endothelium-derived hyperpolarization)¹⁸⁹.

Les composés 7b et 17a qui sont des activateurs puissants des canaux SK3 ont donc été testés pour cette application. Il apparaît que seul le composé 7b présente une activité vasodilatatrice comme cela est rapporté dans l'article présenté ci-après. À notre connaissance, c'est la première fois qu'un composé amphiphile conduit à un effet de vasodilatation *via* une activation des canaux SK3.

V - Article : « Thio-ether functionalized glycolipid amphiphilic compounds reveal a potent activator of SK3 channel with vasorelaxation effect ».

¹⁸⁸ M. A. Ozkor, A. A. Quyyumi, *Cardiol. Res. Pract.* **2011**, 2011, 1–12.

¹⁸⁹ F. C. Yap, D. S. Weber, M. S. Taylor, M. I. Townsley, B. S. Comer, J. Maylie, J. P. Adelman, M. T. Lin, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2016**, 310, H1151–H1163.

Thio-ether functionalized glycolipid amphiphilic compounds reveal a potent activator of SK3 channel with vasorelaxation effect.

Charlotte M. Sevrain,[†] Delphine Fontaine,[‡] Alicia Bauduin,[†] Maxime Guéguinou,[‡] Bei Li Zhang,[§] Aurélie Chantôme,[‡] Karine Mahéo,[‡] Côme Pasqualin,[§] Véronique Maupoil,[§] Hélène Couthon,[†] Christophe Vandier,[‡] Paul-Alain Jaffrès^{†}*

[†] Univ. Brest, CNRS, CEMCA UMR 6521, 6 Avenue Victor Le Gorgeu, Brest, F-29238 Brest, France. e-mail : pjaffres@univ-brest.fr

[‡]Univ. Tours, INSERM, UMR1069, 37000 Tours, France

[§]Univ. Tours, Laboratoire STIM EA 7349, and Groupe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté de pharmacie, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France

KEYWORDS. ion channel ; glycero-lipids ; ether lipids ; thioether; cancer ; cell migration ; vasorelaxation

ABSTRACT. The inhibition of SK3 ion channel was found as a valuable strategy to avoid SK3-dependent cell migration that is implicated in the formation of bone and lung metastasis in some cancers. The modulation of SK3 can be efficiently and selectively achieved by using the amphiphilic compound Ohmlin (a Glyco-Glycero-Ether-Lipid). We report herein a series of Ohmlin's analogues where one oxygen atom of the glycerol moiety is replaced by a thioether, a sulfoxide or a sulfone. Patch clamp measurements indicate that the presence of thioether function (compound **7** and **17a**) produces strong activators of SK3 channels whereas the introduction of a sulfoxide or a sulfone function at the same place produce amphiphiles devoid of effect on SK3 channels. Compounds **7** and **17a** are the first amphiphilic compounds activator of SK3 channel with a so strong effect (close to 200 % of activation). A second modification consisted in the replacement of a methoxy by an ethoxy group at the *sn*-2 position of the glycerol moiety. This modification reverses the action and produces a strong inhibitor of SK3 but this modulation was not associated with a decrease of cytosolic calcium concentration induced by calcium influx suggesting a non-specific action. The cytosolic calcium concentration determined by fluorescence at 3 different times for compound **7b** (13 min., 1h, 24h) revealed that the effect is different suggesting that the compound could be metabolized over time. This compound could be used as a strong SK3 activator for a short time. The capacity of **7b** to activate SK3 was then used to induce vasorelaxation *via* an endothelium-derived hyperpolarization (EDH) pathway. For the first time, we report that an amphiphilic compound can affect the endothelium dependent vasorelaxation.

INTRODUCTION

Among the wide diversity of potassium channels,¹ SK_{Ca} channels constitute a sub-class of channels that are activated and sensitive to cytosolic calcium concentration. This family of ion channels is composed of 3 channels isoforms (SK1, SK2, SK3 also identified as K_{Ca}2.1, K_{Ca}2.2, K_{Ca}2.3 with the genes *KCNN1*, *KCNN2*, *KCNN3*). These channels are implied in different physiological roles (e.g., regulation of neuronal excitability, Sinoatrial node,² implication in blood pressure regulation³) and are also involved in pathological situations (e.g. neuronal disease,⁴ cancer,⁵ neuropathy⁶). The conception of compounds that can modulate the activities of SK_{Ca} channels (activation or inhibition) was developed to assess the role of SK_{Ca} channels and for potent medical applications. Briefly, activation of SK_{Ca} channels was used concomitantly with *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists to produce antinociceptive effects.⁷ Other works have shown that the activation of SK2/SK3 channels improved the mobility of transgenic SCA2 mice,⁸ and the activation of SK3 reduced inflammatory response activated by microglia.⁹ In addition, activators of SK3 channels may be used in pathologies in which SK3 induced hyperpolarization control excitation-contraction coupling such as to prevent preterm labor,^{10,11,12} to prevent bladder over activity¹³ or to treat systemic hypertension by activating endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) and nitric oxide-mediated vasodilation.¹⁴ On the other hand, to mention few examples of the effect of the inhibition of SK3 channel, it is worth mentioning the possibility to reduce migration/invasion of microglia¹⁵; SK3 blocker could reduce taxane-induced peripheral neuropathy.⁶ Of note, in some cancer cells the expression of SK3 channel is modified or abnormally expressed (not expressed in some epithelial cells compare to cancer epithelial cells). For instance, in cancer cells (e.g. MDA-MB-435s) SK3 channel is expressed whereas in non-tumor cells it is not. Interestingly, biopsies of cancer cells have shown

that SK3 channels are also expressed in melanoma,¹⁶ breast and prostate cancers,¹⁷ and colon cancer biopsies.¹⁸ When SK3 channel is expressed in cancer cells, it promotes at least cell migration.¹⁹ These results suggested developing inhibitors of SK3 channel with the aim to reduce cancer cells migration. As detailed in a recent review,⁵ the first strategy to modulate the K⁺ currents triggered by SK3 channel consisted to use peptides (e.g. apamine²⁰), or heterocyclic compounds featuring cationic moieties (e.g. UCL1684, dequalinium²¹). The inhibition can be also achieved by other classes of heterocyclic compounds that modified the sensitivity of cytosolic calcium concentration [Ca]_{cyt.} (e.g. NS8593²²). On the other hand, other heterocyclic compounds were identified to activate SK3 channel (e.g. CyPPA²³, NS130018). More recently, we found that some amphiphilic compounds had the possibility to inhibit SK3 channel activity with an interesting selectivity.^{24,25} Ohmlin (figure 1) appeared as an efficient and selective inhibitor of SK3 channel. This compound inhibited SK3 currents by 73 % (effect observed 2 minutes after adding Ohmlin at 10 μM and measured by patch clamp technique) and inhibited SK3-dependent cancer cells migration (corresponds to 50% of MDA-MB-435s cell migration) at a lower concentration (300 nM) during 24 hours.¹⁷ Interestingly this compound is one of the most selective inhibitors of SK3 since it has a weak effect on SK1 (-20 %) and no effect on both SK2 and IKCa/SK4. This compound is not a pore blocker (cork effect) neither a modulator of the sensitivity of cytosolic calcium concentration. The amphiphilic nature of Ohmlin that belongs to the class of ether lipids,²⁶ suggests a different mechanism of action when compared to the other modulators of SK3 channel. The alkyl chain acts as a membrane anchor and the glycerol moiety and the lactose unit interact with the polar groups of the constituents of the plasma membranes (e.g. phospholipid, cholesterol) as recently shown by ²H NMR and molecular dynamic simulation.²⁷ On this basis, it was suggested that Ohmlin can modulate SK3 channel function by

generating a modification of the bio-physical properties of the membrane and/or by a direct interaction with the SK3 protein within the lipid bilayer. Its action could be view as an illustration of the concept of membrane lipid therapy.²⁸ Ohmlin is also efficient *in vivo* to prevent the occurrence of SK3⁺ bone metastases and to reduce lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer.¹⁷ In that case, Ohmlin induced the dissociation of a protein-protein complex constituted by two ion channels (Orai 1 and SK3) that are located in the plasma membrane. This compound was also the first amphiphilic compound that reduces SOCE-dependent cell migration and modifies anti-EGFR monoclonal antibodies effects.¹⁸ With the aim to identify new Ohmlin's analogues, we have previously modulated the structure of the polar head group,^{29,30} integrated a phosphate moiety³¹ and reported a fluorescent analogue of Ohmlin.³² In the continuity of these studies, we report herein the synthesis and the properties of new Ohmlin's analogues that feature a sulfur-based function (thioether, sulfoxide, sulfone) in replacement of one ether function. We also report the replacement of the methoxy group by an ethoxy group (compounds **17a** and **17b** Figure 1). All these structural changes aim to modulate steric hindrance and electronic demand. As reported below, some of the new compounds are strong activators or strong inhibitors of SK3 channel. One of the activator (**7b**) is the first amphiphilic compound that affects the endothelium dependent vasorelaxation.

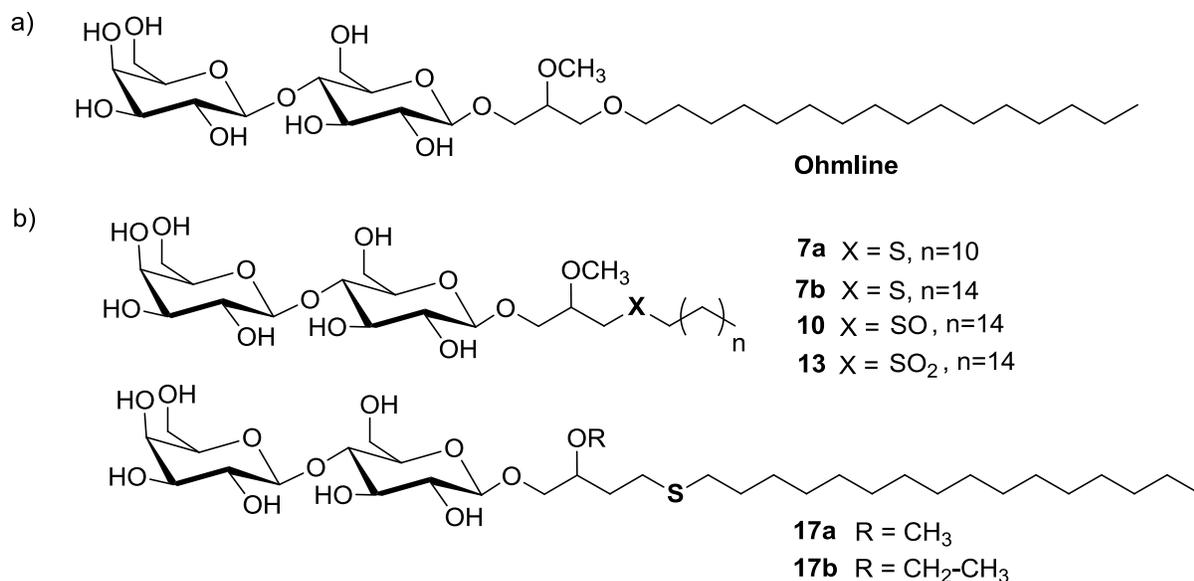


FIGURE 1. a) Chemical structure of Ohmline. b) Chemical structure of the new Ohmline's analogues reported herein.

RESULTS AND DISCUSSION

The replacement of the glycerol moiety present in Ohmline by a thioglycerol unit was the starting point of this study. We hypothesized that the replacement of the ether group by a thioether will induce geometrical modifications similar to those observed when we compare diethylether and diethylthioether (diethyl ether features C-O-C angles of 112° and C-O bonds are close to 1.43 Å³³ whereas diethylthioether features a C-S-C bond angle of 100° and a C-S bond length close to 1.81 Å³⁴). Accordingly, these modifications could influence the interaction of Ohmline's analogues with the other amphiphiles present in the plasma membranes and, then, impact SK3 channels function. Of note, it was previously evidenced that the incorporation of thioether function within lipid chains of ionic liquids,³⁵ bolaamphiphiles³⁶ or cationic amphiphiles, influenced their physico-chemical properties.^{37,38} The other differences induced by the replacement of one ether moiety by a thioether function are: i) the difference of polarity due

to the respective electronegativity of the oxygen and sulfur atoms; ii) the size of sulfur atom, which is larger than oxygen atom and more polarizable; iii) the metabolism of thioether derivatives is different to that of ether compounds because it can be oxidized in sulfoxide³⁹ and subsequently in sulfone.^{40,41}

The synthesis of the thioether analogues of Ohmlin uses thioglycerol as starting material (see supporting materials for a full details of the synthesis) which is converted into the thioether **4a** or **4b** in four synthesis steps (overall yield 40%)^{42,43,44}. Compound **4a** or **4b**, which possess either a C12 or C16 lipid chain, was then engaged in a glycosylation reaction with the lactose acetate **5** activated at its anomeric position with a trichloroacetimidate moiety to produce compound **6a** or **6b**. The deprotection of the seven alcohol functions, achieved by transesterification with potassium carbonate in methanol (for **7a**) or with sodium methanolate (for **7b**), produced **7a** and **7b** in respectively 37% and 100% yields. It is important to emphasize that the precursors **4a** and **4b** are racemic because we have previously shown that the configuration at the *sn*-2 position of the glycerol unit of Ohmlin has no effect on the modulation of SK3 function.^{24a}

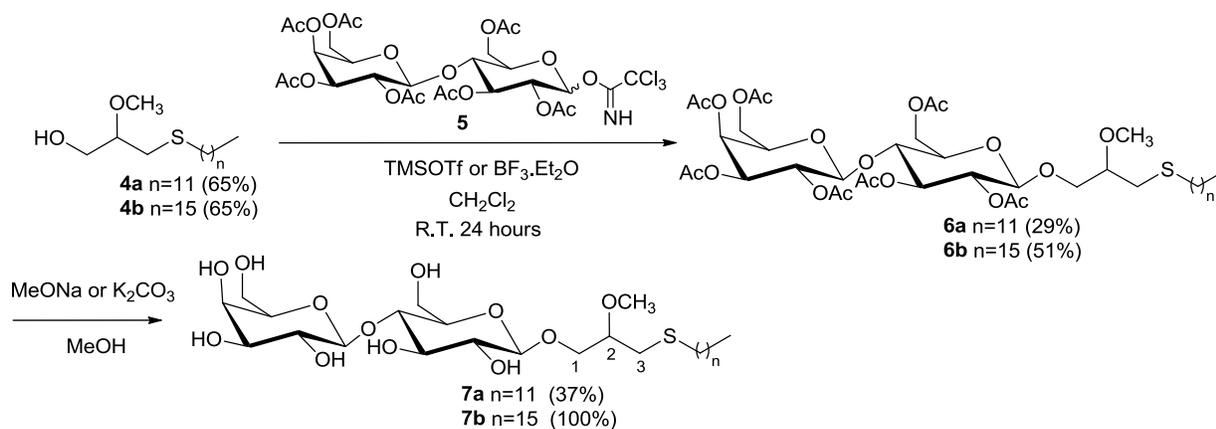


FIGURE 2. Synthesis of thio-ether analogues of Ohmlin **7a** and **7b**.

Then, we prepared analogues of compound **7b** in which the thioether function was oxidized in sulfoxide or sulfone (Figure 3). The synthesis of the sulfoxide starts with **4b** that was oxidized with mCPBA (1 eq. at room temperature) as reported by Ayers et al.⁴⁵ The sulfoxide **8** was glycosylated with lactose-acetate trichloroacetimidate **5**. This reaction, which is catalyzed by BF₃, produced a mixture of compounds that was impossible to separate. The presence of the sulfoxide that can also interact with BF₃ is likely the reason of the side reaction (Figure 3a). To overcome these difficulties, we investigated a second approach consisting to achieve the oxidation of the thioether after the glycosylation step. Accordingly, the addition of one equivalent of mCPBA to the thioether **6b** yields the expected sulfoxide **9** as a mixture of diastereoisomers. The deprotection of the alcohol functions present on the lactose moiety produces the expected compound **10 (Ohmlin-4-SO)** in 93% yield (figure 3b). The preparation of the sulfone was achieved by using the strategy initially attempted for the sulfoxide (figure 3c). The oxidation of compound **4b** with an excess of mCPBA (5 equivalents) for a longer reaction time (4h) produced almost quantitatively the sulfone **11**. Its glycosylation with the activated lactose **5** produced compound **12** in 54 % yield. Finally, the deprotection of alcohol functions yields compound **13 (Ohmlin 4-SO₂)** in quantitative yield.

