



HAL
open science

Inhibiteurs glucosidiques de la glycogène phosphorylase : vers une approche multivalente et dynamique

Maxime Pommier

► To cite this version:

Maxime Pommier. Inhibiteurs glucosidiques de la glycogène phosphorylase : vers une approche multivalente et dynamique. Chimie organique. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1014 . tel-03621964

HAL Id: tel-03621964

<https://theses.hal.science/tel-03621964>

Submitted on 28 Mar 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.

N°d'ordre NNT : 2021LYSE1014



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Chimie, Procédés, Environnement

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Chimie organique

Soutenue publiquement le 29/01/2021, par :
Maxime Pommier

Inhibiteurs glucosidiques de la glycogène phosphorylase : vers une approche multivalente et dynamique

Devant le jury composé de :

Gouin, Sébastien	Directeur de recherche CNRS, UMR 6230 – CEISAM, Rapporteur
Lopin-Bon, Chrystel	Professeure, Université d'Orléans, Rapporteur
Varrot, Annabelle	Directrice de recherche CNRS, UPR 5301 – CERMAV, Examinatrice
Lancelin, Jean-Marc	Professeur, Université de Lyon, Examineur
Vidal, Sébastien	Directeur de recherche CNRS, UPR 2301 – ICSN, Directeur de thèse
Gueyrard, David	Maître de conférences, Université de Lyon, Co-directeur de thèse

Dédiée à Robin Pommier et Camille Plassard

« Nove sed non nova : la manière est nouvelle, mais non la matière. »

Loth

Remerciements

Je souhaite premièrement remercier les membres du jury, Mme Annabelle Varrot, Mme Chrystel Lopin-Bon, M. Jean-Marc Lancelin et M. Sébastien Gouin, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Durant ces trois années de doctorat, j'ai eu la chance de travailler au sein d'un institut riche de diversité et je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, conseillé ou guidé dans ma recherche. J'adresse particulièrement ma gratitude aux services communs de spectrométrie de masse (Antoine, Christian, Elodie et Alexandra) et de RMN (Anne et Emmanuel) pour leur bienveillance et leur disponibilité. Je souhaite aussi adresser mes remerciements à Jean-Marc, Carmine et Florence pour leur accueil et leur grand soutien dans mon travail.

Je souhaite ensuite chaleureusement remercier mon co-directeur de thèse David Gueyrard, qui m'a accompagné durant ces trois années et plus particulièrement au cours de la dernière. Je le remercie pour ses conseils scientifiques toujours très avisés mais aussi pour les tous les moments plus décontractés que l'on a partagé.

J'adresse aussi ma profonde gratitude à mon directeur de thèse Sébastien Vidal, qui m'a encadré et guidé depuis mon master 2. J'ai grandi tant sur le plan professionnel que personnel à ses côtés durant ces 4 années et je le remercie de m'avoir transmis ses valeurs scientifiques mais surtout humaines. C'est lorsque je compare mon parcours de doctorant avec d'autres étudiants que je perçois la chance d'avoir été encadré avec écoute et bienveillance.

Je souhaite également adresser mes remerciements à tous les membres du laboratoire LCO2 et plus particulièrement à mes collègues et amis : Nico, Yoann, Yann, Baptiste, Bastien, Fanny, Dimitri, Augustin et Carolina. Je vous remercie pour tous les moments passés ensemble au labo, et qui ont su apporter un brin de joie à ma recherche.

J'adresse aussi mes remerciements à mes amis, que ce soient ceux de CPE ou du lycée (Seb, Xavier, Bastien, Thibaut, Aurore, Thommy, Axel, Vincent) ou ceux de l'harmonie (Coco, Sophie, Béa, Barbara, Marie, Léa, Manon, Camille F.). Toutes ces rencontres ont façonné ma personnalité et je leur adresse ici ma reconnaissance.

Durant ces trois années, je n'ai parfois pas été aussi souvent disponible que je l'aurai voulu pour ma famille. Je souhaite notamment, avec ces quelques mots, adresser une grande reconnaissance à mes cousins (Thibaut, Timothée, Clément, Aurélien et Antoine) qui ont été (peut être sans le savoir) une source d'inspiration et de motivation. Je remercie aussi ma belle-sœur et mes beaux-frères (Emilie, Romain, Aurélien et Julien), pour le soutien qu'ils m'ont apporté.

Je ne saurais continuer ces remerciements sans évoquer mon frère jumeau Robin. Ayant grandi avec lui depuis toujours, je pense pouvoir dire (sans me tromper) que c'est l'une des personnes qui me connais le mieux. Il est pour moi un modèle et un soutien quotidien et je lui adresse ici toute mon admiration. Je veux aussi bien sûr aussi remercier ma sœur Floriane, et lui dire combien je l'admire pour son choix de parcours professionnel. Je souhaite qu'elle retrouve dans ces mots toute ma fierté.

Je veux aussi remercier mes parents, sans qui je n'aurais pu réaliser tout ce que j'ai accompli jusqu'à aujourd'hui. C'est grâce à l'éducation qu'ils m'ont donnée et aux valeurs qu'ils m'ont transmises que j'ai pu me construire en tant qu'être humain. Ils ont, depuis toujours, soutenu mes choix personnels et professionnels et je réalise aujourd'hui la chance qu'ils m'ont offerte.

Enfin, je souhaite terminer ces remerciements par la personne qui partage ma vie, Camille. Elle m'a soutenu et aidé tout au long de ce parcours et elle a été présente dans les moments les plus difficiles. J'aurais certainement baissé les bras plus d'une fois si elle n'avait pas alimenté ma motivation. Je ne saurais résumer en quelques mots toute l'admiration que j'ai pour elle, toutes les qualités qu'elle possède, et la fierté que j'éprouve d'être à ses côtés chaque jour. Je souhaite qu'elle trouve dans ces courtes lignes la preuve d'amour la plus sincère qui soit.

Table des matières

Remerciements	5
Abréviations	13
Introduction Générale.....	15
Chapitre I. Introduction – Diabète et glycogène phosphorylase, inhibiteurs glycosidiques entre multivalence et chimie combinatoire dynamique	17
I.1. Le diabète est ses cibles thérapeutiques	19
I.1.1. Rappels sur la glycémie	19
I.1.2. Généralités sur le diabète	19
I.1.2.1. Le diabète de type 1	19
I.1.2.2. Le diabète de type 2	20
I.1.3. Les traitements et cibles thérapeutiques pour le diabète de type 2	20
I.1.3.1. Les biguanides	20
I.1.3.2. Les thiazolidinediones ou les glitazones.....	20
I.1.3.3. Les insulinosécréteurs : sulfonylurées et glinides	21
I.1.3.4. Les inhibiteurs des α -glucosidases.....	21
I.1.3.5. Les incrétino-mimétiques ou incrétines.....	22
I.1.3.6. Les inhibiteurs du SGLT2	22
I.1.3.7. La Glycogène Phosphorylase	23
I.1.4. La Glycogène Phosphorylase	24
I.1.4.1. Généralités et structure	24
I.1.4.2. Le site catalytique.....	26
I.1.4.3. Les inhibiteurs connus du site catalytique	28
I.2. La multivalence.....	31
I.2.1. Principe de la multivalence	31
I.2.2. Les différents types d'interactions multivalentes	32
I.2.2.1. L'effet chélate.....	32
I.2.2.2. Le regroupement de récepteurs	34
I.2.2.3. L'association dans un site secondaire	35
I.2.2.4. Le « bind and jump »	35
I.2.2.5. L'effet stérique	36
I.2.2.6. La réticulation.....	36
I.2.3. La multivalence appliquée aux enzymes.....	36
I.3. La chimie combinatoire dynamique.....	39
I.3.1. Principe général.....	39
I.3.1.1. La chimie combinatoire	39

I.3.1.2. La chimie combinatoire dynamique	40
I.3.2. Les différentes liaisons réversibles utilisées.....	41
I.3.3. Les liaisons covalentes.....	42
I.3.4. Les inconvénients de la CCD et les solutions apportées	43
I.3.4.1. L'atteinte de l'équilibre	43
I.3.4.2. L'isoénergicité des espèces chimiques en solution.....	43
I.3.4.3. La compatibilité des conditions opératoires avec les protéines	44
I.3.4.4. Les réactions réversibles compatibles avec les protéines.....	45
I.3.4.4.1. Les disulfures	45
I.3.4.4.2. Les imines	45
I.3.4.4.3. Les hydrazones	46
I.3.4.4.4. Les acylhydrazones	47
I.4. Conclusion	48
Chapitre II. Conception et synthèse d'inhibiteurs multivalents de la glycogène phosphorylase	51
II.1. Présentation de l'étude	53
II.1.1. Choix des inhibiteurs	53
II.1.2. Choix de la plateforme multivalente	54
II.1.3. Sélection du bras espaceur.....	54
II.2. Etudes de docking et dynamique moléculaire	55
II.2.1. Etudes de docking	55
II.2.1.1. Modélisation des ligands pour le docking.....	55
II.2.1.1.1. Etude structurale du site catalytique de la GP	55
II.2.1.1.2. Choix de la position d'ancrage pour le bras espaceur et modélisation du ligand.	57
II.2.1.2. Choix du récepteur pour le docking	58
II.2.1.3. Résultats des études de docking	58
II.2.2. Etudes de dynamique moléculaire	60
II.2.3. Description des résultats obtenus pour le nouveau ligand.....	61
II.2.4. Conclusion	62
II.3. Synthèse du 2-(2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-5-phenyl-imidazole	63
II.4. Synthèse de la glucosamine spiroisoxazoline.....	65
II.4.1. Etude de la synthèse de la spiroisoxazoline	65
II.4.2. Etude bibliographique sur l'oxydation des alcools.....	67
II.4.2.1. Oxydation de Swern	67
II.4.2.2. Oxydation de Dess-Martin.....	68
II.4.2.3. Oxydation de Jones	69
II.4.2.4. Oxydation au chlorochromate de pyridinium	69

II.4.2.5. Oxydation d'Albright-Goldman	70
II.4.3. Etude bibliographique de l'oléfination.....	70
II.4.3.1. La réaction de Wittig ou dérivé	70
II.4.3.2. La réaction de Julia	71
II.4.3.3. L'oléfination de Tebbe.....	71
II.4.4. Autres réactivités pour la formation d'exo-glycals	72
II.4.4.1. Les réactions d'éliminations	73
II.4.4.2. Le réarrangement de Ramberg-Bäcklund	74
II.4.4.3. La réaction de Bamford-Stevens	74
II.4.4.4. Conclusion	75
II.4.5. Première voie de synthèse : l'oléfination de la lactone	76
II.4.5.1. Stratégie de synthèse utilisant la réaction de Julia	76
II.4.5.2. Stratégie de synthèse utilisant la réaction de Tebbe	77
II.4.5.3. Conclusion sur la stratégie de synthèse de l'exo-glucal depuis la lactone.....	79
II.4.6. Deuxième voie de synthèse : la réaction de Bamford-Stevens.....	80
II.4.6.1. Synthèse de la spiroisoxazoline par le glucal II-56	80
II.4.6.2. Changement de groupe protecteur.....	82
II.4.6.3. Synthèse de la spiroisoxazoline par l'exo-glucal II-58	83
II.4.6.4. Etude de la déprotection des groupements acétates et de l'acétamide	86
II.4.7. Conclusion générale sur les deux voies de synthèse.....	87
II.5. Synthèse du bras espaceur.....	89
II.5.1. Synthèse du bras espaceur court II-7	89
II.5.2. Synthèse du bras espaceur long II-8	90
II.6. Synthèse des composés multivalents.....	90
II.6.1. Bref rappel sur le couplage peptidique	91
II.6.2. Bref rappel sur le couplage azide-alcyne.....	92
II.6.3. Première voie de synthèse	93
II.6.4. Deuxième voie de synthèse.....	97
II.7. Evaluation biologique des plateformes multivalentes synthétisées.....	99
II.8. Conclusion	100
Chapitre III. La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase	103
III.1. Rappel bibliographique et présentation de l'étude	105
III.1.1. Rappel bibliographique	105
III.1.2. Présentation de l'étude	105
III.2. Synthèse des dérivés hydrazide et acétaldéhyde du glucose	106

III.2.1. Synthèse de la β -D-glucopyranosyl-hydrazide	106
III.2.2. Synthèse du β -D-glucopyranosyl-acétaldéhyde	107
III.2.3. Conclusion	108
III.3. Réalisation des bibliothèques de chimie combinatoire dynamique	108
III.3.1. Etude préliminaire	108
III.3.2. Optimisation des conditions réactionnelles	110
III.3.2.1. Choix des aldéhydes aromatiques	110
III.3.2.2. Choix de la méthode de suivi des bibliothèques	111
III.3.2.3. Choix de la solution tampon	113
III.3.2.4. Choix de la méthode de traitement des bibliothèques	116
III.3.2.4.1. Traitement par l'acétonitrile	117
III.3.2.4.2. L'ultrafiltration de la GP	118
III.3.2.4.3. Analyse de la bibliothèque sans retirer la GP	120
III.3.2.5. Etude de la quantité d'hydrazide Glc introduite	121
III.3.2.6. Etude de la quantité de protéine introduite	123
III.3.2.7. Etude de l'impact de la catalyse sur l'amplification	124
III.3.3. Réalisation de la première bibliothèque de CCD	125
III.3.4. Réalisation de la seconde bibliothèque de CCD	127
III.3.5. Conclusion	128
III.4. Synthèse des acylhydrazones	128
III.4.1. Synthèse	129
III.4.2. Evaluation biologique	130
III.5. Conclusion	131
IV. Experimental section	133
IV.1. General information	135
IV.1.1. Reagents and solvents	135
IV.1.2. Micro-wave	135
IV.1.3. C18 Column chromatography	135
IV.1.4. Lyophilization	135
IV.1.5. Nuclear Magnetic Resonance	135
IV.1.6. Mass spectrometry	135
IV.1.7. HPLC-MS	135
IV.1.8. High Performance Liquid Chromatography - HPLC	136
IV.1.8.1. HPLC systems	136
IV.1.8.2. Columns	136
IV.1.8.3. Gradients	136

IV.2. Synthesis	137
IV.3. Dynamic combinatorial libraries	167
IV.3.1. Buffers	167
IV.3.2. Reagent stock solution	167
IV.3.3. Procedures	168
IV.4. Inhibition assays	168
V. Annexes	171
V.1. Etude de la quantité d'hydrazide Glc introduite	173
V.2. Etude de la quantité de protéine introduite	174
V.3. Etude de l'impact de la catalyse sur l'amplification	175
V.4. Réalisation de la première bibliothèque de CCD	176
V.5. Réalisation de la deuxième bibliothèque de CCD	178
VI. Références bibliographiques	179
Conclusion Générale	187

Abréviations

Ac	Acétyl
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
β 4Gal-T1	β 1,4-galactosyltransférase
CAN	Nitrate d'ammonium cérique
CCD	Chimie combinatoire dynamique
CCM/TLC	Chromatographie sur couche mince
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole
CuAAC	Cycloaddition azoture-alcyne cuprocatalysée
CSA	Acide camphosulfonique
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DM	Dynamique moléculaire
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EP/PE	Ether de pétrole
ESI-MS	Ionisation par électronébuliseur – Analyse par spectrométrie de masse
FA	Acide formique
FDA	Food and drug administration
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GP	Glycogène phosphorylase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférase
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl-(3 <i>H</i>) [1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-yloxy)-méthaniminium
HBTU	Hexafluorophosphate de <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
hmGP	Glycogène phosphorylase issue de muscles humains
hGST	Glutathion S-transférase humaine
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPLC-MS / LCMS	Chromatographie en phase liquidé à haute performance couplée à la spectrométrie de masse
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ITC	Titration calorimétrique isotherme
LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
MS	Spectrométrie de Masse

NCS	<i>N</i> -Chlorosuccinimide
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
PCC	Chlorochromate de pyridinium
PDC	Dichromate de pyridinium
PLP	Phosphate de pyridoxal
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
ppm	Partie par million
<i>p</i> -TSA	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
rmGP	Glycogène phosphorylase issue de muscles de lapin
RMN/NMR	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	Route Mean Square Deviation
SGLTs	Co-transporteurs sodium/glucose
SJGST	Glutathion S-transférase de <i>Schistosoma japonicum</i>
TBTA	Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
UHPLC	Chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance
UGM	UDP-galactopyranose mutase
UV	Ultraviolet

Introduction Générale

Le diabète est une maladie que se caractérise par une hyperglycémie chronique due à un dysfonctionnement de l'assimilation et de l'utilisation des sucres dans l'organisme. De plus en plus de personnes sont atteintes de cette maladie qui, mal traitée, peut entraîner de nombreuses complications (problèmes cardiaques et rénaux, cécité, amputation). Le diabète de type 2 est le plus couramment rencontré et plusieurs stratégies permettent de le traiter. Parmi les différentes cibles thérapeutiques connues, la Glycogène Phosphorylase (GP) a été largement étudiée. C'est l'une des trois enzymes qui catalyse la glycogénolyse, elle est ainsi directement responsable d'une partie de la production de glucose dans l'organisme. Son inhibition permet donc de réduire la quantité de glucose produite et, par conséquent, de contrôler la glycémie. L'objectif de cette thèse est donc d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la GP en utilisant deux approches : (1) la multivalence et (2) la chimie combinatoire dynamique.

Au laboratoire LCO2, des inhibiteurs du site catalytique de la GP ont été synthétisés et ont montré une très bonne inhibition de l'enzyme *in vitro*. Des études *in vivo* sur le rat diabétique ont été réalisées et les résultats mettent en évidence une diminution notable de la glycémie chez le rat Zucker diabétique.

Dans une autre étude préliminaire menée au laboratoire, des composés trivalents ont été synthétisés. Leur évaluation biologique a été effectuée et une comparaison faite entre l'inhibition de ces derniers avec les dérivés monovalents correspondants. Les résultats dévoilent une inhibition plus élevée pour les composés trivalents, indiquant un faible effet multivalent sur l'inhibition de la GP.

La Chimie Combinatoire Dynamique (CCD) repose sur le principe de l'équilibre thermodynamique de formation de liaisons covalentes réversibles. Cet équilibre thermodynamique peut être déplacé par l'application d'un stimulus externe ou l'ajout d'une molécule (alors appelée « template »). La mise en réaction de plusieurs briques moléculaires possédant des groupements capables de former des liaisons réversibles permet d'obtenir un mélange de composés, la distribution des espèces dans le mélange dépendant directement de la stabilité thermodynamique des différents constituants. L'application d'un stimulus externe va modifier cet équilibre et engendrer une nouvelle distribution en amplifiant les espèces ayant une affinité pour le stimulus (ou template) introduit. L'application de cette stratégie à une enzyme permet alors, en une seule étape, de déterminer les meilleurs ligands parmi un grand nombre d'espèces en équilibre.

Le premier chapitre introduit le contexte général de notre étude en se basant sur la littérature. La structure générale et les différents modes d'inhibition de la glycogène phosphorylase sont présentés. Le concept de la multivalence est introduit et illustré par des applications sur les enzymes. La chimie combinatoire dynamique est explicitée et son application aux protéines détaillée. Ainsi, une description du choix des conditions opératoires mais aussi du type de la liaison covalente réversible choisie est réalisée.

Le second chapitre porte sur la conception et la synthèse de composés multivalents en vue de l'inhibition de la GP. Ainsi, des études par docking et dynamique moléculaire permettant la conception des plateformes multivalentes sont détaillées. Diverses synthèses donnant accès à deux composés multivalents sont réalisées. Les échecs synthétiques qui ont été rencontrés sont aussi décrits dans ce chapitre.

Le dernier chapitre présente la mise en place d'une expérience de CCD appliquée à la GP en utilisant la formation d'acylhydrazones. Ainsi, la synthèse des briques moléculaires est décrite et les conditions opératoires définies. Les expériences de CCD sont menées et permettent l'amplification d'une espèce. La synthèse des acylhydrazones et l'évaluation biologique de ces dernières est réalisée.

Chapitre I. Introduction – Diabète et glycogène phosphorylase, inhibiteurs glycosidiques entre multivalence et chimie combinatoire dynamique

I.1. Le diabète est ses cibles thérapeutiques

I.1.1. Rappels sur la glycémie

La glycémie représente le taux de glucose dans le sang. Chez l'homme à jeun, ce taux se situe entre 0,80 et 1,26 g/L de sang. Le glucose étant la source d'énergie principale des différents organes, ce taux est régulé par l'organisme pour garder un apport énergétique constant. Plusieurs organes jouent un rôle dans cette régulation. Le foie est capable de réguler la production ou le stockage de glucose grâce à différents procédés comme la glycogénogénèse (synthèse de glycogène), la glycogénolyse (hydrolyse du glycogène pour libérer le glucose) ou encore la gluconéogenèse.

Le rôle du pancréas est de produire des hormones pour réguler cette production ou stockage de glucose par le foie. Lors d'une hypoglycémie, les cellules α du pancréas libèrent du glucagon, ce qui résulte d'une production de glucose par le foie. A l'inverse, lors d'une hyperglycémie, les cellules β du pancréas sécrètent de l'insuline, hormone à l'origine du stockage du glucose (Figure 1).

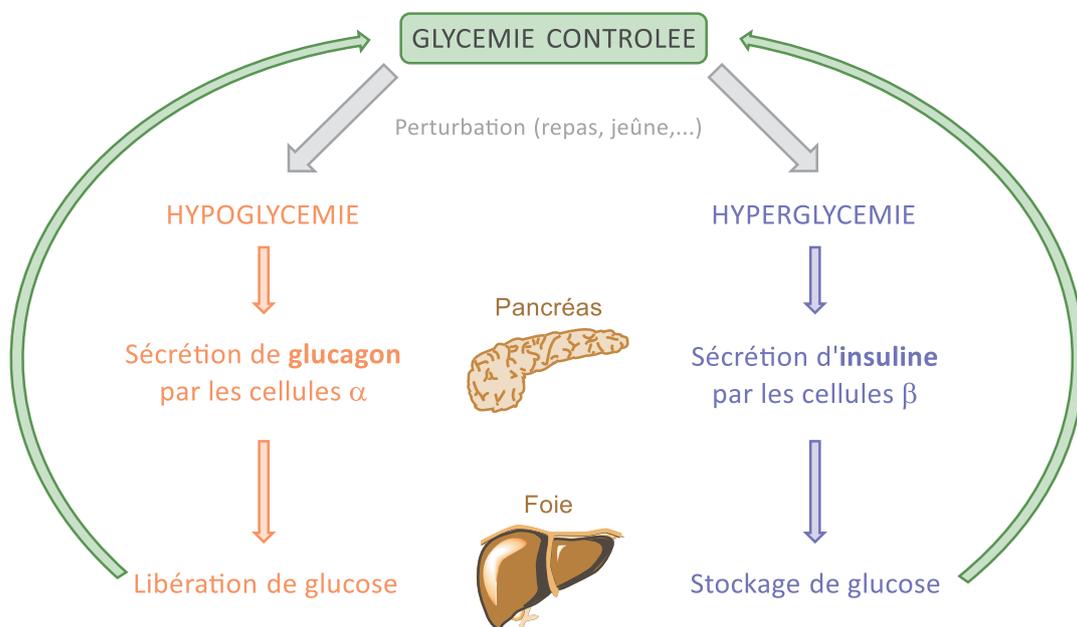


Figure 1 : Régulation de la glycémie

I.1.2. Généralités sur le diabète

Le diabète est une maladie que se caractérise par une hyperglycémie chronique due à un dysfonctionnement de l'assimilation et de l'utilisation des sucres dans l'organisme. Le nombre de personnes atteintes chaque année est en constante augmentation. En 2019, la fédération internationale du diabète a recensé 463 millions de personnes diabétiques et elle estime à 700 millions le nombre de cas pour 2045.^[1] S'il n'est pas correctement traité, le diabète entraîne d'autres complications comme des problèmes cardiaques (infarctus, ...), une insuffisance rénale, la cécité ou encore l'amputation.

I.1.2.1. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1, dit insulino-dépendant, est causé par la destruction auto-immune des cellules β du pancréas. Cette destruction entraîne l'absence quasi-totale de sécrétion d'insuline dans l'organisme atteint.^[2] N'étant plus régulé, le taux de glucose dans le sang est en constante hausse. Pour pallier ce

manque, le patient doit s'injecter de l'insuline pour réguler lui-même sa glycémie. C'est pourquoi le traitement du diabète de type 1 s'accompagne souvent d'épisodes d'hyper ou d'hypoglycémie. Même s'il existe aujourd'hui des méthodes plus commodes avec des systèmes de pompes automatisées, il n'est pas encore possible de mimer le fonctionnement du pancréas en ajustant instantanément la quantité d'insuline injectée en fonction des besoins biologiques. Le diabète de type 1 reste le moins problématique à gérer en terme de santé publique car il peut être relativement bien contrôlé par ces injections d'insuline.

I.1.2.2. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2, dit non-insulinodépendant ou insulino-résistant, est le plus couramment rencontré (plus de 90% des diabétiques). Il se caractérise par deux anomalies physiologiques :

- une résistance à l'insuline par ses récepteurs (récepteur à activité tyrosine kinase)
- une déficience de sécrétion d'insuline

Quelle que soit la défaillance qui survient avant l'autre (résistance à l'insuline ou diminution de la sécrétion), l'une entrainera l'émergence de l'autre dans la suite du développement de la maladie.^{[2],[3]}

Le diabète de type 2 est donc plus difficile à traiter et ne peut être abordé que par des traitements médicamenteux visant à limiter les hyperglycémies en utilisant donc des hypoglycémifiants. Au cours des années, plusieurs cibles thérapeutiques ont été identifiées pour le diabète de type 2 et plusieurs traitements sont aujourd'hui disponibles.

I.1.3. Les traitements et cibles thérapeutiques pour le diabète de type 2

I.1.3.1. Les biguanides

Les biguanides sont principalement représentés par la metformine (Figure 2), qui est donnée en première intention dans le traitement du diabète de type 2. Elle est utilisée en Europe depuis les années 60-70 comme médicament hypoglycémifiant, alors que son mécanisme d'action n'était pas connu. Elle a été autorisée sur le marché américain par la FDA en 1995.^[4]

Le mode d'action de la metformine est complexe mais il a été montré qu'elle agit sur la réduction de la production hépatique de glucose et qu'elle améliore la sensibilité des organes à l'insuline.^{[5],[6],[7]}

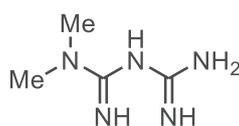


Figure 2 : Structure de la metformine

I.1.3.2. Les thiazolidinediones ou les glitazones

Cette classe de molécules parmi lesquelles les médicaments Avandia® (rosiglitazone) ou encore Actos® (pioglitazone) (Figure 3) diminue la résistance à l'insuline.^[5] Les thiazolidinediones se lient à un récepteur nucléaire, le PPARγ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma), qui contrôle la transcription des gènes. Toutefois, leur mécanisme moléculaire hypoglycémifiant reste peu connu.^[8]

Il faut aussi noter que les médicaments de type rosiglitazone ont été retirés du marché européen en 2010 pour des effets secondaires de type accidents cardiovasculaires.

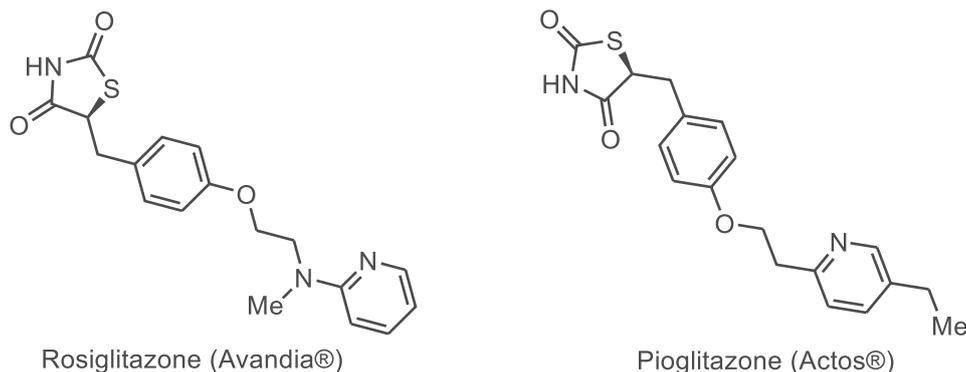


Figure 3 : Structure de la rosiglitazone et de la pioglitazone

1.1.3.3. Les insulinosécréteurs : sulfonurées et glinides

Les insulinosécréteurs sont répartis en deux grandes classes de molécules :

- les sulfonurées (ou sulfamides hypoglycémiant) comme le gliclazide (Diamicon®) qui a été mis sur le marché en 2013 par Pharma Lab (Figure 4)
- les glinides comme la répaglinide (Novonorm®) qui est actuellement la seule molécule de cette classe à être commercialisée en France (Figure 4)

Ces deux familles de molécules ont le même mode d'action. Elles agissent sur les récepteurs des canaux potassiques des cellules β du pancréas, et provoquent la fermeture de ces derniers. Il s'en suit donc une dépolarisation membranaire qui provoque cette fois-ci l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendant, et donc un flux d'ions calcium. Ce flux de cation va finalement provoquer l'exocytose des glandes sécrétoires d'insuline et donc la production d'insuline.^{[9],[10]}

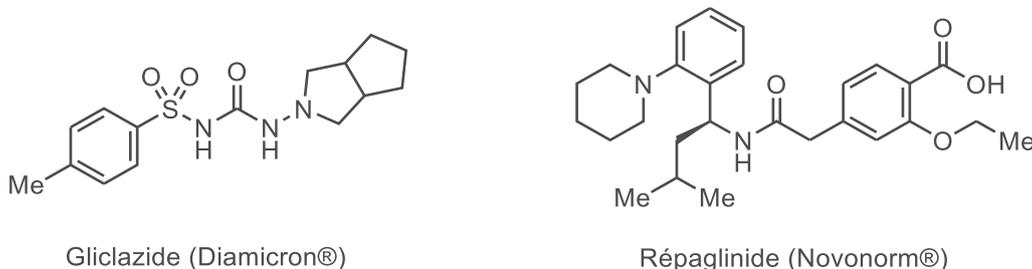


Figure 4 : Structure de la gliclazide et de la répaglinide

1.1.3.4. Les inhibiteurs des α -glucosidases

L'exemple le plus connu est l'acarbose (Glucor®, Bayer) approuvé sur le marché français en 1988 (Figure 5). Les α -glucosidases, présentes notamment dans l'intestin, sont des enzymes qui hydrolysent les polysaccharides en glucose. L'inhibition de leur activité permet donc une diminution de l'absorption des glucides dans l'intestin. Les inhibiteurs des α -glucosidases permettent ainsi de réguler la glycémie post-prandiale.

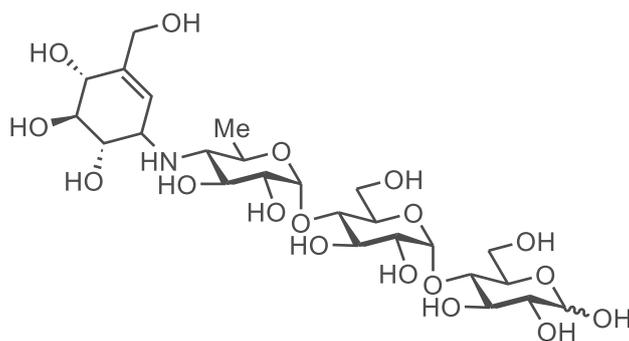


Figure 5 : Structure de l'acarbose

I.1.3.5. Les incrétino-mimétiques ou incrétines

Des études ont montré que la quantité d'insuline sécrétée chez un individu sain dépend du mode d'ingestion du glucose. Ainsi, le niveau d'insuline est plus élevé si le glucose est absorbé oralement que s'il est injecté en intraveineuse. Dès lors, une nouvelle classe d'hormones, les incrétines, ont été identifiées comme responsables de cette production d'insuline. En 1987, Drucker *et al.* montrent que cette sécrétion d'insuline dépend principalement d'une incrétine : le GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1).^[11]

Le GLP-1 est produit par les cellules entéro-endocrines dans le petit intestin et le colon quelques minutes après l'ingestion de nourriture. Il permet d'augmenter la sécrétion d'insuline, d'inhiber la libération du glucagon dans le pancréas et de ralentir la vidange gastrique, ayant pour effet une sensation de satiété. Comme il possède une alanine en position 2, le GLP-1 est un très bon substrat pour la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) et il est malheureusement dégradé très facilement par cette enzyme.^[12]

L'amélioration de ces incrétines est donc une piste thérapeutique intéressante pour le traitement du diabète de type 2 en distinguant deux stratégies pour lutter contre l'hyperglycémie :

- faire un mime du GLP-1 qui aura une meilleure résistance métabolique
- inhiber la DPP-4 pour permettre la non-dégradation du GLP-1 (Onglyza®, saxagliptine)

Ainsi, plusieurs molécules ont été conçues comme la liraglutide (Victoza®).^[13] Bien que la liraglutide possède 97% de ressemblance avec le GLP-1, il a été montré que son activité dans l'organisme dure 2,5 à 5 fois plus longtemps que celle du GLP-1.

Il existe aussi des inhibiteurs de la DPP-4 comme la saxagliptine (Onglyza®) (Figure 6) qui a une grande sélectivité pour la DPP-4 et peu d'effets secondaires, ce qui en fait un bon médicament généralement employé en double thérapie avec d'autres hypoglycémifiants.^[14]

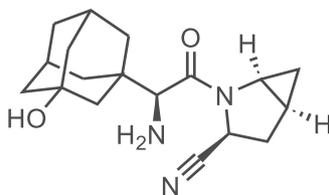


Figure 6 : Structure de la saxagliptine

I.1.3.6. Les inhibiteurs du SGLT2

Les transporteurs de glucose jouent un rôle important dans le contrôle de la glycémie puisqu'ils permettent au glucose de traverser les membranes cellulaires. Parmi ces protéines, les co-

transporteurs sodium/glucose (SGLTs) sont impliqués dans l'absorption et la réabsorption rénale du glucose. Ils sont principalement localisés dans le petit intestin (SGLT1) et dans les tubules proximaux du néphron (SGLT1 et SGLT2). Leur mécanisme symport utilise l'énergie du gradient de sodium pour transporter le glucose à travers la membrane apicale, à l'encontre du gradient de concentration du glucose.^{[15],[16],[17]}

Sous hyperglycémie, les SGLTs sont saturés et l'excès de glucose est évacué par les urines. Cependant, chez les patients atteints du diabète de type 2, les SGLT2 sont souvent sur-exprimés. Le glucose est alors mieux réabsorbé, ce qui entretient l'hyperglycémie. Une inhibition des SGLTs a donc été envisagée pour contrôler la glycémie.