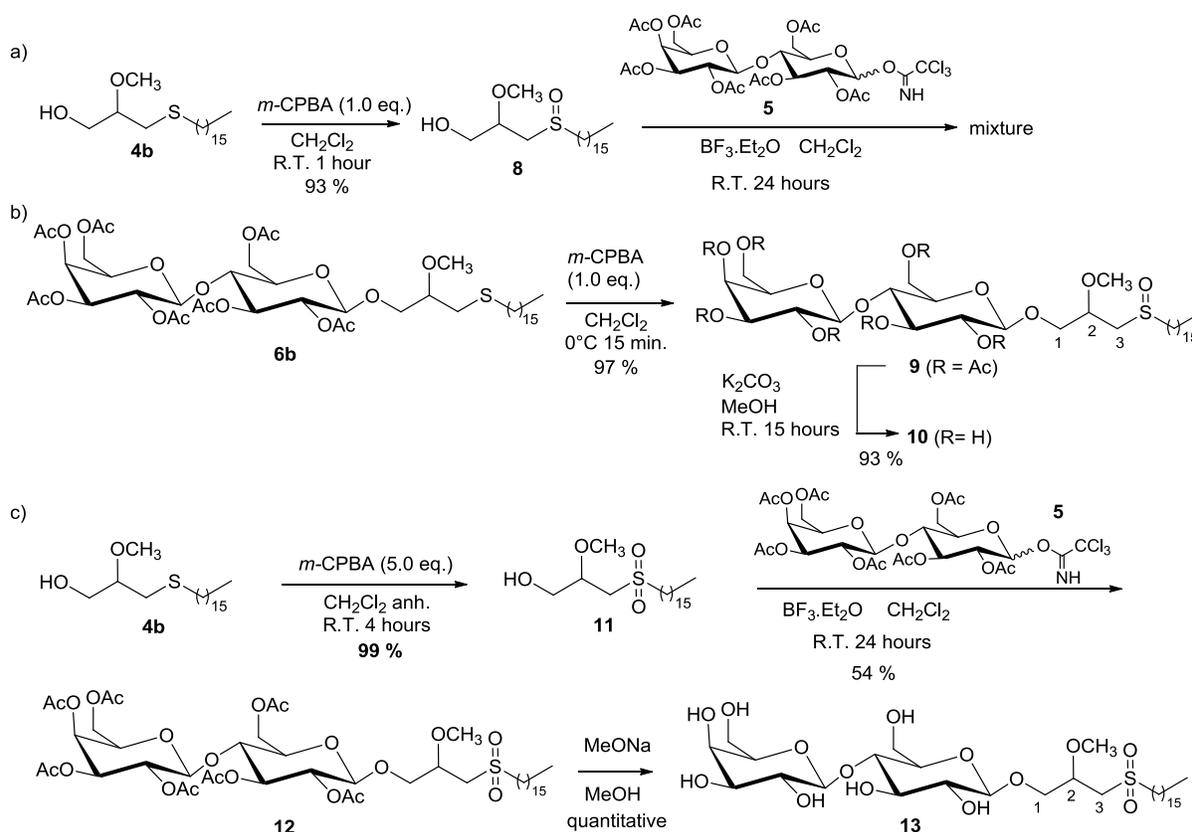


FIGURE 3. a) Attempts to synthesize compound **10** by a glycosylation reaction involving the sulfoxide **8**. b) Synthesis of the sulfoxide analogue of Ohmline **10** (**Ohmline-4-SO**) by oxidation of the thioether **6b**. c) Synthesis of the sulfone **13** from **4b**. Synthesis of thio-ether analogues of Ohmline **7a** and **7b**.

A fourth analogue of Ohmline was prepared with the aim to shift the thioether moiety away from the polar head group by one methylene unit (Figure 4). The synthesis scheme is completely different and starts with the synthesis of the vinyl alcohol by a regioselective opening of the vinyl epoxide in acidic media by adapting a reported procedure.⁴⁶ Then, we applied a photo-click thiol-ene reaction⁴⁷ that engaged compounds **14a-b** with hexadecanethiol. For this reaction, the conditions were inspired from a procedure we have previously optimized to prepare other type of amphiphilic compounds.^{48,49} Then, the intermediate **15a** or **15b** was engaged in a glycosylation

reaction with **5** in presence of $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ to produce **16a** or **16b** in respectively 35% and 41% yield. The deprotection of the alcohol function by sodium methanolate (**17a**) or by potassium carbonate (**17b**) produced compound **17a** or **17b** in respectively 87 % and 99% yield.

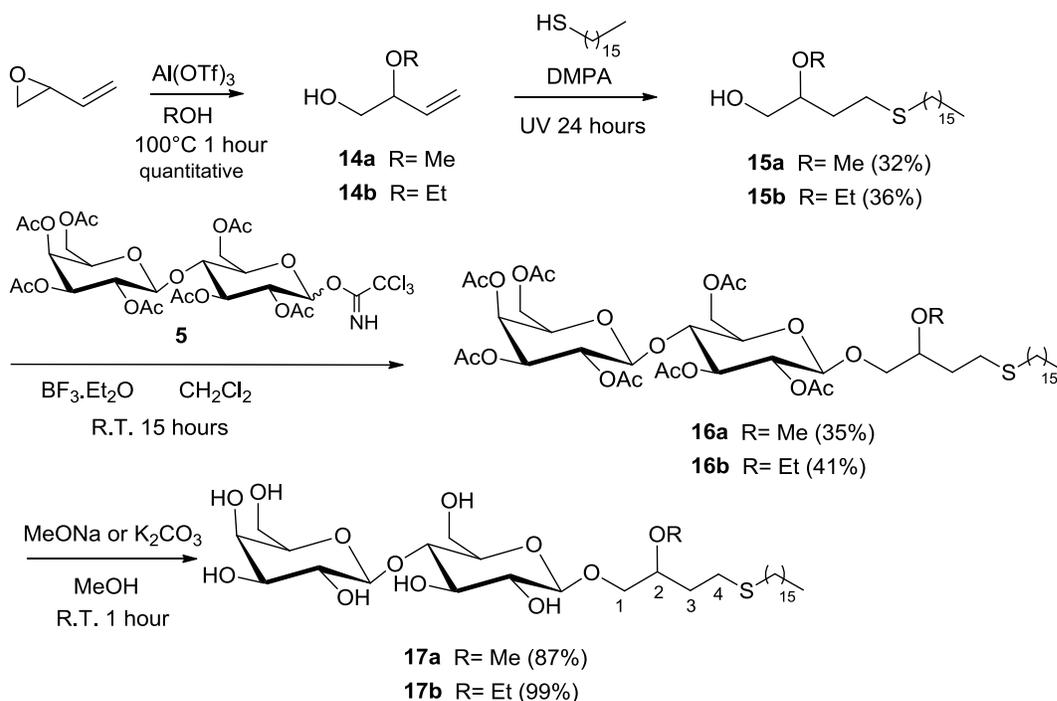


FIGURE 4. Synthesis of the thioether analogue of Ohmline **17a-b**.

Then, we tested the capacity of the molecules **7a-b**, **10**, **13** and **17a-b** (Table 1 and Figure 5) to change the activity of SK3 currents using the whole cell configuration of the patch clamp technique. For these acute tests, we used a concentration of $10\ \mu\text{M}$ for each of the new amphiphilic compounds as already performed with Ohmline.^{24a} The results of the patch clamp measurements are summarized in Table 1. First, we can observe that the replacement of the ether link by a thioether function produces a strong activator of SK3 channel (**7b**) and that this effect depends on the length of the lipid chain. Indeed, the comparison of compounds **7a** and **7b** indicates that the reduction of the length of the lipid chain from 16 carbon atoms (same as Ohmline) to 12 carbon atoms abolished the effect on SK3. We have already shown that reducing

the length of the carbon alkyl chain in *sn-1* position to 12 carbon atoms abolish the inhibitory effect of Ohmlin of SK3 channel (unpublished results). We hypothesize that a short lipid chain would reduce the membrane anchor properties of the amphiphilic compounds. Then, when the position of the sulfur atom was changed the compound kept its activation capacity (comparison of compounds **7b** and **17a**). Figure 5A shows typical SK3 currents recorded at membrane potentials varying from -90 to +90 mV for 500 ms in control condition (vehicle) and after application of compounds **7b** and **17a**. We observe that the amplitude of outward currents strongly increased after application of compounds **7b** and **17a**. SK3 currents were analyzed at 0 mV to minimize chloride currents and showed an increase close to 200% (Table 1). The entire time course of these experiments is depicted in Figure 5B and we can observe a relatively slow effect of these compounds. Indeed, we found that the maximum of the activation was reached 5 minutes after application of either compound **7b** or **17a** (figure 5A and 5B) whereas that maximum inhibitory effect of Ohmlin is observed only 2 minutes after application.^{24a} It can be speculated that compounds **7b** and **17a** are incorporated more slowly than Ohmlin within the plasma membrane. Then, we investigate the consequence of the presence of sulfoxide or a sulfone function. Interestingly, the introduction of a sulfoxide or a sulfone function at the same place than the thioether function present in compound **7b**, produced amphiphiles with reduced or devoid of any action on SK3 currents (comparison of compound **7b** with **10** and **13**). The oxidation of thioether produced more polar functions (sulfoxide or sulfone) that likely influenced the position of the amphiphilic compound within the plasma membrane. Moreover, steric hindrance constrains and supramolecular interactions are completely different from a thioether to a sulfoxide or a sulfone.⁵⁰ Nevertheless, these results show for the first time that the incorporation of thioether in place of an ether function produced the first amphiphilic activators

of SK3 whereas the oxidation of this thioether function produced almost non-active compounds. We next tested compound **17b** that differ from compound **17a** by the presence of ethoxy group at the *sn-2* position in place of a methoxy group present in **17a**. We have previously shown that the methoxy group at the *sn-2* position has an important effect on the modulation capacity of SK3. Indeed, LysoPAF which is an ether lipid possessing a phosphocholine polar head group and an unsubstituted hydroxy group in *sn-2* position has no effect on SK3.²⁴ The result was quite unexpected because the replacement of the methoxy by an ethoxy group converts the activator **17a** as new and original inhibitor of SK3 channel **17b** that reduced SK3 currents by -91.9 ± 1.8 % (Figure 5). The kinetic of the inhibition is even quicker than Ohmlin because the maximum inhibitory effect is reached after 30 seconds (Figure 5A, right). However, we found that the SK3 inhibitor **17b** had no effect on cell migration (1 μ M; 24h) as shown on the supporting material (Supporting Information SI3-1) suggesting a non-specific effect of the compound or a metabolization of the compound to a non-active one as suggested for SK3 activators (see below).

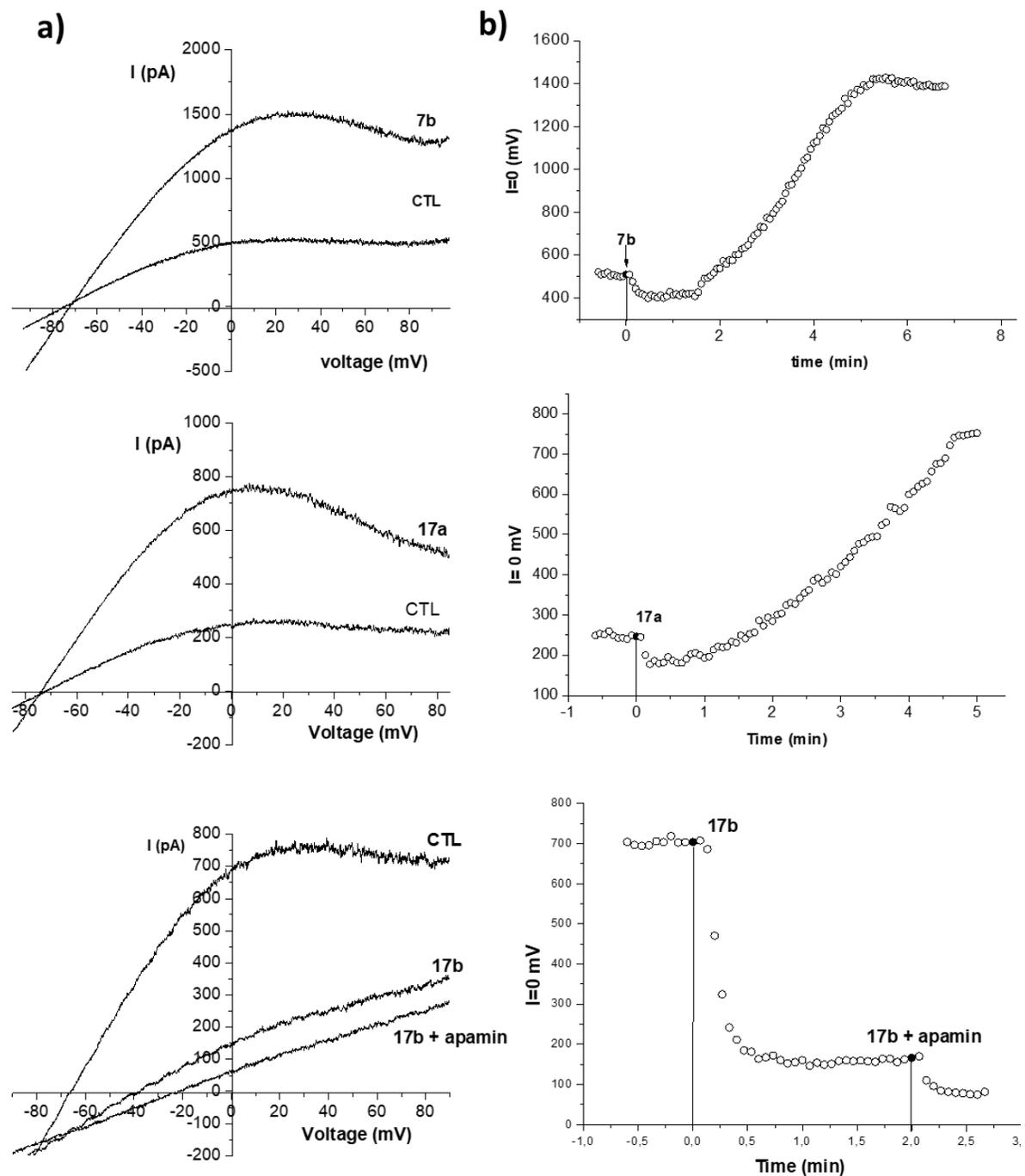
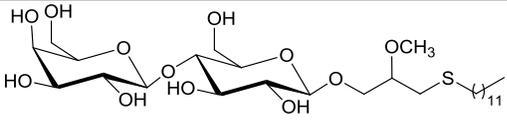
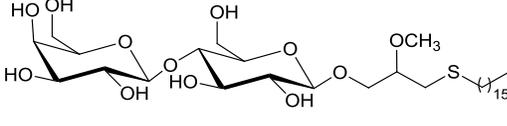
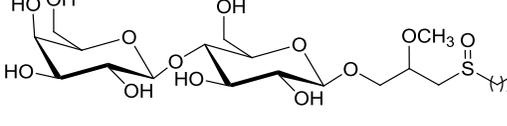
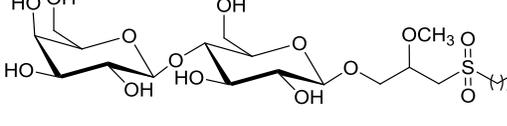
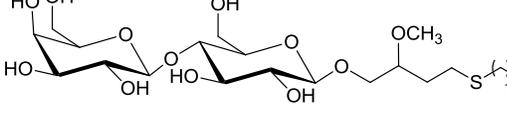
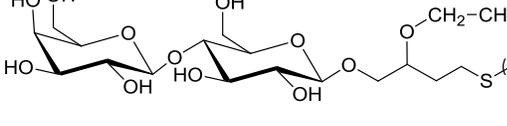


FIGURE 5. Representative SK3 whole-cell currents recorded in HEK293T expressing SK3 channels before and after application of Ohmlin's analogues. Whole-cell currents were generated by ramp protocol from -90 to 90 mV in 500 ms from a constant holding of 0 mV with

a pCa 6. **A**) Recording of currents in condition control (vehicle application) and after exposition of compounds **7b** (top), **17a** (middle) and **17b** (bottom) at 10 μ M. An addition of 100 nM apamin after exposition to **17b** is used to inhibit residual SK currents. **B**) Kinetics of modulation of SK3 currents measured at 0 mV with **7b** (top), **17a** (middle) and **17b** (bottom). Cells were perfused with the vehicle and the moment where the vehicle is substituted by analogue is indicated by a black round.

Table 1. Effect of Ohmlin's analogues on SK3 currents and on SK3 dependent cell migration.

	Structure	SK3 current ^a
7a		-9.7 % \pm 5.2 (N=4)
7b (Ohmlin-4S)		+ 177 % \pm 67 (N=4)
10 (Ohmlin-4SO)		+29 % \pm 8.6 (N=5)
13 (Ohmlin-4SO ₂)		-19.1% \pm 1.8 (N=5)
17a (Ohmlin-5S)		+ 203 % \pm 59 (N=5)
17b (Ohmlin-2-OEt-5S)		-91.9 % \pm 1.8 (N=4)

a) Acute effect of 10 μ M Ohmlin analogues in SK3 current recorded at 0 mV in HEK393 cells expressing recombinant SK3 channel. Results are normalized to control condition (vehicle)

and expressed as mean \pm S.E.M, N corresponds of the number of cells tested. N corresponds to the number of independent experiments.