La phlorizine (Figure 7) est le premier inhibiteur qui a été découvert, elle agit aussi bien sur les SGLT1 que sur les SGLT2. Comme les SGLT1 sont largement exprimés dans l'intestin, cette absence de sélectivité a des répercussions gastro-intestinales indésirables. En s'inspirant de la phlorizine, les chercheurs ont donc développé une classe de molécules, les gliflozines (tofogliflozine, empagliflozine, dapagliflozine) qui inhibent sélectivement les SGLT2 (Figure 7).^{[18],[19]}

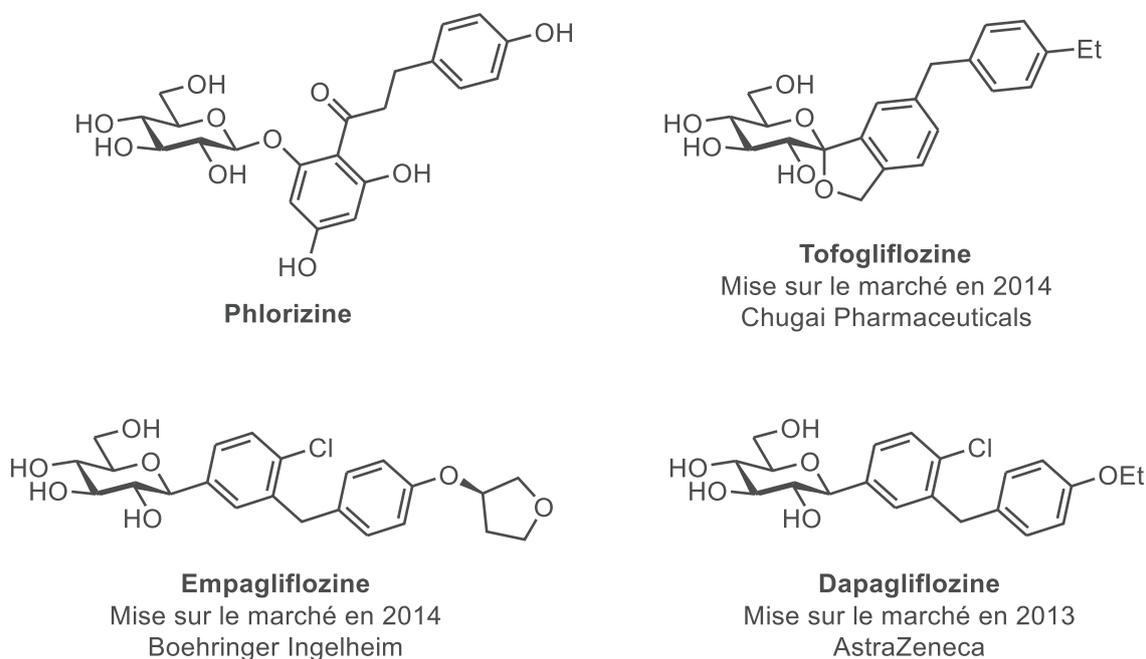


Figure 7 : Inhibiteurs des SGLT2

1.1.3.7. La Glycogène Phosphorylase

Chez l'humain, la Glycogène Phosphorylase (GP) est une enzyme présente dans le foie, les muscles et le cerveau, l'enzyme du foie étant identique à 80% avec celle du muscle et du cerveau, les deux dernières étant identiques entre elles à 84%. Elle catalyse la première étape de la glycogénolyse et réagit donc avec la dernière unité glucose non réducteur d'une branche de glycogène pour phosphoryler la liaison α -1,4-glycosidique et relarguer le glycogène et du glucose-1-phosphate (Schéma 1). Dans les muscles, le glucose-1-phosphate est utilisé via glycolyse pour générer de l'énergie métabolique. Dans le foie cependant, ce glucose rentre ensuite en réaction enzymatique avec la phosphoglucomutase où le phosphate est transféré de la position 1 à la position 6. Enfin, une dernière enzyme catalyse la transformation du glucose-6-phosphate en glucose.

Introduction – Diabète et glycogène phosphorylase, inhibiteurs glycosidiques entre multivalence et chimie combinatoire dynamique

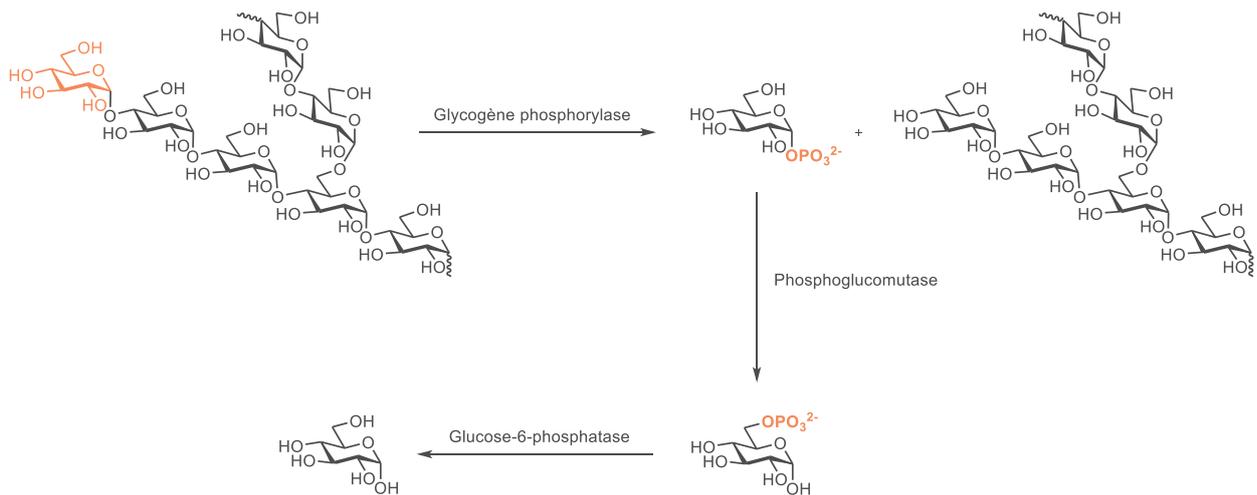


Schéma 1 : Mécanisme de la glycogénolyse

Cette enzyme est une bonne cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 puisqu'elle est responsable d'une partie de la production de glucose dans l'organisme. Une inhibition sélective de la GP du foie peut donc être une stratégie pour l'élaboration d'un médicament hypoglycémiant.

I.1.4. La Glycogène Phosphorylase

I.1.4.1. Généralités et structure

Depuis de nombreuses années, des études structurales de la GP ont permis de bien connaître ses différentes propriétés. L'isoenzyme la plus étudiée est de loin celle issue du muscle de lapin. La GP est un dimère composé de deux sous unités de 97,5 kDa chacune et d'un cofacteur essentiel à son activité, le pyridoxal phosphate, lié à la lysine 680 par une base de Schiff dans chaque monomère.^[20]

La GP existe dans deux formes interconvertibles : une forme peu active non-phosphorylée (GPb) et une forme activée phosphorylée sur la sérine 14 (GPa). Le mécanisme d'interconversion impliquant la phosphorylase kinase et la phosphorylase phosphatase a été établi en 1956 par Fischer *et coll.*^[21] Pour ces deux formes (GPa et GPb), des agents allostériques peuvent favoriser un équilibre entre un état actif (état relaxé R) et un état peu actif (état tendu T). Si l'AMP est capable de favoriser l'état relaxé pour les deux formes, il a été montré que le glucose lui-même est un inhibiteur et qu'il favorise l'état tendu de la GPa et de la GPb.^{[20],[22]} Il existe aussi des inhibiteurs allostériques tels que la caféine qui favorisent l'état T (Schéma 2).^[23]

Introduction – Diabète et glycogène phosphorylase, inhibiteurs glycosidiques entre multivalence et chimie combinatoire dynamique

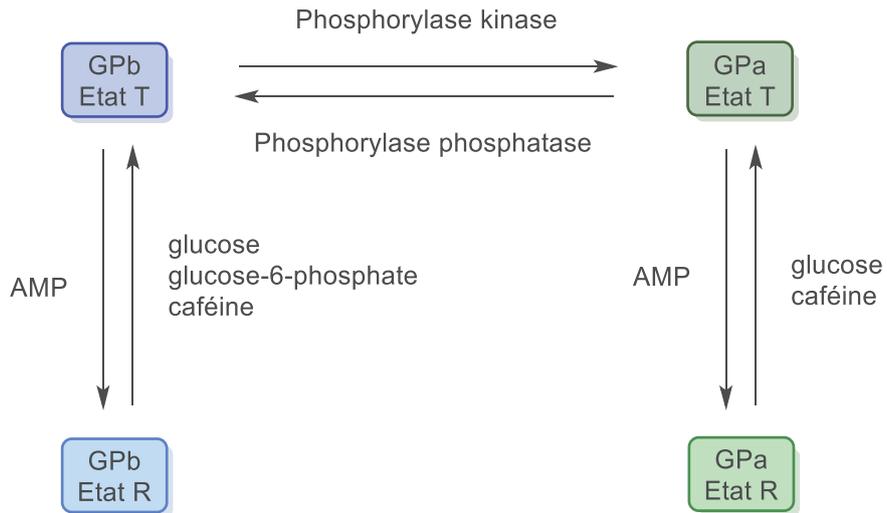


Schéma 2 : Mécanisme d'interconversion entre les différentes formes et états de la GP

Le modèle de Monod-Wyman-Changeux^[24] décrit la transition allostérique des protéines et postule qu'en l'absence de régulateur, les protéines existent dans différents états inter-convertibles. La glycogène phosphorylase suit le modèle de Monod-Wyman-Changeux et possède plusieurs sites d'inhibition, il y a au total six sites potentiels de régulation pour la GP connus à ce jour (Figure 8).

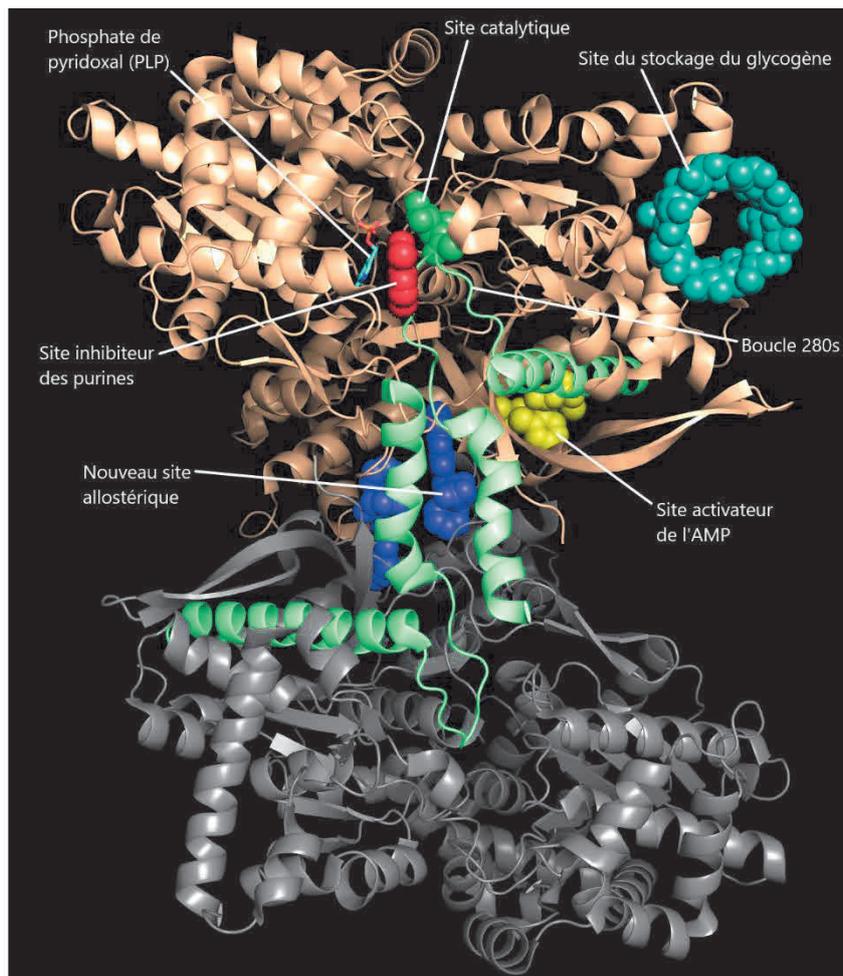


Figure 8 : Structure dimérique de la GP : représentation des sites régulateurs de la GP sur l'un des monomères (en beige et gris les deux monomères et en vert clair la chaîne de la boucle 280s)

Le **site catalytique** ou site actif se lie au glycogène et aux inhibiteurs analogues du glucose. A l'entrée de ce site se situe la boucle 280s qui agit comme une porte. Cette boucle est ouverte dans l'état relaxé R, laissant alors la possibilité au substrat d'avoir accès au site catalytique. A contrario, elle est repliée dans l'état tendu T bloquant ainsi l'entrée du site actif (Figure 8). Dans le dimère, les deux sites catalytiques de chaque monomère sont séparés d'une distance d'environ 100 Å.

Le **site inhibiteur** se situe à 12 Å du site catalytique et est un récepteur pour les purines. De nombreux inhibiteurs allostériques pour ce site ont été reportés au cours des années. Par exemple, la caféine (Figure 8 et Figure 9) a un effet inhibiteur en se liant à ce site ($IC_{50} = 140$ nM). Il a été montré que sa grande affinité est due à la forte interaction aromatique qu'elle fait avec la Phe285 et la Tyr613 présentes dans le site inhibiteur. De plus, la caféine stabilise la position de la boucle 280s du site catalytique dans son état tendu T.^[25]

Le **site allostérique** est inhibé par le glucose-6-phosphate et autres ligands phosphorylés, c'est aussi le site activateur de l'AMP. Il se situe en surface de la protéine, au-dessus de l'interface des deux monomères (Figure 8). Zographos *et al.* ont reporté un inhibiteur puissant ($K_i = 1,6$ nM) pour ce site de régulation. Le composé, nommé Bay W1807, est un diacide carboxylique (Figure 9) qui mime le groupement phosphate qui se lie habituellement au site activateur de l'AMP.^[26]

Le **nouveau site allostérique** peut être inhibé par des dérivés d'indoles et de carboxamides.^[27] Il se trouve à l'interface des deux unités monomériques, dans la cavité centrale de la protéine (Figure 8). En 2000, Oikonomakos *et al.* ont décrit ce nouveau site allostérique et ont aussi reporté un inhibiteur efficace pour ce dernier avec un indole-2-carboxamide, le CP320626 (Figure 9), qui a un IC_{50} de 250 μ M.^[23]

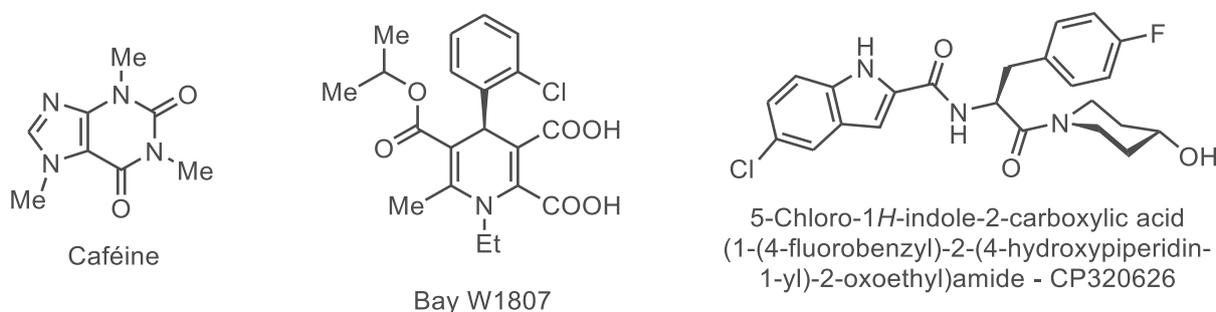


Figure 9 : Inhibiteurs allostériques de la GP

Le **site de phosphorylation**, où se trouve la sérine 14, assure la phosphorylation de la protéine et donc son changement de forme entre GP_a et GP_b.

Enfin, le **site de stockage du glycogène**, situé à 30 Å du site catalytique, permet et stabilise l'association entre la GP et le glycogène pendant l'hydrolyse de la dernière entité glucose du substrat. Il a été montré par plusieurs analyses cristallographiques que le site de stockage du glycogène était capable de lier d'autres oligomères de glucose comme les β - et γ -cyclodextrines (Figure 8).^[28]

1.1.4.2. Le site catalytique

Le site catalytique se situe au centre de la sous-unité sur chaque monomère, enfouie à 15 Å de la surface de la protéine. Il est accessible via un canal dont l'accès est contrôlé par une boucle d'acide

aminés appelée la boucle 280s (résidus 281 à 287). Dans l'état tendu T, cette boucle est refermée sur le site catalytique (Figure 10) et le résidu Asp283 de la boucle pointe en direction du site catalytique. Il établit alors une liaison hydrogène avec le résidu His571, ce qui le stabilise dans cette position (Figure 10). Dans l'état T, la boucle 280s établit aussi des interactions stabilisantes avec une autre boucle formée par les résidus 377 à 384, la boucle 380s.^[29] Ces interactions renforcent la position de la boucle 280s et expliquent l'impossibilité des potentiels substrats d'avoir accès au site catalytique.

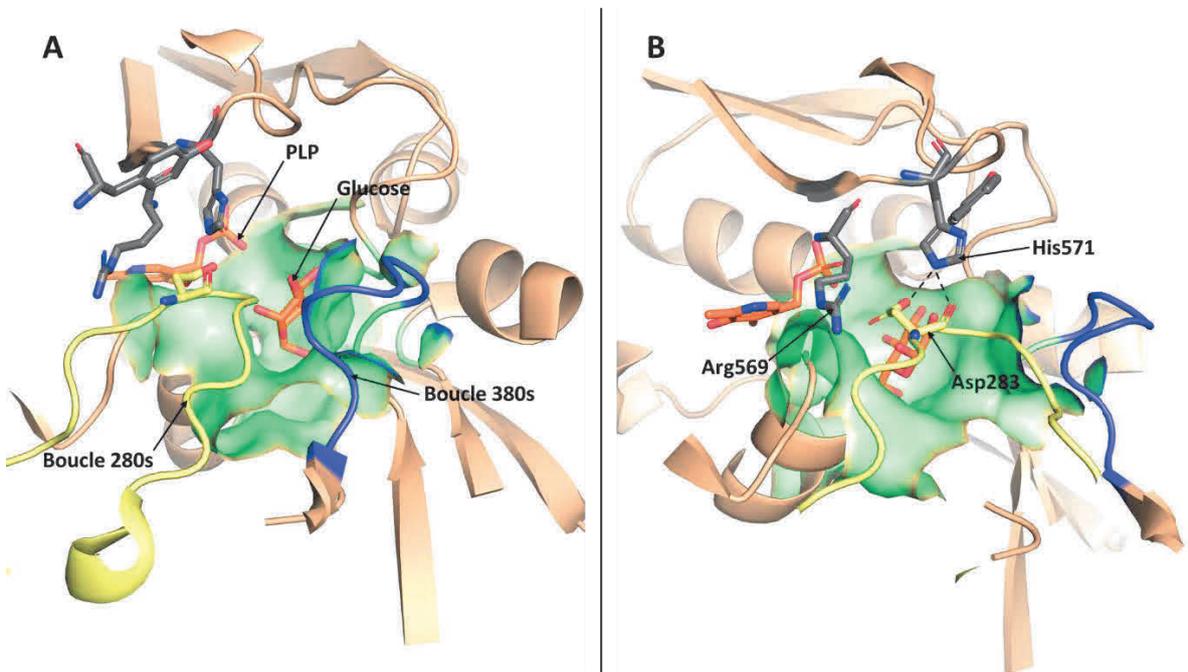


Figure 10 : (A) Représentation rapprochée du site catalytique de la GP dans l'état tendu T. Ici, la surface du site est représentée en vert et le glucose en orange. (B) Le PLP est représenté en orange, la boucle 280s (en jaune) est repliée sur le site catalytique et est stabilisée par la boucle 380s (en bleu). A droite, les liaisons hydrogènes avec les acides aminés (en gris) sont elles aussi représentées (code PDB : 2GPB).

Dans l'état relaxé R cependant, la boucle 380s subit un changement conformationnel, ce qui induit une déconnexion de la boucle 280s vers une forme « ouverte ». Dans cette nouvelle conformation, l'His571 casse son interaction hydrogène avec l'Asp283 pour en former une nouvelle avec la Tyr613 et l'Arg569 (Figure 11). La boucle 280s ne bloque désormais plus l'accès au site catalytique qui est ouvert aux substrats.^[29]

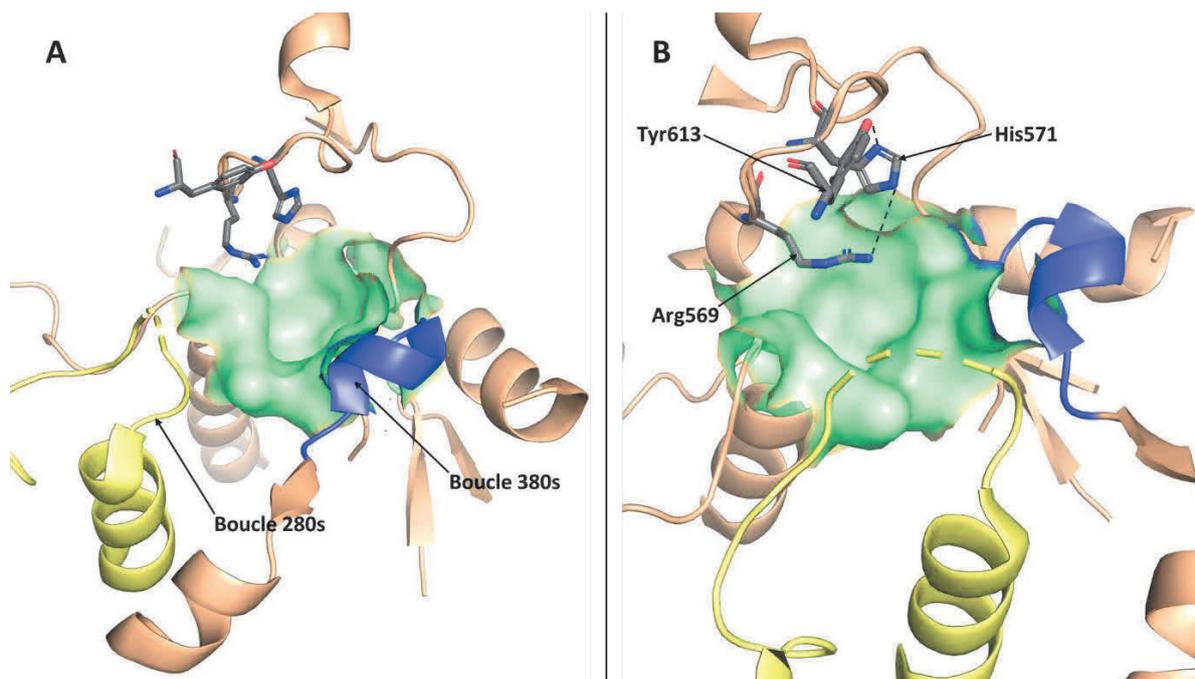


Figure 11 : (A) Représentation rapprochée du site catalytique de la GP dans l'état relaxé R. Dans la poche du site catalytique (en vert), il n'y a cette fois-ci rien dans le site catalytique. La boucle 380s (en bleu) a changé de conformation et ne stabilise plus la boucle 280s. (B) A droite, His571 est stabilisée par Arg569 et la Tyr613 (code PDB : 3E3L).

1.1.4.3. Les inhibiteurs connus du site catalytique

Comme le glucose est le substrat naturel de la GP, la synthèse d'analogues à base de glucose fut un point de départ pour la recherche d'inhibiteurs de la GP. Les C-glucosides ont donc été les molécules les plus étudiées ces dernières années. Bien que de nombreuses molécules aient été reportées à ce jour, il est possible de les classer en trois grandes catégories : les dérivés C-glucosyls aromatiques, les dérivés C-glucosyl hétéro-aromatiques et les dérivés spiro-glucosyl.

Oikonomakos *et coll.* ont reportés une série d'inhibiteurs aromatiques pour la GP (Figure 12). Les composés **1** à **4** ont montré une inhibition modeste pouvant atteindre le micromolaire pour les composés **3** et **4**.^{[30],[31]}

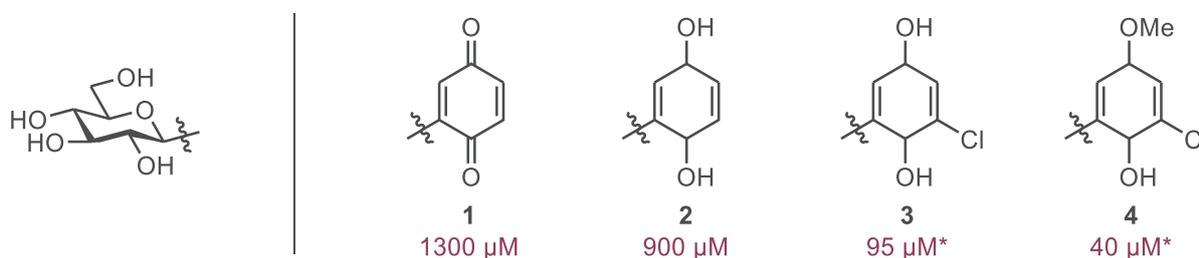


Figure 12 : Inhibiteurs C-glucosyls aromatique de la GP. Inhibitions In vitro évaluées par K_i (ou $^*IC_{50}$)

Les C-glucosyls hétéro-aromatiques font partie des meilleurs inhibiteurs de la GP. Ils sont tous construits de la même façon (Figure 13) avec un hétérocycle qui porte un groupement aromatique d'un côté et qui est relié au glucose en anomérie β de l'autre.

Des études ont montré que le pouvoir inhibiteur de ces composés hétéro-aromatiques est dû à la possibilité de pouvoir établir une ou plusieurs liaisons hydrogènes entre l'hétérocycle et les résidus

proche du site catalytique.^[32] Praly *et coll.* et Somsák *et coll.* ont aussi montré l'importance de la nature des hétérocycles en prenant pour exemple les imidazoles **5** et **6a** et les oxadiazoles **7**, **8** et **9**.^[18] Dans cette catégorie, nous pourrions noter que pour un même pharmacophore (2-naphtyl), la régioisomérisie du motif oxadiazole influence l'inhibition pour l'enzyme. Le meilleur inhibiteur de cette catégorie a été reporté par Somsák *et coll.* avec le dérivé imidazole **6b** (Figure 13).^[33] Une version glucosamine de ce composé a aussi montré une excellente inhibition avec un K_i de 0,191 μM .^[32]

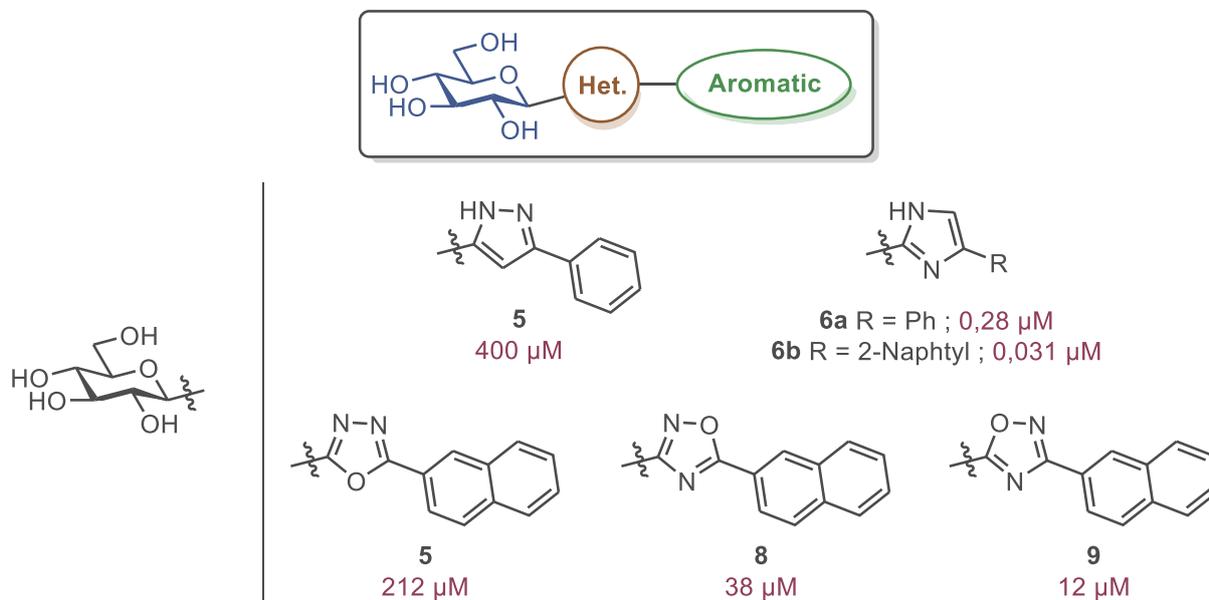


Figure 13 : Inhibiteurs C-glucosyls hétéro-aromatiques de la GP. Inhibitions *in vitro* évaluées par K_i

Les structures cristallographiques des glycogènes phosphorylases du foie et des muscles étant bien connues, une large étude utilisant la modélisation moléculaire et les techniques de docking a permis de faire le screening de nombreux substituants aromatiques porté par un hétérocycle particulier, le 1,2,4-triazole (Figure 14).^[34] Après sélection des meilleurs candidats, la synthèse des molécules et les tests biologiques ont permis de découvrir de nouveaux inhibiteurs potentiels. Selon cette même étude, le dérivé 2-naphtyl est le groupement aromatique qui donne les meilleurs résultats d'inhibition à ce jour.

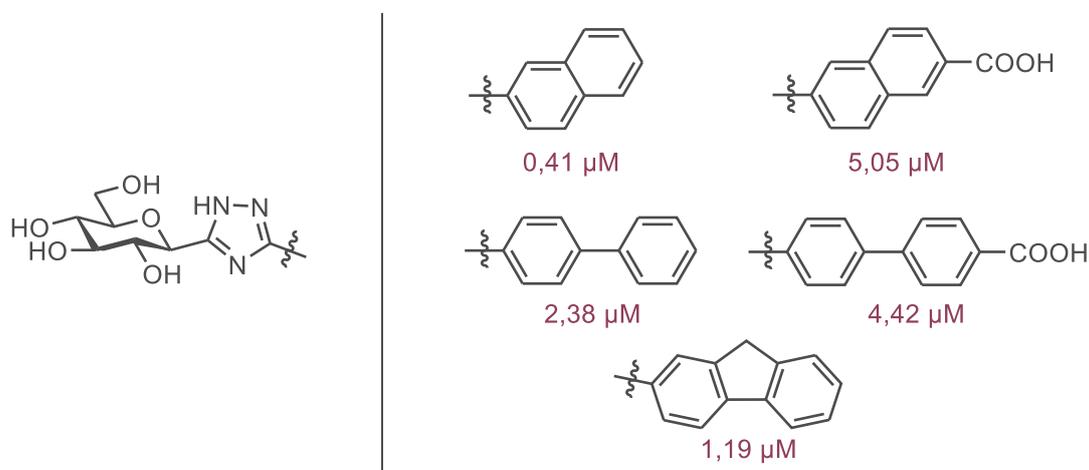


Figure 14 : 1,2,4-Triazoles et inhibitions *in vitro* mesurées par K_i sur la rmGPb

Les premiers dérivés spiro-glucosyl reportés sont des spiro-hydantoïnes (Figure 15) avec une activité micromolaire sur la rmGPb.^[35] Il a été montré que le pouvoir inhibiteur du composé **10** est dû au réseau de liaisons hydrogènes qu'il établit avec les différents acides aminés du site catalytique.^[36] D'autres analogues du composé **10** exploitent la même stratégie et les différences d'activités peuvent s'expliquer par le nombre plus grand ou plus petit de liaisons hydrogènes établies.

Plusieurs précédentes études menés au laboratoire par J.-P. Praly et S. Vidal ont permis de mettre en avant d'autres inhibiteurs spiro-glucosyl (molécules **13** et **14** Figure 15).^{[37],[38]} Ces inhibiteurs conservent le réseau de liaisons hydrogènes établi par le cycle spiro mais exploitent aussi les interactions de la poche β du site catalytique situé sous la boucle 280s (Figure 16).

Vidal *et coll.* ont aussi réalisé une étude plus approfondie avec les tests *in vitro* et *in vivo* de plusieurs dérivés aryls glucopyranosylidène-spiro-isoxazoline.^[39] Le composé 2-naphtyl (molécule **13** Figure 15) a été identifié comme étant le meilleur de cette étude, et a montré une diminution du taux de glucose dans le sang de 33% pour une dose de 30 mg/kg.

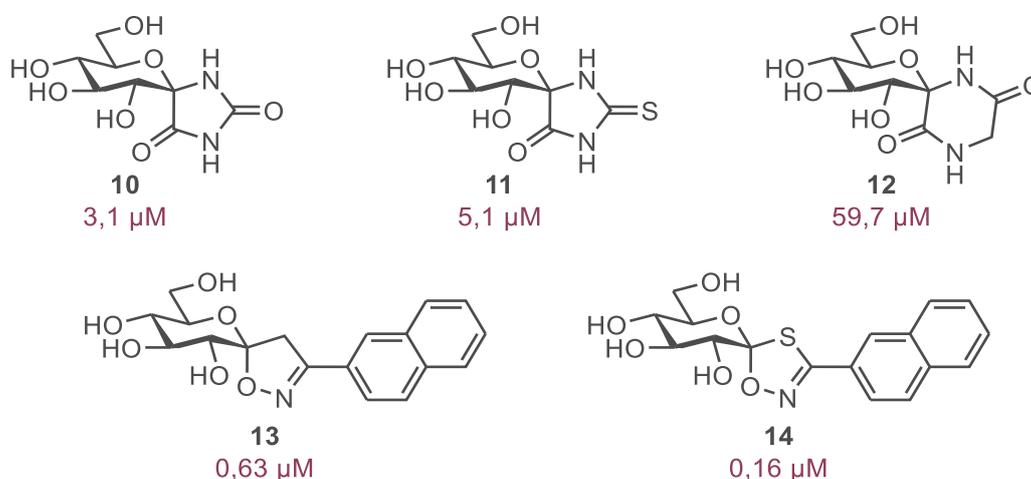


Figure 15 : Inhibiteurs spiro-glucosyl de la GP. Inhibitions *in vitro* (K_i) sur la rmGPb

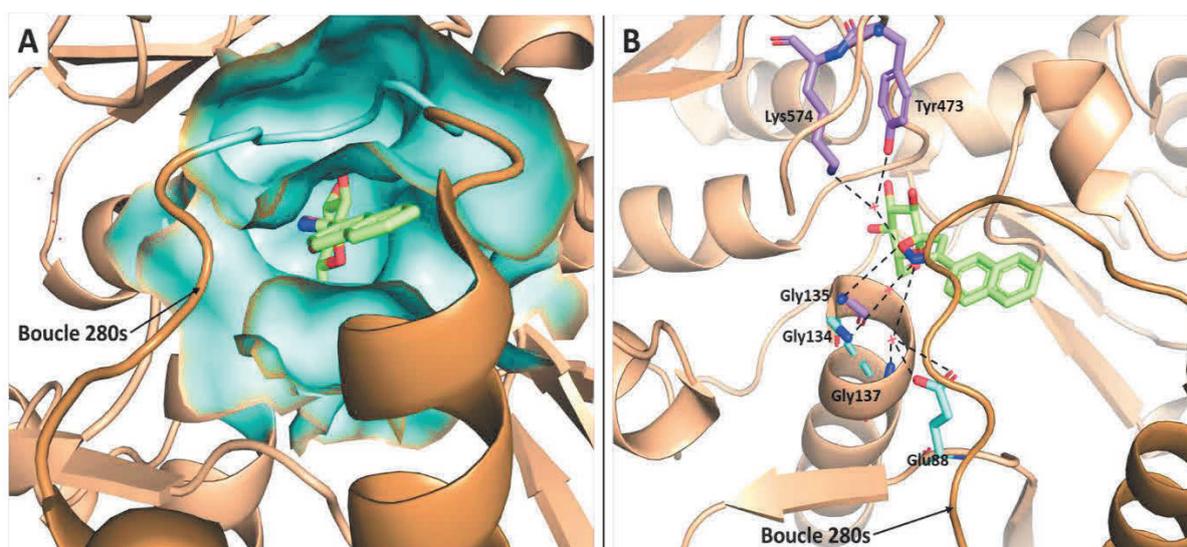


Figure 16 : Structure RX (site catalytique) du co-cristal de la rmGPb avec l'inhibiteur spiro-isoxazoline **13**. (A) Surface du site catalytique avec la poche β située sous la boucle 280s est représenté en bleu. (B) Représentation du réseau de liaisons hydrogènes établi par les atomes d'oxygène et d'azote du cycle isoxazoline. Ces liaisons sont directes ou réalisées par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (croix rouge) (code PDB : 2QRP).

I.2. La multivalence

I.2.1. Principe de la multivalence

Les interactions multivalentes se caractérisent par la connexion simultanée de plusieurs ligands sur un seul élément biologique qui possède plusieurs récepteurs. Elles se distinguent des interactions monovalentes par leurs caractéristiques particulières, notamment leur force de liaison bien plus élevée que la liaison monovalente de même nature. Un objet multivalent est ainsi caractérisé par sa valence et la nature des interactions qu'il met en place avec ses récepteurs.

La valence d'un objet est définie par le nombre de connections séparées, de même nature, qu'il peut mettre en place avec un autre objet, à travers le principe d'interactions ligand-récepteur. Un objet est donc dit multivalent si sa valence est supérieure à 1 (Figure 17). Lors de la connexion simultanée d'un ligand multivalent de valence N avec un récepteur, il est possible de définir une constante d'association. Alors, si cette constante d'association est supérieure au produit de N fois la constante d'association de chaque interaction prises indépendamment, il y a un « effet multivalent ».^[40]

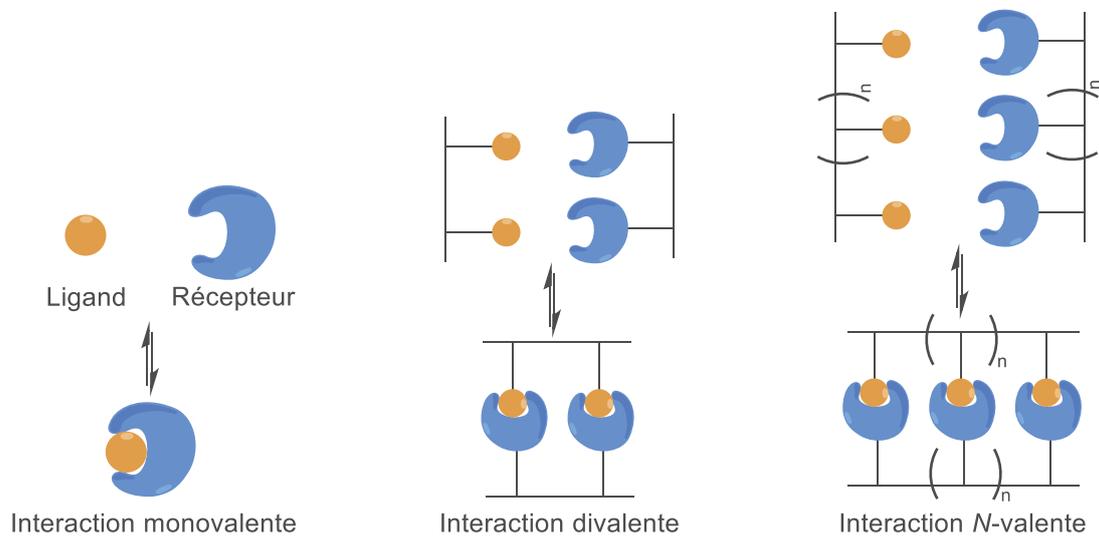


Figure 17 : Représentation de l'interaction multivalente

L'explication de cet effet multivalent repose sur plusieurs caractéristiques comme la coopérativité, l'avidité ou l'affinité. Pour comparer l'efficacité d'un système multivalent de valence N , il faut prendre en compte le même système monovalent avec N récepteurs indépendants qui interagissent avec N ligands indépendants. Afin de simplifier l'étude des interactions multivalentes, Whitesides *et coll.* ont fait l'approximation suivante : l'énergie libre moyenne ΔG_{moy}^{multi} de l'interaction entre N ligands et N récepteurs est égale à l'énergie libre totale du système ΔG_N^{multi} divisée par le nombre d'interaction N .^[40] La constante d'association moyenne de l'interaction K_{moy}^{multi} est ainsi définie par les équations (1) - (3).

$$\Delta G_{moy}^{multi} = \frac{\Delta G_N^{multi}}{N} \quad (1)$$

$$\Delta G = -RT \ln(K) \quad (2)$$

$$K_N^{multi} = (K_{moy}^{multi})^N \quad (3)$$

Le terme qualitatif « affinité » est utilisé pour qualifier une interaction monovalente. Ainsi, la constante d'affinité se définit comme étant la constante K^{mono} de l'interaction. Le terme « avidité » renvoi

cependant à l'interaction multivalente entre N ligands et N récepteurs et la « constante d'avidité » K_N^{multi} est définie par l'équation (3) ci-dessus.

En chimie, la coopérativité mesure la facilité qu'a un ligand multivalent à s'appareiller à un second récepteur, sachant qu'une connexion ligand-récepteur est déjà établie. Elle est mesurée avec le paramètre α , nommé degré de coopérativité que Whitesides *et coll.* définissent avec les équations ci-dessous (4) à (7).^[40]

$$\Delta G_{moy}^{multi} = \alpha \Delta G^{mono} \quad (4)$$

$$N \Delta G_{moy}^{multi} = \Delta G_N^{multi} = \alpha N \Delta G^{mono} \quad (5)$$

$$K_N^{multi} = (K_{moy}^{multi})^N = (K^{mono})^{\alpha N} \quad (6)$$

$$\alpha = \frac{\lg(K_N^{multi})}{\lg(K^{mono})^N} \quad (7)$$

Si l'énergie libre moyenne ΔG_{moy}^{multi} de l'interaction entre un ligand et un récepteur multivalent est plus grande que celle de l'interaction monovalente de même nature ΔG^{mono} , alors $\alpha > 1$ et le système a une coopérativité dite positive. La première connexion entre le ligand multivalent et le récepteur favorise donc l'établissement des suivantes. En revanche, si $\alpha < 1$ alors $\Delta G_{moy}^{multi} < \Delta G^{mono}$ et la coopérativité est dite négative. Dans ce cas la première association défavorise l'établissement des suivantes. Enfin la coopérativité est qualifiée de nulle si $\alpha = 1$. Dans ce cas, chaque interaction ligand-récepteur est indépendante des autres.

En réalité, seulement un petit nombre d'interactions multivalentes avec une coopérativité positive ont été reportés. Cependant, pour un ligand N -valent, une coopérativité négative ne signifie pas que l'avidité du ligand sera inférieure à N fois l'affinité du même ligand monovalent. Whitesides *et coll.* ont donc aussi défini un autre paramètre, appelé facteur d'amélioration β , qui permet d'évaluer plus facilement le potentiel d'avidité d'un ligand multivalent.^[40] Ainsi, selon l'équation (8), si $\beta > N$ l'interaction multivalente est bénéfique, et ce même si la coopérativité est négative.

$$\beta = \frac{K_N^{multi}}{K^{mono}} \quad (8)$$

1.2.2. Les différents types d'interactions multivalentes

Au fil des observations d'effets multivalents dans de multiples systèmes biologiques, les chercheurs ont essayé de rationaliser cette augmentation d'avidité en proposant différents mécanismes pour les interactions multivalentes. Ainsi, l'effet chélate, le regroupement de récepteurs (ou « effet cluster »), l'association d'un site secondaire, le « bind and jump », l'effet stérique ou encore la réticulation sont des interactions qui ont été étudiées par différents groupes de recherche.^{[41],[42]}

1.2.2.1. L'effet chélate

L'effet chélate est le plus connu de toutes les interactions multivalentes car il est le plus observé. Il se base sur le principe de minimisation du coût entropique. Durant la première association du ligand à un premier récepteur, l'organisation spatiale de l'ensemble ligand/récepteur réduit grandement le coût entropique d'une seconde association intramoléculaire (Figure 18).^[41]

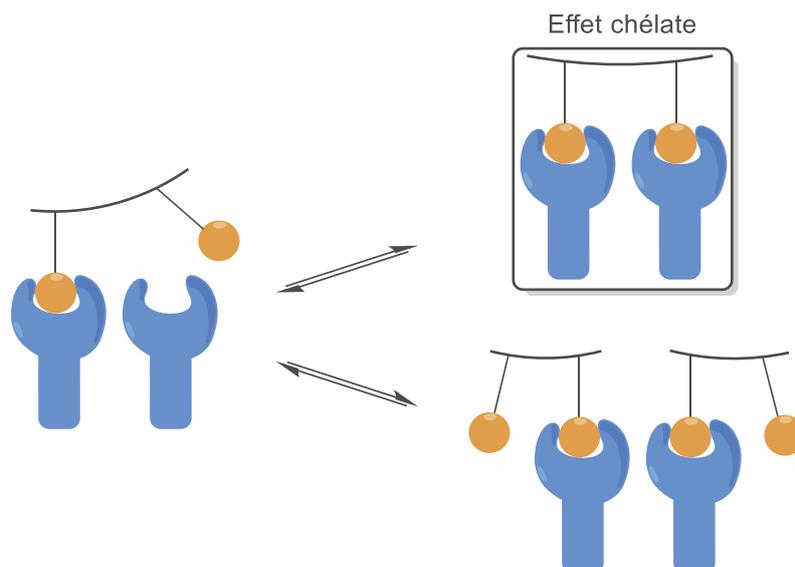


Figure 18 : Représentation de l'effet chélate

Une autre notion qui rentre en compte est la concentration effective, définie par Lees *et al.* comme étant la concentration locale en ligand à l'abord du site récepteur.^[43] Si cette concentration effective est supérieure à la concentration du ligand en solution, alors l'association intramoléculaire est là aussi favorisée. Toutefois, pour que l'effet chélate soit possible, il faut que la géométrie du ligand soit compatible avec la distance qui sépare les différents récepteurs de la cible. Le ligand multivalent doit donc avoir des bras espaceurs assez longs pour permettre à l'unité en bout de bras d'atteindre les sites du récepteur.

Même si l'effet chélate a été largement étudié pour les lectines (protéine dénuée de fonction enzymatique et agissant comme récepteur d'entités osidiques) et autres protéines possédant de multiples sites récepteurs à leur surface,^[44] les exemples d'effet chélate avec les protéines sont plus rares. Il est tout de même possible de prendre pour exemple l'étude de Hoover *et coll.* sur la GP avec un ligand bidentate.^[45] Les auteurs sont partis du constat qu'un inhibiteur de la GP (le CP-403,700) se liait au nouveau site allostérique décrit par Oikonomakos *et al.*^[23] la même année (Figure 19). Comme les deux sites se situent à l'interface entre les deux monomères (un sur chaque entité), ils ne sont séparés que de 6 Å l'un de l'autre. Hoover *et coll.* ont donc construit un ligand divalent en ne gardant que la partie carboxamide d'indole du CP-403,700 qui selon eux était essentielle pour l'interaction avec le récepteur. En reliant les deux carboxamides d'indoles par un espaceur de la bonne dimension (Figure 19), ils ont obtenu un nouvel inhibiteur divalent (le CP-526,423). L'augmentation de l'inhibition du CP-526,423 (IC_{50} 2000 fois meilleur que pour le même composé monovalent CP-305,494) a été rationalisée avec l'obtention d'un co-cristal analysé par diffraction des RX montrant l'occupation des deux récepteurs de la GP par le ligand (Figure 19).^[45]

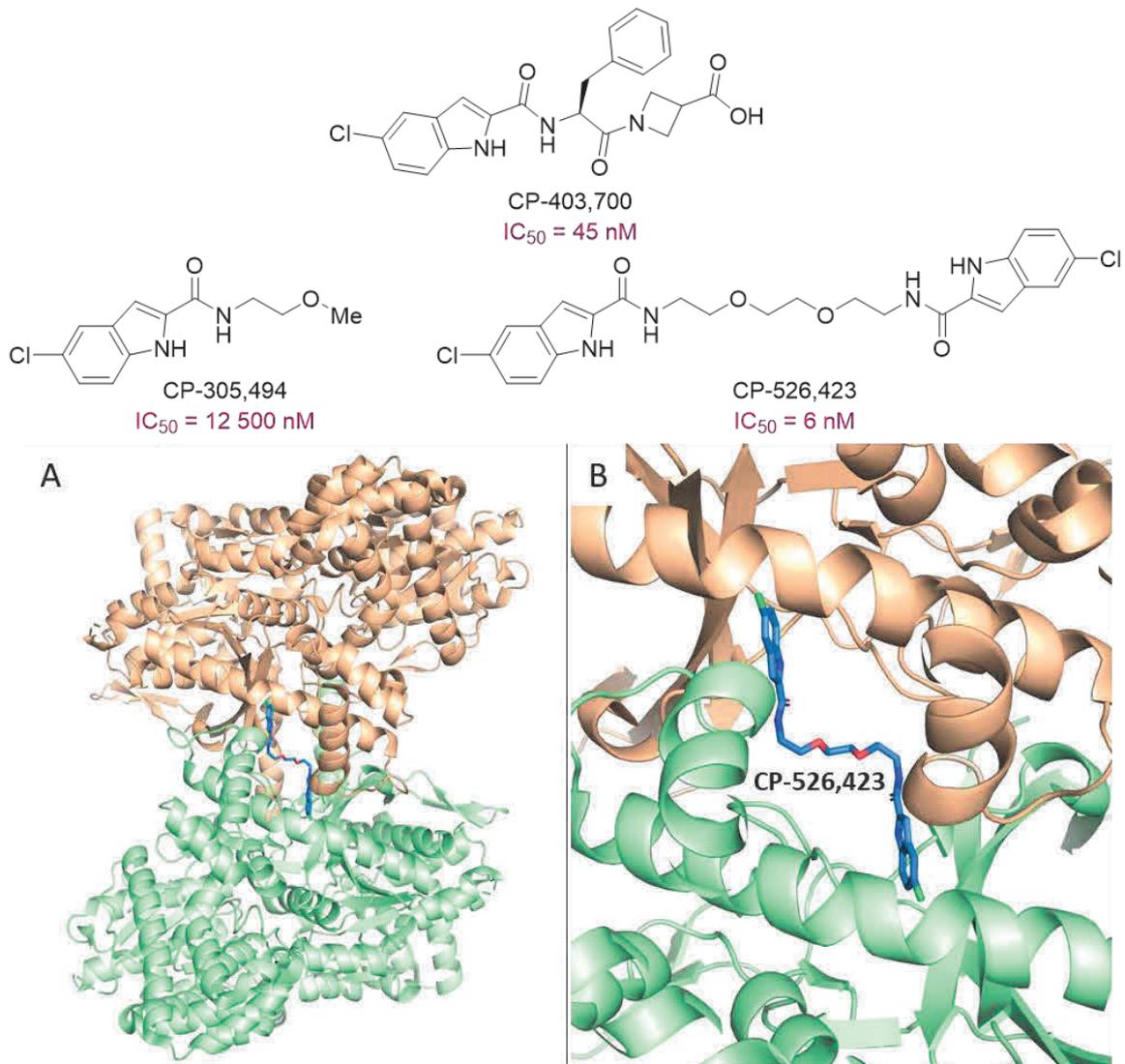


Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la GP avec un inhibiteur divalent (CP-526,423) en vue globale (A) et rapprochée (B). Les deux monomères de la GP sont représentés en beige et vert.

1.2.2.2. Le regroupement de récepteurs

Comme décrit par Kiessling *et coll.*, le regroupement de récepteurs est un mécanisme qui peut avoir lieu dans certains systèmes ligand-récepteur. Le mécanisme repose sur le fait que les récepteurs de la cible vont s'orienter et se réarranger lors de l'approche d'un ligand multivalent pour s'adapter à la géométrie de ce dernier (Figure 20).^[41] Ce phénomène est bien connu notamment à la surface des cellules, où la fluidité de la membrane lipidique permet cette liberté de mouvement.

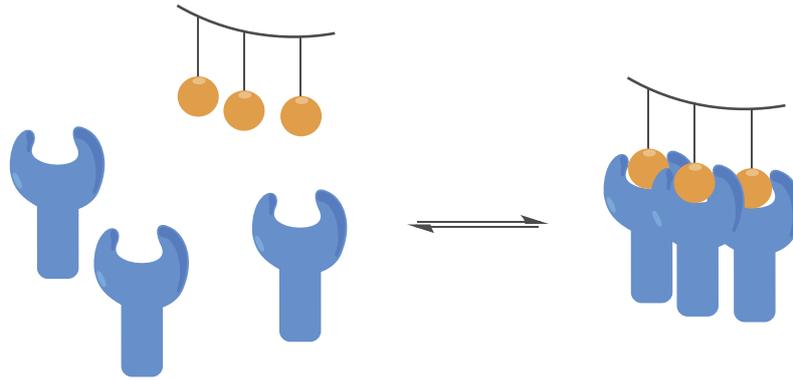


Figure 20 : Représentation du regroupement de récepteurs

1.2.2.3. L'association dans un site secondaire

Ce mécanisme repose sur le constat que certains récepteurs possèdent deux sites d'association de nature différente proches l'un de l'autre. A l'instar de l'effet chélate, le design d'un ligand possédant les deux épitopes correspondant aux deux récepteurs ciblés peut améliorer l'affinité (Figure 21).^{[41],[46]}

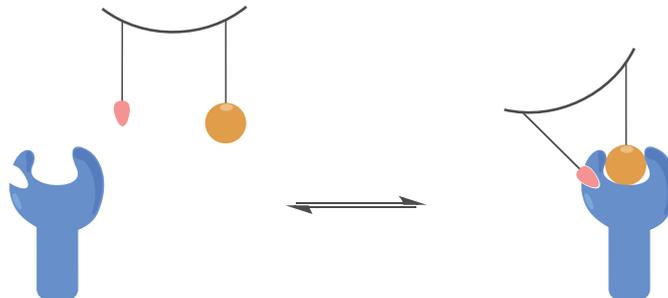


Figure 21 : Représentation de l'association avec un site secondaire

1.2.2.4. Le « bind and jump »

Le « bind and jump » est lui aussi expliqué avec la concentration effective du ligand, qui est plus élevée autour du récepteur que dans la solution. Lors de la dissociation d'un ligand avec son récepteur, la probabilité que ce même ligand se réassocie avec le récepteur est plus grande (Figure 22).^[47] Un même ligand mobilise alors plus longtemps le récepteur, ce qui améliore l'affinité du ligand. Ce mécanisme permettrait d'expliquer les gains d'avidité, spécifiquement lorsque le récepteur est monovalent.

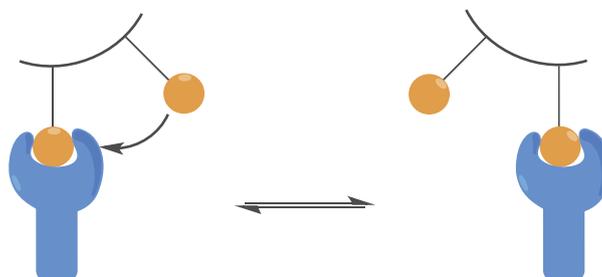


Figure 22 : Représentation du « bind and jump »

I.2.2.5. L'effet stérique

Ce mécanisme est le plus évident à envisager : lorsqu'un ligand multivalent de grande taille se lie à un récepteur, il peut gêner les autres ligands compétiteurs d'accéder au récepteur (Figure 23).^[41] Surtout envisagé comme explication lorsque le récepteur est monovalent, il reste difficile de le prouver dans les cas de récepteurs multivalents.

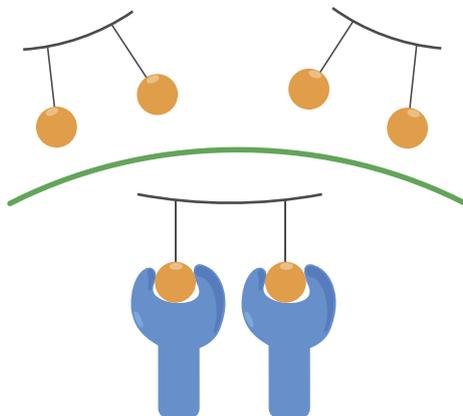


Figure 23 : Représentation de l'effet stérique

I.2.2.6. La réticulation

Le dernier mécanisme qui permet de rationaliser l'effet multivalent est la réticulation. La réticulation s'observe lorsque le ligand, dans l'impossibilité de se lier à plusieurs sites du même récepteur, s'associe à un second récepteur. Il y a alors création d'un système réticulé.^[42]

Cette réticulation peut être linéaire (Figure 24-A) ou se propager dans toutes les directions (Figure 24-B), en fonction de la géométrie du ligand et du récepteurs. L'existence d'une telle réticulation a pu être prouvée en utilisant les techniques d'analyses comme le microscope à force atomique (AFM) ou la diffusion dynamique de la lumière (DLS).^[46]

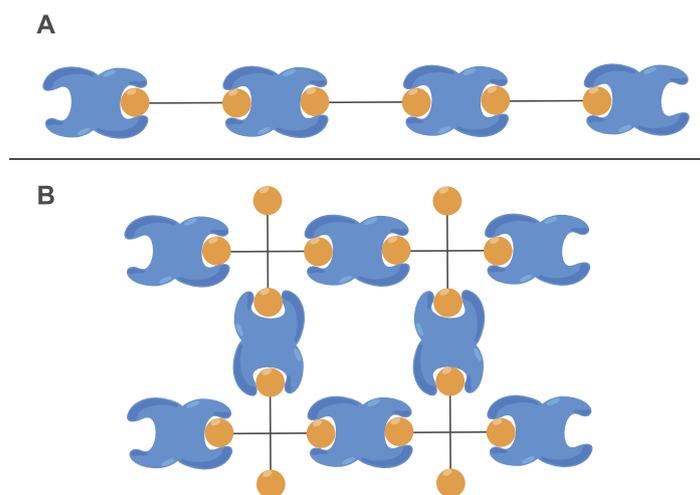


Figure 24 : Représentation de la réticulation

I.2.3. La multivalence appliquée aux enzymes

Depuis plus de 30 ans, l'effet multivalent a été largement exploré pour les interactions lectines-sucre, où il est connu sous le nom de « glycoside cluster effect ».^{[44],[48]} En effet, les lectines sont

particulièrement adaptées pour la multivalence car leur structure est généralement multimérique et présente donc plusieurs domaines de reconnaissance pour les sucres. Ainsi, plusieurs études montrent l'amélioration considérable de l'affinité en passant d'un inhibiteur monovalent à la version multivalente. De plus, les ligands multivalents se sont montrés extrêmement sélectifs, même en présence de lectines semblables.^[49]

En revanche, le concept de multivalence pour l'inhibition d'enzymes comme les glycosidases a longtemps été considéré comme étant difficile à appliquer et théoriquement approximatif. Puisque beaucoup d'enzymes ne possèdent qu'un seul site catalytique, la mise en place d'interactions multiples comme dans le cas de lectines est compromise.^[50] Cependant, plusieurs études récentes ont montré l'existence d'un effet multivalent avec les enzymes.

Webb *et coll.* ont montré un effet multivalent pour l'inhibition de la galactosylation du GlcNAc **15** en Gal(β 1-4)GlcNAc **16** par la bovine β 1,4-galactosyltransférase (β 4Gal-T1).^[51] Pour cela, les auteurs ont développé des rafts de lipides sur lesquels ils ont attaché des GlcNAc. L'un des rafts présente une distribution aléatoire de GlcNAc et l'autre présente des agrégats ordonnés de GlcNAc (Figure 25). En obtenant un taux de conversion de **15** en **16** neuf fois plus grand pour le raft avec les agrégats, ils en ont conclu que l'activité de l'enzyme pouvait être affectée par la densité de substrat qui lui était présentée.

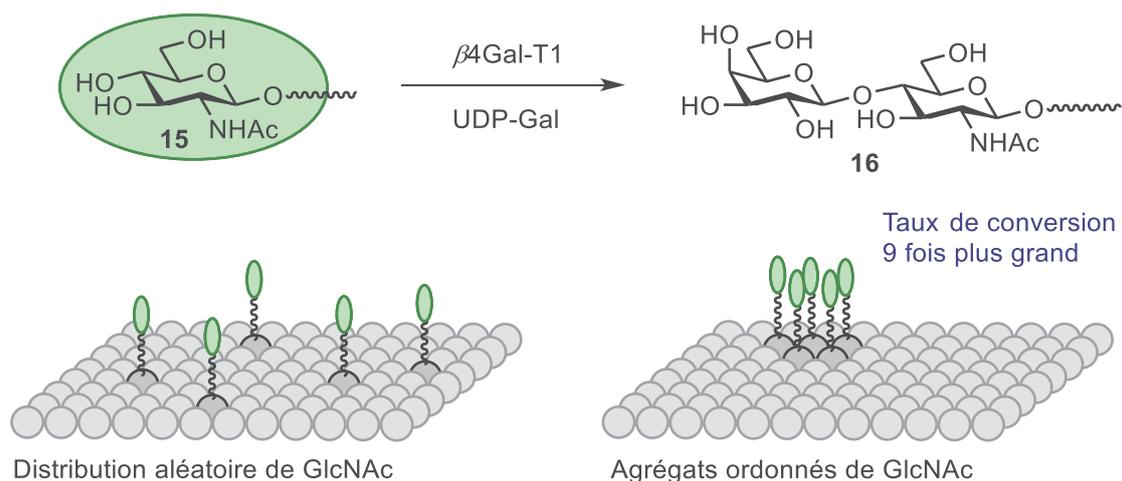


Figure 25 : Effet de la densité de substrat pour la réaction enzymatique de la β 4Gal-T1

Des études récentes sur les α -mannosidases réalisées indépendamment par Compain *et coll.* et Gouin *et coll.* ont permis de montrer les premiers effets multivalents sur cette classe d'enzyme, ouvrant donc l'application de la multivalence aux enzymes du même type.

Gouin *et coll.* ont synthétisé des dérivés mono-, di- et trivalent d'un ligand iminosucre connu pour son inhibition des glycosidases (Figure 26). Ils ont testé ces 3 molécules sur 9 glycosidases afin d'évaluer un éventuel effet multivalent. Les résultats ont montré que pour l' α -mannosidase JbMan une inhibition 7,5 fois supérieure à l'inhibition monovalente était observée pour le ligand trivalent **19**.^[52] En rapportant cette inhibition au nombre d'épitope, elle est de 2,5 fois supérieure.

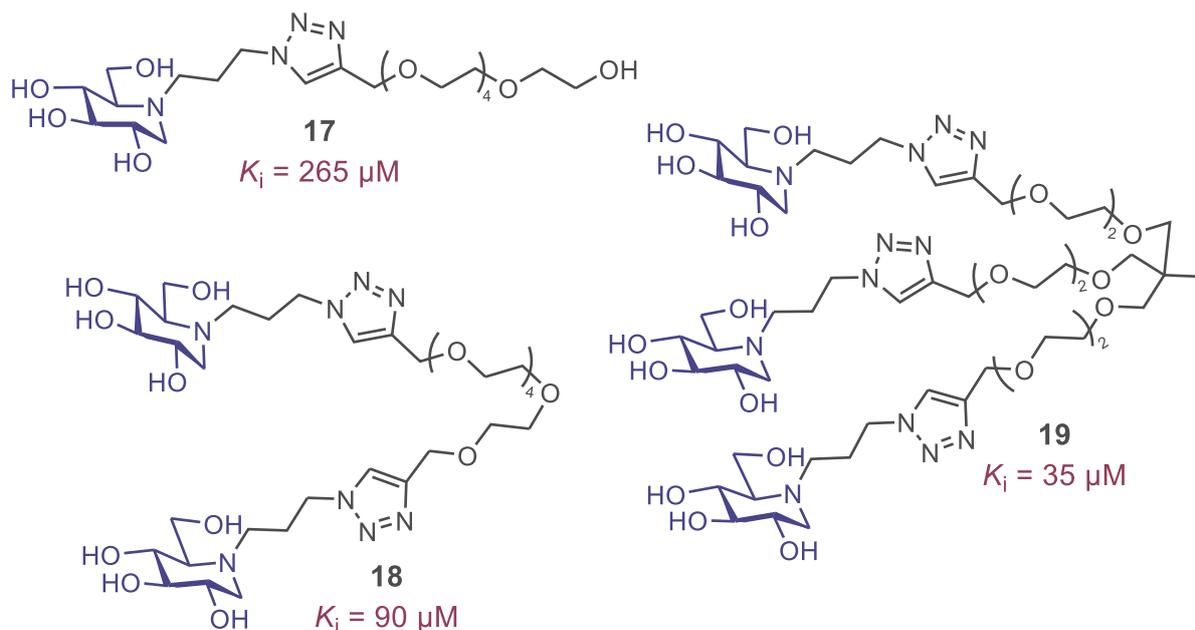


Figure 26 : Inhibiteurs mono, di et trivalent de JbMan

En poursuivant cette étude, ils ont réalisé des objets dodécavalents et tétradécavalents et ont cette fois montré une augmentation d'affinité bien plus impressionnante (Figure 27). L'augmentation de la valence est donc l'un des paramètres qui pourrait expliquer l'effet multivalent.^{[53],[54]} Cependant, aucun mécanisme permettant de rationaliser cet effet multivalent n'a été prouvé. De plus, l'effet multivalent n'a été observé que pour une seule enzyme sur les 9 testées. Cela montre une bonne sélectivité certes, mais reste cependant étonnant considérant que l'inhibiteur testé était connu pour une inhibition plus large des glycosidases.

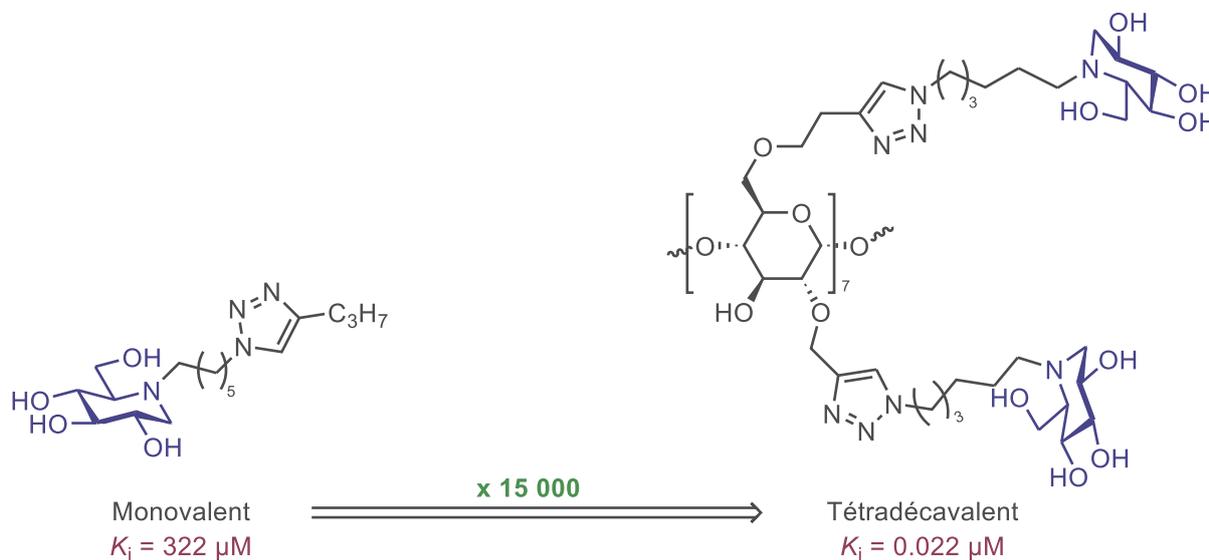


Figure 27 : Observation d'un effet multivalent pour JbMan

Pour essayer de rationaliser les mécanismes impliqués dans de tels effets multivalents, les auteurs ont réalisé des expériences de microscopie atomique (AFM) et de diffusion de la lumière (DLS). Ces expériences montrent que les iminosucres multivalents augmentent significativement la formation d'agrégats.^[46]

Concernant la GP, des études préliminaires de multivalence ont aussi été réalisées au laboratoire par Praly *et coll.* avec un inhibiteur de type C-glucosyl oxadiazole. Alors que le composé monovalent **20** ne présentait pas d'activité pour la GP, une inhibition a été observée pour son analogue trivalent **21** (Figure 28).^[55] Les auteurs obtiennent les mêmes résultats d'inhibitions pour deux autres molécules à base de phényloxadiazole. Cette étude permet donc de penser que la GP est une enzyme sensible à la multivalence.