Next, the effect of SK3 activators **7b** and **17a** on MDA-MB-435s and PC3 cell migration (1 or 10 μ M ; 24h) was studied. As shown in the supporting information (Figure SI3-1), **7b** and **17a** have no effect on cell migration whereas Ohmlin^{24a} or CYPPA modulated cell migration in similar conditions.⁵¹ These unexpected results arise the question about the effect of these thioether compounds on calcium entries and particularly on store operated calcium entries (SOCE) that we already found to inhibit or promote colon and prostate cancer cell migration respectively in the case of Ohmlin and CYPPA.^{52,18,51} Accordingly, the cytosolic calcium concentration induced by SOCE was measured on two SK3+ cell lines (colon HCT116 and prostate PC3 cancer cell lines). After a short period (13 min) it is observed that **7b** and **17a** induced an increase of cytosolic calcium concentration as expected for an activator of SK3 channel (Figure 6). Indeed, as previously reported, the activation of SK3 channel hyperpolarize plasma membrane that favor calcium entries.⁵³ Note that **17b** (SK3 inhibitor) has no effect on SOCE suggesting that the absence of effect of this compound on cancer cell migration (Figure SI3-1) is due to its absence of effect on calcium entry (Figure SI4-1). The same experiment was repeated for **7b** after 24h because this time correspond to the migration assay that was negative for **7b**. Surprisingly, we found that after 24h, SOCE were significantly reduced as shown in figure 6E-F. This could explain the absence of effect of these compounds on cancer cell migration. Altogether, these results suggest that **7b** activate migration after 13 min application and then inhibits cell migration after 24h application. Interestingly, after 1 h application compound **7b** has no effect on SOCE (Figure 6 G-H). Thus, this compound time dependently switches from an activator, to a non-active compound and then to a low inhibitor of SOCE suggesting a time dependent metabolization of the compound. We next hypothesized that the thioether function

could be biochemically oxidized in sulfoxide or sulfone overtime leading to modulate the initial effect. Since sulfone **13** is according to patch clamp measurements (Table 1) a weak inhibitor of SK3, we measured the modulation of SOCE induced by compound **13**. Compound **13** was found to have no significant effect on SOCE that could be explained by its weak effect on SK3 channel (see supporting information SI5-1). Altogether, we report that **7b** and **17a** are strong activators of SK3 channel for short time applications but as suggested above, the biochemically transformation of **7b** produced a compound that after 24h reduces SOCE following a mechanism which is not yet understood. Non-selective effect (possible inhibition of calcium channels) likely occurred because the acute application of compound **13** is not able to decrease the cytosolic calcium concentration like observed with Ohmlin. Of note, none of the compounds tested presented a toxicity according to the MTT assays (Figure SI6-1).

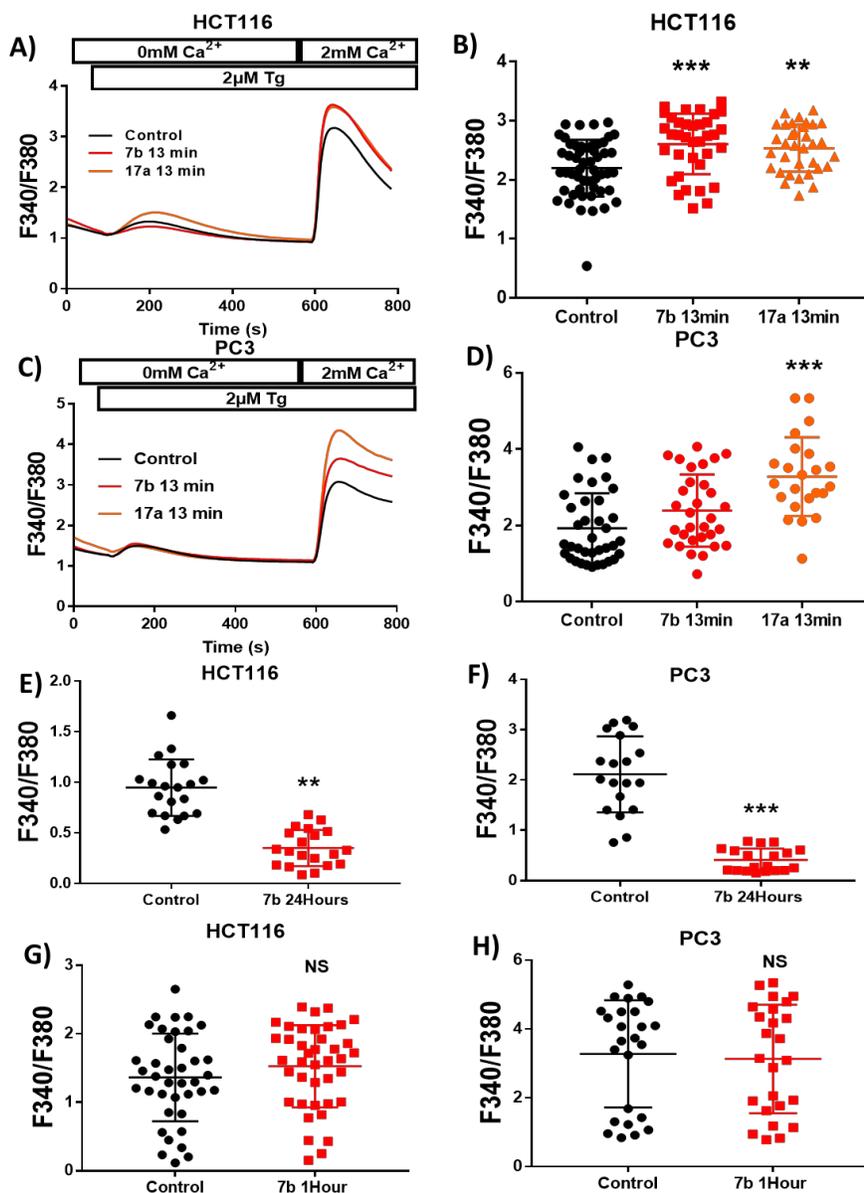


FIGURE 6. Effect of compounds **7b** and **17a** at 10 µM on cytosolic calcium concentration of HCT116 colon cancer cell line and PC3 prostate cancer cell line. Mean traces representing Ca²⁺ signals (indicated by Fura-2 fluorescence ratio) triggered by adding 2 µM of thapsigargin (Tg) to HCT116 (A) and PC3 cells (C) with or without pre-treatment of the chosen drugs (shown in various coloured lines, each at 10µM dose with different times). (B-D) scatter plots showing the peak SOCE levels triggered by Tg in control cells and cells treated with 10 µM of each drug after a short period of exposure (13 minutes). Scatter plots showing the peak SOCE levels

triggered by Tg in control cells and cells pre-treated with each drug at 10 μ M dose during 24 h (E-F) or 1 h (G-H). Each value (mean \pm SD) was derived from 3–5 individual experiments and a total of 20–52 wells. The statistical comparison among the values for all conditions was determined using one way ANOVA followed by Dunnett's test or Mann-Whitney test. NS, **P < 0.01, ***P < 0.001.

The activation of SK3 channel, found to be expressed in endothelial cells of small mesenteric arteries, is supposed to induce vasorelaxation via EDHF pathway.³ Thus, we tested the capacity of SK3 activators to induce vasorelaxation by modulating excitation-contraction coupling of mesenteric smooth muscle. The two activators **7b** and **17a** were tested on isolated rat mesenteric arteries precontracted with the thromboxane analog U46619. As expected, acute exposure to the compound **7b** at 1 μ M induced an endothelium-dependent vasorelaxant effect (-34% \pm 9%, n=8) which reached a maximum value after about 20 min of incubation (Figure 7). Conversely, the acute exposure to the compound **17a** had no vasorelaxant effect (data not shown).

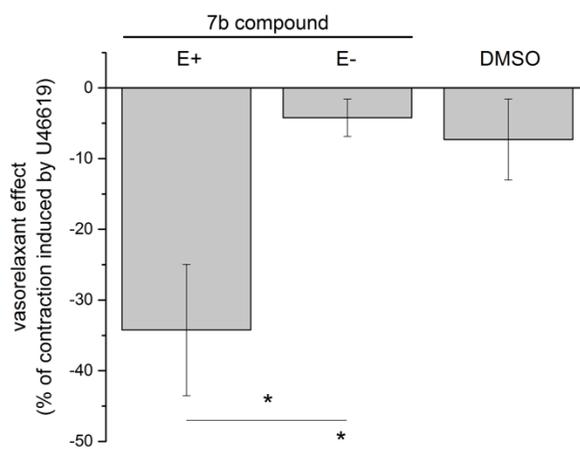


FIGURE 7. Relaxant effect of **7b** (1 μ M) on isolated rat mesenteric artery rings pre-contracted by U46619 (3 μ M) in endothelium-intact (E+) and endothelium denuded (E-) rings. * $p < 0.05$ (Student t-test).

CONCLUSION

We report herein the synthesis of Ohmlin's analogues in which the ether function linked to the lipid chain is replaced by a thioether, a sulfoxide or a sulfone. The evaluation of these 3 compounds by patch clamp measurements indicated that only the thioether containing compound **7b** exhibited a strong activation effect on SK3 (+ 177 % \pm 67). The presence of a shorter lipid chain (12 carbon atoms instead of 16 atoms in **7b**) produced a compound devoid of any action on SK3 thus emphasizing the importance of a long lipid chain. Then, we report the synthesis of one analogue of compound **7b** featuring a thioether function shifted by one methylene unit away from the polar head group. We found that this compound **17a** also features a strong and rapid activation effect (+ 203 % \pm 59) on SK3 channels at 10 μ M. If **7b** and **17a** are strong activator of SK3, unlike Ohmlin they have no effect on cancer cell migration after 24h. This behavior questioned about their possible metabolization overtime. Then, we recorded the SK3-dependent calcium entries at different times (13 min, 1h and 24 h) triggered by **7b** by using fluorescence techniques. We report for the first time that **7b** is a strong and rapid SK3 activator, which is correlated with the calcium entry SOCE as shown by cytosolic calcium measurements. However, after 24h a strong decrease of SOCE was measured indicating that **7b** has a time dependent effect: first, it increases SOCE, then, has no effect (1h) and after 24h it reduces SOCE. Its biochemical transformation, possibly by oxidation, is one hypothesis but the non-selective effect *via* its action on another ion channels (e.g. inhibition of calcium channel) is also hypothesized and will require further investigations. The last modulation dealt with the replacement of the

methoxy group present in compound **17a** by an ethoxy group to produce compound **17b**. Surprisingly, **17b** has a strong inhibitory effect on SK3 at 10 μM ($-91.9\% \pm 1.8$) pointing out the great influence of the substituent present on the central oxygen atom. However, **17b** has no effect on cancer cell migration after 24h suggesting non-specific action. Finally, **7b**, which is a strong activator for a short time, is the first amphiphilic compound that induces vasorelaxation *via* an endothelium-derived hyperpolarization.

EXPERIMENTAL SECTION

General

The commercially available chemicals were used without additional purification. The products were characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy (Bruker AC 300, Avance DRX 400 and Avance DRX 500 spectrometers) and mass spectrometry (BrukerAutoflex MALDI TOF-TOF III, LRF200CID). For NMR, scalar coupling constants J are given in hertz. The following abbreviations were used: s for singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet and m for multiplet.

1-S-dodecyl-2-O-methyl-*rac*-thioglycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (6a)

A solution of lactose trichloroacetimidate **5**⁵⁴ (850 mg, 1.08 mmol, 1.0 eq.) and **4a** (300 mg, 1.03 mmol, 0.95 eq.) in dry CH_2Cl_2 (4 mL) is stirred with molecular sieves 4 Å during one hour under inert atmosphere. At 0°C $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in dry CH_2Cl_2 (2mL) (196 μL , 1.08 mmol, 1 eq.) is added dropwise and the mixture is stirred 4 hours at 0 °C under inert atmosphere. Triethylamine is added at 0°C and the mixture is stirred during 15 minutes. The mixture is concentrated and the compound is diluted in ethyl acetate (20 mL), filtered on celite and concentrated to give the

crude compound **6a**, purified on column on silica gel (eluent: hexane / ethyl acetate: 9/1 to 8/2) to give **6a** (270 mg) in 29 % yield. Rf (hexane / acetone (6 / 4)): 0.8 ; ¹H NMR (CDCl₃, 500.253): 5.33 (d, 1 H, H_{4'}); 5.2 (t, 1H, H_{2'}); 5.1 (m, 1 H, H_{3'}); 5.0-4.85 (m, 2H, H₁ + H_{1'}); 4.6-4.4 (m, 3H, H_{6b} + H₂ + H_{1'}); 4.2-4.0 (m, 3 H, H_{6b} + H_{6a} + H_{5'}); 3.7-3.4 (m, 1 H, H_{5'} + H_{6a}); 3.7-3.55 (m, 2 H, CH₂ *sn*-3); 3.5-3.4 (m, 1 H, CH *sn*-2); 3.4 (2s, 3 H, OCH₃ two diastereoisomers); 2.7-2.6 (m, 2 H, CH₂ *sn*-1); 2.52 (t, 2H, J_{HH} = 7 Hz, CH₂ α fatty chain); 2.0-2.2 (m, 21H, CH₃ acetyl); 1.55 (qt, 2 H, J_{HH} = 7 Hz, CH₂ β fatty chain); 1.35 (m, 2H, CH₂ fatty chain); 1.3-1.2 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.88 (t, 3 H, J_{HH} = 7 Hz, CH₃ fatty chain) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 125.803): 170.4 (s, C=O); 170.2 (s, C=O); 170.1 (s, C=O); 169.8 (s, C=O); 169.7 (s, C=O); 169.1 (s, C=O); 101.1 (s, C_{1'}); 101.0-100.9 (C₁ two diastereoisomers); 79.8 (CH *sn*-2, two diastereoisomers); 76.2 (s, C₄); 72.6 (s, C₅); 71.6 (s, C_{5'}); 71.0 (CH₂ fatty chain); 70.9 (CH₂ *Sn*-1); 70.7 (C₂); 69.5 (CH₂ *sn*-3); 69.1 (s, C_{2'}); 66.6 (s, C_{4'}); 62.0 (s, C₆) ; 60.8 (s, C_{6'}); 58.0-57.7 (OCH₃, two diastereoisomers); 33.2 (CH₂ fatty chain); 33.1 (CH₂ α fatty chain); 32.8 (s, CH₂ fatty chain); 32.7 (s, CH₂ fatty chain); 31.9 (s, CH₂ fatty chain); 32.7 (s, CH₂ fatty chain); 31.9 (s, CH₂ fatty chain); 29.8 (s, CH₂ fatty chain); 29.7 (s, CH₂ fatty chain); 29.6 (s, CH₂ fatty chain); 29.5 (s, CH₂ fatty chain); 29.4 (s, CH₂ fatty chain); 29.2 (s, CH₂ fatty chain); 28.9 (s, CH₂ fatty chain); 22.7 (s, CH₂ fatty chain); 20.8 (s, OCH₃); 14.1 (s, CH₃ fatty chain).