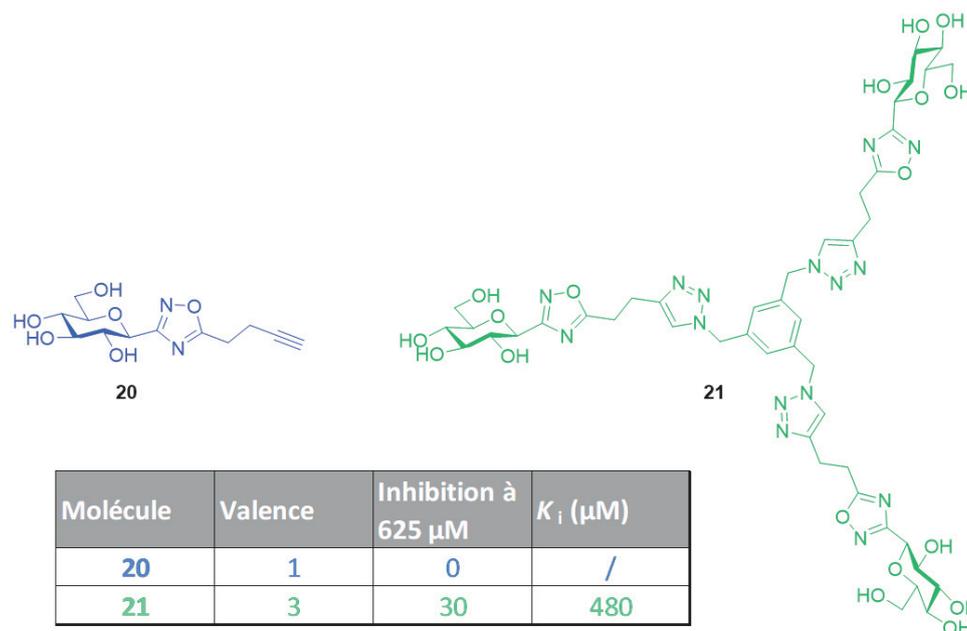


Figure 28 : Inhibiteur trivalent de la glycogène phosphorylase (inhibition mesurée *in vitro* sur la rmGPb)

I.3. La chimie combinatoire dynamique

I.3.1. Principe général

I.3.1.1. La chimie combinatoire

Avant de définir la chimie combinatoire dynamique, il faut rappeler le principe de la chimie combinatoire. Dans les années 80-90, la chimie organique dite classique était systématiquement utilisée pour la synthèse de molécules bioactives. Cette méthodologie est longue et parfois contraignante. Les chimistes développent alors un nouvel outil permettant la synthèse rapide et diversifiée d'un grand nombre de molécules, afin de pouvoir tester leur activité sur la cible biologique concernée, la chimie combinatoire. Alors qu'habituellement un réactif A est mis en réaction avec un autre réactif B, la chimie combinatoire utilise plusieurs réactifs (A_1, A_2, \dots, A_n) ne pouvant pas réagir entre eux, pour les faire réagir avec plusieurs autres composés (B_1, B_2, \dots, B_n). Le plus souvent, l'un des réactifs est attaché sur un support, ce qui permet une purification rapide des produits synthétisés. Cette étape de réaction peut se répéter autant de fois que possible, permettant d'obtenir des bibliothèques conséquentes de produits (Figure 29).

Introduction – Diabète et glycogène phosphorylase, inhibiteurs glycosidiques entre multivalence et chimie combinatoire dynamique

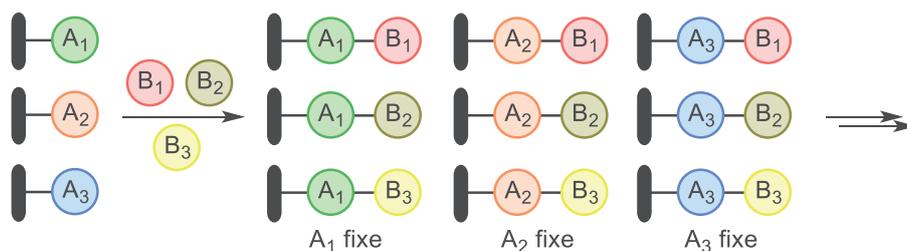


Figure 29 : Obtention d'une bibliothèque combinatoire

Les bibliothèques obtenues sont alors testées pour trouver une potentielle activité biologique. La molécule responsable de l'activité peut alors être retrouvée grâce à un processus de déconvolution. Bien que la synthèse de peptide se soit montrée particulièrement adaptée à cette technique,^[56] l'application de la chimie combinatoire à la synthèse de petites molécules organiques rencontre des limitations. Même si des exemples peuvent être trouvés,^{[57],[58],[59]} la difficulté de mettre en place des synthèses complexes, le nombre important de « faux positifs » et la difficulté d'analyses des bibliothèques ont poussé les chercheurs à développer d'autres outils comme la chimie combinatoire dynamique.

1.3.1.2. La chimie combinatoire dynamique

La chimie combinatoire dynamique (CCD) est une méthode de synthèse et de screening basée sur la chimie combinatoire, mais utilisant la formation de liaisons réversibles. Les briques moléculaires ou synthons qui composent le mélange de départ vont s'auto-assembler et se réarranger perpétuellement pour former des structures plus complexes, et ainsi explorer virtuellement toutes les combinaisons de produits possibles (Figure 30-A).^[60] La bibliothèque atteint un état thermodynamiquement stable dans lequel la proportion des différents produits peut être influencée par un stimulus externe (température, pH, potentiel redox, introduction d'une molécule).^[61] L'application d'un tel stimulus a alors pour effet de redistribuer la proportion des produits dans le mélange, pouvant favoriser la formation d'un produit par rapport à un autre. Dans le cas de l'introduction d'une molécule ou protéine (appelée template), le terme « amplification » est employé pour désigner la formation préférentielle d'un produit (Figure 30-B). Ainsi, le principal avantage de la CCD par rapport à la chimie combinatoire « classique » est la réalisation simultanée de la synthèse et de l'identification d'un composé *via* l'effet template, limitant de fait le temps et les coûts de découvertes de nouvelles molécules.

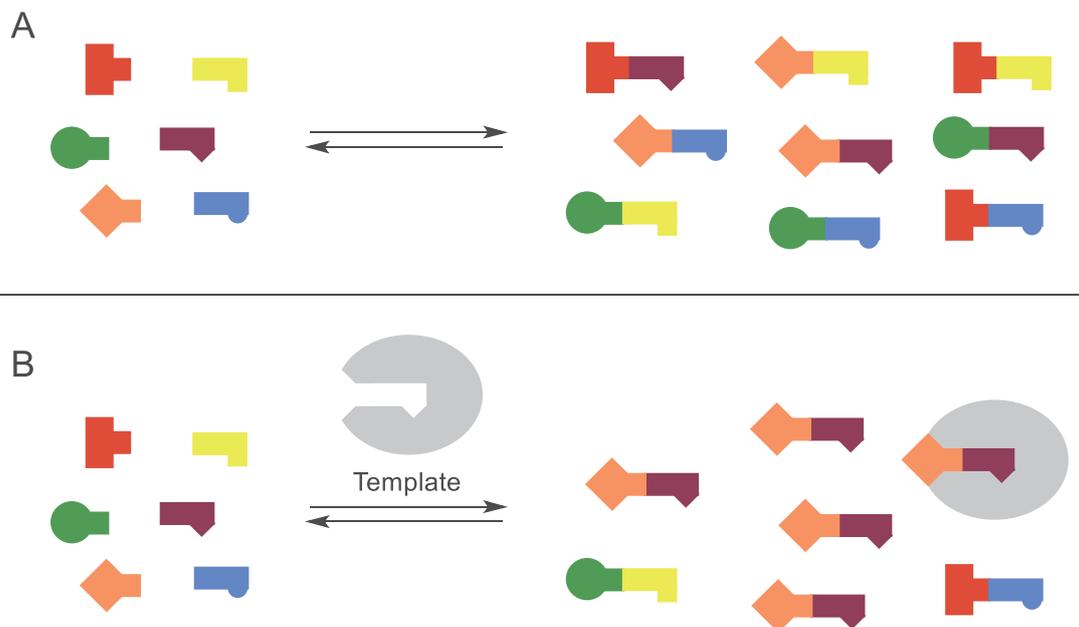


Figure 30 : Représentation d'une expérience de CCD sans template (A) et avec template (B)

Les applications de la CCD sont larges : catalyse, reconnaissance moléculaire, synthèse de polymères bio-mimétiques, découvertes de molécules bioactives pour la conception de médicaments, et d'autres.^[62]

Toutefois, la mise en place d'une bibliothèque de CCD requiert la prise en compte de différents facteurs pour son bon déroulement. Il faut tout d'abord veiller à ce que le temps d'équilibration thermodynamique de la bibliothèque soit raisonnable. Pour cela les conditions d'équilibrations peuvent être ajustées avec différents paramètres.^{[63],[64]} Comme équilibration et sélection s'effectuent idéalement dans le même temps, il faut aussi que le template soit compatible avec les conditions d'équilibration (dans le cas de l'utilisation d'une protéine, le pH jouera alors un rôle primordial). Enfin, pour faire l'analyse quantitative des espèces présentes dans le mélange, il faut être capable d'arrêter le dynamisme et de « figer » la bibliothèque sans en changer sa composition.^{[63],[64]}

1.3.2. Les différentes liaisons réversibles utilisées

Il existe 3 types de liaisons pour établir des connexions réversibles : la liaison non-covalente (ou liaison hydrogène), la liaison de coordination et la liaison covalente. Chacune possède ses avantages et inconvénients qui vont être détaillés brièvement ci-après.

Les liaisons hydrogènes permettent généralement d'établir une équilibration rapide de la bibliothèque. Cependant, l'énergie de liaison est faible (entre 0 et 20 kJ/mol) et les produits formés sont donc peu stables en solution et souvent difficiles à isoler et à analyser.^[63] La faible énergie de liaisons est généralement compensée par l'établissement d'un grand nombre de liaisons hydrogènes. L'exemple le plus connu reprenant ce phénomène est le double brin d'ADN.

Les liaisons de coordinations ont une énergie plus forte que les liaisons hydrogène (entre 80 et 350 kJ/mol). Ces liaisons, empruntées à la chimie organométallique, sont employées lorsque le template est un métal.^[65]

Les liaisons covalentes ont une cinétique d'équilibration plus modeste, qui peut cependant être accélérée par l'utilisation d'un catalyseur. L'énergie de liaison (entre 150 et 800 kJ/mol) permet une analyse plus pratique de la bibliothèque. Ainsi, les produits peuvent être isolés sans crainte d'une ré-équilibration.^[63]

1.3.3. Les liaisons covalentes

La chimie donne accès à un grand nombre de liaisons covalentes réversibles. Dans cette partie, nous limiterons donc nos études aux liaisons les plus utilisées en CCD (Schéma 3).^{[63],[64]}

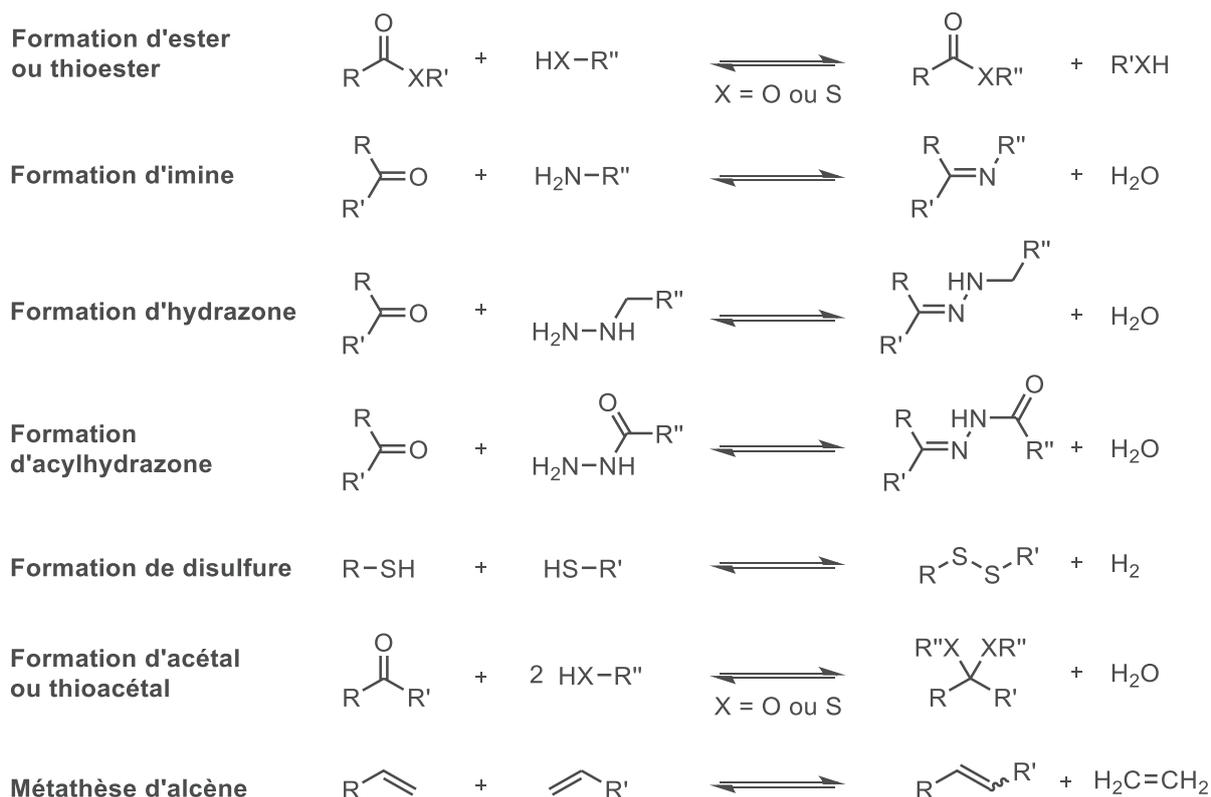


Schéma 3 : Les principales liaisons covalentes réversibles utilisées en CCD

La transestérification utilise le déplacement de l'équilibre en faveur de la formation de l'ester, qui peut se faire en ajoutant un excès de réactif (alcool ou acide carboxylique) ou en retirant du milieu le sous-produit formé au cours de la réaction. Cependant, lorsque les réactifs sont introduits en quantité stœchiométriques, le recours à un catalyseur est nécessaire pour diminuer le temps d'équilibration. Les catalyseurs acides usuels utilisés en chimie organique classique (*p*-TSA, CSA par exemple) ne peuvent eux non plus pas être employés car ils peuvent entraîner une dégradation des briques qui composent la bibliothèque.^[63] L'utilisation de catalyseurs basiques semblent être les plus efficaces pour effectuer les transestérification. L'un des premier catalyseur développé fut le méthanolate de potassium complexé à un éther couronne dans le toluène à reflux, il permet alors une équilibration thermodynamique de la bibliothèque en 10 minutes.^[63] Ces conditions réactionnelles, considérées comme dures, permettent d'établir une preuve de concept. L'emploi de méthanolate limite cependant l'utilisation de certaines fonctions chimiques, et la température élevée réduit l'effet template. Des conditions permettant une tolérance à l'eau ont aussi été mise en place avec l'utilisation de catalyseurs enzymatiques tels que les lipases.^[63]

Les formations d'imines, d'hydrazones et d'acylhydrazones peuvent être regroupées dans une même catégorie de réactions réversibles. Elles peuvent se faire en milieu aqueux, autorisant donc l'utilisation de protéine comme « template ».^[64] La formation d'imine se réalise à un pH modérément acide (autour de 5), tandis que la formation d'hydrazones et d'acylhydrazones peut se faire dans des conditions beaucoup plus acides.^[63] Dans tous les cas, l'équilibre de la réaction peut être stoppé par une basification du milieu. L'utilisation de ces deux dernières liaisons sera approfondie dans la suite de ce chapitre.

De nombreux exemples d'utilisation de disulfure en chimie combinatoire dynamique sont reportés.^[63] La possibilité de réaliser les bibliothèques en milieu aqueux et de figer facilement l'équilibration par acidification du milieu permet de simplifier l'analyse et l'isolation des produits formés.

Il existe aussi d'autres liaisons réversibles comme la formation d'acétals ou la métathèse d'alcènes. Ces liaisons nécessitent le plus souvent l'utilisation de solvants organiques. Seulement de rares exemples peuvent être trouvés avec l'utilisation de ces liaisons en présence d'un template biologique.^[63]

Différentes techniques d'analyses pour les bibliothèques ont été décrites dans la littérature.^[62] L'utilisation de la RMN ou de la cristallographie par rayons X permet l'analyse de petites bibliothèques mais l'interprétation des spectres devient complexe si le nombre d'espèces présentes en solution augmente. L'utilisation d'outils chromatographiques comme la HPLC ou la GC est alors courante. Couplées à un spectromètre de masse, ces dernières techniques se révèlent être des outils rapides et puissants.

1.3.4. Les inconvénients de la CCD et les solutions apportées

Bien que de nombreuses études portant sur la CCD aient été réalisées ces dernières années, il existe des limitations difficilement contournables à l'utilisation de cet outil. Dans cette partie, nous nous attarderons principalement aux problèmes rencontrés lors de la mise en place d'une expérience de CCD en présence d'un template biologique (screening de molécule bioactives, lecture d'information biologique, ...). Nous aborderons également les méthodes qui ont été trouvées pour pallier ces limitations.

1.3.4.1. L'atteinte de l'équilibre

L'équilibre thermodynamique étant au centre du principe de la CCD, il est primordial de vérifier l'atteinte de cet équilibre dans une bibliothèque. Pour ce faire, plusieurs expériences simples ont été décrites.^[63] La méthode la plus courante consiste à introduire l'un des réactifs en excès et de montrer que la distribution des espèces à l'équilibre reste la même.

Il est aussi possible d'appliquer un stimulus faisant changer l'état d'équilibre de la bibliothèque (saut de pH, température, potentiel redox, introduction d'un template). Un retour aux conditions initiales doit alors permettre de retrouver le premier état d'équilibre.

1.3.4.2. L'isoénergicité des espèces chimiques en solution

Le fait que les bibliothèques dépendent de la stabilité thermodynamique des produits la composant implique que ces derniers doivent être isoénergétiques, afin de ne pas biaiser l'équilibre en faveur de composés agissant comme des « puits » ou des « montagnes » énergétiques.^[63] En pratique cette

condition est rarement vérifiée. Dans le cas de bibliothèques formant des produits macrocycliques, la formation de petits oligomères sera toujours favorisée pour des questions entropiques.

1.3.4.3. La compatibilité des conditions opératoires avec les protéines

Indépendamment du type de liaison réversible utilisée, l'équilibration d'une bibliothèque de CCD doit être rapide et conduire à la formation des produits avec une constante d'équilibre maximale. Le principal problème rencontré est donc l'adéquation de ces conditions expérimentales d'équilibration avec celles requises pour que le template biologique puisse exercer son activité, c'est-à-dire en milieu aqueux, à pH physiologique (ou proche de la neutralité) et à des températures modérées (en dessous de 50°C).^[62] Dans certains cas, l'ajout d'un catalyseur peut permettre d'accélérer l'équilibration dans de telles conditions, notamment pour la formation d'hydrazones.^[66]

Lorsque les conditions d'équilibration ne permettent pas l'utilisation du template, il peut être ajouté après une phase de pré-équilibration. Dans ce cas, la bibliothèque est tout d'abord équilibrée seule, puis les conditions opératoires sont modifiées pour stopper l'équilibre et figer la bibliothèque. Le template est ensuite ajouté dans la bibliothèque et il se lie aux espèces avec lesquelles il a le plus d'affinité. Finalement, le retrait du template et la comparaison de la répartition des espèces avant et après l'ajout du template permet d'en déduire les meilleures (Figure 31). J.-M. Lehn *et coll.* ont étudié les différences entre la pré-équilibration et l'équilibration en présence du template en prenant comme exemple la concanavaleine A.^[67] Dans le cas d'une pré-équilibration, il n'est pas possible de parler d'amplification puisque le dynamisme de la bibliothèque est figé lors de l'ajout du template. Les auteurs décrivent cependant qu'il est possible de sélectionner les meilleures espèces présentes dans le mélange. Ainsi, en analysant la bibliothèque après avoir retiré le template, seules les espèces les moins actives restent en solution. Cependant, les auteurs décrivent que lors de l'ajout du template dès le début de l'équilibration, le rendement de l'espèce sélectionnée est bien meilleur. Le template pourrait donc agir comme un puits thermodynamique pendant l'équilibration.

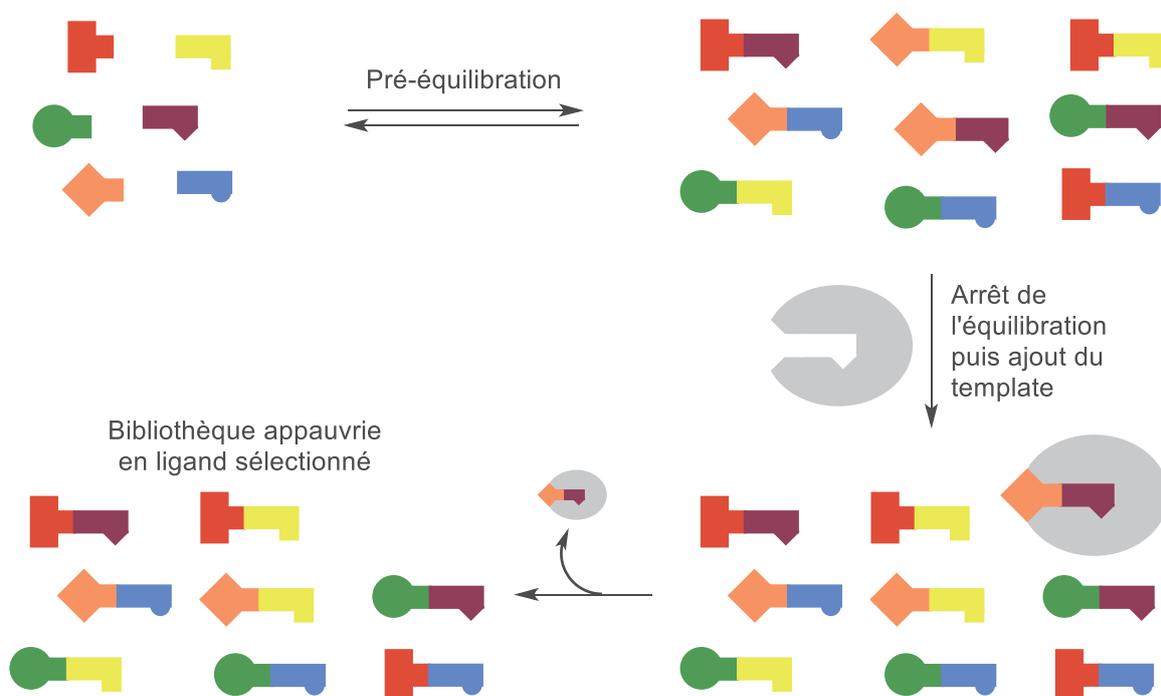


Figure 31 : Représentation de la pré-équilibration

Il existe un outil dérivé de la pré-équilibration appelé CCD itérative. L'expérience se déroule alors comme suit. La chimiothèque est pré-équilibrée sans le template, puis l'équilibre est figé avant l'ajout de ce dernier. Le complexe template/ligand est ensuite retiré du mélange et la bibliothèque appauvrie en substrat sélectionné est remise en équilibration. A la fin de la deuxième équilibration, le template est de nouveau introduit dans le mélange, puis isolé avec son ligand. Les cycles d'équilibration et de sélection s'enchaînent et après plusieurs cycles, il est possible d'obtenir une sélection pour un ou plusieurs produits.^[68]

La présence de la protéine en solution peut aussi poser des problèmes lors de la dénaturation de celle-ci par exemple. En effet, il faut s'assurer que l'équilibre de la bibliothèque n'est pas influencé par les conditions de dénaturation de la protéine.^[69]

1.3.4.4. Les réactions réversibles compatibles avec les protéines

Malgré le large panel de liaisons covalentes réversibles disponibles pour la CCD,^[62] seulement peu sont couramment utilisées pour la mise en place de bibliothèques avec un template biologique. Quatre réactions sont largement étudiées : la formation de disulfures, d'imines, d'hydrazones et d'acylhydrazones.^{[64],[70]}

1.3.4.4.1. Les disulfures

L'échange de disulfure joue un rôle primordial en biologie puisqu'il est impliqué dans le repliement des protéines et dans le clivage de l'ADN.^[63] Cet échange nécessite la présence de thiolate pour avoir lieu et il est donc extrêmement sensible au pH (Schéma 4). Un pH très légèrement basique (entre 7 et 9) permet de générer suffisamment de thiolate pour permettre cet échange. A l'inverse, il sera extrêmement simple de stopper l'équilibre en passant en milieu acide.



Schéma 4 : Mécanisme d'échange des disulfures

L'un des premiers exemples d'utilisation de disulfures en CCD pour la découverte de nouvelles molécules bioactives a été reporté par Lehn *et coll.* en 2000.^[67] Depuis, l'utilisation de bibliothèques de disulfures en présence de protéines a été plus largement étudiée.^[71]

1.3.4.4.2. Les imines

La stabilité de la liaison C=N de l'imine est grandement affectée par les substituants sur la partie carbonyle. La formation d'une imine avec des cétones aromatiques nécessite que l'eau co-formée soit retirée du milieu réactionnel. Cependant, l'utilisation de cétones aliphatiques ou d'aldéhydes permet la formation de l'imine en présence d'eau. De plus, l'imine formée est beaucoup plus stable avec l'utilisation d'aldéhydes aromatiques. Ces derniers sont donc largement utilisés pour créer des bibliothèques de CCD.^[63]

En 1997, la première utilisation d'imine en CCD pour une bibliothèque dirigée par une enzyme (l'anhydrase carbonique) a été reportée par Lehn *et coll.*^[72] Dans leur étude, les auteurs mettent en mélange 4 amines avec 3 aldéhydes aromatiques (Figure 32) dans un tampon phosphate à pH = 6 en présence de la protéine. A la fin de l'équilibration, la bibliothèque est figée par réduction des imines transitoires avec le cyanoborohydrure de sodium. La protéine est dénaturée avec une montée en

température et retirée du mélange par microfiltration. L'amplification du composé **22** a été mise en évidence par HPLC.

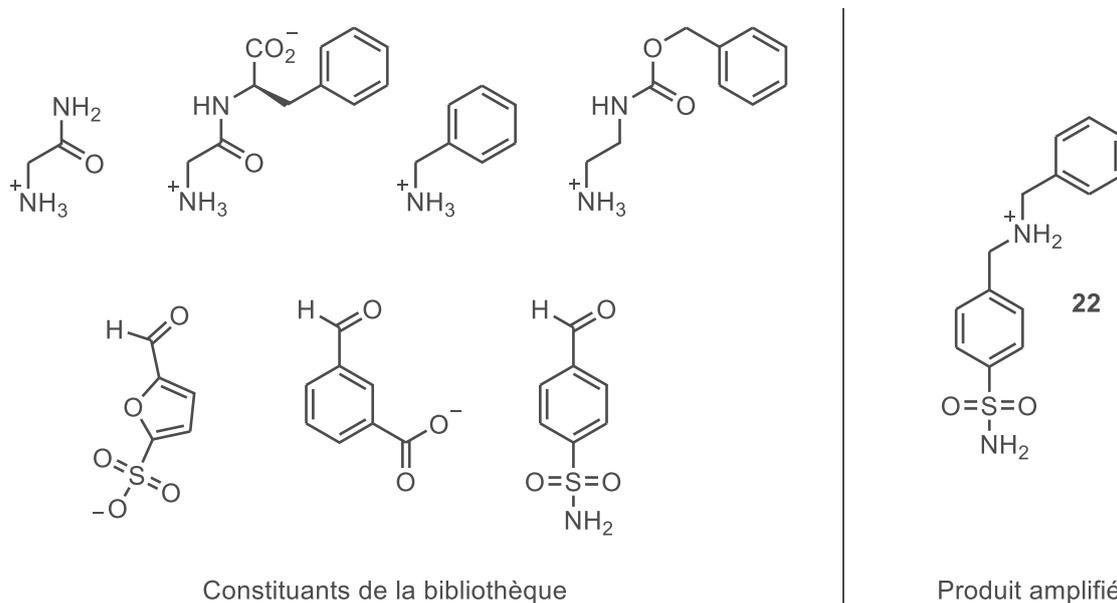


Figure 32 : Bibliothèque composée de 4 amines et 3 aldéhydes, le produit amplifié est donné sous sa forme protonée après réduction d'une imine transitoire par le cyanoborohydrure de sodium

1.3.4.4.3. Les hydrazones

A l'inverse des imines, les hydrazones sont stables et se forment en conditions fortement acides (pH < 4) et sont inertes à pH neutre.^[63] Les groupes de Sanders et Fischer^{[73],[74]} font partis des premiers à avoir démontré l'intérêt de cette réaction en CCD. Cependant, bien que de nombreuses références reportent l'utilisation d'hydrazones,^{[63],[71]} peu d'études initiales proposent une équilibration des synthons à pH neutre compatible avec l'introduction d'une protéine dans le mélange. Nous nous intéresserons donc aux études plus récentes qui apportent une amélioration sur ce point.

Wanner *et coll.* a récemment publié une étude utilisant les hydrazones à pH neutre pour l'identification de ligands des transporteurs GABA 1.^[75] En mettant en mélange une hydrazine **23** (Schéma 5) en large excès avec des aldéhydes aromatiques, ils obtiennent des bibliothèques de CCD dites pseudo-statiques. Ils utilisent le terme pseudo-statique car l'hydrazine, en excès, déplace l'équilibre vers la formation des hydrazones. Les auteurs réalisent ainsi 28 bibliothèques avec l'hydrazine et 8 aldéhydes aromatiques puis testent le pouvoir inhibiteur de ces bibliothèques par ligation compétitive (du ligand NO711) analysée par MS. Les bibliothèques remplissant leurs critères d'inhibitions sont ensuite évaluées par déconvolution pour trouver les meilleures hydrazones formées. Le composé **24** (Schéma 5) a ainsi pu être identifié comme nouvel inhibiteur potentiel des transporteurs GABA 1.

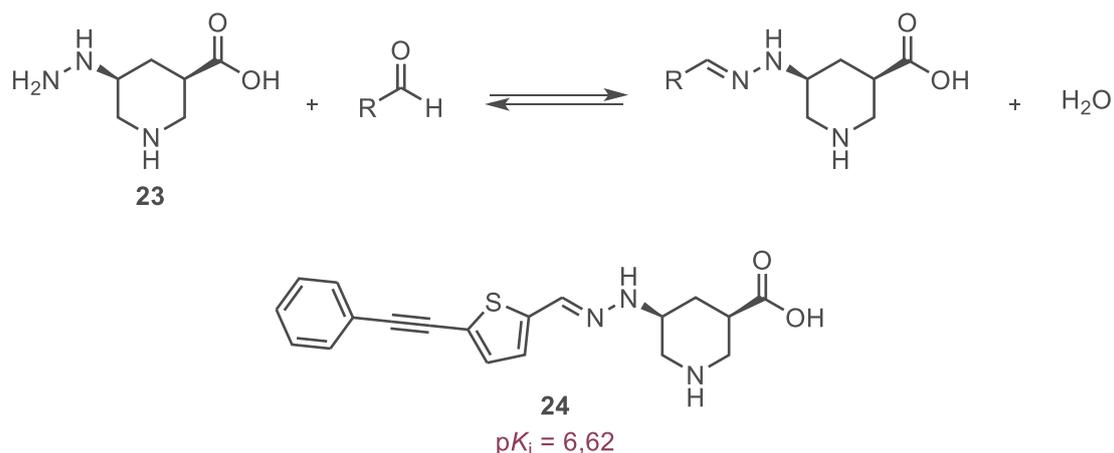


Schéma 5 : Nouvel inhibiteur des transporteurs GABA 1 trouvé à l'aide d'une bibliothèque CCD composée de l'hydrazine et 8 aldéhydes aromatiques (pK_i déterminé par MS Binding Assays)

Une autre étude récente menée par Kool *et coll.* montre qu'il est possible d'utiliser des catalyseurs dérivés d'amines aromatiques pour favoriser la formation d'hydrazones.^[76] Ils montrent notamment que le 2-(aminométhyl)-imidazole (Figure 33) peut avoir la double fonction de catalyseur et de tampon. Cette catalyse sera évaluée dans le cadre de notre étude sur la GP. Une autre étude décrit aussi la possibilité d'effectuer la catalyse de la formation d'acylhydrazone avec l'indoline.^[77]

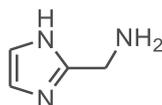


Figure 33 : 2-(Aminométhyl)-imidazole comme catalyseur/tampon pour la catalyse de la formation d'hydrazones

1.3.4.4.4. Les acylhydrazones

La formation d'acylhydrazones est l'une des transformations les plus utilisées en CCD. Introduite en 1999 par le groupe de Sanders,^{[78],[79],[80]} son utilisation avec les protéines a longtemps été limitée par la nécessité d'avoir un pH acide pour l'équilibrage de la bibliothèque. Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux recherches qui proposent des alternatives pour pallier cette limitation.

En 2010, Greaney *et coll.* furent les premiers à démontrer l'utilisation d'une catalyse nucléophile pour la formation d'acylhydrazones en utilisant l'aniline.^[81] Les auteurs montrent qu'il est possible d'avoir une équilibration réversible en 6 heures à $pH = 6,2$ en présence d'aniline (comme catalyseur), au lieu de 5 jours sans le catalyseur. Ils ont aussi montré que l'équilibration pouvait être arrêtée ou réactivée par changement de pH . Les auteurs font aussi l'étude de leur bibliothèque avec deux isoenzymes (SjGST et hGST) de la glutathione *S*-transférerase (GST). La bibliothèque est constituée d'un aldéhyde **25** (dérivé d'un substrat connu de la GST) et de 10 hydrazides chacun en excès (Schéma 6). Ils introduisent ici les hydrazides en excès pour s'assurer une cinétique d'équilibration d'ordre 1 par rapport à l'aldéhyde. Pour chacune des deux isoenzymes, une analyse par LC-MS leur a permis détecter une amplification pour deux acylhydrazones différentes **26a** et **26b** (Schéma 6).

Introduction – Diabète et glycogène phosphorylase, inhibiteurs glycosidiques entre multivalence et chimie combinatoire dynamique

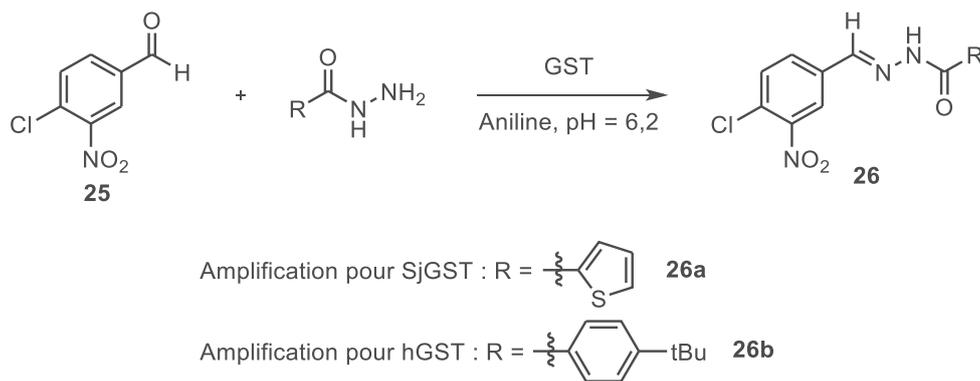


Schéma 6 : Bibliothèque d'acylhydrazones catalysée par l'aniline

D'autres exemples plus récents de l'utilisation d'aniline comme catalyseur nucléophile pour la construction de bibliothèques d'acylhydrazones peuvent être signalés.^{[82],[83]}

Vincent *et coll.* appliquent cette même stratégie avec une bibliothèque adaptative dirigée par l'enzyme UDP-galactopyranose mutase (UGM).^[82] Cette enzyme, présente à la surface de *Mycobacterium tuberculosis* (agent pathogène responsable de la tuberculose) est une cible thérapeutique bien identifiée pour cette maladie.^[84]

La bibliothèque, composée d'un aldéhyde **27** (Schéma 7) et d'un mélange d'hydrazides et d'hydrazines montre une amplification pour deux nouvelles molécules. Après synthèse et évaluation biologique de ces dernières, les auteurs montrent que l'une d'entre elle (composé **28** Schéma 7) a un fort pouvoir inhibiteur pour les UGMs. Cette étude est le premier exemple de l'application de la CCD dirigée par une cible biologique validée, dans l'optique du traitement d'infections bactériennes.

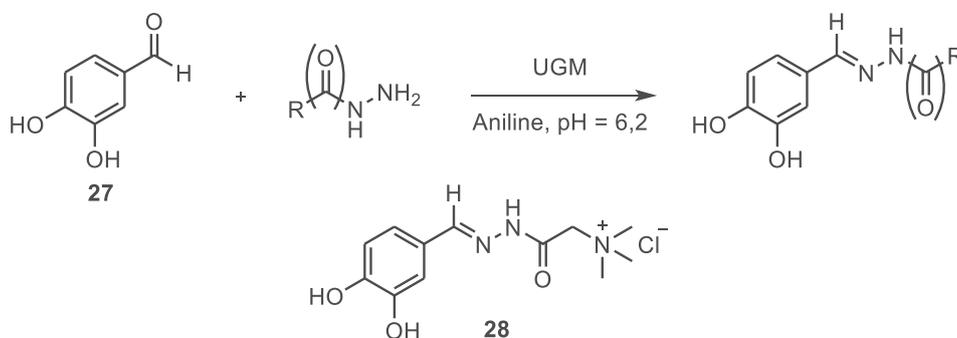


Schéma 7 : Synthèse d'une bibliothèque composée de 9 hydrazides et 2 hydrazines pour la détection d'inhibiteurs de UGM

I.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons évoqué les différentes cibles thérapeutiques pour lutter contre le diabète de type 2. L'une des méthodes pour réguler la glycémie consiste à bloquer la formation du glucose par la dépolymérisation du glycogène en inhibant l'activité d'une des enzymes impliquées dans le mécanisme : la glycogène phosphorylase. Plusieurs sites d'intérêt permettent l'inhibition de cette enzyme : notamment le site catalytique. Au laboratoire, plusieurs molécules ont déjà été synthétisées et se sont révélées être de bons candidats pour l'inhibition de la GP. Cependant, à l'instar des études réalisées sur les lectines, n'est-il pas possible d'améliorer cette inhibition avec la synthèse de composés multivalents ?

Une première étude^[52] démontre l'existence d'effets multivalents sur les glycosidases et nous permet d'envisager d'appliquer ce concept à la GP. Au laboratoire, des résultats prometteurs ont été obtenus et ont montrés l'apparition d'une inhibition de la GP en passant d'un composé monovalent à un composé trivalent. Afin de démontrer et de conclure sur la possibilité d'effectuer une inhibition multivalente de la GP, nous réaliserons la synthèse et l'évaluation biologique de plusieurs plateformes multivalentes. Ces synthèses seront détaillées dans le deuxième chapitre de ce manuscrit (Figure 34).

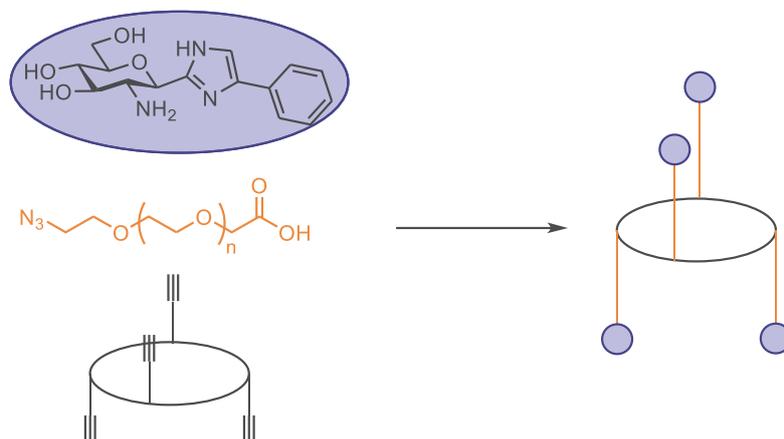


Figure 34 : Synthèse de composés multivalents

Toutefois, quand il s'agit d'inhibition de protéines, une question reste toujours en suspens : avons-nous trouvé le meilleur inhibiteur possible ? Pour répondre à cette question, nous décidons d'interroger directement la protéine concernée en appliquant les concepts de la chimie combinatoire dynamique. Dans ce cas précis, les chimistes utilisent uniquement des liaisons réversibles et les molécules formées au cours des expériences de CCD sont toutes inter-convertibles. Ainsi, la distribution des produits dans le mélange ne dépend que de leur stabilité thermodynamique. L'application d'un *stimulus* (une protéine par exemple) externe peut permettre une perturbation de l'équilibre thermodynamique initial, et entraîner une modification de la distribution des espèces, favorisant celles qui sont stabilisées par le *stimulus*.

Dans le but de répondre à cette deuxième question, nous réaliserons la synthèse de glucoses modifiés permettant de réaliser des réactions réversibles avec des composés aromatiques. La génération de bibliothèques de CCD utilisant la GP comme *stimulus* permettrait alors de trouver les meilleurs inhibiteurs possibles. Ces études feront l'objet de la deuxième partie de ce projet de thèse et seront détaillées dans le troisième chapitre de ce manuscrit (Figure 35).

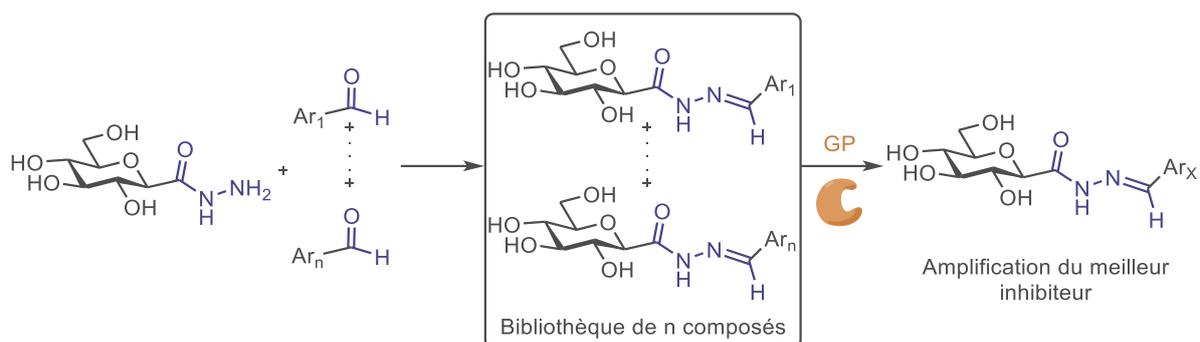


Figure 35 : Elaboration de bibliothèques de CCD appliquées à la GP

Chapitre II. Conception et synthèse d'inhibiteurs multivalents de la glycogène phosphorylase

II.1. Présentation de l'étude

L'objectif de cette étude est de montrer l'influence d'un effet multivalent lors de l'inhibition de la glycogène phosphorylase. Ce chapitre présentera donc le choix des inhibiteurs multivalents ainsi que leur synthèse. Ces inhibiteurs auront tous en commun la structure suivante (Figure 36) :

- Une plateforme multivalente de type calixarène
- Un bras espaceur, dont la longueur est à déterminer, qui séparera la plateforme de l'épitope
- Un épitope glucosidique du site catalytique de la GP

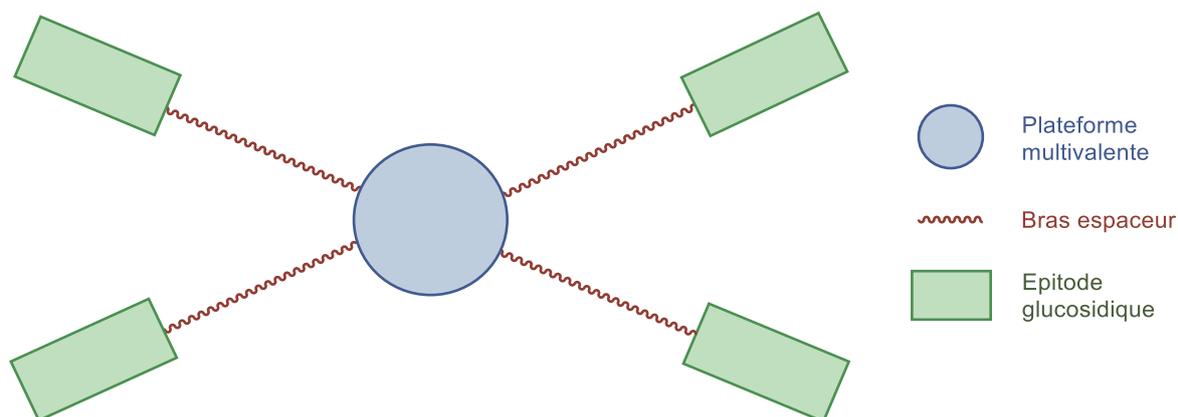


Figure 36 : Structure des plateformes multivalentes

II.1.1. Choix des inhibiteurs

Deux inhibiteurs glucosidiques connus du site catalytique de la GP ont été choisis pour mener cette étude (Figure 37), le dérivé imidazole reporté par Somsák *et coll.*^[32] et le dérivé spiroisoxazoline reporté par Praly *et coll.*^[37]

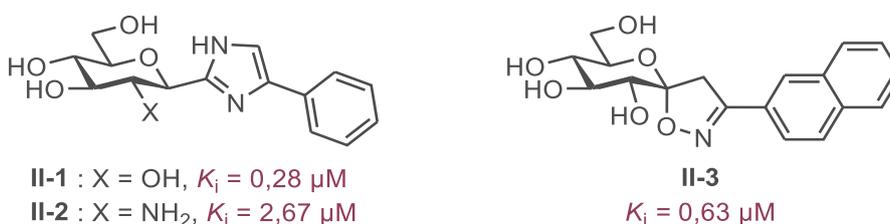


Figure 37 : Inhibiteurs de la GP sélectionnés

Nous avons choisi parmi les meilleurs inhibiteurs du site catalytique de la GP afin de montrer l'existence ou non d'un effet multivalent. Même s'il existe des inhibiteurs encore plus performants ayant une inhibition sub-micromolaire, nous orientons notre sélection sur des inhibiteurs ayant un K_i de l'ordre du micromolaire. En effet, notre objectif n'est pas tant de trouver le meilleur inhibiteur multivalent possible, mais simplement de montrer la présence ou non d'un effet multivalent pour l'inhibition de cette enzyme.

Le dérivé imidazole **II-1** a été choisi pour sa facilité relative d'accès et il est le point de départ de cette étude. De plus, la possibilité de synthétiser la version glucosamine **II-2** nous permet d'avoir accès à une liaison chimiosélective qui permettra de conjuguer facilement le bras espaceur. Le choix du composé **II-3** s'est quant à lui naturellement imposé puisque qu'il a été développé au laboratoire.

II.1.2. Choix de la plateforme multivalente

La plateforme multivalente que nous avons sélectionnée pour cette étude est le calix-[4]-arène-1,3-alterné **II-4** (Figure 38). Afin de pouvoir attacher le bras espaceurs de manière chimiosélective, le calixarène est fonctionnalisé avec des alcynes terminaux. Une réaction « click » azide-alcyne permettra donc d'effectuer la conjugaison.

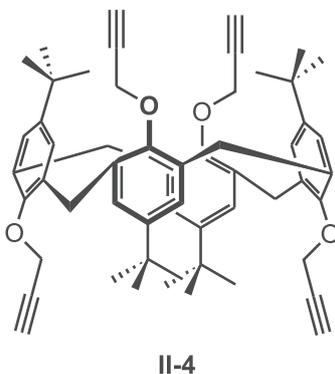


Figure 38 : Plateforme multivalente sélectionnée

Plusieurs arguments ont motivé le choix de cette plateforme. Le choix d'une valence faible (seulement 4) semble aller à l'encontre de l'étude précédemment décrite de Gouin *et al.* et Compain *et al.* sur les glycosidases. Cependant, les études préliminaires menées au laboratoire ont montrées qu'un effet multivalent sur la GP pouvait être observé avec un inhibiteur trivalent.^[55] Une valence de 4 serait donc potentiellement suffisante pour mener à bien notre étude.

II.1.3. Sélection du bras espaceur

Nous avons fait le choix de bras espaceurs de type oligoéthylèneglycol (Figure 39) car ils sont commerciaux avec un coût peu élevé. De plus, ils possèdent une bonne flexibilité pour présenter l'inhibiteur dans le site catalytique de l'enzyme. Enfin, leur caractère hydrophile permet d'apporter une meilleure solubilité dans l'eau à nos composés.

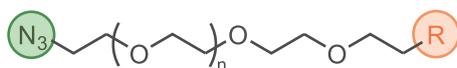


Figure 39 : Représentation du bras espaceur

Ce bras sera facilement désymétrisé de manière à avoir d'un côté une fonction azide qui permettra de le greffer sur la plateforme multivalente et de l'autre un acide carboxylique permettant le couplage avec l'inhibiteur glucosidique.

Afin de déterminer le point d'ancrage de la chaîne glycol sur l'inhibiteur, nous avons réalisé des études de docking et de dynamique moléculaire. Ces études permettront aussi de déterminer la longueur de la chaîne et le point de fonctionnalisation du bras espaceur pour le greffage sur le sucre.

II.2. Etudes de docking et dynamique moléculaire

Pour évaluer l'influence de l'introduction d'un bras espaceur sur l'inhibiteur glucosidique, et pour déterminer le point d'encrage préférentiel sur ce dernier (Figure 40), une approche par des études de docking, de modélisation moléculaire et de dynamique moléculaire a été réalisée.

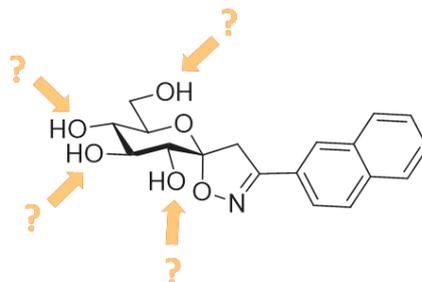


Figure 40 : Les différents point d'encrage pour le bras espaceur

II.2.1. Etudes de docking

Le docking est une méthode de calcul qui va prédire l'orientation et la structure 3D d'une molécule par rapport à une autre. Cette méthode est notamment utilisée pour la prédiction de complexes biomoléculaires, dans le cadre de l'analyse de structures mais aussi pour la conception de molécules bioactives.^[85] Dans notre cas, afin de pouvoir mener notre étude de docking il faut commencer par décrire le ligand et le récepteur que nous souhaitons utiliser.

II.2.1.1. Modélisation des ligands pour le docking

II.2.1.1.1. Etude structurale du site catalytique de la GP

Avant de modéliser les futurs ligands pour les études de docking, l'étude complète des interactions entre la partie glucose de l'inhibiteur et les acides aminés du site catalytique a été nécessaire. Lorsqu'ils ont reporté leur composé **II-3**, Vidal *et coll.*^[37] ont détaillé ses interactions avec la GP (Figure 41). Ainsi, O2 fait des interactions avec Glu672 et Asn284, O3 établie des liaisons hydrogènes avec les acides aminés Glu672, Ala673 et Gly 675. Une seule interaction est reportée pour O4 avec Gly675, tandis que O6 interagit avec His377 et Asn484.

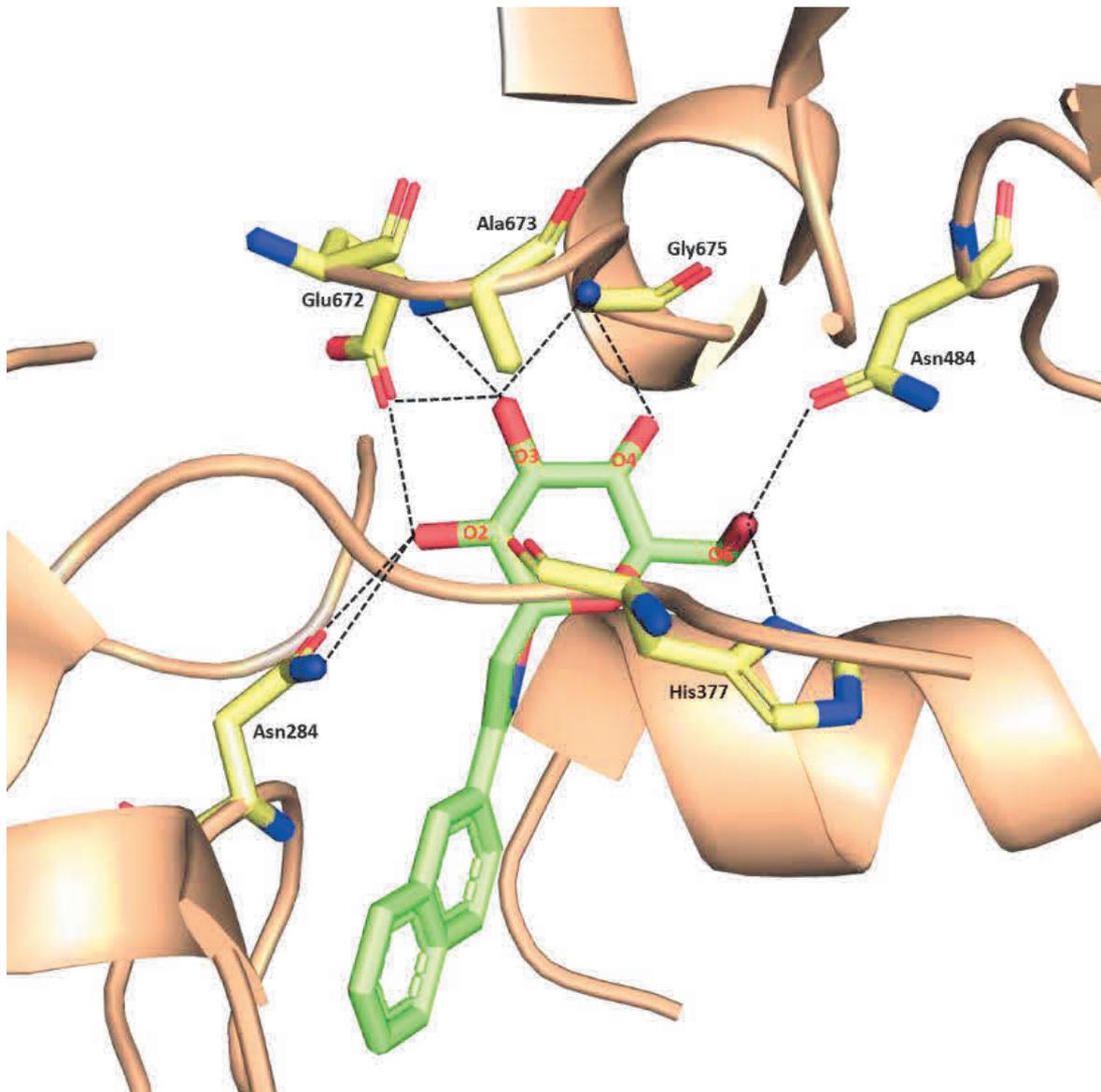


Figure 41 : Vue rapprochée du site catalytique de la GP, sur laquelle est mis en évidence les différentes interactions entre les acide aminés et l'inhibiteur II-3 (code PDB : 2QRP).

Les mêmes interactions sont aussi reportées par Somsák *et coll.*^[32] pour d'autres molécules inhibitrices. Ceci nous amène donc à penser que ces interactions sont primordiales pour la stabilisation dans le site catalytique, et qu'elles doivent être conservées.

Afin de choisir un emplacement pour le branchement du bras espaceur, il faut non seulement tenir compte des interactions au sein du site mais il faut aussi prendre en compte l'encombrement stérique du ligand dans le site catalytique. L'étude tridimensionnelle du site catalytique en présence de la spiroisoxazoline II-3 donne des informations essentielles à ce propos (Figure 42). La position du glucose dans le site catalytique implique que les positions 4 et 6 du sucre ne sont pas accessibles facilement depuis l'extérieur de la protéine puisque enfouies dans le fond de la poche. En revanche, la position 2 pointe vers la boucle 280s et semble être potentiellement accessible pour le branchement du bras espaceur (Figure 42). La position 3 semble elle aussi accessible pour une fonctionnalisation.

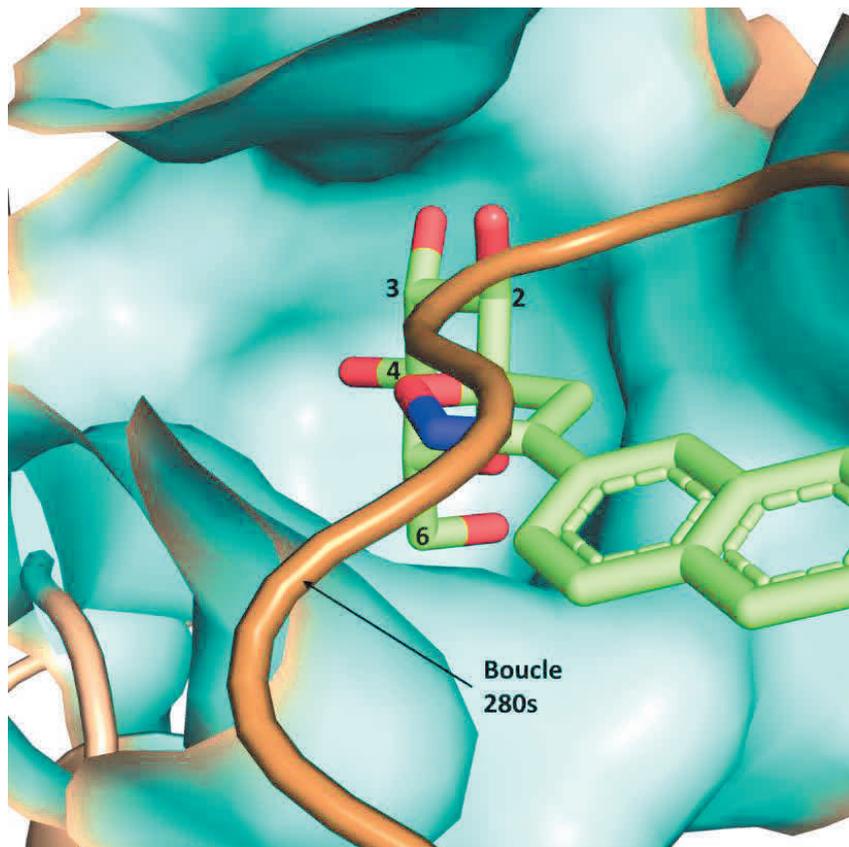


Figure 42 : Surface du site catalytique de la GP (en bleu) avec l'inhibiteur II-3 (code PDB : 2QRP)

II.2.1.1.2. Choix de la position d'ancrage pour le bras espaceur et modélisation du ligand

Il y a donc deux positions sur le glucose qui pourraient servir de point d'ancrage à la plateforme multivalente : les positions 2 et 3. Cependant, la position 3 effectue des interactions avec 3 acides aminés selon l'étude de Vidal *et coll.*^[37] et nous considérons ces interactions comme primordiales pour la stabilité du complexe ligand-protéine. Nous établissons donc l'hypothèse que la position 2 du glucose est un bon candidat pour l'attachement d'un bras espaceur.

Afin de vérifier cette hypothèse, un ligand est modélisé en prenant pour base la spiro-isoxazoline II-5 (Figure 43). Une liaison amide en position 2 permet l'attache du bras espaceur triéthylèneglycol. Il est fait ici le choix arbitraire de mettre un bras avec comme longueur 3 unités glycol seulement. Ce ligand sera ensuite évalué en complexe avec la Glycogène Phosphorylase dans des expériences de docking (voir section II.2.1.3).

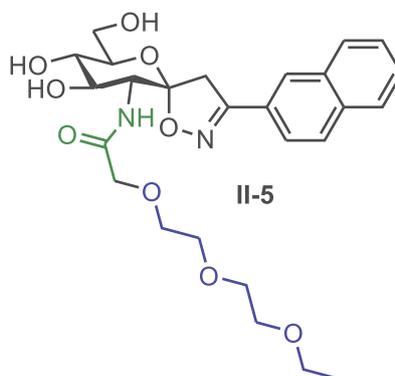


Figure 43 : Ligand modélisé

II.2.1.2. Choix du récepteur pour le docking

Pour pouvoir réaliser des études sur la GP, deux choix sont possibles : utiliser comme modèle la GP issue de muscles humains (hmGP) ou celle issue de muscles de lapin (rmGP). La rmGP est communément utilisée en biologie pour évaluer l'activité de molécules,^{[23],[25],[30],[39]} mais aussi plus récemment employée pour des études de docking par Somsák *et coll.*^[34] Elle est aussi plus facile d'accès car commercialement disponible.

Cependant, afin de faire un choix définitif entre ces deux modèles, nous avons voulu confirmer la similitude séquentielle des deux protéines. Nous voulons donc réaliser une comparaison entre les deux GP tirées de la base de données UniProt (Universal Protein Resource ID P06737). Cependant, la structure 3D de la hmGP n'est pas entièrement définie en RX et il manque une dizaine d'acides aminés, trop mobiles pour pouvoir être définie en structure RX.

De manière à reconstituer ces quelques acides aminés manquants à la séquence et à comparer cette hmGP à celle du lapin, une modélisation avec SWISSMODEL est réalisée.^[86] Cette modélisation utilise pour modèle une structure cristallographique de GP issue de muscles de lapin (code PDB : 2PYD). Le résultat de la modélisation est résumé dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Séquence couverte	Homologie des séquences	Qualité de la modélisation
100%	97,39%	0,99

Tableau 1 : Résultats de la modélisation 3D de la hmGP par SWISSMODEL, en utilisant le modèle PDB 2PYD

Pour conclure, la modélisation est concluante avec un score de qualité de 0,99. Il est aussi possible de dire avec certitude que les structures des deux hmGP et rmGP sont très similaires avec plus de 97% d'homologie sur l'entièreté de la séquence. Il est aussi observé que l'homologie du site catalytique est totale. Nous vérifions ainsi que la protéine issue du muscle de lapin est un bon modèle pour la protéine humaine. Aussi, cette protéine sera utilisée par la suite dans toutes les études de docking menées. De plus, comme la rmGP est utilisée dans la plupart des études présentes dans la littérature. Ainsi il nous sera possible de comparer les résultats obtenus avec les travaux publiés.

II.2.1.3. Résultats des études de docking

Les études de docking sont réalisées avec le ligand **II-5** décrit précédemment et le récepteur rmGP (code PDB 2QRP). Ce complexe GP-inhibiteur n'est pas choisi au hasard, c'est celui qui provient de la co-cristallisation de l'inhibiteur **II-3** décrit par Vidal *et coll.*^[37] avec la rmGP. La structure cristallographique de la protéine est préparée pour le docking en retirant les molécules d'eau et les molécules organiques. Les parties de séquence manquantes (résidus 252 à 257 et 316 à 324) sont générées avec SWISSMODEL.^[86] Le docking en lui-même est effectué avec Autodock selon la méthode décrite par Morris *et al.*^[85] pour prédire la position spatiale du ligand **II-5** dans la GP. Afin de se limiter au site catalytique, une boîte de calcul de 19x26x23 Å³ est centrée sur le site catalytique à l'aide du ligand co-cristallisé dans le complexe 2QRP. Les degrés de liberté des liaisons sont automatiquement détectés par Autodock et les liaisons du glucose sont fixées. Les paramètres par défaut de l'Algorithme Génétique Lamarckien ont été utilisés pour le calcul. Trois runs de docking sont réalisés, chaque run comptant 100 positions de ligands. Ces 300 positions testées révèlent au total 5 modes d'associations spatiaux possibles pour le ligand **II-5** dans le site catalytique. Il est possible de comparer ces 5 complexes avec différents critères :

- Leur fréquence d'apparition (ou population)
- Leur énergie d'association calculée par Autodock
- Leur RMSD (Route Mean Square Deviation) par rapport au ligand co-cristallisé dans 2QRP

Tous ces résultats sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Complexe	Nombre de positions	Population (%)	Energie de liaison (kcal/mol)	RMSD vs 2QRP (Å)
1	87	29	-9,07	1,61
2	147	49	-5,12	8,29
3	50	16.67	-3,76	1,74
4	9	3	-3,11	3,07
5	7	2.33	-1,82	8,46

Tableau 2 : Résultats des études de docking sur le ligand II-5 dans la rmGP

Parmi ces 5 complexes, certains sont plus vraisemblables que d'autres. Les complexes 2 et 5 présentent par exemple un RMSD ≥ 8 par rapport au ligand de 2QRP. Cela signifie que les deux unités de glucose des deux ligands ne sont pas orientées de la même façon dans l'espace. Or, comme évoqué précédemment, la position du glucose dans le site catalytique de l'enzyme est primordiale pour la mise en place des liaisons hydrogènes. Les complexes 2 et 5 ne sont donc pas de bons candidats pour la suite de notre étude. Le complexe 4, étant faiblement représenté dans la population totale, n'est pas retenu non plus pour la suite de l'étude. Les complexes 1 et 3 ont un RMSD faible (respectivement 1,61 et 1,74), ce qui montre que la position spatiale de l'unité glucose est cohérente par rapport au ligand co-cristallisé de 2QRP. En effet, il est possible de vérifier visuellement cette superposition des deux ligands grâce aux structures 3D fournies par le docking (Figure 44). Sur cette image, dans les deux complexes, l'unité de glucose du ligand II-5 (représenté en jaune) se superpose avec l'unité glucose du ligand co-cristallisé de 2QRP (représenté en rose).

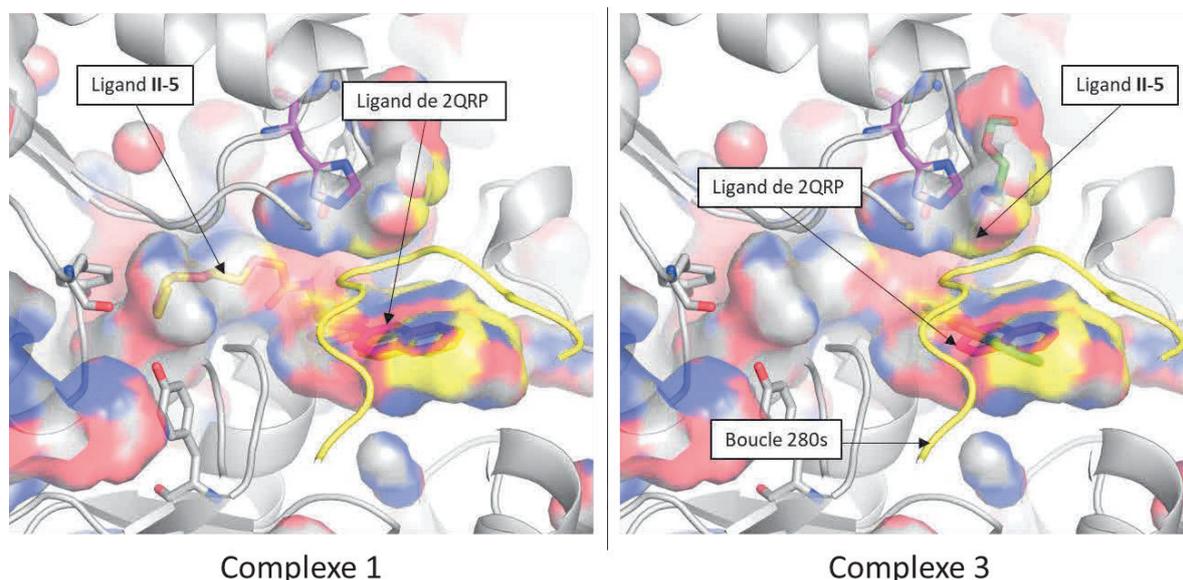


Figure 44 : Représentation 3D des complexes 1 et 3 issus du docking du ligand II-5 dans la rmGP

Bien que la méthode de docking nous permette de prédire deux modes d'association vraisemblables pour le ligand II-5, elle ne prend en compte que les interactions spatiales dans un état figé. Afin de valider ou non notre hypothèse pour le branchement du bras espaceur, il est possible de faire des études de dynamique moléculaire. Cette méthode de calcul, qui prend en compte l'interactions des différents atomes entre eux, permettra de conclure quant à la stabilité des complexes 1 et 3.