1-S-hexadecyl-2-O-methyl-*rac*-thioglycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (6b)

A solution of lactose trichloroacetimidate **5** (442 mg, 0.57 mmol, 1.0 eq.) and **4b** (200 mg, 0.58 mmol, 1.02 eq.) in dry CH₂Cl₂ (15 mL) is stirred with molecular sieves 4 Å during one hour under N₂. At 0°C BF₃.Et₂O (28 μL, 0.23 mmol, 0.4 eq.) is added dropwise and the mixture is stirred 24 hours at room temperature. The mixture is quenched by addition of water (10 mL). The

organic layer is washed twice with aqueous saturated NaHCO₃ solution (2 x 10 mL) and an aqueous saturated NaCl solution (10 mL). The organic layer is dried with MgSO₄, filtered and concentrated to give the crude compound **6b**. The product is purified on chromatography on silica gel (eluent: petroleum spirit/ethyl acetate: 8/2 to 7/3) to give **6b** (284 mg) in 51 % yield. R_f (petroleum spirit/ ethyl acetate (7: 3)): 0.28 ; ¹H NMR (CDCl₃, 399.972): 5.33 (d, 1 H, J_{HH} = 3.2 Hz, H_{4'}); 5.18 (t, 1 H, J_{HH} = 10.0 Hz, H₃); 5.09 (dd, 1 H, J_{HH} = 10.0 Hz, J_{HH} = 7.9 Hz, H_{2'}); 4.95-4.88 (m, 2 H, H₂ + H_{3'}); 4.53-4.45 (m, 3 H, H₁ + H_{6a} + H_{1'}); 4.11-4.06 (m, 3 H, H_{6b} + H_{6'a} + H_{6'b}); 3.98-3.85 (m, 2 H, H_{5'} + H_a CH₂ *sn*-3); 3.78 (t, 1 H, J_{HH} = 10.0 Hz, H₄); 3.67-3.54 (m, 2 H, H₅ + H_b CH₂ *sn*-3); 3.48-3.42 (m, 1 H, CH *sn*-2); 3.39-3.38 (2 s, 3 H, OCH₃ two diastereoisomers); 2.63-2.59 (m, 2 H, CH₂ *sn*-1); 2.49 (t, 2 H, J_{HH} = 7.4 Hz, CH₂ α fatty chain); 2.13 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.10 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.04 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.03 (s, 9 H, CH₃ acetyl); 1.95 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 1.54 (qt, 2 H, J_{HH} = 7.6 Hz, CH₂ β fatty chain); 1.34-1.22 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.86 (t, 3 H, J_{HH} = 6.8 Hz, CH₃ fatty chain) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 125.804): 170.4 (s, C=O); 170.2 (s, C=O); 170.1 (s, C=O); 169.8 (s, C=O); 169.7 (s, C=O); 169.1 (s, C=O); 101.1 (s, C_{1'}); 101.0-100.9 (C₁ two diastereoisomers); 79.9-79.7 (CH *sn*-2, two diastereoisomers); 76.2 (s, C₄); 72.7 (s, C₃); 72.6 (s, C₅); 71.6 (s, C₂); 71.0 (C_{3'}); 70.6 (C_{5'}); 69.5 (CH₂ *sn*-3); 69.0 (s, C_{2'}); 66.6 (s, C_{4'}); 62.0 (s, C₆) ; 60.8 (s, C_{6'}); 58.1-57.7 (OCH₃, two diastereoisomers); 33.2-32.8 (CH₂ *sn*-1, two diastereoisomers); 32.6 (CH₂ α fatty chain); 31.9 (s, CH₂ fatty chain); 29.7 (s, CH₂ fatty chain); 29.6 (s, CH₂ fatty chain); 29.5 (s, CH₂ fatty chain); 29.4 (s, CH₂ fatty chain); 29.3 (s, CH₂ fatty chain); 28.9 (s, CH₂ fatty chain); 22.7 (s, CH₂ fatty chain); 20.9 (s, OCH₃); 20.8 (s, OCH₃); 20.7 (s, OCH₃); 20.5 (s, OCH₃); 14.1 (s, CH₃ fatty chain) ; Masse (MALDI-TOF; matrix dithranol 100 mg/mL): m/z calcd for C₄₆H₇₆O₁₉S [M+Na]⁺: 987.4594 , found 987.4651.

1-S-dodecyl-2-O-methyl-*rac*-thioglycer-3-yl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside (7a - Ohmline-4S)

K₂CO₃ (182mg, 1.32 mmol, 6 eq.) is added to a solution of **6a** (200 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (5 mL). The mixture is stirred at room temperature during 2 hours. After filtration on resin DOWEX, the filtrate is concentrated to give the crude compound **7a**. The crude compound is purified by column on silica gel (CHCl₃/MeOH: 80/20) to give **7a** (50 mg) in 37% yield. ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500.252): 5.10 (brs, 2 H, 2 OH); 4.8 (brs, 1 H, OH); 4.66 (brs, 2 H, 2 OH); 4.51 (brs, 2 H, 2 OH); 4.21-4.18 (m, 2 H, H₁ + H_{1'}); 3.9-3.72 (m, 3 H, H_{6a} + CH₂ *sn*-3); 3.58-3.54 (m, 3 H, H₅ + H_{6b} + H_{4'}); 3.53-3.42 (m, 5 H, H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + H_{6b} + CH *sn*-2); 3.42-3.27 (m, 7 H, H₃ + H₄ + H_{2'} + H_{3'} + OCH₃); 2.99 (m, 1 H, H₂); 2.70-2.57 (m, 2 H, CH₂ *sn*-1); 2.60-2.50 (m, 4 H, CH₂ α fatty chain + DMSO); 1.51-1.48 (m, 1 H, CH₂ β fatty chain); 1.32-1.28 (m, 2 H, CH₂ fatty chain); 1.23 (s, 24 H, CH₂ fatty chain); 0.87-0.83 (t, 3 H, J_{HH}= 7 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125.803): 103.9 (s, C_{1'}); 103.0-102.9 (C₁ diastereoisomers); 80.8 (C₄) 79.6-79.5 (CH *sn*-2, diastereoisomers); 75.5 (s, C_{5'}); 75.0 (s, C₃); 74.9 (s, C₅); 73.3 (s, C₂); 73.1 (s, C_{3'}); 70.6 (C_{2'}); 69.5-69.3 (CH₂ *sn*-3, diastereoisomers); 68.1 (C_{4'}); 60.5-60.4 (2s, C₆ + C_{6'}); 57.0-56.9 (OCH₃, diastereoisomers); 32.4-32.2 (CH₂ *sn*-1, diastereoisomers); 32.1 (CH₂ α fatty chain); 31.4 (s, CH₂ fatty chain); 29.3 (s, CH₂ fatty chain); 29.1 (s, CH₂ fatty chain); 28.8 (s, CH₂ fatty chain); 28.7 (s, CH₂ fatty chain); 28.3 (s, CH₂ fatty chain); 22.2 (s, CH₂ fatty chain); 14.0 (s, CH₃ fatty chain); Masse (MALDI-TOF; matrix dithranol 100 mg/mL): m/z calcd for C₂₈H₅₄O₁₂S [M+K]⁺: 653.297 , found: 653.412

1-S-hexadecyl-2-O-methyl-*rac*-thioglycer-3-yl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside (7b - Ohmline-4S)

MeONa in methanol (2.8 mL, 0.02 mmol, 0.5 eq.) is added to a solution of **6b** (40 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (5 mL). The mixture is stirred at room temperature during 15 hours. Amberlyst IR-120 (H⁺) is added and the mixture is stirred 30 minutes at room temperature. The reaction is warmed (reflux), quickly filtered and concentrated to give the crude compound **7b** (28 mg) in a quantitative yield. ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500.133): 5.12-5.10 (m, 2 H, 2 OH); 4.80 (brs, 1 H, OH); 4.68-65 (m, 2 H, 2 OH); 4.52-4.50 (m, 2 H, 2 OH); 4.22-4.20 (m, 2 H, H₁ + H_{1'}); 3.83-3.72 (m, 3 H, H_{6a} + CH₂ *sn*-3); 3.62-3.60 (m, 3 H, H₅ + H_{6b} + H_{4'}); 3.53-3.43 (m, 4 H, H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH *sn*-2); 3.36-3.27 (m, 7 H, H₃ + H₄ + H_{2'} + H_{3'} + OCH₃); 3.00-2.98 (m, 1 H, H₂); 2.70-2.64 (m, 1 H, H_a CH₂ *sn*-1); 2.60-2.50 (m, 3 H, CH₂ α fatty chain + H_b CH₂ *sn*-1); 1.52-1.47 (m, 2 H, β CH₂ fatty chain); 1.32-1.23 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.85 (t, 3 H, J_{HH}= 6.8 Hz, CH₃ fatty chain) ; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125.803): 103.9 (s, C_{1'}); 103.0-102.9 (C₁ diastereoisomers); 80.8 (C₄) 79.6-79.5 (CH *sn*-2, diastereoisomers); 75.5 (s, C_{5'}); 75.0 (s, C₃); 74.9 (s, C₅); 73.3 (s, C₂); 73.1 (s, C_{3'}); 70.6 (C_{2'}); 69.5-69.3 (CH₂ *sn*-3, diastereoisomers); 68.1 (C_{4'}); 60.5-60.4 (2s, C₆ + C_{6'}); 57.0-56.9 (OCH₃, diastereoisomers); 32.4-32.2 (CH₂ *sn*-1, diastereoisomers); 32.1 (CH₂ α fatty chain); 31.4 (s, CH₂ fatty chain); 29.3 (s, CH₂ fatty chain); 29.1 (s, CH₂ fatty chain); 28.8 (s, CH₂ fatty chain); 28.7 (s, CH₂ fatty chain); 28.3 (s, CH₂ fatty chain); 22.2 (s, CH₂ fatty chain); 14.0 (s, CH₃ fatty chain) ; Masse (MALDI-TOF; matrix dithranol 100 mg/mL): m/z calcd for C₃₂H₆₂O₁₂S [M+Na]⁺: 693.3854 , found 693.3804.

3-(hexadecylsulfanyl)-2-methoxypropan-1-ol (8)

To a stirred solution of **4b** (198 mg, 0.571 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) is added very slowly *m*-CPBA (77 %) (128 mg, 0.571 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) at 0°C. The mixture is stirred at 0°C and the reaction is followed by TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5). The mixture is quenched with a saturated aqueous solution of NaHSO₃ (10 mL). The aqueous layer is

extracted three times with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) and the combined organic layers are washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL) and brine (30 mL). The organic layer is dried on MgSO₄, filtered and concentrated to give **8** (193 mg; 93% yield) as a white solid. Rf (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5): 0.39; ¹H NMR (CDCl₃, 500.133): 3.80-3.70 (m, 2 H, CH *sn*-2 + H_a CH₂ *sn*-3); 3.40-3.35 (m, 1 H, H_b CH₂ *sn*-3); 3.40-3.35 (2 s, 3 H, OCH₃ two diastereoisomers); 2.98-2.61 (m, 4 H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ α fatty chain); 1.68 (qt, 2 H, J_{HH}= 7.0 Hz, CH₂ β fatty chain); 1.38-1.17 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.80 (t, 3 H, J_{HH}= 7.0 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.475): 76.1-75.8 (CH *sn*-2, two diastereoisomers); 62.3-62.0 (CH₂ *sn*-3, two diastereoisomers); 57.9-57.1 (OCH₃, two diastereoisomers); 55.7-52.6 (CH₂ *sn*-1, two diastereoisomers); 53.2 (CH₂ α fatty chain); 31.9 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 29.5 (CH₂ fatty chain); 29.3 (CH₂ fatty chain); 29.2 (CH₂ fatty chain); 28.8 (CH₂ fatty chain); 22.7 (CH₂ fatty chain); 14.1 (CH₃ fatty chain); masse (ESI, 100 mg/mL): m/z calcd for C₂₀H₄₂O₃S [M]: 362.29, found 363.35 [M+H]⁺, 385.35 [M+Na]⁺, 747.55 [2M+Na]⁺.

1-*S*-hexadecylsulfinyl-2-*O*-methyl-*rac*-thioglycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-*D*-glucopyranoside (9)

To a stirred solution of **6b** (150 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) is added very slowly *m*-CPBA (77 %) (34 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) at 0°C. The mixture is stirred at 0°C and the reaction is followed by TLC (petroleum ether/ethyl acetate: 3/7). The mixture is quenched with a saturated aqueous solution of NaHSO₃ (10 mL). The aqueous layer is extracted three times with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) and the combined organic layers are washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL) and brine (30 mL). The organic layer is dried upon MgSO₄, filtered and concentrated to give **9** (148 mg; 97 yield). Rf (petroleum spirit/ ethyl acetate: 7/3): 0.10 ; ¹H NMR (CDCl₃, 399.972): 5.34 (d, 1 H, J_{HH} = 3.2 Hz, H_{4'}); 5.19 (td, 1 H,

$J_{\text{HH}} = 9.8 \text{ Hz}$, $J_{\text{HH}} = 2.8 \text{ Hz}$, H_3); 5.10 (dd, 1 H, $J_{\text{HH}} = 10.4 \text{ Hz}$, $J_{\text{HH}} = 8.0 \text{ Hz}$, H_2); 4.96-4.90 (m, 2 H, $\text{H}_2 + \text{H}_3$); 4.53-4.46 (m, 3 H, $\text{H}_1 + \text{H}_{6a} + \text{H}_1$); 4.12-4.06 (m, 3 H, $\text{H}_{6b} + \text{H}_{6a} + \text{H}_{6b}$); 3.98-3.61 (m, 6 H, $\text{H}_4 + \text{H}_5 + \text{H}_5 + \text{CH}_2 \text{ sn-3} + \text{CH sn-2}$); 3.46-3.38 (4 s, 3 H, OCH_3 diastereoisomers); 2.98-2.61 (m, 4 H, $\text{CH}_2 \text{ sn-1} + \text{CH}_2 \alpha$ fatty chain); 2.14 (s, 3 H, CH_3 acetyl); 2.11 (s, 3 H, CH_3 acetyl); 2.05 (s, 3 H, CH_3 acetyl); 2.03 (s, 3 H, CH_3 acetyl); 2.02 (s, 6 H, 2 CH_3 acetyl); 1.95 (s, 3 H, CH_3 acetyl); 1.75-1.71 (m, 2 H, CH_2 fatty chain); 1.32-1.23 (m, 26 H, CH_2 fatty chain); 0.87 (t, 3 H, $J_{\text{HH}} = 6.8 \text{ Hz}$, CH_3 fatty chain) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.474): 170.3 (s, $\text{C}=\text{O}$); 170.1 (s, $\text{C}=\text{O}$); 170.0 (s, $\text{C}=\text{O}$); 169.7 (s, $\text{C}=\text{O}$); 169.0 (s, $\text{C}=\text{O}$); 101.1 (s, C_1); 101.0-100.6 (C_1 diastereoisomers); 76.1 (s, C_4); 74.0 (m, CH sn-2); 72.8 (s, C_3); 72.6 (s, C_5); 71.6 (s, C_2); 71.0 (C_3); 70.7 (C_5); 70.3 (m, $\text{CH}_2 \text{ sn-3}$); 69.1 (s, C_2); 66.6 (s, C_4); 61.8 (s, C_6) ; 60.8 (s, C_6); 58.5 (m, OCH_3 , diastereoisomers); 55.9 (m, $\text{CH}_2 \text{ sn-1}$, diastereoisomers); 52.8 (m, $\text{CH}_2 \alpha$ fatty chain); 31.9 (s, CH_2 fatty chain); 29.7 (s, CH_2 fatty chain); 29.5 (s, CH_2 fatty chain); 29.4 (s, CH_2 fatty chain); 29.2 (s, CH_2 fatty chain); 28.8 (s, CH_2 fatty chain); 22.7 (s, CH_2 fatty chain); 20.9 (s, OCH_3); 20.8 (s, OCH_3); 20.6 (s, OCH_3); 20.5 (s, OCH_3); 14.1 (s, CH_3 fatty chain); masse (ESI, 100 mg/mL): m/z calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_{20}\text{S}$ [M]: 980.47, found 981.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-S-hexadecylsulfinyl-2-O-methyl-rac-thioglycer-3-yl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside (10 - Ohmlin-4-SO)

K_2CO_3 (2.8 mg, 0.02 mmol, 0.5 eq.) is added to a solution of **9** (40 mg, 0.04 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (10 mL). The mixture is stirred at room temperature overnight. Amberlyst IR-120 (H^+) is added and the mixture is stirred 30 minutes at room temperature. The reaction is warmed to reflux, quickly filtered and concentrated to give **10** in a quantitative yield (28 mg); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 500.133): 5.20-5.13 (m, 1 H, OH); 5.07 (brs, 1 H, OH); 4.76 (brs, 1 H, OH); 4.66-4.62 (m, 2 H, 2 OH); 4.57-4.49 (m, 2 H, 2 OH); 4.25-4.18 (m, 2 H, $\text{H}_1 + \text{H}_1$); 3.94-3.25 (m, 17 H,

H₃ + H₄ + H₅ + H_{6a} + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-3 + OCH₃); 3.09-3.02 (m, 1 H, H₂); 3.09-2.80 (m, 2 H, CH₂ *sn*-1); 2.77-2.49 (m, 2 H, CH₂ α fatty chain); 1.65-1.60 (m, 2 H, CH₂ β fatty chain); 1.39-1.32 (m, 2 H, CH₂ fatty chain); 1.32-1.20 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.86 (t, 3 H, J_{HH}= 6.8 Hz, CH₃ fatty chain) ; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125.771): 103.8 (s, C_{1'}); 103.0-102.8 (C₁ diastereoisomers); 80.7-80.6 (C₄ diastereoisomers); 75.5 (s, C_{5'}); 74.9 (brs, C₃ + C₅); 74.7-73.7 (m, CH *sn*-2 diastereoisomers); 73.2 (s, C₂); 73.1 (s, C_{3'}); 70.5 (C_{2'}); 69.6-69.2 (CH₂ *sn*-3, diastereoisomers); 68.1 (C_{4'}); 60.5-60.4 (2s, C₆ + C_{6'}); 57.3-56.6 (m, OCH₃ diastereoisomers); 54.5-51.8 (m, CH₂ *sn*-1 diastereoisomers); 52.5-51.3 (m, CH₂ α fatty chain diastereoisomers); 31.3 (s, CH₂ fatty chain); 29.0 (s, CH₂ fatty chain); 28.8 (s, CH₂ fatty chain); 28.7 (s, CH₂ fatty chain); 28.1 (s, CH₂ fatty chain); 22.1 (s, CH₂ fatty chain); 13.9 (s, CH₃ fatty chain)); masse (ESI, 100 mg/mL): m/z calcd for C₃₂H₆₂O₁₃S [M]: 686.39, found 687.35 [M+H]⁺, 709.35 [M+Na]⁺.

3-(hexadecylsulfonyl)-2-methoxypropan-1-ol (11)

To a stirred solution of **4b** (200 mg, 0.577 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) is added *m*-CPBA (500 mg, 2.885 mmol, 5.0 eq.) dissolved in few mL of dry CH₂Cl₂ at 0°C. The mixture is stirred at room temperature 4 hours. The mixture is quenched with a saturated aqueous solution of NaHSO₃ (10 mL). The aqueous layer is extracted three times with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) and the combined organic layers are washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer is dried with MgSO₄, filtered and concentrated to give **11** (209 mg; 98% yield). R_f (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5): 0.66 ; ¹H NMR (CDCl₃, 399.992): 3.85-3.82 (m, 2 H, CH *sn*-2 + H_a CH₂ *sn*-3); 3.63-3.59 (m, 1 H, H_b CH₂ *sn*-3); 3.43 (s, 3 H, OCH₃); 3.37 (dd, 1 H, J_{HH} = 14.8 Hz, J_{HH} = 8.0 Hz, H_a CH₂ *sn*-1); 3.10-3.00 (m, 3 H, H_b CH₂ *sn*-1 + CH₂ α fatty chain); 1.82 (qt, 2 H, J_{HH}= 6.6 Hz, CH₂ β fatty chain); 1.41 (qt, 2 H, J_{HH}= 6.8 Hz, CH₂ fatty chain); 1.36-

1.23 (m, 24 H, CH₂ fatty chain); 0.87 (t, 3 H, J_{HH} = 6.6 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.475): 76.4 (CH *sn*-2); 62.0 (CH₂ *sn*-3); 57.6 (OCH₃); 55.0 (CH₂ *sn*-1); 54.6 (CH₂ α fatty chain); 32.0 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 29.6 (CH₂ fatty chain); 29.4 (CH₂ fatty chain); 29.3 (CH₂ fatty chain); 29.1 (CH₂ fatty chain); 28.5 (CH₂ fatty chain); 22.7 (CH₂ fatty chain); 21.9 (CH₂ fatty chain); 14.2 (CH₃ fatty chain) ; masse (ESI, 100 mg/mL): m/z calcd for C₂₀H₄₂O₄S [M]: 378.28, found 401.35 [M+Na]⁺, 442.40 [M+Na+CH₃CN]⁺, 779.55 [2M+Na]⁺.

1-S-hexadecylsulfonyl-2-O-methyl-*rac*-thioglycer-3-yl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (12)

A solution of lactose trichloroacetimidate **5**⁵⁴ (202 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.) and **11** (100 mg, 0.26 mmol, 1.02 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) is stirred with molecular sieves 4 Å during one hour under inert atmosphere. At 0°C BF₃.Et₂O (13 μL, 0.10 mmol, 0.4 eq.) is added dropwise and the mixture is stirred 17 hours at room temperature under inert atmosphere. The mixture is quenched by addition of water (3 mL). The organic layer is washed twice with aqueous saturated NaHCO₃ solution (2 x 3 mL) and an aqueous saturated NaCl solution (3 mL). The organic layer is dried with MgSO₄, filtered and concentrated. The crude compound is purified on chromatography on silica gel (Eluent: petroleum spirit/ethyl acetate: 1/1) to give **12** (140 mg; 54% yield) as a colorless oil. R_f (petroleum spirit/ethyl acetate: 1/1): 0.35 ; ¹H NMR (CDCl₃, 399.972): 5.34 (d, 1 H, J_{HH} = 3.2 Hz, H_{4'}); 5.19 (t, 1 H, J_{HH} = 9.8 Hz, H₃); 5.12 (dd, 1 H, J_{HH} = 9.8 Hz, J_{HH} = 8.0 Hz, H_{2'}); 4.96-4.87 (m, 2 H, H₂ + H_{3'}); 4.52-4.47 (m, 3 H, H₁ + H_{6a} + H_{1'}); 4.12-4.06 (m, 3 H, H_{6b} + H_{6'a} + H_{6'b}); 3.93-3.87 (m, 3 H, H_{5'} + CH *sn*-2 + H_a CH₂ *sn*-3); 3.78 (t, 1 H, J_{HH} = 9.8 Hz, H₄); 3.70-3.59 (m, 2 H, H₅ + H_b CH₂ *sn*-3); 3.41-3.40 (2 s, 3 H, OCH₃ two diastereoisomers); 3.28-3.12 (m, 1 H, H_a CH₂ *sn*-1); 3.10-2.90 (m, 3 H, H_b CH₂ *sn*-1 + CH₂ α fatty chain); 2.16 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.14 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.12 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.05 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.03

(s, 6 H, 2 CH_3 acetyl); 1.95 (s, 3 H, CH_3 acetyl); 1.83-1.80 (m, 2 H, CH_2 fatty chain); 1.42-1.24 (m, 26 H, CH_2 fatty chain); 0.87 (t, 3 H, J_{HH} = 6.6 Hz, CH_3 fatty chain); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.474): 170.3 (s, $C=O$); 170.1 (s, $C=O$); 170.0 (s, $C=O$); 169.7 (s, $C=O$); 169.6 (s, $C=O$); 169.1 (s, $C=O$); 101.1 (s, $C_{1'}$); 100.8-100.4 (C_1 two diastereoisomers); 76.1 (s, C_4); 75.2-74.9 (CH *sn*-2, two diastereoisomers); 72.8 (s, C_3); 72.6 (s, C_5); 71.5 (s, C_2); 71.0 ($C_{3'}$); 70.7 ($C_{5'}$); 69.1 (s, $C_{2'}$); 68.5 (CH_2 *sn*-3); 66.6 (s, $C_{4'}$); 61.8 (s, C_6) ; 60.8 (s, $C_{6'}$); 58.0-57.7 (OCH_3 , two diastereoisomers); 55.0 (CH_2 *sn*-1, two diastereoisomers); 54.8 (CH_2 α fatty chain); 31.9 (s, CH_2 fatty chain); 29.7 (s, CH_2 fatty chain); 29.1 (s, CH_2 fatty chain); 28.5 (s, CH_2 fatty chain); 22.7 (s, CH_2 fatty chain); 21.8 (s, CH_2 fatty chain); 20.8 (s, OCH_3); 20.6 (s, OCH_3); 20.5 (s, OCH_3); 14.1 (s, CH_3 fatty chain) ; Masse (MALDI-TOF; matrix dithranol 100 mg/mL): m/z calcd for $C_{46}H_{76}O_{21}S [M+Na]^+$: 1019.4492 , found 1019.4607.

1-S-hexadecylsulfonyl-2-O-methyl-*rac*-thioglycer-3-yl- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside (13 - Ohmlin- 4-SO₂)

NaOMe (solution 0.5 M in MeOH, 48 μ L, 1.3 mg, 0.03 mmol, 0.3 eq.) is added to a solution of **12** (80 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (10 mL). The mixture is stirred at room temperature during 5 hours. Amberlyst IR-120 (H^+) is added and the mixture is stirred 30 minutes at room temperature. The reaction is warmed to reflux, quickly filtered and concentrated to give the compound **13** (53 mg) in a quantitative yield. 1H NMR ($DMSO-d_6$, 399.972): 5.28-5.12 (m, 2 H, 2 OH); 4.85 (brs, 1 H, OH); 4.71-65 (m, 2 H, 2 OH); 4.60-4.52 (m, 2 H, 2 OH); 4.25-4.18 (m, 2 H, $H_1 + H_{1'}$); 3.89-3.74 (m, 3 H, $H_{6a} + CH$ *sn*-2 + H_a CH_2 *sn*-3); 3.61-3.30 (m, 16 H, $H_3 + H_4 + H_5 + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + H_b$ CH_2 *sn*-3 + $OCH_3 + CH_2$ *sn*-1); 3.08-3.02 (m, 3 H, $H_2 + CH_2$ α fatty chain); 1.68 (qt, 2 H, J_{HH} = 7.6 Hz, CH_2 β fatty chain); 1.36-1.23 (m, 26 H, CH_2 fatty chain); 0.85 (t, 3 H, J_{HH} = 6.8 Hz, CH_3 fatty chain) ; ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 125.803):

103.9 (s, C₁); 103.0-102.8 (C₁ two diastereoisomers); 80.7 (C₄) 75.5 (CH *sn*-2); 75.0 (brs, C₅ + C₃ + C₅); 73.2 (s, C₂); 73.1 (s, C₃); 70.6 (C₂); 68.9-68.4 CH₂ *sn*-3, two diastereoisomers); 68.1 (C₄); 60.5-60.4 (2s, C₆ + C₆); 57.1 (OCH₃); 54.1 (CH₂ *sn*-1); 53.7 (CH₂ α fatty chain); 31.3 (s, CH₂ fatty chain); 29.0 (s, CH₂ fatty chain); 28.7 (s, CH₂ fatty chain); 28.5 (s, CH₂ fatty chain); 27.7 (s, CH₂ fatty chain); 22.1 (s, CH₂ fatty chain); 21.1 (s, CH₂ fatty chain); 14.0 (s, CH₃ fatty chain) ; masse (ESI, 100 mg/mL): m/z calcd for C₃₂H₆₂O₁₄S [M]: 702.38, found 725.35 [M+Na]⁺, 741.30 [M+K]⁺.

2-methoxy-but-3-en-1-ol (14a)

To a stirred solution of butadiene oxide (575 μL, 7.13 mmol, 1.0 eq.) in methanol (7 mL) is added Al(OTf)₃ (3.4 mg, 0.007 mmol, 0.001 eq.) in methanol (3 mL) dropwise. The mixture is stirred at 100°C during 1 hour (oil bath temperature). The solvent is removed carefully under vacuum (T = 25 °C, P = 160 mbar) to obtain quantitatively the compound **14a** as a colorless liquid (728 mg). Rf (petroleum spirit/ethyl acetate: 1/1): 0.65 ; ¹H NMR (CDCl₃, 399.972): 5.65-5.57 (m, 1 H, H₃); 5.28-5.22 (m, 2 H, CH₂ H₄); 3.67-3.63 (m, 1 H, H₂); 4.51-3.45 (m, 2 H, CH₂ H₁); 3.28 (s, 3 H, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5): 134.9 (CH alcene); 119.4 (CH₂ alcene); 83.5 (CH); 65.3 (CH₂); 56.6 (OCH₃); Masse (MALDI-TOF; matrix DCTB 10 mg/mL): m/z calcd for C₅H₁₀O₂ [M]: 102,0675, found 102.0659.

2-ethoxy-but-3-en-1-ol (14b)

To a stirred solution of butadiene oxide (575 μL, 7.13 mmol, 1.0 eq.) in ethanol (7mL) id added Al(OTf)₃ (3.4 mg, 0.007 mmol, 0.001 eq.) in ethanol (3 mL) dropwise. The mixture is stirred at 100°C during 1 hour (heater block insert). The solvent is removed carefully under vacuum (T = 25°C, P = 6 mbar) to obtain the compound **14b** (1.44g; 87% yield) as a colorless liquid. Rf (petroleum spirit/ethyl acetate: 1/1): 0.67; ¹H NMR (CDCl₃, 399.920): 5.73-5.65 (m,

1H, H₃); 5.34-5.25 (m, 2H, CH₂ H₄); 3.85-3.81 (m, 1 H, H₂); 3.69-3.49 (m, 3 H, CH₂ H₁ + CH₂OEt); 3.43-3.38 (m, 1 H, CH₂ H₁); 1.22-1.19 (t, 3H, J_{HH} = 7.2 Hz CH₃OEt); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5):): 135.3 (CH alcene); 117.8 (CH₂ alcene); 81.4 (CH); 64.9 (CH₂OEt); 63.8 (CH₂); 14.8 (CH₃OEt);

4-(hexadecylthio)-2-methoxybutan-1-ol (15a)

Compound **14a** (200 mg, 1.96 mmol, 1.0 eq.) and 1-hexadecanethiol (1.81 mL, 5.87 mmol, 3.0 eq.) are mixed under argon. DMPA (20 mg, 10 % wt) is added and the solution is placed under UV 24 hours at room temperature. The product is purified by chromatography on silica gel (eluent: petroleum spirit/ethyl acetate: 8/2) to give the pure **15a** with 32 % yield (218 mg). R_f (petroleum spirit/ethyl acetate: 8/2): 0.50; ¹H NMR (CDCl₃, 399.992): 3.73 (ABX, part A, dd, 1 H, J_{HH}= 11.6 Hz, J_{HH}= 3.6 Hz, H_a CH₂ H_A); 3.51 (ABX, part B, dd, 1 H, J_{HH}= 11.6 Hz, J_{HH}= 5.2 Hz, H_b CH₂ H_A); 3.40 (s, 4 H, H_B + OCH₃); 2.57 (t, 2 H, J_{HH}= 7.0 Hz, CH₂ α fatty chain); 2.51 (t, 2 H, J_{HH}= 7.2 Hz, CH₂ H_D); 1.88 (h, 1 H, J_{HH} = 6.8 Hz, H_a CH₂ H_C); 1.77 (h, 1 H, J_{HH} = 6.8 Hz, H_b CH₂ H_C); 1.59 (qt, 2 H, J_{HH} = 7.4 Hz, CH₂ β fatty chain); 1.35-1.119 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.88 (t, 3 H, J_{HH} = 6.6 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474): 80.2 (C_B); 63.4 (C_A); 57.3 (OCH₃); 32.2 (CH₂ α fatty chain); 31.9 (CH₂ fatty chain); 30.6 (C_C); 29.7; 29.5; 29.3; 29.2; 28.9; 27.9 (C_D + CH₂ fatty chain); 22.7 (CH₂ fatty chain); 14.1 (CH₃ fatty chain); masse (ESI, 100 mg/mL): m/z calcd for C₂₁H₄₄O₂S [M]: 360.31, found 399.35 [M+K]⁺.

4-(hexadecylthio)-2-ethoxybutan-1-ol (15b)

Compound **14b** (400 mg, 3.44 mmol, 1.0 eq.) and 1-hexadecanethiol (3.2 mL, 10.3 mmol, 3.0 eq.) are mixed under nitrogen. DMPA (20 mg, 10 % wt) is added and the solution is placed under UV 24 hours at room temperature. The product is purified by chromatography on silica gel (eluent: pentane/ethyl acetate: 8/2) to give **15b** (460 mg; 36% yield) as a colorless liquid. R_f

(pentane/ethyl acetate: 8/2): 0.41; ¹H NMR (CDCl₃, 399.922): 3.67-3.62 (m, 1H, CH_a sn3); 3.57-3.52 (m, 2H, CH₂ -OEt); 3.48-3.43 (m, 2 H, CH_b sn3 + CH sn2); 2.55 (t, 2 H, J_{HH}= 7.2 Hz, CH₂ α S); 2.48 (t, 2 H, J_{HH}= 7.2 Hz, CH₂ α S fatty chain); 2.38 (s, 1H, OH); 1.83-1.78 (m, 1H, CH_a sn1); 1.73-1.69 (m, 1H, CH_b sn1); 1.55-1.49 (m, 2H, CH₂ βS fatty chain); 1.34-1.31 (m, 2H; CH₂ γS fatty chain), 1.21 (s, 23H, CH₂ fatty chain); 1.17 (t, 3H, CH₃ -OEt); 0.84 (t, 3H, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474): 78.5 (CH sn2); 65.3 (CH₂ -OEt); 63.97 (CH₂ sn3); 32.3; 32.0; 31.2; 29.8; 29.6; 29.5; 29.4; 29.0; 28.1 (CH₂ αS + CH₂ fatty chain); 22.8 (CH₂ sn1) 15.7 (CH₃ -OEt); 14.2 (CH₃ fatty chain); masse (Maldi TOF/TOF, Matrix HCCA): m/z calcd for C₂₂H₄₆O₂S [M]: 374.32, found 397.62 [M+Na]⁺.