II.2.2. Etudes de dynamique moléculaire

Afin d'étudier les interactions des deux précédents complexes en Dynamique Moléculaire (DM), nous prenons comme point de départ les structures 3D fournies par Autodock. Les simulations de DM ont été réalisées avec la suite Amber 2017.^[87] Le champ de force Amber 14SB^[88] a été utilisé pour la protéine et le champ de force de Gaff^[89] a été employé pour les ligands organiques. La distribution de charge du ligand a été calculée avec Gaussian09 en dérivant les charges électrostatiques potentielles.^[90] Le système protéine-ligand a été solvaté dans un octaèdre avec des molécules d'eau à une distance minimale de 10 Å du soluté, et chaque complexe est neutralisé avec des ions sodium ou chlorure. Le système a ensuite été minimisé en utilisant un critère de convergence pour le gradient d'énergie fixé à 0,01 kcal.mol⁻¹.Å⁻², puis il est chauffé de 0 à 298 K en 100 ps ce qui restreint la position des atomes lourds du ligand et de la protéine avec une constante de force de 50 kcal.mol⁻¹.Å⁻². Les contraintes sont progressivement relâchées pendant 3 ns à pression (1 bar) et température (298 K) constantes, ce qui permet à la densité du système d'être équilibrée. Pour finir, des trajectoires de DM sans contraintes ont été produites pour chaque système. Les simulations ont été calculées en utilisant l'algorithme SHAKE pour contraindre les hydrogènes, l'algorithme Particle Mesh Ewald pour l'électrostatique longue portée et un seuil de 9 Å pour les interactions non liées.

L'analyse des trajectoires de DM montre des valeurs faibles et stables de RMSD sur 200 ns pour les deux complexes **1** et **3** (Figure 45). La constance et la faible valeur de RMSD indique que les deux complexes sont stables et que leur mode de liaison respectif est valide et viable.

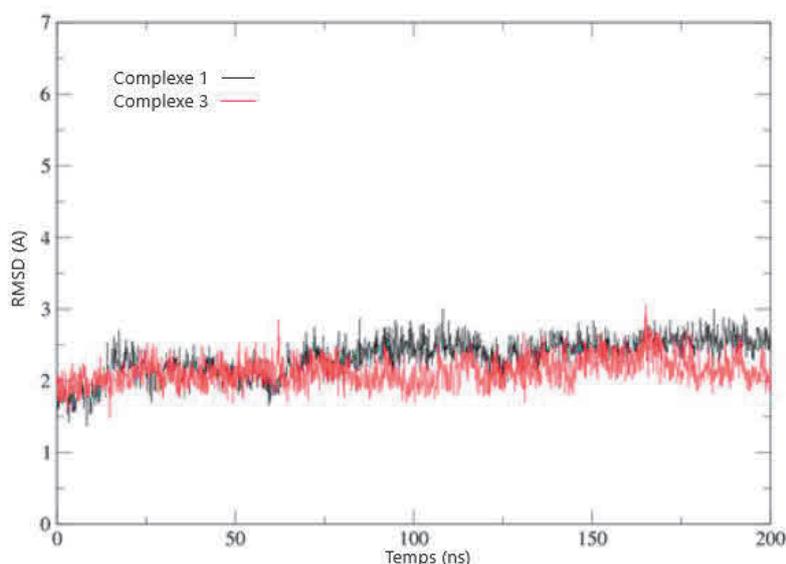


Figure 45 : Représentation du RMSD en fonction du temps pour les trajectoires DM des complexes 1 et 3

Cependant, en analysant la structure 3D de ces deux complexes (Figure 44), il faut souligner que pour le complexe **1**, le bras glycol s'étend vers l'intérieur de la protéine. Il est donc impossible d'imaginer un branchement de plateforme multivalente à cette extrémité. En revanche, pour le complexe **3**, le bras glycol s'étend par-dessus la boucle 280s vers la surface de la protéine. L'analyse de la trajectoire DM révèle cependant que le bras est trop court pour atteindre le solvant.

Notre hypothèse suggérant que la position 2 du glucose peut servir de point d'ancrage à un bras espaceur menant vers une plateforme multivalente n'est donc pas encore totalement vérifiée.

Afin de permettre une vérification certaine de cette hypothèse, un nouveau ligand **II-6** est modélisé (Figure 46). Il présente cette fois un glycol à cinq unités, qui est relié à son extrémité à un groupement triphénylméthyl qui servira de modèle pour la plateforme multivalente. Ce ligand est étudié en docking et en DM selon les mêmes protocoles utilisés précédemment. Les résultats de ces études sont décrits ci-après.

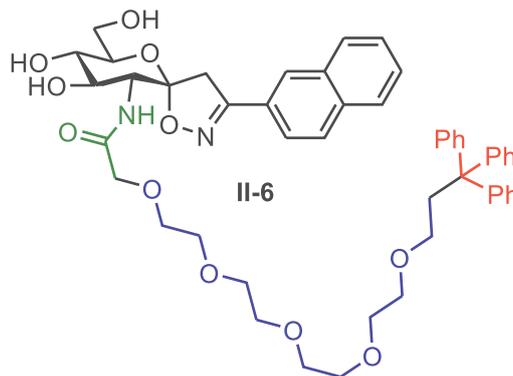


Figure 46 : Nouveau ligand modélisé

II.2.3. Description des résultats obtenus pour le nouveau ligand

L'étude de docking permet comme précédemment de donner une structure 3D du complexe de **II-6** avec la rmGP qui sert de point de départ pour la trajectoire de dynamique moléculaire. L'analyse de cette trajectoire permet de tracer le RMSD en fonction du temps (Figure 47). A la vue de la stabilité du RMSD sur les 150 dernières nanosecondes de la trajectoire, il est possible de conclure que l'association ligand-protéine est stable.

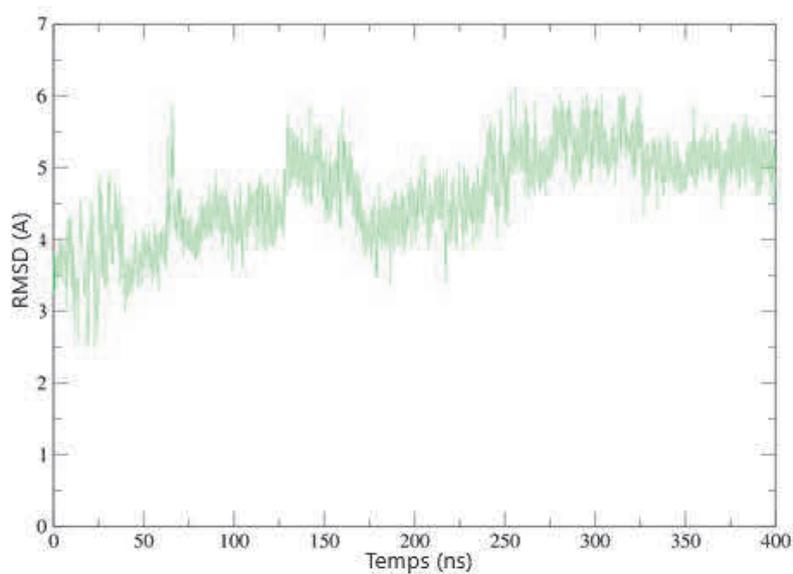


Figure 47 : Représentation du RMSD en fonction du temps pour la trajectoire DM de **II-6** dans la rmGP

De plus, l'analyse structurale de la structure 3D en fin de trajectoire permet de montrer plusieurs éléments (Figure 48). Tout d'abord, le groupement triphénylméthyle est cette fois en dehors de la protéine, ce qui permet de confirmer la possibilité de conjugaison à une plateforme multivalente. La figure ci-dessous (Figure 48) représente la superposition 3D de 2 complexes : celui obtenu par dynamique moléculaire avec le ligand **II-6** (représenté en turquoise) et la structure provenant du co-cristal 2QRP (représenté en blanc). Il faut alors noter que le bras glycol part de la poche du site catalytique (encerclée en noir) et passe dans une autre poche (encerclée en rouge) pour atteindre le solvant. Cette poche correspond au site inhibiteur de la caféine. Il faut aussi noter le changement de conformation de His571 en fin de trajectoire, respectivement au complexe 2QRP.

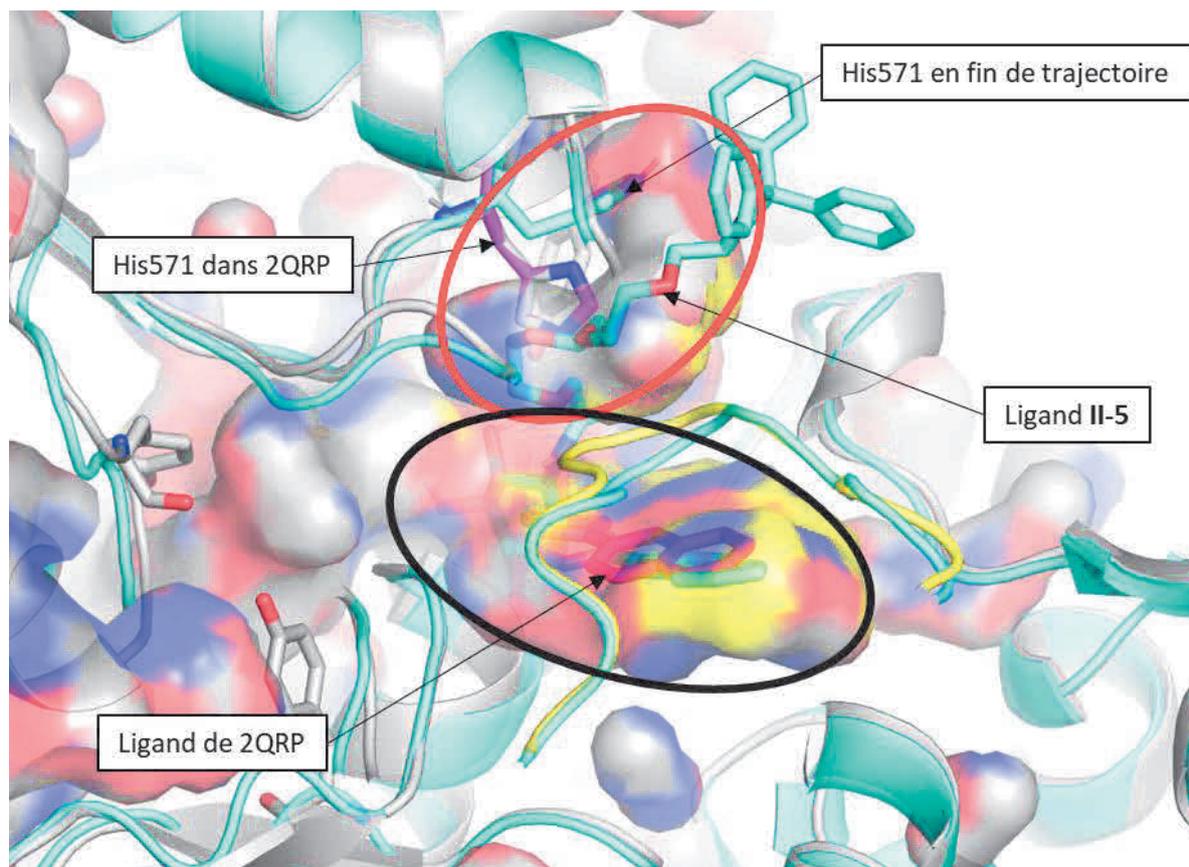


Figure 48 : Représentation superposée des structures 3D du complexe 2QRP (en blanc) et du complexe obtenu par dynamique moléculaire (en turquoise).

II.2.4. Conclusion

Pour conclure, les résultats obtenus par dynamique moléculaire avec le ligand **II-6** et la rmGP permettent de dire que le branchement d'un bras espaceur vers une plateforme multivalente peut se faire sur la position 2 du glucose.

Afin de vérifier expérimentalement ces résultats obtenus par une méthode prédictive, nous nous proposons de faire la synthèse de six composés multivalents représentés ci-dessous (Figure 49). Ils ont tous en commun la même plateforme multivalente qui est le calixarène **II-4**, sur lequel seront greffés, grâce à une réaction de couplage azide-alcyne, deux bras espaceurs de longueurs différentes : l'un à trois unités glycol et l'autre en possédant cinq (respectivement **II-7** et **II-8**). A l'extrémité des bras de

ces deux plateformes seront conjuguées les glucosamines **II-2**, **II-9** et **II-10** avec un lien amide, offrant les six composés multivalents désirés.

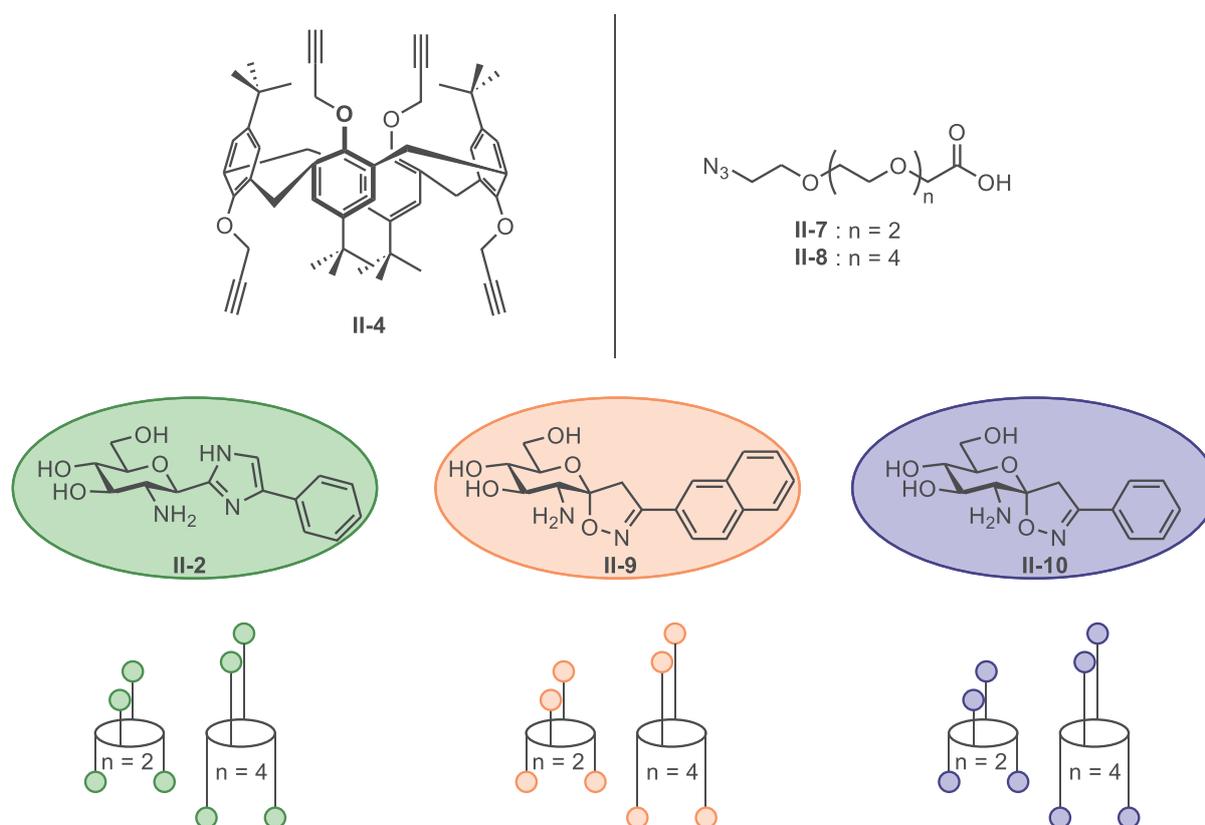


Figure 49 : Les différents calixarènes multivalents

La synthèse de **II-2** a déjà été reportée par Somsák *et coll.*^[32] et nous la redétaillerons ci-après dans ce chapitre. La synthèse des glucosamines **II-9** et **II-10** n'a quant à elle jamais été réalisée. Nous proposerons une voie de synthèse pour ces deux nouvelles molécules, afin de synthétiser les 6 inhibiteurs multivalents.

Par la suite, l'évaluation biologique de ces calixarènes sera effectuée. Elle permettra de confirmer ou de contredire les résultats obtenus par la modélisation moléculaire et de conclure sur la présence d'un effet multivalent pour l'inhibition de la glycogène phosphorylase.

II.3. Synthèse du 2-(2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-5-phenyl-imidazole

Dans cette partie nous allons détailler la synthèse de l'inhibiteur glucosidique **II-2**. Cette synthèse a été décrite par Somsák *et coll.*^[32] en partant de l'amide **II-14** (Schéma 8). Les étapes de synthèse menant à cet amide sont elles aussi décrites dans la littérature. La voie de synthèse complète menant au composé **II-2** est montrée ci-dessous.

Conception et synthèse d'inhibiteurs multivalents de la glycogène phosphorylase

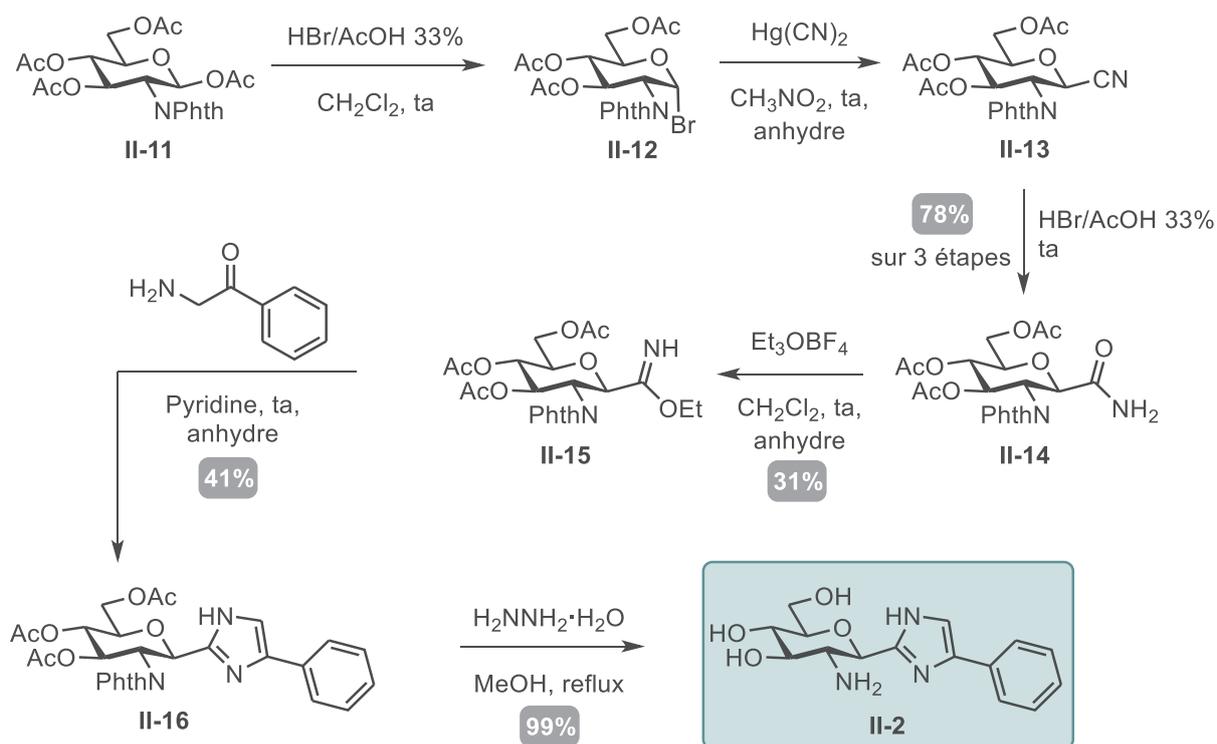


Schéma 8 : Voie de synthèse du 2-(2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-5-phenyl-imidazole

La première étape de cette synthèse consiste en la bromation de la position anomère du 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranose **II-11** disponible commercialement. L'introduction du brome permet à son tour une cyanation en position anomère (composé **II-13**) en présence de cyanure de mercure.^[91] Il faut noter que cette réaction nécessite le séchage de tous les réactifs et solvant pour ne pas hydrolyser le réactif. Il faut aussi souligner que l'emploi du cyanure de mercure, hautement toxique, nécessite des traitements particuliers en fin de réaction pour s'assurer de sa neutralisation. Il est notamment nécessaire d'effectuer des lavages au KBr pour favoriser le passage en phase aqueuse sous forme de KCN. Il est aussi primordial d'éviter les milieux acides pour ne pas former HCN qui est un neurotoxique. L'amide **II-14** de départ de Somsák est obtenu facilement par l'hydrolyse du nitrile **II-13** en présence d'acide bromhydrique à 33%^[92] dans l'acide acétique avec un rendement global de 78% pour ces trois premières étapes de synthèse.

La réaction de cet amide, en condition anhydre, avec le sel de Meerwein permet d'obtenir l'iminoéther **II-15** avec un rendement faible de 31%, bien que les auteurs reportent un rendement de 97% pour cette même réaction. Mis en réaction avec la 2-aminophénone, l'iminoéther **II-15** permet la formation de l'imidazole **II-16**. La dernière étape de cette synthèse consiste en la déprotection des groupements acétates et phthalimide par l'hydrazine pour obtenir l'inhibiteur **II-2**.

La synthèse de cet inhibiteur étant faite, il faudra ensuite réaliser la liaison amide pour introduire le bras espaceur et le greffage sur le cœur calixarène. Ces étapes seront détaillées plus loin dans ce chapitre.

II.4. Synthèse de la glucosamine spiroisoxazoline

II.4.1. Etude de la synthèse de la spiroisoxazoline

La synthèse de l'inhibiteur **II-3** reportée dans la littérature par Praly *et coll.* à partir de l'*exo*-glucal **II-19b** est la suivante^[37] (Schéma 9).

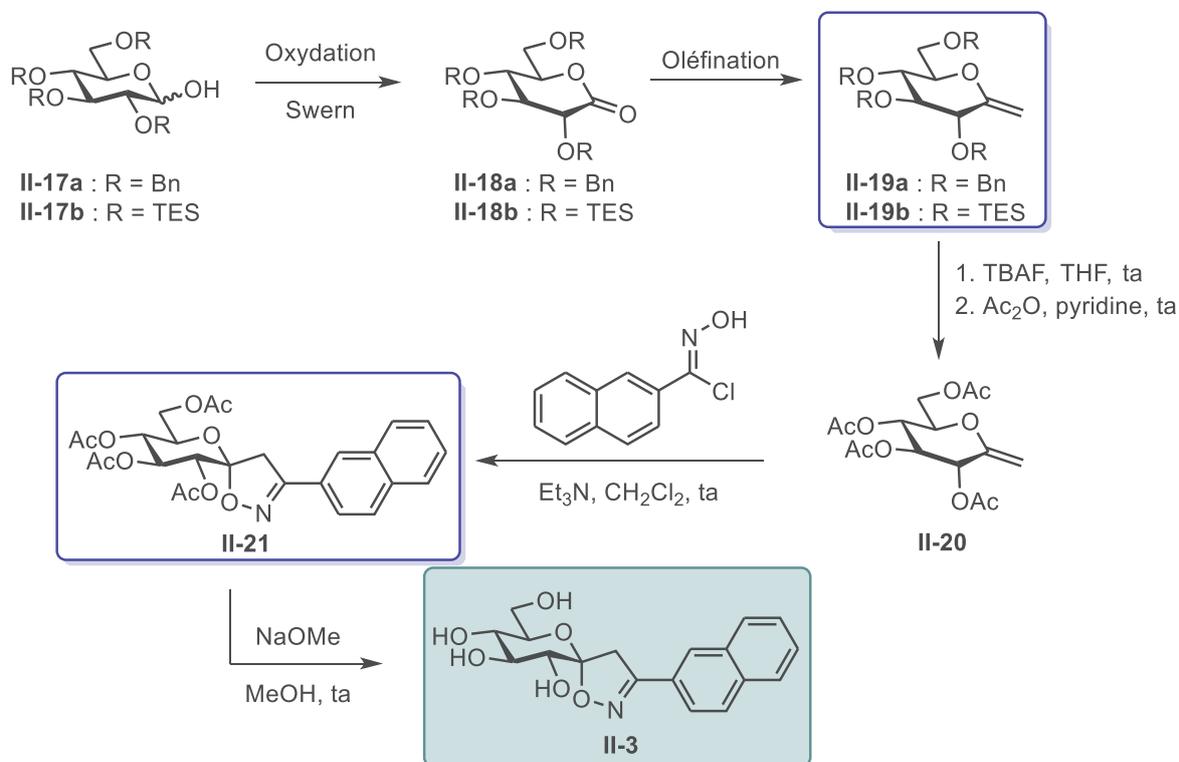


Schéma 9 : Synthèse de la spiroisoxazoline selon Praly et coll.

La synthèse débute par l'oxydation dans les conditions de Swern du glucose protégé **II-17** en lactone **II-18**. A partir de cette lactone, plusieurs types d'oléfination sont possibles pour obtenir l'*exo*-glucal **II-19**. En 1986, Rajanbabu *et al.* reportent l'utilisation du réactif de Tebbe sur la lactone **II-18a** pour obtenir le dérivé **II-19a** avec un rendement de 82%.^[93] Plus récemment, des études réalisées au laboratoire par Gueyrard *et al.* montrent la possibilité d'utiliser une réaction de Julia modifiée pour permettre la formation des *exo*-glucal **II-19a** et **II-19b** à partir des lactones correspondantes avec de bons rendements (respectivement 74% et 53%).^[94] Il faut noter que l'emploi de la réaction de Julia modifiée permet l'utilisation d'éther silylés comme groupements protecteurs alors que l'oléfination de Tebbe requiert des éthers benzylques. A partir de l'*exo*-glucal **II-19b**, les auteurs effectuent un changement de groupe protecteur des silyles aux acétates. En effet, dans une étude préalable,^[95] ils montrent qu'avec des groupements silyles aucune cycloaddition n'est possible (Schéma 10). De plus, bien que l'utilisation des benzyls permet l'obtention de la spiroisoxazoline **II-22**, toute tentative de déprotection de ces groupements par hydrogénolyse entraîne une coupure de liaison O-N de l'hétérocycle précédemment formé (Schéma 10). Le changement des groupes protecteurs apparaît donc ici comme primordial pour la synthèse.

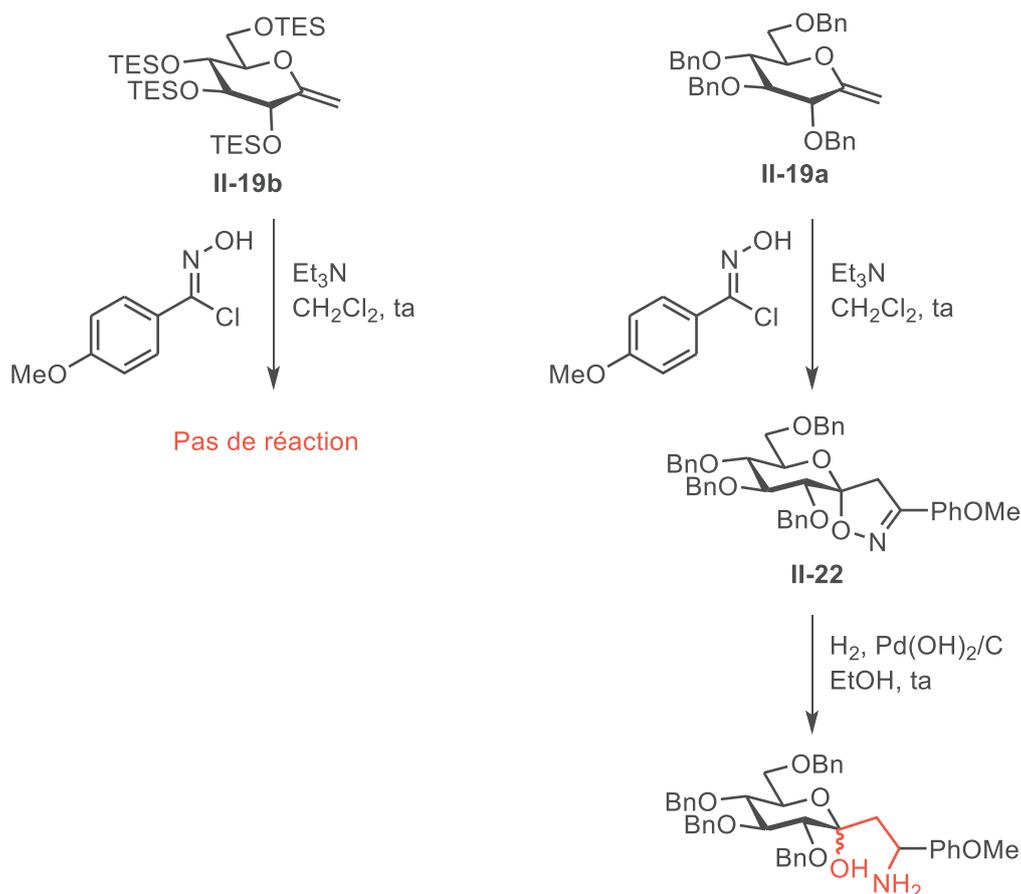


Schéma 10 : Formation de la spiroisoxazoline avec différents groupes protecteurs

Le composé **II-20** obtenu est alors mis en présence de 2-naphtyl-chloroxime et de triéthylamine pour effectuer la cycloaddition 1,3-dipolaire permettant la formation de la spiroisoxazoline **II-21** (Schéma 9). Une dernière étape de déprotection des groupements acétates par la méthode de Zemplén permet l'obtention de l'inhibiteur **II-3**.

Dans une étude plus récente, les mêmes auteurs décrivent d'autres conditions réactionnelles pour la cycloaddition 1-3 dipolaire^[39] (Schéma 11). Initialement, les chloroximes **II-24** étaient mises en réaction avec la triéthylamine, une élimination d'acide chlorhydrique permettait alors d'obtenir l'oxyde de nitrile intermédiaire nécessaire à la cyclisation. Les nouvelles conditions reportées permettent l'utilisation d'oximes **II-23** qui, lors d'ajout d'hypochlorite de sodium dilué, forment les oxydes de nitrile intermédiaires. Cette réaction « one-pot » représente les avantages d'être plus simple à mettre en œuvre et de fournir de meilleurs rendements (99% contre 94% pour le dérivé 2-naphtyl). Les auteurs ont aussi constaté que la chloration d'oximes par le NCS/HCl_g posait parfois des problèmes en chlorant le noyau aromatique de l'oxime. En utilisant cette méthodologie, les auteurs ont ainsi pu synthétiser facilement 19 spiroisoxazolines.

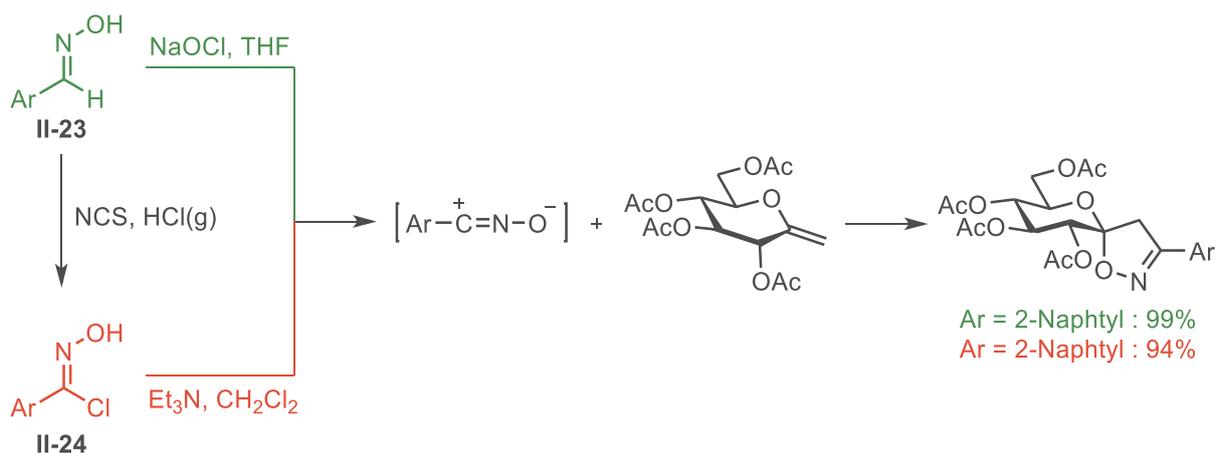


Schéma 11 : Comparaison des deux méthodes de cycloaddition

L'étude de cette synthèse permet de conclure que 2 étapes sont primordiales pour la formation du spiro-hétérocycle : la formation de l'*exo*-glucal et la cycloaddition 1,3-dipolaire (Schéma 9).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons étudier ces deux étapes clés afin de pouvoir proposer et réaliser une voie de synthèse viable de nos deux inhibiteurs cibles **II-9** et **II-10** comportant une fonction amine en position 2.

II.4.2. Etude bibliographique sur l'oxydation des alcools

Afin de pouvoir choisir les conditions réactionnelles qui nous seront les plus favorables pour notre synthèse, nous allons étudier dans cette partie des réactions d'oxydation qui nous permettraient d'obtenir la lactone. La liste qui suit présente donc les réactions principales mais elle n'est pas exhaustive.