1-O-[4-(hexadecylthio)-2-methoxybutyl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (16a)

A solution of lactose trichloroacetimidate **5**⁵⁴ (425 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.) and **15a** (200 mg, 0.55 mmol, 1.02 eq.) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) is stirred with molecular sieves 4 Å during one hour under inert atmosphere. At 0°C BF₃.Et₂O (27 μL, 0.216 mmol, 0.4 eq.) is added dropwise and the mixture is stirred 15 hours at room temperature under inert atmosphere. The mixture is quenched by addition of water (3 mL). The organic layer is washed twice with aqueous saturated NaHCO₃ solution (2 x 3 mL) and an aqueous saturated NaCl solution (3 mL). The organic layer is dried on MgSO₄, filtered and concentrated to give **16a** which was purified by chromatography on silica gel (Eluent: petroleum spirit/ethyl acetate: 8/2 to 6/4) to give **16a** (180 mg) in 35 % yield. R_f (petroleum spirit/ethyl acetate: 6/4): 0.65 ; ¹H NMR (CDCl₃, 399.992): 5.34 (d, 1 H, J_{HH} = 2.8 Hz, H_{4'}); 5.19 (t, 1 H, J_{HH} = 9.4 Hz, H₃); 5.11 (dd, 1 H, J_{HH} = 10.2 Hz, J_{HH} = 7.8 Hz, H_{2'}); 4.95-4.87 (m, 2 H, H₂ + H_{3'}); 4.52-4.45 (m, 3 H, H₁ + H_{6a} + H_{1'}); 4.11-4.03 (m, 3 H, H_{6b} + H_{6'a} + H_{6'b}); 3.87-3.80 (m, 2 H, H_{5'} + H_a CH₂ H_A); 3.80 (t, 1 H, J_{HH} = 9.4 Hz, H₄); 3.59-3.56 (m,

1 H, H₅); 3.53-3.39 (m, 2 H, CH H_C + H_b CH₂ H_A); 3.36-3.35 (2 s, 3 H, OCH₃ diastereoisomers); 2.55-2.52 (m, 2 H, CH₂ H_D); 2.48 (t, 2 H, J_{HH} = 7.4 Hz, CH₂ α fatty chain); 2.13 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.10 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.04 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 2.02 (s, 9 H, 3 CH₃ acetyl); 1.94 (s, 3 H, CH₃ acetyl); 1.72-1.70 (m, 2 H, CH₂ H_C); 1.56 (qt, 2 H, J_{HH} = 7.4 Hz, CH₂ β fatty chain); 1.34-1.19 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.87 (t, 3 H, J_{HH} = 6.8 Hz, CH₃ fatty chain) ; ¹³C NMR (CDCl₃, 75.474): 170.4 (s, C=O); 170.2 (s, C=O); 170.1 (s, C=O); 169.9 (s, C=O); 169.7 (s, C=O); 169.2 (s, C=O); 101.2 (s, C_{1'}); 100.8 (s, C₁); 78.6-78.4 (C_B); 76.4 (s, C₄); 72.8 (s, C₃); 72.7 (s, C₅); 71.7 (s, C₂); 71.1 (C_{3'}); 70.8 (C_{5'}); 72.2-70.3 (C_A); 69.2 (s, C_{2'}); 66.7 (s, C_{4'}); 62.1 (s, C₆) ; 60.9 (s, C_{6'}); 58.3-57.7 (m, OCH₃, diastereoisomers); 32.3 (m, CH₂ α fatty chain); 32.0 (s, CH₂ fatty chain); 31.6 (s, C_C); 29.8; 29.5; 29.4; 29.0; 27.9 (C_D + CH₂ fatty chain); 22.8 (s, CH₂ fatty chain); 21.0 (s, OCH₃); 20.9 (s, OCH₃); 20.7 (s, OCH₃); 20.6 (s, OCH₃); 14.2 (s, CH₃ fatty chain) ; Masse (MALDI-TOF; matrix dithranol 100 mg/mL): m/z calcd for C₄₇H₇₈O₁₉S [M+Na]⁺: 1001.4750 , found 1001.4678.

1-O-[4-(hexadecylthio)-2-ethoxybutyl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (16b)

A solution of lactose trichloroacetimidate **5**⁵⁴ (1.44 g, 1.84 mmol, 1.5 eq.) and **15b** (460 mg, 1.23 mmol, 1.0 eq.) in dry CH₂Cl₂ (15 mL) is stirred with molecular sieves 4 Å for one hour under inert atmosphere. At 0°C BF₃·Et₂O (160 μL, 0.98 mmol, 0.8 eq.) is added dropwise and the mixture is stirred 15 hours at room temperature under inert atmosphere. The mixture is quenched by addition of water (5 mL). The organic layer is washed twice with aqueous saturated NaHCO₃ solution (2 x 10 mL) and an aqueous saturated NaCl solution (10 mL). The organic layer is dried on MgSO₄, filtered and concentrated to give **16b** which was purified by chromatography on silica gel (Eluent: pentane/ethyl acetate: 7/3) to give **16b** (500 mg; 41 %

yield). Rf (pentane/ethyl acetate: 7/3): 0.4; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.133): 5.2 (d, 1 H, $^3J_{\text{HH}} = 3.0$, H_4); 5.07 (t, 1 H, $J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, H_3); 4.97 – 4.94 (dd, 1 H, $J_{\text{HH}} = 10.5$ Hz, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, H_2); 4.85-4.82 (m, 1 H, H_3); 4.78 - 4.73 (q, 1H, $J_{\text{HH}} = 9.50$ Hz, $J_{\text{HH}} = 18$ Hz, H_2); 4.43-4.34 (m, 3 H, $\text{H}_1 + \text{H}_{6a} + \text{H}_{1'}$); 4.01-3.94 (m, 3 H, $\text{H}_{6a'}$ + $\text{H}_{6b'}$ + H_{6b}); 3.80 (t, 1 H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, $\text{H}_{5'}$); 3.68 (t, 2H, $J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, $\text{H}_4 + \text{H}_{A1}$); 3.50 - 3.30 (m, 5H, $\text{H}_5 + \text{H}_B + \text{H}_{A2} + \text{CH}_2$ -OEt diastereoisomers); 2.45 – 2.33 (m, 4 H, $\text{H}_D + \text{CH}_2$ fatty chain); 2.03 - 1.81 (m, 25 H, CH_3 acetyl); 1.61 – 1.54 (m, 2 H, CH_2 H_C); 1.42 (qt, 2 H, $J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, CH_2 β fatty chain); 1.23 (m, 2H, CH_2 γ fatty chain); 1.11 (s, 26 H, CH_2 fatty chain); 1.0 (t, 3H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH_3 -OEt); 0.74 (t, 3 H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH_3 fatty chain) ; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.771): 169.94(s, C=O); 169.92 (s, C=O); 169.8 (s, C=O); 169.6 (s, C=O); 169.4 (s, C=O); 169.2 (s, C=O); 169.0 (s, C=O); 168.7 (s, C=O); 100.7 (s, C_1); 100.33 + 100.28 (s, $\text{C}_{1\alpha} + \beta$); 76.4 -76.1 (C_B); 75.9 (s, C_4); 72.6 (s, C_3); 72.3 (s, C_5); 72.1 (C_{A1}); 71.3 (s, C_2); 70.7 (C_3'); 70.4 (C_{A2}) 70.3 (C_5'); 68.8 (s, C_2'); 66.4 (s, C_4'); 65.6 – 65.0 (OCH₂ diastereoisomers); 61.7 (s, C_6') ; 61.0 (s, C_6); 31.7 - 31.5 (m, CH_2 α fatty chain + C_c); 30.0 (s, CH_2 fatty chain); 29.3, 29.2, 29.0, 28.6, 27.5, 26.5 ($\text{C}_D + \text{CH}_2$ fatty chain); 22.3 (s, CH_2 fatty chain); 20.6 – 20.1 (m, OCH₃); 15.3 (s, OEt); 13.8 (CH_3 fatty chain). Masse (Maldi TOF/TOF, Matrix HCCA): m/z calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{19}\text{S}$ [M]: 992.501, found 1031.567 [M+K]⁺.

1-O-[4-(hexadecylthio)-2-methoxybutyl]- β -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside (17a - Ohmline-5S)

NaOMe (solution 0.5 M in MeOH, 33 μL , 0.90 mg, 0.017 mmol, 0.1 eq.) is added to a solution of **16a** (163 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.) in methanol (10 mL). The mixture is stirred at room temperature for one hour. Amberlyst IR-120 (H^+) is added and the mixture is stirred 30 minutes at room temperature. The reaction is warmed to reflux, quickly filtered and concentrated to give **17a** (99 mg; 87 % yield). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300.131): 5.12-5.09 (m, 2 H, 2 OH); 4.77 (brs, 1

H, OH); 4.67-64 (m, 2 H, 2 OH); 4.54-4.50 (m, 2 H, 2 OH); 4.22-4.19 (m, 2 H, H₁ + H_{1'}); 3.78-3.75 (m, 2 H, H_{6a} + H_a CH₂ H_A); 3.61-3.29 (m, 15 H, H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + H_b CH₂ H_A + CH H_B + OCH₃); 3.02-3.00 (m, 1 H, H₂); 2.54-2.44 (m, 4 H, CH₂ H_D + CH₂ α fatty chain); 1.72-1.62 (m, 2 H, CH₂ H_C); 1.52 (qt, 2 H, J_{HH} = 6.6 Hz, CH₂ β fatty chain); 1.36-1.23 (m, 26 H, CH₂ fatty chain); 0.87 (t, 3 H, J_{HH} = 6.8 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.474): 103.9 (s, C_{1'}); 102.9-102.7 (C₁ diastereoisomers); 80.8 (C₄); 78.0 (C_B); 75.5 (s, C_{5'}); 75.0 (s, C₃); 74.9 (s, C₅); 73.2 (s, C₂); 73.1 (s, C_{3'}); 70.5 (C_{2'}); 70.2-69.8 (C_A, diastereoisomers); 68.1 (C_{4'}); 60.6-60.4 (2s, C₆ + C_{6'}); 57.0-56.8 (OCH₃, diastereoisomers); 31.3 (CH₂ α fatty chain); 32.1 (C_C); 29.0; 28.7; 28.6; 28.2; 27.1 (C_D + CH₂ fatty chain); 22.1 (s, CH₂ fatty chain); 13.9 (s, CH₃ fatty chain). Masse (ESI, 100 mg/mL): m/z calcd for C₃₄H₆₄O₁₂S [M]: 684.41, found 707.40 [M+Na]⁺, 723.35 [M+K]⁺.

1-O-[4-(hexadecylthio)-2-ethoxybutyl]-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-β-D-glucopyranoside
(**17b** - Ohmline-2-OEt-5S)

Potassium Carbonate (0.021 mg, 0.15 mmol, 0.5 eq.) is added to a solution of **16b** (300 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.) in methanol (20 mL). The mixture is stirred at room temperature for 6 hours. Amberlyst IR-120 (H⁺) is added and the mixture is stirred 30 minutes at room temperature. The reaction is warmed to reflux, quickly filtered and concentrated to give the compound **17a** (211 mg; 99 % yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500.251): 5.2-8 (m, 2 H, 2 OH); 4.8-4.3 (m, 4 H, OH); 4.67-64 (m, 2 H, 2 OH); 4.22-4.19 (m, 2 H, H₁ + H_{1'}); 3.76-3.71 (m, 2 H, H_{6a} + CH₂ H_A); 3.61-3.41 (m, 15H, H₃ + H₄ + H₅ + H_{6b} + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'a} + H_{6'b} + H_b CH₂ H_A + CH H_B + CH₂ -OEt); 3.0-2.98 (m, 1 H, H₂); 2.51-2.44 (m, 4 H, CH₂ H_D + CH₂ α fatty chain); 1.60 (m, 1H, CH_{C1}); 1.49 (m, 1H, CH_{C2}); 1.52 (m, 1 H, CH₂ β fatty chain); 1.33-1.22 (m, 25 H, CH₂ fatty chain); 1.1 – 1.06 (m, 2H, CH₂ -OEt); 0.87 (t, 3 H, J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃ fatty chain); ¹³C NMR

(DMSO-*d*₆, 125.804): 103.8 (s, C_{1'}); 102.8 + 102.7 (C₁ diastereoisomers); 80.8 (C₄); 76.2 (C_B); 75.5 (s, C_{5'}); 75.0 (s, C₃); 74.8 (s, C₅); 73.2 (s, C₂); 73.1 (s, C_{3'}); 70.7 (C_{A1} diastereoisomers); 70.5 (C_{2'}); 70.3 (C_{A2}, diastereoisomers); 68.1 (C_{4'}); 64.4 + 64.3 (2s, CH₂ –OEt diastereoisomers); 60.5 - 60.3 (2s, C₆ + C_{6'}); 31.7 (CH₂ α fatty chain); 32.1 (C_C); 40.0; 28.9; 28.8; 28.7; 28.6; 28.1; 27.1 (C_D + CH₂ fatty chain); 22.1 (s, CH₂ fatty chain); 15.5 (s, CH₃ –OEt diastereoisomers); 13.9 (s, CH₃ fatty chain). Masse (Maldi TOF/TOF, Matrix HCCA): m/z calcd for C₃₄H₆₆O₁₂S [M]:698.427, found 737.667 [M+K]⁺.

Cell culture

HEK293T were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% (v:v) fetal bovine serum (Lonza, France). Cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C and with 95% air and 5% CO₂. HEK293T cells were transduced as previously described to obtain stable expression of homotetramer SK3 channels.^{16,24}

Human cancer cell lines MDA-MB-435s, HCT116 and PC3 were purchased at the American Type Culture Collection and grown respectively in Alpha Dulbecco's Modified Eagles Medium (USA, Manassas, Virginia), McCoy's 5A medium and RPMI medium containing 10% of Foetal Bovine Serum (Hyclone, Lonza, Levallois-Perret, France) at 37°C, 5% of CO₂ and at moisture saturation as already described.^{17,18,52}

Electrophysiological recordings

Experiments were performed in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. The patch pipettes were filled with solution contained 145 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM Mg-ATP, 0.7 mM CaCl₂, 1 mM EGTA and 10 mM HEPES (PCa 6). pH was adjusted to 7.2 with KOH. The bath solution contained 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10

mM HEPES, 0.33 mM NaH₂PO₄, and 11.5 mM D-glucose. pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Patch-clamp experiments and data analyses were conducted as previously described²⁴ The effects of compounds on HEK293T cells expressing SK3 were measured using a ramp protocol from +100 mV to -100 mV with a holding potential of 0 mV (500 ms duration; 4 sec intervals) to inactive endogenous potassium currents. The amplitude of the apamin-sensitive current was obtained by subtraction of the amplitude of the current before and after application of 100 nmol/L apamin (a specific SKCa blocker).

In Vitro Cell Viability and Cell Migration assay

Cell viability was determined using the tetrazolium salt reduction method (MTT) and cell migration assay was performed in 24-well plates cell culture inserts with a pore size of 8- μ m as previously described.⁵⁵ HCT116 and PC3 cell migration was performed as already described^{18,52}. Briefly, after 24 h, stationary cells were removed from the top side, whereas migrated cells in the bottom side of the inserts were fixed with DAPI (Sigma-Aldrich) and then counted. Three independent experiments were performed and these were done in triplicate.

Ca²⁺ entry measurements

Time-lapse [Ca²⁺] cytosolic measurements were performed using the FlexStation III fluorometer (Molecular Devices). HCT116 and PC3 cells were seeded on 96-well flat clear-bottom black microplates (#3603, Corning) at a density of 3 10⁴ cells/well. HCT116 and PC3 cells were grown on fibronectin-coated microplates. One day after seeding, HCT116 and PC3 cells were incubated with 4 mmol/L Fura-2/AM in culture medium for 35 minutes at 37°C protected from light. Afterward, the cells were gently washed three times with HEPES buffered saline (140 mmol/L NaCl, 1.13 mmol/L MgCl₂, 4.7 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L D-glucose, and 10 mmol/L HEPES, pH 7.4) and left for 5 minutes at room temperature and

protected from light. Data acquisition was performed using SoftMax pro software. Fura-2-loaded cells were alternately illuminated with 340 and 380 nm. Fluorescence emission was collected at 510 nm. Figures showing Ca^{2+} traces show averages from several well per condition and are representative of several independent recordings.

Vasorelaxation experiments

Animals

Male Wistar rats (350 - 450 g) were purchased from CER Janvier (Le Genest, st Isle, France). All experiments involving animals were approved by the institutional ethical committee (Comité d'éthique en expérimentation animal Val de Loire, Tours, France, Permit number: 2016090711251954) and carried out in accordance with European guidelines on animal experimentation and the French "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation"

Preparation of isolated mesenteric arteries

Rats were anaesthetised with a bolus injection of sodium pentobarbital (60 mg kg⁻¹, i.p.). After intravenous injection of heparin (500 IU/kg) the mesenteric bed irrigating the ileum was removed and immediately placed in a Krebs-Henseleit solution contained 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 1.17 mM MgSO_4 , 1.36 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 and 5.5 mM glucose. After dissection of surrounding tissue, the second-order mesenteric resistance arteries were cut into 1.5 - 2 mm ring segments and were individually mounted in a Mulvany-Halpern myograph (Multi Myograph system-610, DMT, Aarhus, Denmark). The 9-ml organ chamber were filled with Krebs' solution continuously bubbled with 95 % O_2 / 5 % CO_2 and maintained at 37 °C.

Experiment protocols

Experiment were started after an equilibration period of at least 30 minutes. The mesenteric arteries were stretched to a tension of 3 mN/mm which corresponds to the physiological conditions. The measurements of isometric force (mN/mm) were performed according to the methods described by Mulvany and Halpern.⁵⁶ Isometric wall tensions of mesenteric arteries were measured by force transducers connected to a Powerlab system and recorded by Chart 5 software. To evaluate the vasorelaxant effect of the compounds, the mesenteric artery rings were precontracted by U46619 (3 μ M), an agonist of thromboxane A₂ receptors. The role of endothelium in the relaxation effect induced by 7b (1 μ M) has been tested in mesenteric artery rings with or without endothelium. Endothelium was removed by gently rubbing the mesenteric artery luminal surface with a human hair. The integrity or functional removal of endothelium has been checked by the endothelium-dependent relaxation response to acetylcholine (10 μ M).

Statistics.

Statistical analyses have been performed using SigmaStat Software (version 3.0.1a, Systat Software, Inc). Unless otherwise indicated, data were expressed as mean \pm standard error of the mean (N, number of experiments and n, number of cells from independent experiments). For comparison between more than two means we used Kruskal-Wallis one way analysis of variance followed by Dunn's or Dunnet's post hoc tests as appropriate. Comparisons between two means were made using Mann-Whitney and by using Student t-text for vasorelaxation experiments. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. This section includes protocols for the synthesis of compounds **1-4**, ^1H and ^{13}C NMR spectra for the compounds **7a**, **7b**, **10**, **13**, **17a** and **17b**, figures related to cell migration experiments, figures related to the effect of **13** and **17b** on cytosolic calcium concentration and one figure related to the toxicity of compounds **7b**, **17a** and **17b**. The following files are available free of charge.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Pr. Paul-Alain Jaffrès - pjaffres@univ-brest.fr ; tel : (00 33) 298 016 153

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge CNRS, INSERM, la ligue contre le cancer, CANCECEN, la région Bretagne, Université de Brest, Université de Tours, Région Centre-Val de Loire for their financial supports. We also thank Isabelle Domingo for her technical assistance, the Cancéropôle Grand Ouest and the platforms (RMN-RPE and spectrométrie de masse) from the University of Brest. This study was funded by Institut National du Cancer (INCA N°2018-151),

ABBREVIATIONS

TLC, thin layer chromatography; mCPBA, *meta*-Chloroperoxybenzoic acid; Ohmline, 1-O-hexadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-lactose; CyPPA, Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine.

BRIEFS.

-
- ⁴ B. Honrath, I. E. Krabbendam, C. Culmsee, A. M. Dolga, Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in the plasma membrane, mitochondria and the ER: Pharmacology and implications in neuronal diseases *Neurochem Inter.*, **2017**, *109*, 13-23.
- ⁵ A. Girault, J.P. Haelters, M. Potier-Cartereau, A. Chantome, P.A. Jaffrès, P. Bougnoux, V. Joulin, C. Vandier, Targeting SKCa channels in cancer: potential new therapeutic approaches *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 697-713.
- ⁶ C. Rua, M. Guéguinou, I. Soubai, E. Viel, M. Potier-Cartereau, A. Chantome, C. Barbe, P. Bougnoux, C. Barin-Le Guellec, C. Vandier, SK3 Gene Polymorphism Is Associated with Taxane Neurotoxicity and Cell Calcium Homeostasis *Clin Cancer Res.*, **2018**, *24*, 5313-5320.
- ⁷ L. Hipólito, A. K. Fakira, D. Cabañero, R. Blandón, S. M. Carlton, J. A. Morón, Z. Melyan, In vivo activation of the SK channel in the spinal cord reduces the NMDA receptor antagonist dose needed to produce antinociception in an inflammatory pain model *Pain.*, **2015**, *156*, 849–858.
- ⁸ A. W. Kasumu, C. Hougaard, F. Rode, T. A. Jacobsen, J.M. Sabatier, B. L. Eriksen, D. Strøbæk, X. Liang, P. Egorova, D. Vorontsova, P. Christophersen, L. C. B. Rønn, I. Bezprozvanny, Selective positive modulator of calcium-activated potassium channels exerts beneficial effects in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 2 *Chem. Biol.*, **2012**, *19*, 1340-1353.
- ⁹ A.M. Dolga, T. Letsche, M. Gold, N. Doti, M. Bacher, N. Chiamvimonvat, R. Dodel, C.G. Culmsee, Activation of KCNN3/SK3/K(Ca)_{2.3} channels attenuates enhanced calcium influx and inflammatory cytokine production in activated microglia *Glia*, **2012**, *60*, 2050-64.

¹⁰ C.T. Bond, R. Sprengel, J.M. Bissonnette, W.A. Kaufmann, D. Pribnow, T. Neelands, T. Storck, M. Baetscher, J. Jerecic, J. Maylie, H.G. Knaus, P.H. Seeburg, J.P. Adelman, Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel subunit, *SK3 Science*, **2000**, 289, 1942-6.

¹¹ A. Brown, T. Cornwell, I. Korniyenko, V. Solodushko, C.T. Bond, J.P. Adelman, M.S. Taylor, Myometrial expression of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels depresses phasic uterine contraction *Am J Physiol Cell Physiol* **2007**, 292, C832-40.

¹² S.L. Pierce, J.D.K. Kresowik, K.G. Lamping, S.K. England., Overexpression of SK3 channels dampens uterine contractility to prevent preterm labor in mice *Biology of Reproduction*, **2008**, 78, 1058–1063.

¹³ H. Lee, B.H. Koh, L.E. Peri, R.D. Corrigan, H.T. Lee, N.E. George, B.P. Bhetwal, Y. Xie, B.A. Perrino, T.C. Chai, K.M. Sanders, S.D. Koh, Premature contractions of the bladder are suppressed by interactions between TRPV4 and SK3 channels in murine detrusor PDGFR α + cells *Scientific Reports*, **2017**, 7, 12245.

¹⁴ S. Brähler, A. Kaistha, V.J Schmidt, S.E Wölfle, C. Busch, B.P Kaistha, M. Kacik, A.L. Hasenau, I. Grgic, H. Si, C.T Bond, J.P Adelman, H. Wulff, C. de Wit, J. Hoyer, R. Köhler, Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension *Circulation*, **2009**, 119, 2323-32.

¹⁵ T. Siddiqui, S. Lively, R. Ferreira, R. Wong, L.C. Schlichter, Expression and contributions of TRPM7 and KCa2.3/SK3 channels to the increased migration and invasion of microglia in anti-inflammatory activation states *PLoS One.*, **2014**, 9, e106087.

-
- ¹⁶ A. Chantome, A. Girault, M. Potier, C. Collin, P. Vaudin, J.C. Pagès, C. Vandier, V. Joulin, KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility *Exp. Cell Res.*, **2009**, *315*, 3620-3630.
- ¹⁷ A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, L. Clarysse, G. Fromont, S. Marionneau-Lambot, M. Guéguinou, J.C. Pagès, C. Collin, T. Oullier, A. Girault, F. Arbion, J.P. Haelters, P.A. Jaffrès, M. Pinault, P. Besson, V. Joulin, P. Bougnoux, C. Vandier, Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases *Cancer Research*, **2013**, *73*, 4852-61.
- ¹⁸ M. Guéguinou, T. Harnois, D. Crottes, N. Deliot, A. Gambade, A. Chantôme, J.P. Haelters, P.A. Jaffrès, M.L. Jourdan, G. Weber, P. Bougnoux, O. Mignen, N. Bourmeyster, B. Constantin, T. Lecomte, C. Vandier M. Potier-Cartereau, SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin *Oncotarget*, **2016**, *7*, 36168-36184.
- ¹⁹ M. Potier, V. Joulin, S. Roger, P. Besson, M.L. Jourdan, J.Y. LeGuennec, P. Bougnoux, C. Vandier, Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration *Mol. Cancer. Ther.*, **2006**, *5*, 2946-53.
- ²⁰ C. Hanselmann, S. Grissmer, Characterization of apamin-sensitive Ca(2+)-activated potassium channels in human leukaemic T lymphocytes *J. Physiol.*, **1996**, *496*, 627-637.
- ²¹ D. Strøbaek, T.D. Jørgensen, P. Christophersen, P.K. Ahring, S.P. Olesen, Pharmacological characterization of small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels stably expressed in HEK 293 cells *Br. J. Pharmacol.*, **2000**, *129*, 991-999.

²² D. Strobaek, C. Hougaard, T.H. Johansen, U.S. Sorensen, E.O. Nielsen, K.S. Nielsen, R.D. Taylor, P. Pedarzani, P. Christophersen, Inhibitory gating modulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels by the synthetic compound (R)-N-(benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtylamine (NS8593) reduces afterhyperpolarizing current in hippocampal CA1 neurons *Mol. Pharmacol.*, **2006**, *70*, 1771-1782.

²³ C. Hougaard, B.L. Eriksen, S. Jørgensen, T.H. Johansen, T. Dyhring, L.S. Madsen, D. Strøbæk, P. Christophersen, Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, *151*, 655–665.

²⁴ A. Girault, J.P. Haelters, M. Potier, A. Chantôme, M. Pineau, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, G. Simon, H. Couthon-Gourvès, P.A. Jaffrès, V. Joulin, B. Corbel, P. Bougnoux, C. Vandier, New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and occurrence of metastasis *Current Cancer Drug Target*, **2011**, *11*, 1111-1125. B)

²⁵ C. Vandier, P. Bougnoux, A. Chantome, B. Corbel, A. Girault, J.P. Haelters, V. Joulin, M. Potier-Cartereau, G. Simon, Method for preventing cancer metastasis, PCT Int. Appl. (**2011**), WO 2011101408 A1 20110825.

²⁶ P.A. Jaffrès, C. Gajate, A.M. Bouchet, H. Couthon-Gourvès, A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, P. Besson, P. Bougnoux, F. Mollinedo, C. Vandier, Alkyl ether lipids, ion channels and lipid raft reorganization in cancer therapy *Pharm. Ther.*, **2016**, *165*, 114-131.

²⁷ F. Herrera, C.M. Sevrain, P.A. Jaffrès, H. Couthon-Gourvès, A. Grélard, E.J. Dufourc, A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, C. Vandier, A. Bouchet, Singular Interaction between an

Antimetastatic Agent and the Lipid Bilayer: The Ohmlin Case *ACS Omega*, **2017**, *2*, 6361-6370.

²⁸ P.V. Escriba, Membrane-lipid therapy: A historical perspective of membrane-targeted therapies - From lipid bilayer structure to the pathophysiological regulation of cells *Biochem. Biophys. Acta*, **2017**, *1859*, 1493-1506.

²⁹ C.M. Sevrain, J.P. Haelters, A. Chantôme, H. Couthon-Gourvès, M. Gueguinou, M. Potier-Cartereau, C. Vandier, P.A. Jaffrès, DiGalactosyl-Glycero-Ether Lipid: synthetic approaches and evaluation as SK3 channel inhibitor *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 4479-4487.

³⁰ W. Berthe, C.M. Sevrain, A. Chantôme, A.M. Bouchet, M. Gueguinou, Y. Fourbon, M. Potier-Cartereau, J.P. Haelters, H. Couthon-Gourvès, C. Vandier, P.A. Jaffrès, New Disaccharide-Based Ether Lipids as SK3 Ion Channel Inhibitors *ChemMedChem*, **2016**, *11*, 1531-1539.

³¹ C.M. Sevrain, J.P. Haelters, A. Chantôme, H. Couthon-Gourvès, A. Girault, C. Vandier, P.A. Jaffrès, Glyco-Phospho-Glycero Ether Lipids (GPGEL): synthesis and evaluation as small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK3) inhibitors *MedChemComm.*, **2012**, *3*, 1471-1478.

³² A. Bauduin, M. Papin, A. Chantôme, H. Couthon, L. Deschamps, J. Requejo-Isidro, C. Vandier, P.A. Jaffrès, Development of pyrene-based Fluorescent ether lipid as inhibitor of SK3 ion channels, *Eur. J. Med. Chem.* accepted manuscript.

³³ D. Andri, R. Fourme, K. Zechmeister, Crystal and molecular structure of diethylether at 128°K *Acta Cryst.*, **1972**, *B28*, 2389.

-
- ³⁴ O. Gereben, L. Pusztai, Molecular conformations and the liquid structure in bis(methylthio)methane and diethyl sulfide: diffraction experiments vs molecular dynamics simulations *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 9114–9121.
- ³⁵ R. A. O'Brien, A. Mirjafari, K.M. Mattson, S.M. Murray, N. Mobarrez, E.A. Salter, A. Wierzbicki, J.H. Davis, K.N. West, The effect of the sulfur position on the melting points of lipidic 1-methyl-3-thiaalkylimidazolium ionic liquids *J. Phys. Chem. B*, **2014**, *118*, 10232-10239.
- ³⁶ S. Drescher, A. Meister, G. Graf, G. Hause, A. Blume, B. Dobner, General synthesis and aggregation behaviour of new single-chain bolaphospholipids: variations in chain and headgroup structures *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 6796-6804.
- ³⁷ A. Bouraoui, M. Berchel, R. Ghanem, V. Vié, G. Paboeuf, L. Deschamps, O. Lozach, T. Le Gall, T. Montier, P.A. Jaffrès, Substitution of unsaturated lipid chains by thioether-containing lipid chains in cationic amphiphiles: physicochemical consequences and application for gene delivery *Org. Biomol. Chem*, **2019**, *17*, 3609-3616.
- ³⁸ A. Bouraoui, R. Ghanem, M. Berchel, V. Vié, Y. Le Guen, G. Paboeuf, L. Deschamps, T. Le Gall, T. Montier, P.A. Jaffrès, Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery *ChemPhysChem*, **2019**, *20*, 2187-2194.
- ³⁹ W. Vogt, Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal *Free Rad. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 93-105.

-
- ⁴⁰ J. Tang, K.A. Usmani, E. Hodgson, R.L. Rose, In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam *Chemico-Biol. Interactions*, **2004**, *147*, 319-329.
- ⁴¹ S.C. Mitchell, R.M. Nickson, Metabolism of Sulfur-Containing Xenobiotics *Sulfur Reports*, **1993**, *13*, 161-195.
- ⁴² D.D. Lawson, H.R. Getz, D.A. Miller, Synthesis of the Sulfur Analogs of Batyl and Chimyl Alcohols *J. Org. Chem.*, **1961**, *26*, 615-16.
- ⁴³ S. Morris-Natschke, J. R. Surles, L. W. Danie, M. E. Berens, E. J. Modest, C. Piantadosi, Synthesis of sulfur analogues of alkyl lysophospholipid and neoplastic cell growth inhibitory properties *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 2114-2117.
- ⁴⁴ R. L. Alexander, S. L. Morris-Natschke, K. S. Ishaq, R. A. Fleming, G. L. Kucera, Synthesis and cytotoxic activity of two novel 1-dodecylthio-2-decyloxypropyl-3-phosphatidic acid conjugates with gemcitabine and cytosine arabinoside *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4205–4208.
- ⁴⁵ B. Ayers, H. Long, E. Sim, I. A. Smellie, B. L. Wilkinson, A. J. Fairbanks, Stereoselective synthesis of beta-arabino glycosyl sulfones as potential inhibitors of mycobacterial cell wall biosynthesis *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 739–746.
- ⁴⁶ D. B. G. Williams, M. Lawton, Aluminium triflate: a remarkable Lewis acid catalyst for the ring opening of epoxides by alcohols *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 3269–3272.
- ⁴⁷ A. Wimmer, B. König, Photocatalytic formation of carbon-sulfur bonds *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, *14*, 54–83.

⁴⁸ D. Afonso, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, A. Grélard, S. Prakash, M. Berchel, N. Kervarec, E.J. Dufourc, T. Montier, P.A. Jaffrès, Triggering bilayer to inverted-hexagonal nanostructure formation by thiol-ene click chemistry on cationic lipids: consequences on gene transfection *Soft Matter*, **2016**, *12*, 4516 – 4520.

⁴⁹ M. Berchel, T. Le Gall, O. Lozach, J.P. Haelters, T. Montier, P.A. Jaffrès, Lipophosphoramidate-based bipolar amphiphiles: their syntheses and transfection properties *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 2846-53.

⁵⁰ T.J. Deming, Functional Modification of Thioether Groups in Peptides, Polypeptides, and Proteins *Bioconjugate Chem.*, **2017**, *28*, 691-700.

⁵¹ F. Bery, S. Figiel, S. Kouba, D. Fontaine, M. Guéguinou, M. Potier-Cartereau, C. Vandier, R. Guibon, F. Bruyère, G. Fromont, K. Mahéo, Hypoxia Promotes Prostate Cancer Aggressiveness by Upregulating EMT-Activator Zeb1 and SK3 Channel Expression *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 4786.

⁵² S. Figiel, F. Bery, A. Chantôme, D. Fontaine, C. Pasqualin, V. Maupoil, I. Domingo, R. Guibon, F. Bruyère, M. Potier-Cartereau, C. Vandier, G. Fromont, K. Mahéo, A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy *Cancers*, **2019**, *11*, 1814.

⁵³ M. Potier-Cartereau, W. Raoul, G. Weber, K. Mahéo, R. Rapetti-Mauss, M. Gueguinou, P. Buscaglia, C. Goupille, N. Le Goux, S. Abdoul-Azize, T. Lecomte, G. Fromont, A. Chantome, O. Mignen, O. Soriani, C. Vandier, Potassium and Calcium Channel Complexes as Novel

Targets for Cancer Research *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, **2020**, doi:
10.1007/112_2020_24.

⁵⁴ M. Yamabe, K. Kaihatsu, Y. Ebara, Sialyllactose-Modified Three-Way Junction DNA as Binding Inhibitor of Influenza Virus Hemagglutinin *Bioconjug. Chem.* **2018**, **29**, 1490-1494.