II.4.2.1. Oxydation de Swern

En 1978, Swern *et coll.* décrivent des conditions douces pour permettre l'oxydation des alcools en dérivés carbonylés.^[96] Ces conditions représentent l'avantage de ne pas sur-oxyster l'aldéhyde obtenu à partir d'un alcool primaire. L'inconvénient principal de cette réaction est l'emploi du chlorure d'oxalyle, hautement réactif et corrosif (Schéma 12).

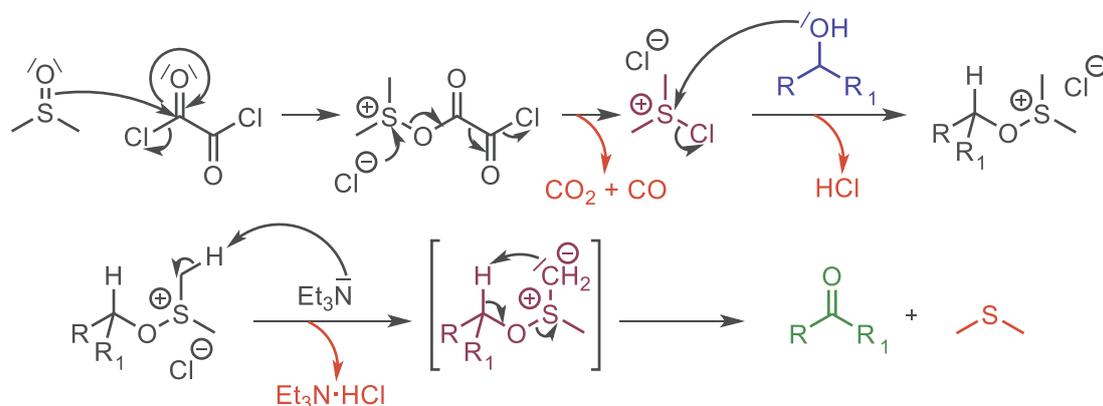
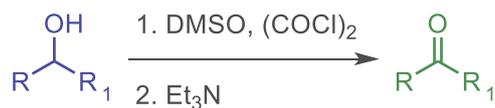


Schéma 12 : L'oxydation de Swern et son mécanisme

L'espèce chimique permettant de réaliser l'oxydation est l'ion diméthylchlorosulfonium qui est obtenu *in situ* par la condensation du DMSO sur le chlorure d'oxalyle. L'attaque de l'alcool sur ce cation forme un alcoxysulfonium qui, en présence d'une base, subit une déprotonation pour former un ylure de soufre. Cet ylure va à son tour subir une déprotonation intramoléculaire *via* un état de transition cyclique, ce qui permet la formation du dérivé carbonylé, accompagnée de sulfure de diméthyle.

II.4.2.2. Oxydation de Dess-Martin

En 1983, D. B. Dess et J. C. Martin décrivent un nouveau réactif pour faire l'oxydation des alcools, le Dess-Martin periodinane.^[97] Ce composé présente un iode hypervalent et il offre une oxydation douce des alcools en aldéhydes ou cétones (Schéma 13). Comme pour les conditions de Swern, l'aldéhyde ne sera pas sur-oxydé en acide carboxylique dans cette réaction.

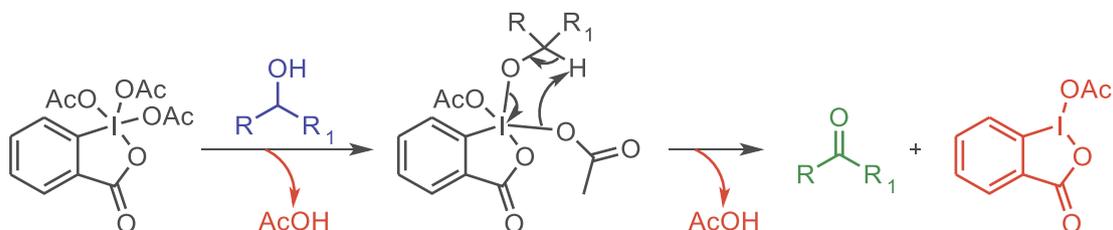
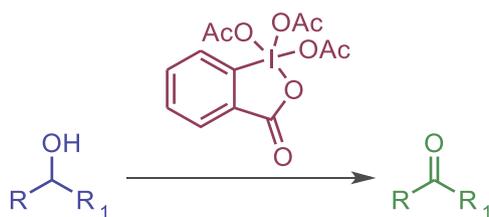


Schéma 13 : L'oxydation de Dess-Martin et son mécanisme

La réaction, généralement réalisée dans le dichlorométhane à température ambiante, est rapide et les produits obtenus sont facilement séparés du co-produit iodé par de simples lavages basiques.

II.4.2.3. Oxydation de Jones

L'utilisation de chrome permet aussi d'obtenir des dérivés carbonyles par l'oxydation des alcools.^[98] Le réactif de Jones est formé à partir de trioxyde de chrome et d'acide sulfurique (Schéma 14). L'acide chromique obtenu forme un ester de chromate en présence d'alcool qui réagit de façon intra- ou intermoléculaire pour donner le composé carbonyle correspondant. Toutefois, si le produit formé est un aldéhyde, il peut alors s'hydrater et effectuer une seconde oxydation suivant le même mécanisme pour former l'acide carboxylique.

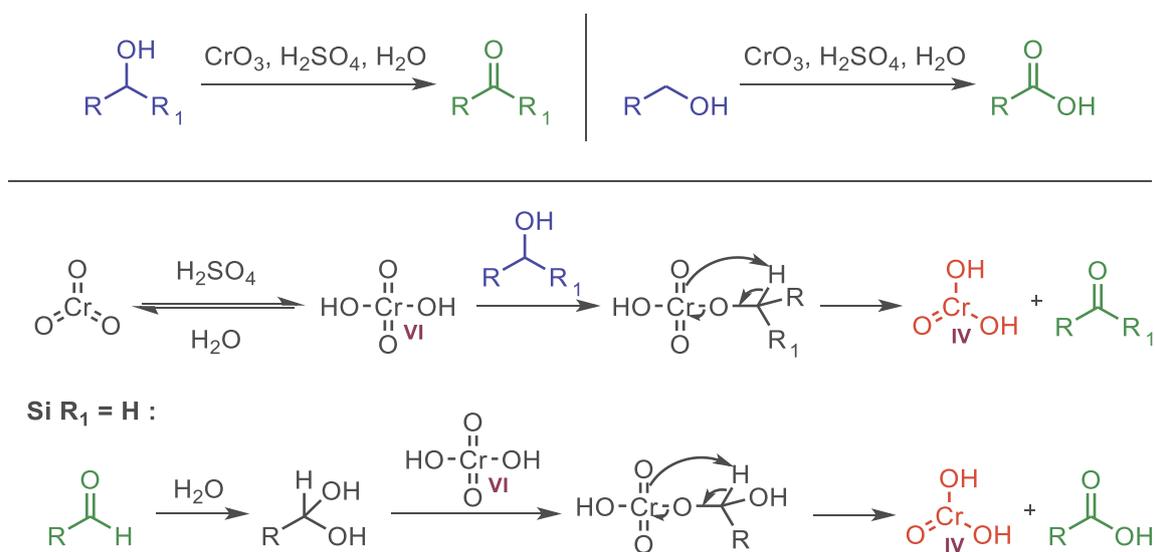


Schéma 14 : L'oxydation de Jones et son mécanisme

II.4.2.4. Oxydation au chlorochromate de pyridinium

Une alternative aux conditions de Jones a été apportée par Corey *et al.* avec l'utilisation de chlorochromate de pyridinium (PCC).^[99] Les propriétés du PCC peuvent être comparées à celle du PDC (dichromate de pyridinium) puisqu'ils ont tous deux l'avantage d'être stable à l'air, peu hygroscopique et commerciaux. S'il n'est pas utilisé dans sa forme commerciale, PCC peut-être formé *in situ* en mélangeant le trioxyde de chrome à l'acide chlorhydrique et la pyridine (Schéma 15). Le chlorochromate obtenu réagit avec l'alcool selon un mécanisme similaire au réactif de Jones détaillé ci-dessous (Schéma 15). Toutefois, contrairement aux conditions de Jones, l'utilisation de PCC ne permettra pas la sur-oxydation de l'aldéhyde en acide carboxylique.

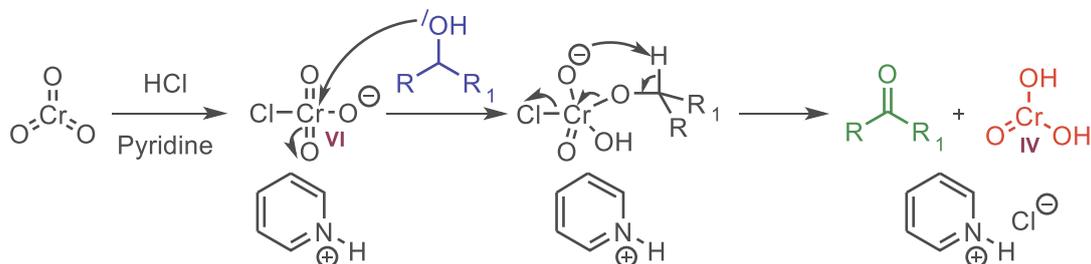
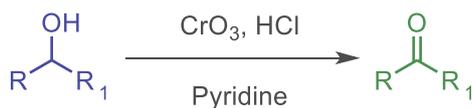


Schéma 15 : Oxydation au PCC et mécanisme

II.4.2.5. Oxydation d'Albright-Goldman

En 1965, J. D. Albright et L. Goldman développent des conditions d'oxydations en employant un mélange de DMSO et d'anhydride acétique comme agent oxydant.^[100] Le mécanisme réactionnel, qui peut être comparé à celui de Swern est illustré ci-dessous (Schéma 16).

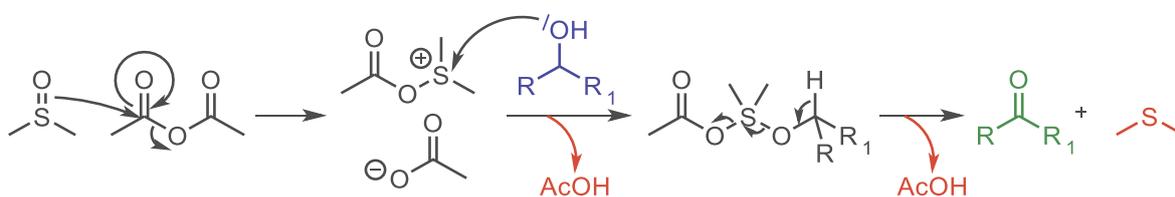


Schéma 16 : L'oxydation d'Albright-Glodman et son mécanisme

Le DMSO réagit avec l'anhydride acétique pour former le cation sulfonium réactif. L'addition de l'alcool sur ce cation entraîne le départ d'acide acétique pour donner un intermédiaire réactionnel qui se réarrange pour former le dérivé carbonylé correspondant et du sulfure de diméthyle. Par rapport à l'oxydation de Swern, ces conditions présentent l'avantage d'être beaucoup moins toxiques.

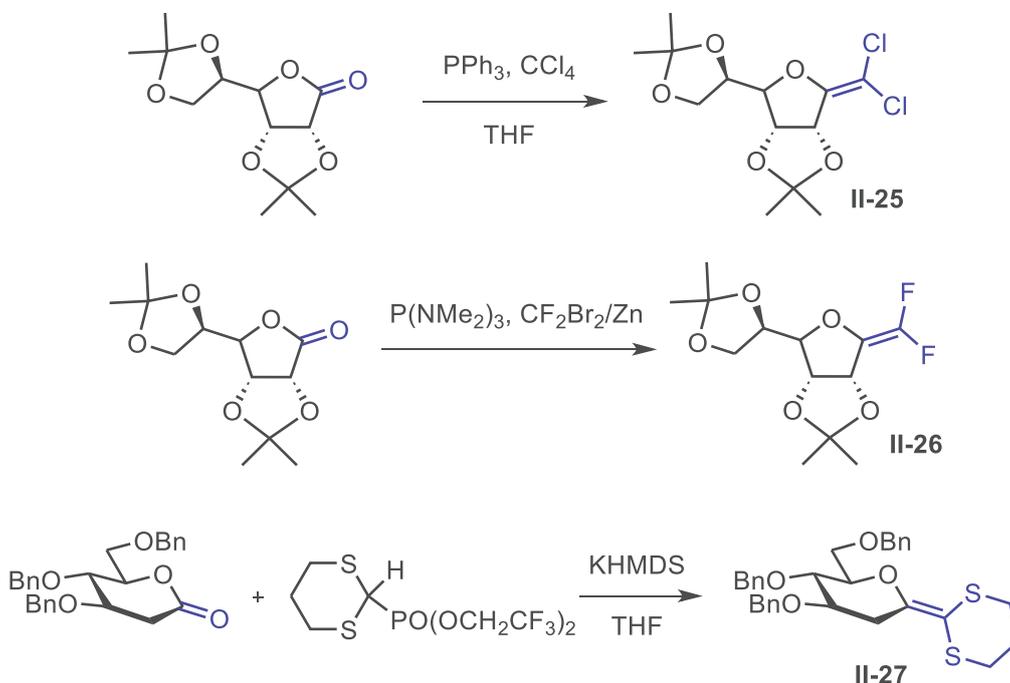
II.4.3. Etude bibliographique de l'oléfination

Comme nous l'avons vu précédemment, la formation de la lactone permet d'introduire l'*exo*-glucal par oléfination de cette dernière. Dans cette partie, nous allons nous consacrer à l'étude des oléfinations sur les dérivés carbonylés. Nous n'étudierons volontairement que des exemples d'oléfination réalisés sur des lactones ou des dérivés de sucres.

II.4.3.1. La réaction de Wittig ou dérivé

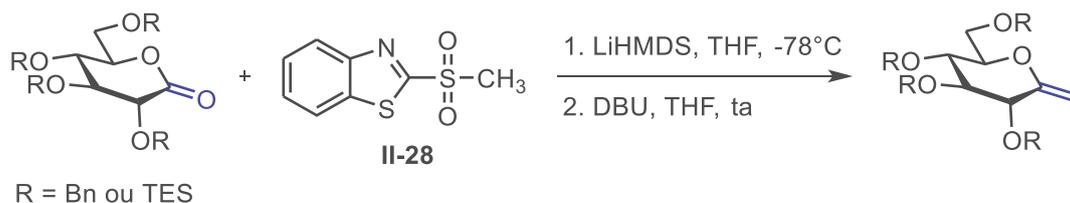
La réaction de Wittig^[101] semble être un outil adapté pour former une double liaison C-C à partir d'un carbonyle. Cependant, la faible réactivité des esters pour les phosphoranes est bien établie et peu d'exemples de réactions de Wittig réalisées sur des glyconolactones sont présents dans la

littérature.^[102] Parmi ces exemples, la formation d'alcènes *gem*-dihalogénés^{[103],[104]} (**II-25** et **II-26** Schéma 17) ou la formation d'alcènes dithioacétals^[105] par une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons ou de Peterson (**II-27** Schéma 17). Bien que ces réactions aient un intérêt pour la synthèse de C-glycosides, aucune ne permet la formation du méthylène *exo*-glycal requis pour notre synthèse.



II.4.3.2. La réaction de Julia

Des études précédentes menées au laboratoire par Gueyraud *et coll.* ont permis de montrer qu'il est possible de réaliser une oléfination de Julia sur des glyconolactones.^{[94],[106],[107]}



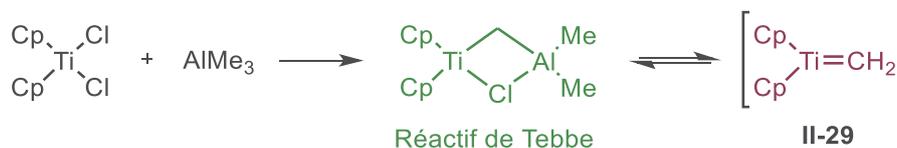
Avec l'emploi de la sulfone **II-28** (Schéma 18), la réaction de Julia permet d'obtenir le méthylène *exo*-glycal voulu. Les auteurs étudient aussi l'influence de la base permettant la déprotonation de la sulfone. En utilisant le LiHMDS dans les conditions de Barbier (ajout de la base sur le mélange de sulfone et de lactone), ils obtiennent les meilleurs résultats.

Cependant, le recours à une base lithiée interdit l'utilisation d'esters comme groupements protecteurs.

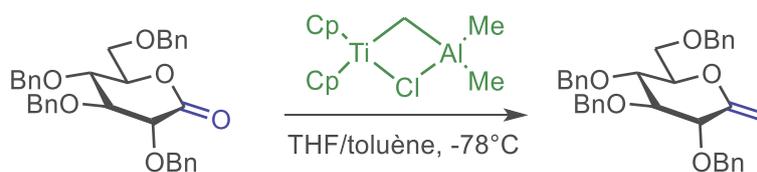
II.4.3.3. L'oléfination de Tebbe

En 1978, Tebbe *et al.* décrivent l'utilisation d'un réactif à base de titane pour réaliser l'homologation par oléfination des carbonyles.^[108] Il est obtenu en faisant réagir le dichlorure de titanocène avec du

triméthylaluminium (Schéma 19). Le réactif de Tebbe n'est pas l'espèce chimique réactive dans le milieu, il subit un réarrangement pour fournir le carbène de Schrock **II-29** qui réagit lui avec le dérivé carbonylé.

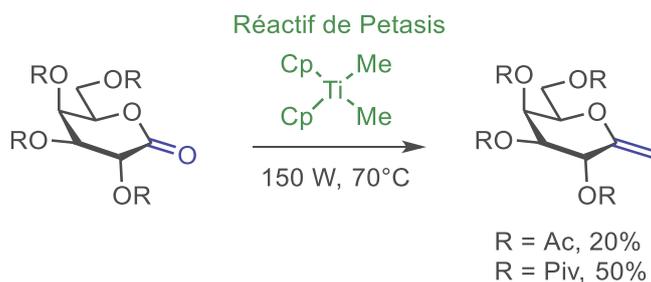


L'utilisation de ce réactif a donc permis de synthétiser des méthylènes *exo*-glycals, et des exemples peuvent être trouvés dans la littérature^[102] (Schéma 20).



Toutefois, aucune réaction n'utilisant des groupements protecteurs à base d'esters n'a été reportée avec ce réactif.

Il existe cependant un autre dérivé de titane, appelé le réactif de Petasis, qui permet lui aussi de réaliser des oléfination sur les lactones. Le titanocène de Petasis présente l'avantage d'être stable à l'air et il est considéré comme plus sécuritaire sur la synthèse à plus grande échelle. Woodward *et al.* ont reporté l'utilisation de ce réactif sur des glyconolactones protégées par des acétates et pivalates^[109] (Schéma 21). Ils remarquent une différence de réactivité avec un faible rendement de 20% pour la synthèse avec les groupements acétates, contre 50% avec la protection par les pivalates. Bien que certains chercheurs aient aussi essayé de démontrer la différence de réactivité vis-à-vis des différentes fonctions ester,^[110] peu de rationalisation a pu être faite à ce jour.



II.4.4. Autres réactivités pour la formation d'*exo*-glycals

Bien que les réactions d'oléfination offrent des possibilités intéressantes pour l'obtention d'*exo*-glycals, elles ne tolèrent généralement pas la présence des esters en groupement protecteur. Comme énoncé précédemment, une protection par les acétates est nécessaire afin de réaliser la cycloaddition 1,3-dipolaire qui permet de former l'isoxazoline. Dans le cas de l'utilisation de réaction d'oléfination

(outre celle de Petasis), il faudrait alors faire un changement de groupe protecteur. Cependant, d'autres voies de synthèses permettent d'accéder aux *exo*-glycals.

II.4.4.1. Les réactions d'éliminations

Contrairement aux méthodes étudiées jusqu'à présent, cette approche implique la réalisation de 2 étapes de synthèse indépendantes. La première étape de la séquence consiste généralement en l'introduction d'un groupe partant en position anomère ou en alpha qui sera éliminé pour former la double liaison C=C dans un deuxième temps. Prenons pour exemple la synthèse de Martin *et al.* qui décrit l'obtention d'un *exo*-glucal en deux étapes à partir du gluco-heptinol **II-30** (Schéma 22).^[111] La première étape consiste en la cyclisation assistée par Hg(OAc)₂ et permet l'introduction d'un iodométhylène en position anomère. Dans la deuxième étape, l'élimination de l'iode en présence de base permet d'obtenir le méthylène *exo*-glycal correspondant.

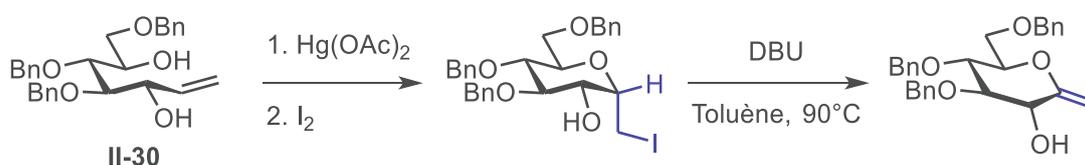


Schéma 22 : Synthèse de Martin *et al.*

Un autre exemple peut être cité pour l'obtention d'*exo*-glycal substitués avec la synthèse décrite par Lin *et coll.*^[112] (Schéma 23). A partir de la gluconolactone benzylée, l'addition d'un lithien ou d'un magnésien donne le composé **II-31** qui, traité par de l'anhydride trifluoroacétique, forme l'*exo*-glycal **Z II-32**. La sélectivité s'explique par la conformation de l'intermédiaire oxonium formé (Schéma 23). Lors de l'activation par l'anhydride trifluoroacétique, le groupement hydroxyle est éliminé pour former les oxoniums **A** et **B**. Or, le conformère **A** est défavorisé à cause de l'interaction 1,3-allylique entre le benzyle du carbone 2 et le groupement R. La formation de l'isomère **Z** issu de l'intermédiaire **B** est donc favorisée. Les auteurs exemplifient cette réaction avec le glucose, le galactose et le mannose et une multitude de groupements R sont aussi testés, ce qui fait de cette réaction un outil robuste pour la synthèse.

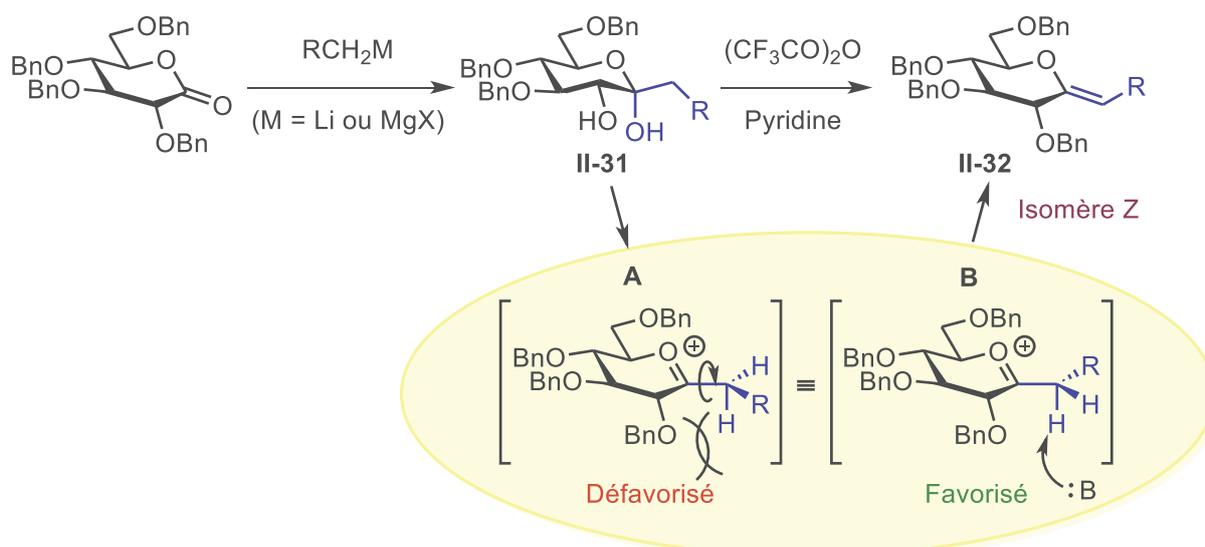


Schéma 23 : Synthèse d'*exo*-glycals par Lin *et coll.*

II.4.4.2. Le réarrangement de Ramberg-Bäcklund

La préparation d'oléfines avec des sulfones en utilisant le réarrangement de Ramberg-Bäcklund est aussi bien connue. Le principe de cette réaction est d'utiliser une sulfone asymétrique qui sera halogénée sur l'une de ces positions α . Un traitement par une base vient ensuite déprotoner l'autre position α de la sulfone. Il s'en suit un réarrangement intramoléculaire par la formation d'une première liaison C-C pour faire une épisulfone, et le départ de dioxyde de soufre permet l'obtention de la double liaison. Ce concept est appliqué par Taylor *et coll.* et Franck *et coll.* à une glycosyl-sulfone pour l'obtention d'*exo*-glycals^{[113],[114]} (Schéma 24). Les auteurs utilisent ici un agent chlorant et l'hydroxyde de potassium en tant que base pour effectuer la réaction. Ils reportent aussi que dans d'autres conditions (CBr₂F₂ et KOH), le composé bromé **II-33** est aussi obtenu en mélange. Il faut aussi noter qu'aucune sélectivité n'est observée pour l'acène obtenu.

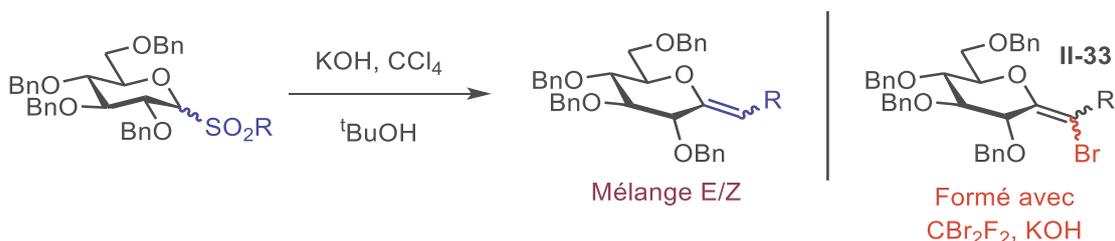


Schéma 24 : Réarrangement de Ramberg-Bäcklund

II.4.4.3. La réaction de Bamford-Stevens

Récemment, Tóth *et al.* ont décrit la formation de méthylène *exo*-glycal par la réaction de Bamford-Stevens sur des anhydroaldose tosylhydrazones.^{[115],[116]} A partir du dérivé cyano **II-34** ou de l'aldéhyde **II-35**, les auteurs reportent l'obtention de la tosylhydrazone **II-36**. En présence de NaH, ce composé réagit pour former l'intermédiaire carbène qui donne l'*exo*-glycal correspondant (Schéma 25).

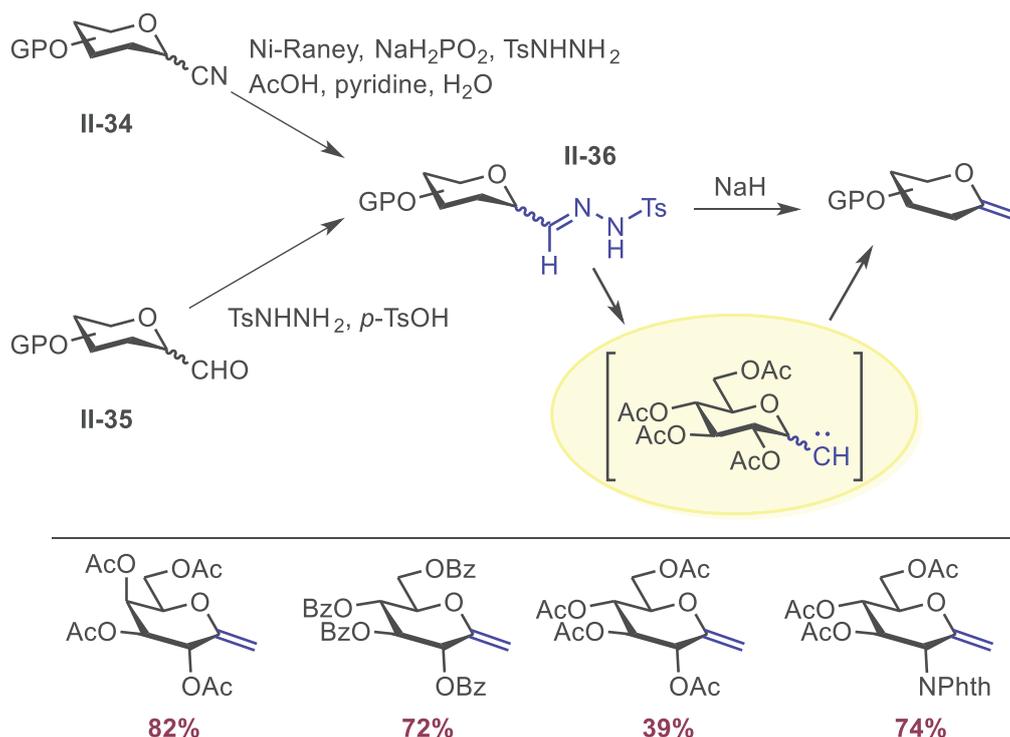


Schéma 25 : la réaction de Bamford-Stevens pour la synthèse d'exo-glycal

Les auteurs utilisent cette méthodologie sur différents sucres protégés par des esters avec de bons rendements, le moins bon étant observé pour le glucal peracétylé. Il est aussi possible de réaliser cette réaction en version glucosamine, l'amine étant protégée par un phthalimide. Les multiples exemples décrits par les auteurs font de cette réaction un outil puissant pour la synthèse de méthylène *exo*-glycals.

II.4.4.4. Conclusion

La palette de réactions que nous venons d'étudier nous permet d'établir deux rétro-synthèses intéressantes pour la formation de nos spiroisoxazolines **II-37** et **II-38** (Schéma 26). A l'instar de la synthèse de Vidal *et al.*,^[37] la formation du cycle spiro sera effectuée par cycloaddition 1,3-dipolaire à partir de l'*exo*-glycal protégé **II-39** et de l'oxime aromatique correspondante. Concernant la formation de l'*exo*-glycal, nous envisageons deux possibilités pour le former. La première consiste à réaliser l'oléfination de la lactone **II-40** par réaction de Julia modifiée ou de Tebbe. La deuxième reprend les conditions de la réaction de Bamford-Stevens développées par Tóth *et al.*^[115] à partir de la tosylhydrazone **II-41**. Le choix des groupes protecteurs sera aussi important durant la synthèse. Idéalement, OGP¹ et NGP² devront être orthogonaux pour permettre une déprotection sélective de l'amine dans le but de faire le couplage peptidique sur le bras espaceur.

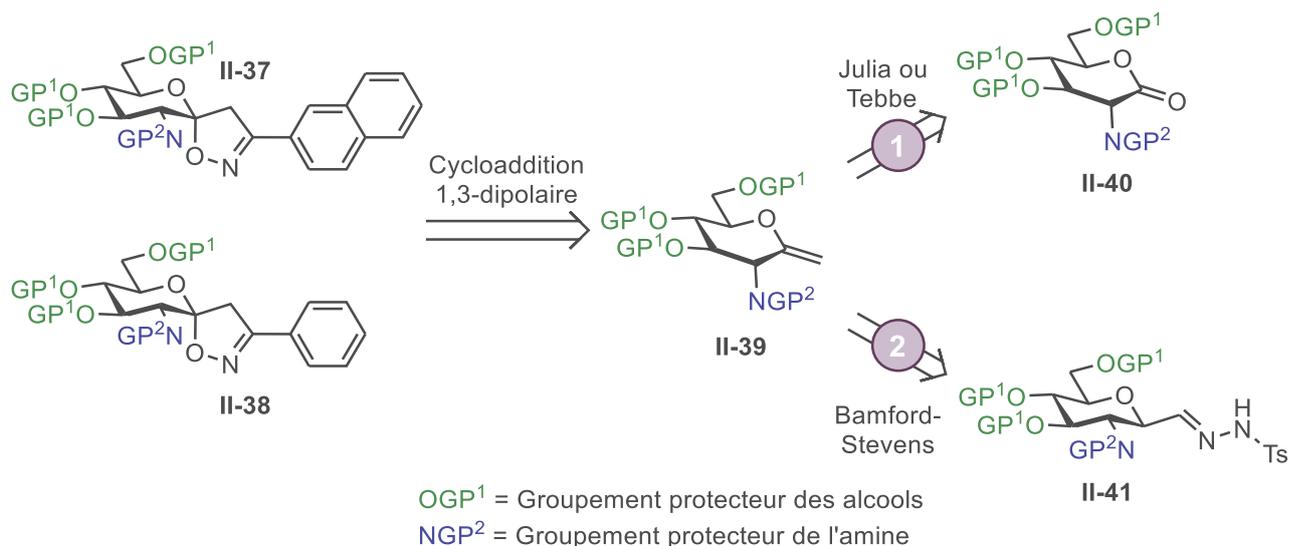


Schéma 26 : Choix de rétro-synthèse pour les spiroisoxazolines

II.4.5. Première voie de synthèse : l'oléfination de la lactone

II.4.5.1. Stratégie de synthèse utilisant la réaction de Julia

Pour synthétiser l'*exo*-glycal à partir de la lactone, nous choisissons tout d'abord de tester la réaction de Julia, car cette méthode est bien connue au laboratoire. Il faut donc choisir des groupes protecteurs compatibles aux conditions de cette réaction. La protection des alcools sera effectuée par des éthers silylés, et nous faisons le choix d'utiliser le groupement azido comme précurseur de la fonction amine (Schéma 27). A partir du glucal commercial **II-44**, le groupement azido peut être introduit par azido-nitration. Une fois le composé **II-43** obtenu, une oxydation permettrait d'obtenir la lactone **II-42** souhaitée.