⁵⁵ M. Potier, A. Chantome, V. Joulin, A. Girault, S. Roger, P. Besson, M.-L. Jourdan, J.-Y. Le Guennec, P. Bougnoux, C. Vandier, The SK3/K(Ca)_v2.3 potassium channel is a new cellular target for edelfosine *Br. J. Pharmacol.*, **2011**, *162*, 464–479.

⁵⁶ M.J. Mulvany, W. Halpern, Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats *Circ. Res.*, **1977**, *41*, 19–26.

Conclusion
générale

Conclusion générale

Ces travaux ont porté sur la synthèse et l'optimisation de composés amphiphiles modulateurs du canal SK3, canal anormalement exprimé dans certaines cellules cancéreuses (ex. cancer du sein). Cette expression des canaux SK3 confère à ces cellules des capacités de migration accrues et, en conséquence, un phénotype invasif.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à la synthèse de composés amphiphiles fluorescents, analogues de l'Ohmlin (molécule de référence au sein de notre laboratoire). Nous avons alors deux objectifs : 1- disposer d'un composé qui puisse conserver ses propriétés de modulation des canaux SK3 après y avoir incorporé un motif fluorescent ; 2- pouvoir étudier la distribution de ce composé à l'échelle cellulaire et ainsi contribuer à mieux comprendre le mécanisme d'action de ce type de composés amphiphiles. Pour cela, 4 analogues ont été synthétisés avec une sonde fluorescente de type pyrène placée en position ω de la chaîne aliphatique de longueur variable. Trois d'entre eux possèdent une longueur de chaîne de 4 (OP1), 11 (OP2) et 16 carbones (OP3) ainsi qu'une tête polaire de type lactose, tandis que le quatrième possède une tête polaire monosaccharidique de type glucose avec une chaîne grasse en 16 carbones (II.20). La localisation de la sonde fluorescente dans la partie hydrophobe du composé amphiphile a été retenue car nous faisons l'hypothèse que cette localisation induirait un minimum de perturbation et permettrait de conserver les propriétés de modulation des canaux SK3. En effet, nous avons proposé que le rôle du domaine hydrophobe était de servir « d'ancre » au composé au sein de la membrane plasmique. En conséquence de ce choix de localisation, le fluorophore devait avoir une structure apolaire afin de conserver une structure amphiphile pour nos analogues fluorescents de l'Ohmlin. Pour cela, notre choix s'est porté sur le pyrène en raison de ses propriétés hydrophobes proches de celles de la chaîne aliphatique présente dans l'Ohmlin. La première voie réactionnelle a utilisé le pyrène méthanol comme chromophore en raison d'une stratégie de synthèse plus courte mais qui n'a pu aboutir en raison, probablement, de l'instabilité de la fonction éther générée se trouvant en position benzylique. C'est pourquoi, nous avons retenu une autre voie de synthèse dans laquelle aucun hétéroatome n'est incorporé à proximité du pyrène. Les 13

étapes réactionnelles nous ont permis d'isoler chacun des analogues souhaités et de les envoyer en tests biologiques à l'équipe du Pr. Christophe Vandier (N2C UMR INSRM 1069, Université de Tours). Seul l'analogue **OP2** s'est révélé être un inhibiteur du courant SK3 (déterminée par patch-clamp) et ce, avec une efficacité proche de notre composé de référence. Les résultats ont montré qu'**OP2** est également capable d'inhiber la migration SK3 dépendante mais à une concentration plus élevée que celle de l'Ohmlin (1 μ M *versus* 300nM), son action est donc dépendante de la concentration utilisée. De plus, **OP2** ne génère aucune toxicité aux concentrations employées. Les propriétés de fluorescence du composé **OP2** ont été étudiées et nous nous sommes intéressés à l'interaction de ce composé ainsi que des autres analogues fluorescents avec des membranes modèles (liposomes). Nous avons alors montré que le composé **OP2** est en effet capable de s'intégrer dans la bicouche des liposomes. Lors d'une mobilité au Centre National de biotechnologies de Madrid (Dr. José Isidro-Requejo), des études de microscopie de fluorescence sur des cellules cancéreuses ont été réalisées, afin d'étudier la cinétique d'interaction du composé **OP2** avec ces cellules. Nous avons montré que le composé **OP2** s'intègre rapidement à la membrane plasmique confirmant sa capacité à interagir rapidement avec une membrane. Nous avons aussi montré qu'après un temps plus long (20 minutes) le composé s'internalise pour se localiser proche du noyau. Même si les études ne nous ont pas permis de localiser avec précision **OP2** après son internalisation, ces résultats montrent que **OP2** n'a pas uniquement une localisation au niveau de la membrane plasmique mais suggèrent qu'il peut être aussi localisé dans les membranes des organites cellulaires. Cela suggère que ce type de composé pourrait aussi être utilisé pour moduler certaines protéines membranaires (ex. SK3 présent au niveau mitochondrial) présentes dans les membranes intracellulaires. Au final, le composé **OP2** est le premier composé amphiphile fluorescent modulateur des canaux SK3.

Dans un second temps, nous avons poursuivi les modulations de structure de l'Ohmlin, grâce à l'insertion d'un motif photo-isomérisable de type azobenzène dans le but d'obtenir des modulateurs efficaces, non toxiques et « photoswitchables » du canal SK3. En effet, nous imaginions que, selon la stéréochimie du motif azobenzène et les conséquences que cette dernière induit sur sa polarité, nous pourrions disposer soit d'un composé modulateur des canaux SK3 soit d'un composé inactif. Ainsi un contrôle de l'activité *via* un stimulus lumineux pourrait être envisagé. Pour cela, le motif photo-isomérisable a été

positionné dans la partie hydrophobe, soit directement sur l'oxygène de la position *sn-1* du motif glycérol (III.9), soit en position ω de la chaîne lipidique (III.18a-c). Les trois analogues possédant le fragment azobenzène en bout de chaîne sont tous de puissants modulateurs du canal SK3. Les études de spectroscopies UV-Visible et de RMN du composé III.18c ont permis de montrer qu'un temps d'irradiation de 15 minutes à 380 nm est suffisant pour obtenir majoritairement (81 %) l'isomère *cis*. Le suivi cinétique de la photo-réversion de ce composé a montré une cinétique de retour extrêmement lente (plusieurs jours). Cette propriété devrait faciliter l'étude des propriétés de modulation des canaux SK3 de ce diastéréoisomère. Ces trois analogues sont, à notre connaissance, les premiers modulateurs photo-isomérisables possédant un fragment azobenzène capables de moduler efficacement le canal SK3. Cependant, des études complémentaires (effet sur la concentration calcique intracellulaire, effet sur la migration cellulaire, effet du diastéréoisomère *Z*) doivent encore être réalisées. Au-delà de ces études à venir, ces résultats montrent que la fonctionnalisation de la chaîne lipidique, à condition de placer les modifications de structures en position ω de la chaîne alkyle, est possible. Cette conclusion ouvre donc d'autres possibilités de modulation de structures.

Suite à des études antérieures concernant la position *sn-2* de l'Edelfosine et de ses analogues, qui ont permis de mettre en lumière l'importance de cette position dans la modulation de l'activité du canal SK3, la troisième partie de travail a porté sur la modulation de cette position. Sept analogues de l'Ohmlin avec un groupement éthoxy, benzyle, fluorobenzyle, azoture, amine et acétamide (IV.5a, IV.5b, IV.12, IV.16, IV.21, IV.22 et IV.27) ont été synthétisés puis testés biologiquement. Deux analogues (IV.5a, IV.5b) se sont révélés être de puissants inhibiteurs, les plus puissants conçus au laboratoire à ce jour, sur la base des résultats obtenus par mesure de la variation des courants ioniques (mesure par patch-clamp). Les études de l'évaluation de la concentration cytosolique en ions calciques nous permettront de confirmer si leur puissante activité inhibitrice est bien corrélée avec une variation de la concentration calcique cytosolique. Ces études confirment que la position *sn-2* joue également un rôle crucial dans la modulation de l'activité du canal SK3.

Le dernier chapitre, quant à lui, porte sur la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux analogues de l'Ohmlin, dont l'oxygène de la position *sn-1* a été substitué par une

fonction thioéther, sulfoxyde ou encore sulfone. Ces travaux ont vu le jour suite à la découverte d'une métabolisation extrêmement lente de l'Ohmlin, dans les tissus, qui serait liée à la présence de fonctions éthers très stables. De façon surprenante et inattendue, certains de ces analogues soufrés se sont révélés être de puissants activateurs du canal SK3. Cette nouvelle propriété a permis à un composé d'être étudié sur des cellules cardiaques afin d'induire une vasorelaxation SK3 dépendante. L'ensemble de ces travaux de ce chapitre a fait l'objet d'un dépôt de brevet (2020) ainsi que d'une publication intitulée « *Introduction of a thio-ether on glycolipid amphiphilic compounds reveals a potent activator of SK3 Channel with vasorelaxation effect.* ».

Annexe

Actions de communication grand public :

- [La nuit Européenne des chercheurs](#) (29 Septembre 2017 et 28 Septembre 2018) - Océanopolis Brest
- [Fête de la Science](#) (Octobre 2017, 2018 et 2019) : Quartz Brest
- [Pint of Science](#) – Brest - « [Quand la médecine a besoin de chimie](#) » - 15 Mai 2018

Présentations orales :

- « [Synthèse de composés amphiphiles modulateurs du canal potassique SK3 pour la prévention des métastases osseuses](#) » - prix de la meilleure communication orale - pH-D Day – 21 Décembre 2017 – Brest.
- « [Synthèse d'un analogue fluorescent de l'Ohmlin, molécule anti-métastasiante potentielle](#) » - 2^{ème} Symposium du Réseau Canaux ioniques et Cancer du Cancéropôle Grand Ouest – 18 Septembre 2018 – Tours.
- « [Synthèse de composés amphiphiles modulateurs du canal SK3 pour la prévention des métastases osseuses](#) » - **Colloque de l'IBSAM** - prix de la meilleure communication orale - 10 octobre 2018 – Brest.
- « [Fluorescent analogue of Ohmlin, an anticancer molecule – synthesis and first results](#) » [Alicia BAUDUIN](#), Hélène COUTHON, Wilfried BERTHE, Christophe VANDIER, Aurélie CHANTÔME, Delphine FONTAINE, Laure DESCHAMPS, Paul-Alain JAFFRES – **Séminaire UMR CNRS 6521** - 6 Décembre 2018 – Brest.

Présentations de Posters :

- « [Fluorescent Analogue of the glyco-glycero lipid Ohmlin](#) » [Alicia BAUDUIN](#), Hélène COUTHON, Wilfried BERTHE, Christophe VANDIER, Aurélie CHANTÔME, Delphine FONTAINE, Laure DESCHAMPS, Paul-Alain JAFFRES - **Congrès international « Groupe d'étude des membranes »** - du 5 au 8 Novembre 2017 à Roscoff.
- « [Détermination de la localisation à l'échelle cellulaire de l'Ohmlin, molécule antimétastasiante potentielle](#) » [Alicia BAUDUIN](#), Hélène COUTHON, Wilfried BERTHE, Christophe VANDIER, Aurélie CHANTÔME, Delphine FONTAINE, Laure DESCHAMPS, Paul-Alain JAFFRES – **Colloque du Cancéropôle Grand Ouest** - 2 et 3 Juillet 2018 à Vannes.
- « [Fluorescent analogue of the glyco-glycero lipid Ohmlin](#) » (2^{ème} version) – [Alicia BAUDUIN](#), Hélène COUTHON, Wilfried BERTHE, Christophe VANDIER, Aurélie

CHANTÔME, Delphine FONTAINE, Laure DESCHAMPS, Paul-Alain JAFFRES – **Journée des écoles doctorales** – 29 octobre 2018 - Rennes.

- « [Fluorescent analogue of the glyco-glycero lipid Ohmlin](#) » (2^{ème} version) – Alicia BAUDUIN, Hélène COUTHON, Wilfried BERTHE, Christophe VANDIER, Aurélie CHANTÔME, Delphine FONTAINE, Laure DESCHAMPS, Paul-Alain JAFFRES - **Société de Chimie Thérapeutique** - 20 au 22 Février 2019 – Paris.

Publications dans des journaux à comité de lecture et brevet :

A. Bauduin, M. Papin, A. Chantôme, H. Couthon, L. Deschamps, J. Requejo-Isidro, C. Vandier, P. A. Jaffrès. « *Development of pyrene-based Fluorescent ether lipid as inhibitor of SK3 ion channels* » - *Eur. J. Med Chem.* **Acceptée le 24 Septembre 2020**

C. M. Sevrain, D. Fontaine, A. Bauduin, M. Guéguinou, B. L. Zhang, A. Chantôme, K. Mahéo, C. Pasqualin, V. Maupoil, H. Couthon, C. Vandier, P.A. Jaffrès. « *Thio-ether functionalized glycolipid amphiphilic compounds reveal a potent activator of SK3 channel with vasorelaxation effect* » - **En soumission**

Dépôt de Brevet: New glycolipids and use thereof as SK3 ion channel modulators. H. Couthon, P.A. Jaffrès, C. Sevrain, A. Bauduin, A. Chantôme, D. Fontaine, C. Vandier - 17 juillet 2020, EP 20 305 829.2.

Autres :

- Membre élu à la commission recherche de l'Université de Bretagne Occidentale
- Membre élu à la commission Europe et Internationale de l'Université de Bretagne Occidentale
- Membre organisateur de la JED 3M (journée des Écoles Doctorales) se déroulant à Brest
- Membre organisateur de la pH-D day (2017 et 2018)
- Membre du jury pour la « faites de la Science »
- Tutrice pour les cordées de la réussite (2018 et 2019)

Titre : Conception de composés amphiphiles modulateurs du canal SK3.

Mots clés : Ohmline, SK3, glyco-glycero-ether-lipide, anti-métastatique, pyrène, fluorescence, azobenzène.

Résumé : Le canal SK3, est exprimé dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (sein, prostate, peau) connues pour leurs propriétés invasives. Il joue un rôle majeur dans la prolifération et la motilité des cellules cancéreuses ce qui fait de lui une nouvelle cible thérapeutique intéressante pour réduire leur migration et potentiellement le développement des métastases. L'Ohmline, un glyco-glycero-ether-lipide, est la première molécule amphiphile capable de moduler efficacement, sélectivement et sans générer de toxicité, l'activité des canaux SK3. Afin de mieux comprendre son mécanisme d'action et sa localisation à l'échelle cellulaire, des analogues fluorescents à base de pyrène ont été synthétisés, dont l'un d'entre eux s'est révélé biologiquement actif, non toxique et sélectif. La synthèse, les études biologiques et de microscopies de fluorescence sont discutées.

Par la suite, nous avons synthétisés de nouveaux analogues, modulés en position sn-1 par un motif bis(phényl)diazène capable de s'isomériser à la lumière, afin d'obtenir les premiers commutateurs amphiphiles modulateurs du canal SK3. Trois d'entre eux sont de bons inhibiteurs de l'activité du canal SK3. La synthèse, les études spectroscopiques ainsi que les études biologiques sont également discutées. Les études se sont poursuivies avec la conception d'analogues modulés en position sn-2 qui ont permis d'obtenir les deux amphiphiles modulant le plus efficacement les canaux SK3. La dernière étude porte sur le développement de nouveaux analogues soufrés qui visent à améliorer la métabolisation de l'Ohmline dans les tissus. Des activateurs très efficaces des canaux SK3 ont été identifiés.

Title : Design of amphiphilic compounds, modulator of SK3 channel.

Keywords : Ohmline, SK3, glyco-glycero-ether-lipid, anti-metastatic, pyrene, fluorescence, azobenzene

Abstract : SK3 channel is expressed in several cancer cell lines (breast, prostate, skin) known for their invasive properties. This channel plays a major role in the proliferation and motility of cancer cells, which makes it a promising therapeutic target for reducing their migration and potentially to reduce the occurrence of metastases.

Ohmline, a glycol-glyceroether-lipid, is the first amphiphilic compounds able to modulate efficiently and selectively SK3 channel activity without any visible side effect. In order to better understand its mechanism of action and its localization at a cellular scale, fluorescent analogs with a pyrene as fluorescent probe, have been synthesized. One of them has been shown to be biologically active, non-toxic and selective. The synthesis, biological studies and fluorescence microscopy are discussed.

Subsequently, we synthesized new analogs, modulated at the sn-1 position by a bis(phenyl)diazene moiety able to isomerize its diazene bond by light, in order to obtain the first amphiphilic switches modulators of SK3 channel. Three of them are efficient inhibitors. Synthesis, spectroscopic studies as well as the biological studies are also discussed. This work continues with the design of analogs, modulated at the sn-2 position. Two of them are powerful inhibitors of SK3 and are among the most efficient inhibitors identified so far. The latest part reports the development of new sulfur analogs that aim to improve Ohmline's metabolism. Some of the new analogues are powerful activator of SK3 channels.