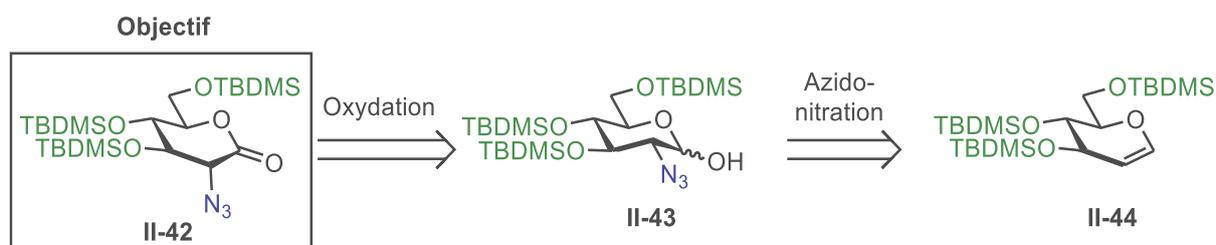
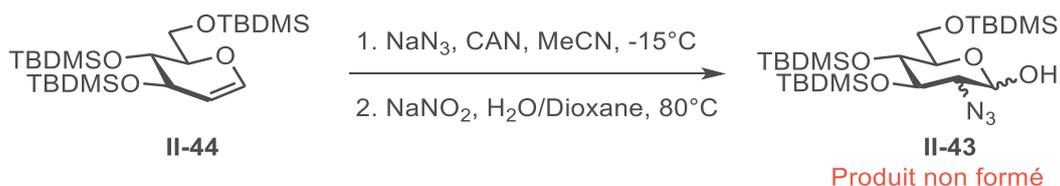


Schéma 27 : Rétro-synthèse envisagée pour l'obtention de la lactone **II-42**

Nous décidons donc d'effectuer cette synthèse en commençant par l'azido-nitration du glucal **II-44**. Les conditions choisies sont classiques et bien décrites dans la littérature^[117] et elles permettraient d'obtenir en deux étapes successives le glucose **II-43** qui sera prêt à être oxydé (Schéma 28). Malheureusement, après la synthèse, le produit désiré n'est pas obtenu, bien que les analyses de RMN ¹H et de masse réalisées montrent une consommation totale du glucal.

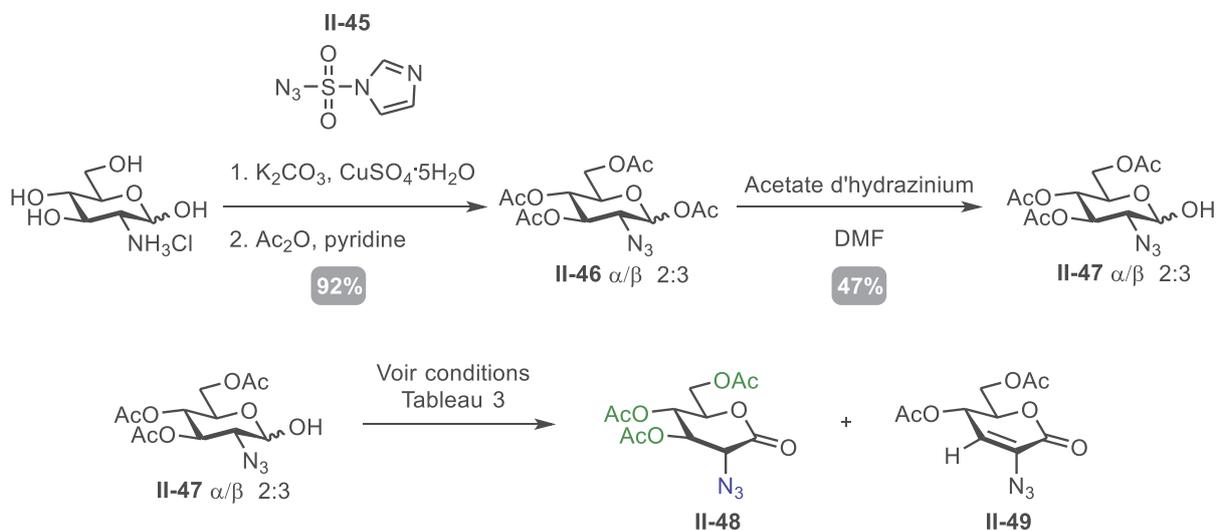

 Schéma 28 : Synthèse de **II-43**

Une explication possible de ce résultat peut être trouvée dans la nature des groupes protecteurs. Dans la littérature, cette réaction est bien référencée avec l'utilisation d'acétates. Dans notre cas, l'utilisation des éthers silylés n'est peut-être pas compatible avec les conditions réactionnelles, ce qui expliquerait la dégradation du réactif.

Après ce premier essai négatif, nous faisons le choix de ne pas poursuivre cette voie de synthèse et de nous tourner vers les esters comme autres groupements protecteurs des alcools.

II.4.5.2. Stratégie de synthèse utilisant la réaction de Tebbe

Le choix d'utiliser des esters pour protéger les alcools du glucose n'est plus compatible avec l'oléfination de Julia. Cependant, l'oléfination de Tebbe reportée par Woodward *et al.* reste une option intéressante.^[109] Nous décidons donc de synthétiser la lactone **II-48** à partir du chlorhydrate de glucosamine commercial (Schéma 29). Un diazo-transfert réalisé sur la glucosamine avec le composé **II-45**^[118] permet d'introduire le groupement azido puis une acétylation fournit le dérivé du glucose protégé **II-46** avec un excellent rendement. La position anomère est ensuite déprotégée avec de l'acétate d'hydrazinium pour obtenir **II-47** avec 41% de rendement.^[119]


 Schéma 29 : Synthèse de la lactone **II-48**

Afin d'obtenir la lactone, plusieurs conditions d'oxydation ont été testées (Tableau 3). Dans les conditions d'Albright-Goldman (**Entrée 1**), l'oxydation de **II-47** se fait mais donne lieu à un réarrangement par l'élimination de l'acétate en position 3 pour former quantitativement la lactone α,β-insaturée **II-49** (produit identifié par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse). D'autres conditions testées (**Entrée 2 et 3**) fournissent un résultat équivalent. En utilisant les conditions de Jones (**Entrée 4**) une dégradation du milieu réactionnel est constatée. Enfin, l'utilisation du réactif de Dess-Martin^[120] (**Entrée 5**) permet d'obtenir la lactone **II-48** en mélange avec le produit de dégradation **II-**

49 avec un rendement de 41%. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à séparer les deux produits par chromatographie sur gel de silice.

Entrée	Conditions	II-48 (%)	II-49 (%)	Rendement
1	DMSO/Ac ₂ O	0	100	99%
2	PCC	0	100	Non purifié
3	NIS	0	100	Non purifié
4	CrO ₃ /H ₂ SO ₄	-	-	Dégradation de la lactone
5	Dess-Martin	91	9	41%

Tableau 3 : Résumé des conditions d'oxydation testées (les proportions de **II-48** et **II-49** sont calculées à partir du spectre RMN ¹H)

Bien que nous ayons réussi à obtenir la lactone **II-48** souhaitée, nous décidons aussi d'envisager la synthèse d'une autre lactone avec un autre groupement protecteur pour l'amine : le trichloroacétamide (**II-54**, Schéma 30). Nous espérons ainsi défavoriser la formation du produit d'élimination, ce qui permettrait d'obtenir une meilleure pureté de la lactone pour la suite de la synthèse.

La synthèse débute avec une succession de protections et de déprotections permettant d'introduire les acétates sur les alcools et le trichloroacétamide sur l'amine à partir du chlorhydrate de glucosamine (Schéma 30).^[121] La glucosamine protégée **II-51** ainsi obtenue est mise en réaction avec de l'acétate d'hydrazinium pour fournir le composé **II-52** avec un rendement de 89%.^[119] Une oxydation de **II-52** dans les conditions d'Albright-Goldman forme de nouveau la cétone α,β -insaturée **II-53** (identifiée par spectroscopie RMN et masse). C'est une nouvelle fois en utilisant le réactif de Dess-Martin que la lactone **II-54** est obtenue, néanmoins en mélange avec une impureté non identifiée.

Les deux synthèses présentées précédemment nous permettent d'obtenir deux lactones (**II-48** et **II-54**) dans une pureté relative certes, mais cela permet tout de même de tester la réaction d'oléfination dans les conditions de Tebbe. A l'instar des travaux de Woodward *et al.*,^[109] nous avons traité nos deux lactones par le réactif de Petasis sous activation micro-ondes pour espérer former l'*exo*-glycal correspondant (Schéma 31). Pour la lactone **II-48**, aucune formation de glycal n'est constatée et une analyse de spectrométrie de masse sur le mélange réactionnel nous montre que le produit de départ est toujours dans le milieu. L'application des mêmes conditions sur la lactone **II-54** donne des résultats similaires. Une analyse de masse sur le mélange réactionnel montre que le réactif est toujours présent mais en mélange avec un autre composé dont la masse indique une perte de chlore (supposément le composé **II-55**).

Conception et synthèse d'inhibiteurs multivalents de la glycogène phosphorylase

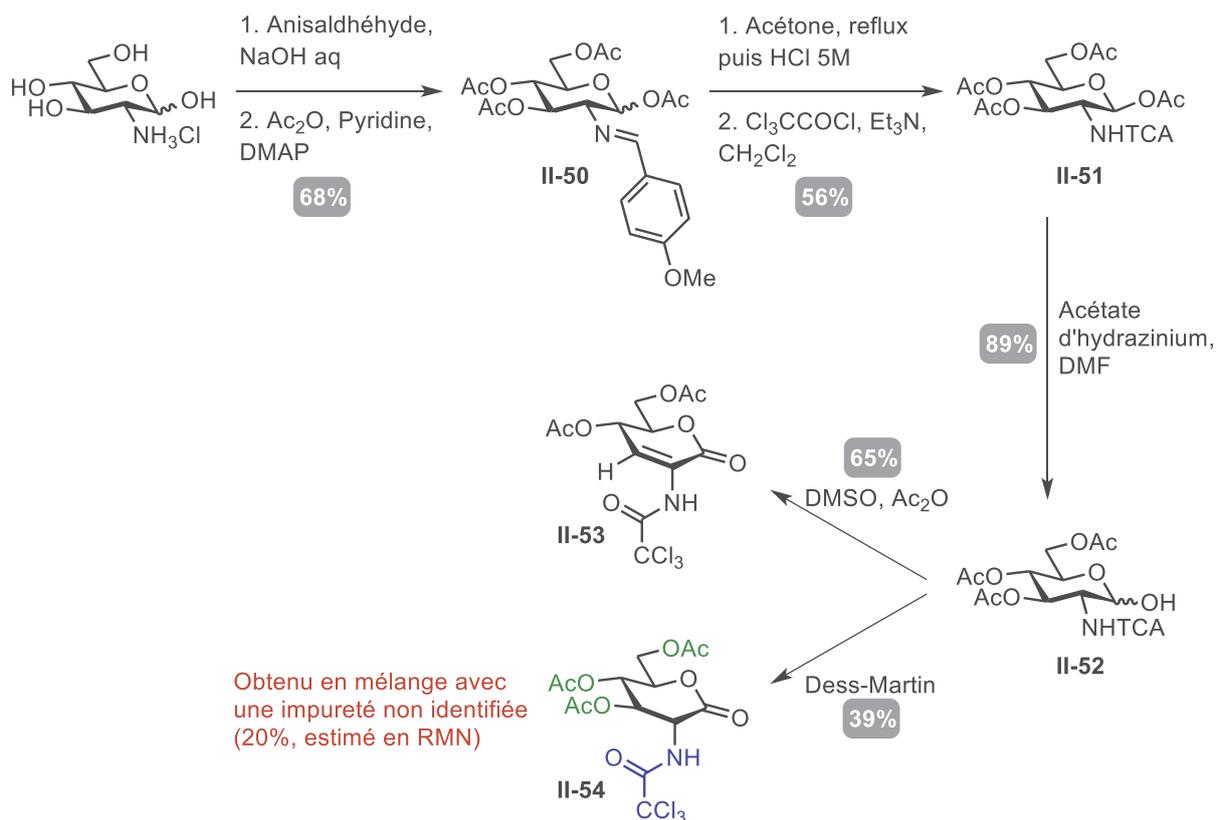


Schéma 30 : Synthèse de la lactone **II-54**

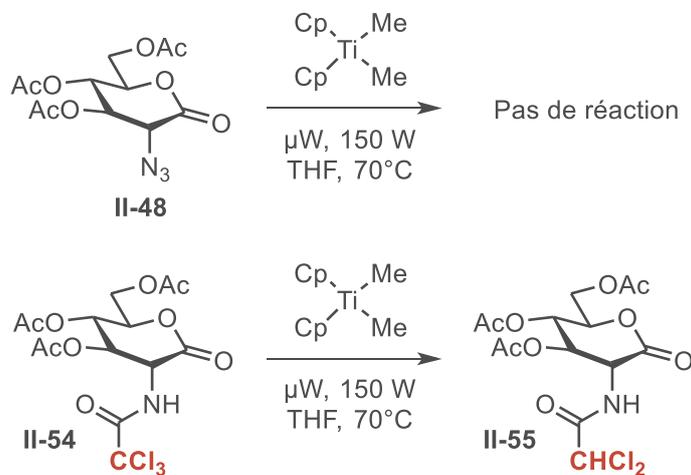


Schéma 31 : Oléfination de Petasis sur les lactones **II-48** et **II-54**

II.4.5.3. Conclusion sur la stratégie de synthèse de l'*exo*-glucal depuis la lactone

Nous avons réussi à synthétiser deux lactones avec des groupements protecteurs différents qui ont pu être testées en réaction d'oléfination. Les conditions expérimentales testées pour l'oléfination avec le réactif de Petasis ne permettent pas de former les *exo*-glucals attendus. A la vue de ces résultats, nous décidons de ne pas pousser nos recherches pour cette voie de synthèse et de nous tourner vers la deuxième stratégie que nous avons envisagée : la formation de l'*exo*-glucal par la réaction de Bamford-Stevens.

II.4.6. Deuxième voie de synthèse : la réaction de Bamford-Stevens

Comme détaillé précédemment dans le paragraphe **II.4.4.3**, Tóth *et al.* ont publié une étude portant sur la synthèse d'*exo*-glucals par la réaction de Bamford-Stevens.^[115] Dans cette partie, nous nous proposons de faire la synthèse de trois *exo*-glucals différents (Figure 50) qui seront ensuite engagés dans des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaires pour former les spiroisoxazolines correspondantes.

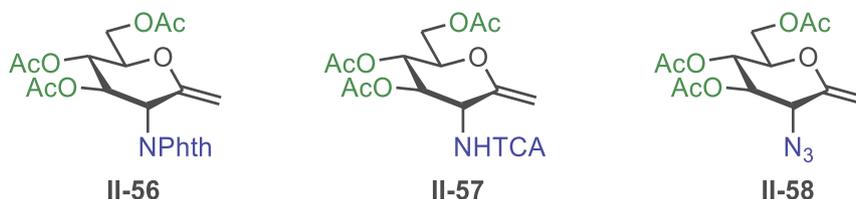


Figure 50 : Exo-glucals envisagés

Le composé **II-56** a déjà été synthétisé par les auteurs dans leur étude, ce qui nous permettra de tester rapidement la faisabilité de la réaction de cycloaddition en version glucosamine. La synthèse des glucals **II-57** et **II-58** permettra de tester différents groupements protecteurs de l'amine qui pourront être déprotégés orthogonalement aux groupements acétates.

II.4.6.1. Synthèse de la spiroisoxazoline par le glucal **II-56**

Nous reproduisons donc la synthèse du composé **II-56** à partir du dérivé nitrile **II-13**, obtenu en deux étapes comme décrit dans le paragraphe **II.3** (Schéma 8).^[32] La première étape consiste à synthétiser la tosylhydrazone **II-59** en faisant réagir **II-13** en présence de tosylhydrazine et de nickel de Raney (Schéma 32).^[116] Le composé **II-59**, obtenu avec **50%** de rendement est ensuite traité avec de l'hydrure de sodium pour fournir l'*exo*-glucal avec un excellent rendement de **96%**.

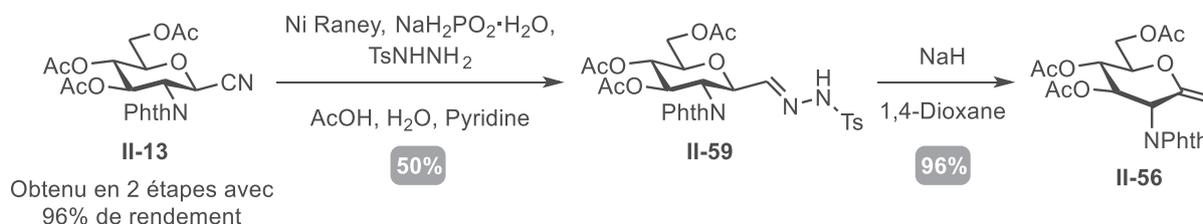


Schéma 32 : Synthèse du glucal de Tóth *et al.*

Nous avons ensuite effectué la cycloaddition 1,3-dipolaire entre le glucal et les deux oximes aromatiques **II-60** et **II-62** selon la méthode utilisant une oxime et l'hypochlorite de sodium décrite par Vidal *et al.*^[39] (Schéma 33). Ainsi, **II-56** est mis en réaction dans du THF avec le dérivé 2-naphtyl et, un ajout lent d'eau de javel pendant 16 heures permet de former la spiroisoxazoline. Après purification du brut réactionnel sur colonne de silice, une analyse par spectroscopie de RMN ¹H montre la présence de deux isomères en mélange. Ces deux isomères sont vraisemblablement les composés **II-61a** et **II-61b** qui ont été identifiés en spectrométrie de masse et avec les signaux RMN ¹H caractéristiques du méthylène de l'isoxazoline. Deux purifications successives sur colonne de silice sont également réalisées et ne permettent pas de les séparer.

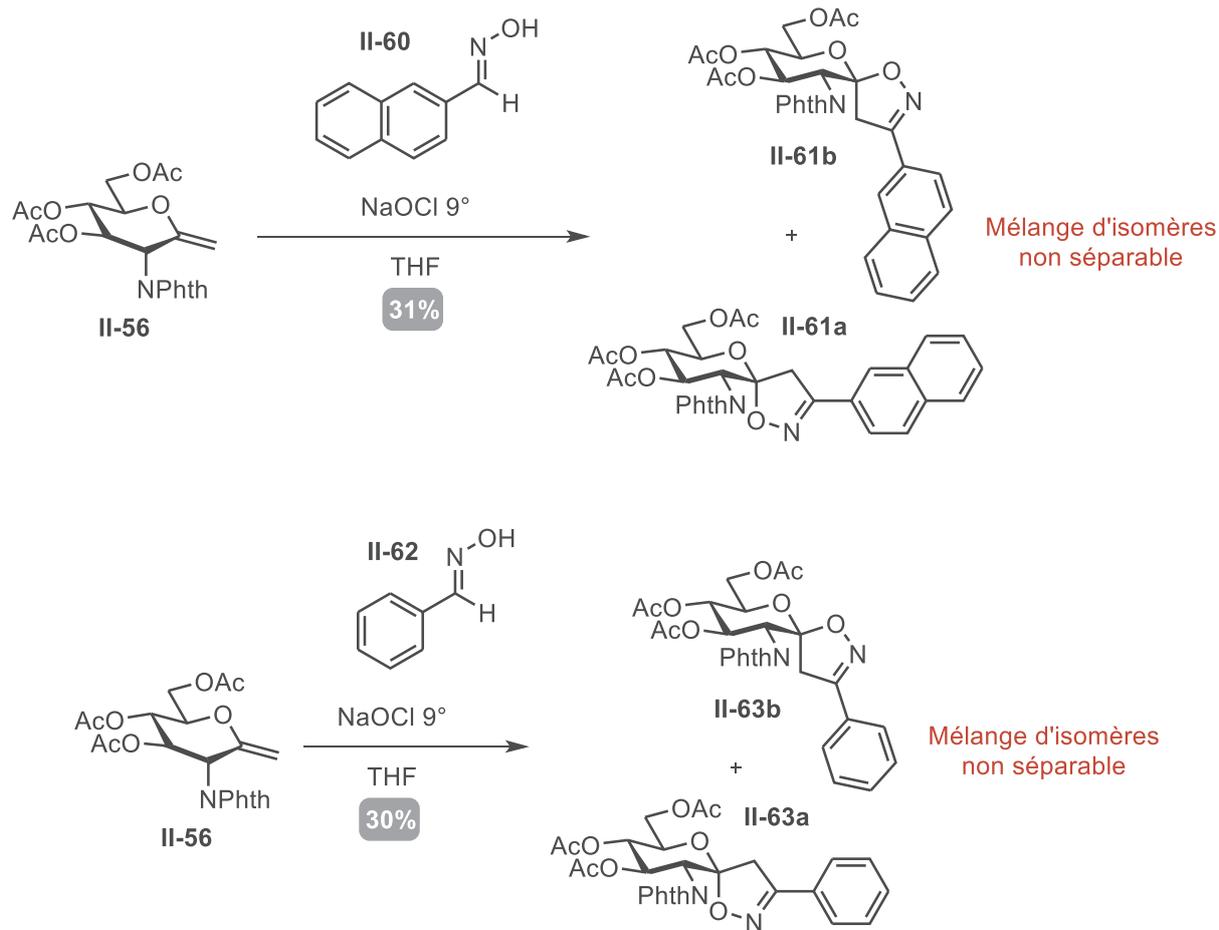


Schéma 33 : Essais de cycloaddition 1,3-dipolaire

Le deuxième essai de cycloaddition avec la benzaloxime **II-62** n'est pas plus concluant et un mélange des deux isomères non séparables **II-63a** et **II-63b** est également obtenu avec un rendement similaire de 30%. De la même manière, l'obtention de ces deux isomères est déduite d'analyses de spectroscopie RMN ^1H . Sur la figure ci-dessous (Figure 51), les signaux caractéristiques du méthylène de l'isoxazoline sont mis en évidence. La présence de deux systèmes AB correspondant chacun à un isomère résonant à $\approx 3,45$ et $3,88$ ppm est observée.

Bien qu'il soit possible de réaliser cette cycloaddition, l'obtention systématique de ces deux isomères pose un problème. Cette formation peut cependant être expliquée par la présence du groupe phthalimide en position 2 du glucal. Quand l'oxime réagit sur la double liaison C=C, elle peut attaquer par la « face inférieure » ou par la « face supérieure » (Figure 52). L'attaque par la « face inférieure », normalement favorable, étant gênée par l'encombrement du phthalimide, l'isomère résultant de l'attaque par la « face supérieure » est lui aussi formé.

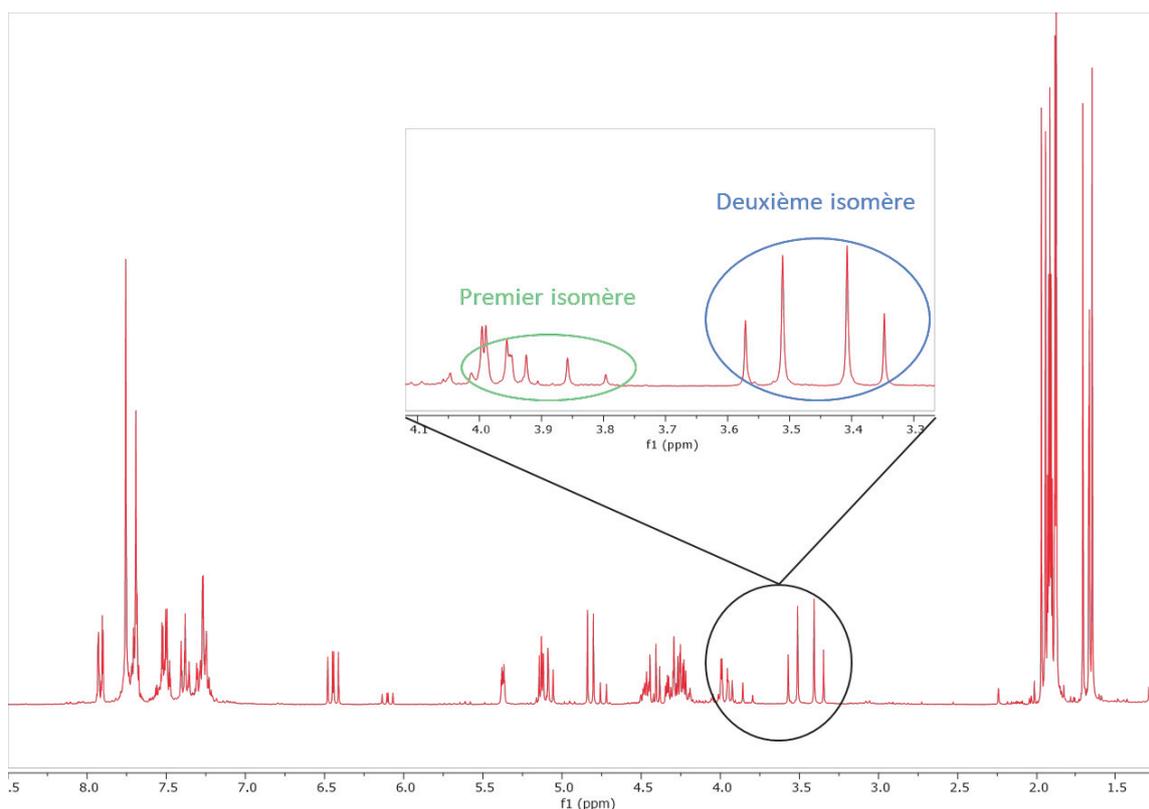


Figure 51 : Spectre RMN du mélange d'isomères **II-63a** et **II-63b**

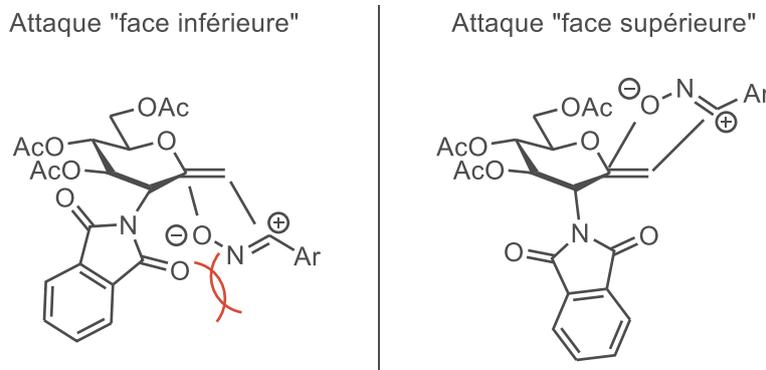
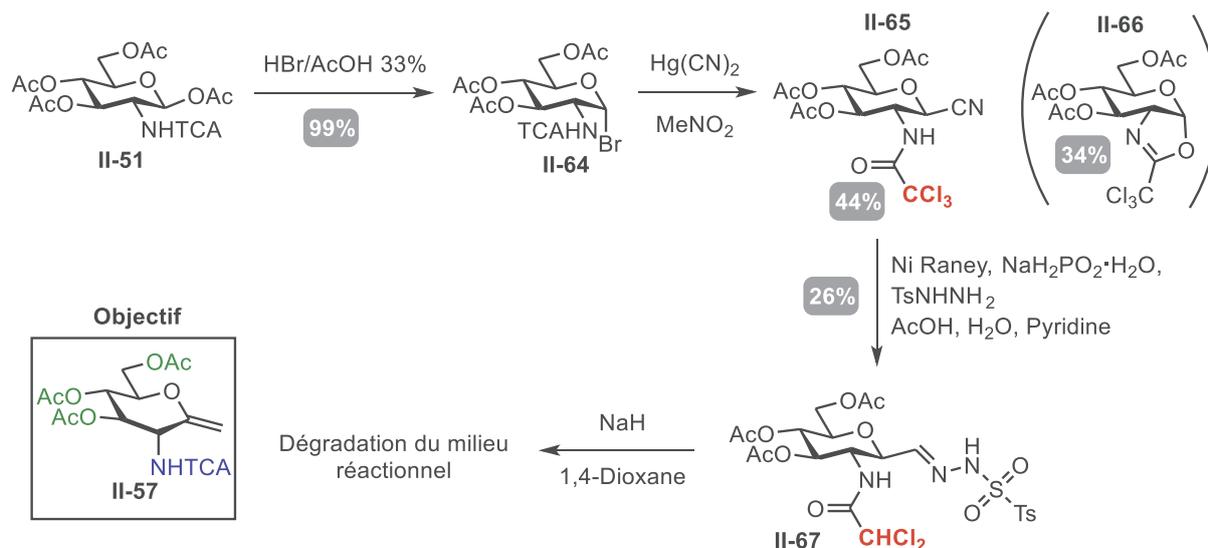


Figure 52 : Rationalisation de l'attaque de l'oxime sur l'*exo-glucal*

II.4.6.2. Changement de groupe protecteur

Les problèmes rencontrés avec le groupement phthalimide peuvent toutefois être résolus en changeant de groupe protecteur. Comme énoncé précédemment, nous faisons alors le choix de synthétiser l'*exo-glucal* **II-57** qui porte en position 2 un trichloroacétamide (Schéma 34).

A partir du composé **II-51** (dont la synthèse a été décrite précédemment), une bromation de la position anomère par l'acide bromhydrique permet de former quantitativement l'intermédiaire bromé **II-64**.^[122] Une cyanation de la position anomère est alors effectuée avec du cyanure de mercure et donne le composé attendu **II-65** avec un rendement de 44%. Ce faible rendement est expliqué par la formation, au cours de la réaction, de l'oxazoline **II-66** (identifiée par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse). Des essais de réouverture de cet oxazoline avec du cyanure de mercure ont été réalisés sans succès.


 Schéma 34 : Application de la réaction de Bamford-Stevens pour la synthèse de l'exo-glucal **II-57**

Le traitement de **II-65** par la tosylhydrazine et le nickel de Raney^[116] donne la formation de la tosylhydrazone **II-67** avec un rendement faible de 26%. L'analyse de ce composé démontre une perte de chlore sur le groupement protecteur de l'amine. Une analyse de spectrométrie de masse sur le mélange réactionnel nous indique la présence d'un mélange de plusieurs composés qui n'ont pu être purifiés et identifiés. Cette analyse et la perte d'un chlore sur le produit final obtenu indique une décomposition du réactif ou du produit formé au cours de la réaction, ce qui explique le faible rendement obtenu. Cependant, la tosylhydrazone **II-67** est ensuite traitée par l'hydrure de sodium selon le protocole de Tóth *et al.*^[115] mais une analyse par spectrométrie de masse indique une dégradation du réactif.

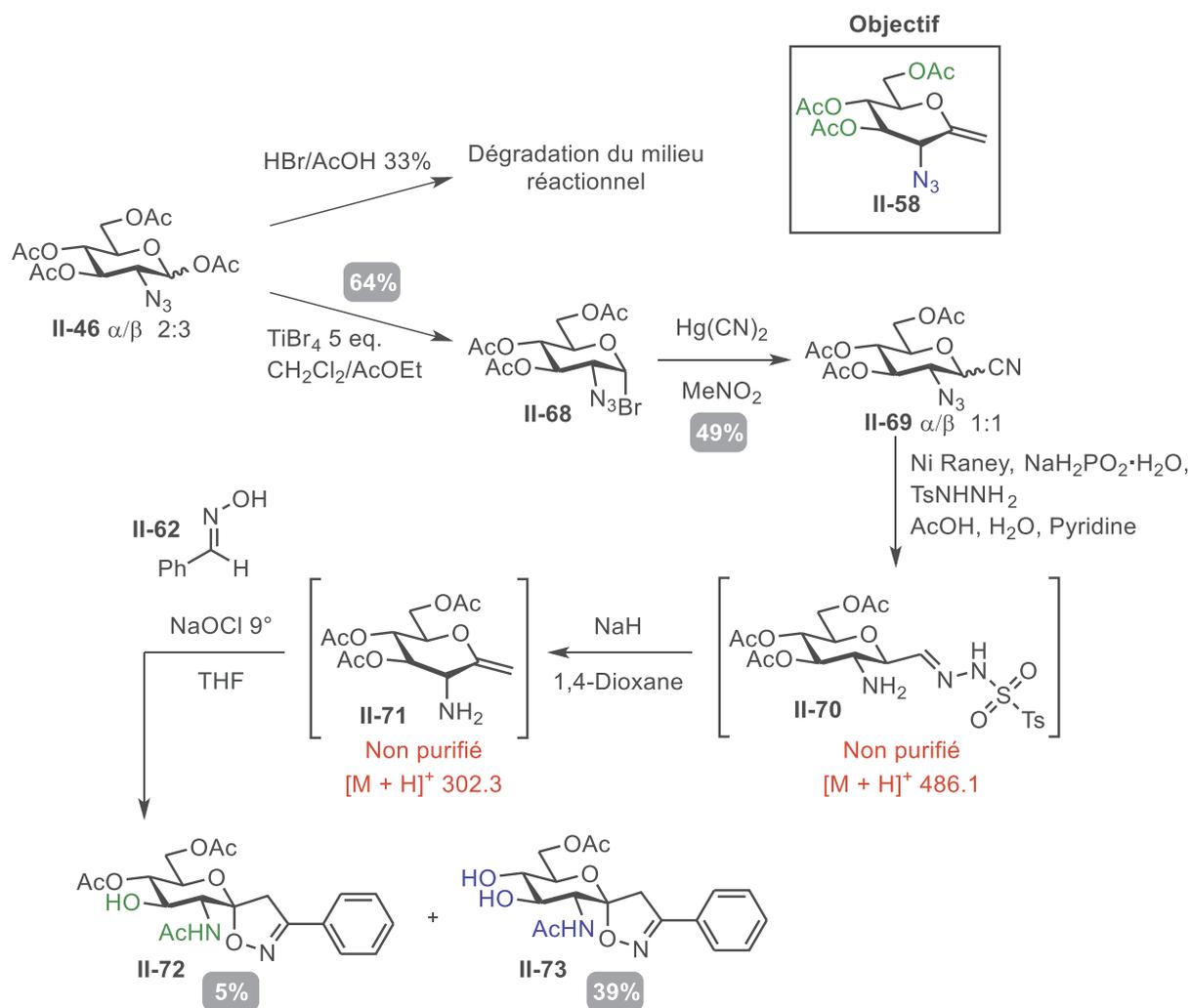
Pour conclure, le changement du groupe protecteur de l'amine du phthalimide au trichloroacétamide ne permet pas de réaliser la synthèse de la spiroisoxazoline. Nous décidons alors de choisir une autre fonction pour protéger l'amine, le groupement azido. Notre objectif est donc de synthétiser l'exo-glucal **II-58** (Figure 50).

II.4.6.3. Synthèse de la spiroisoxazoline par l'exo-glucal **II-58**

Comme évoqué précédemment, l'introduction de la fonction azido à partir du chlorhydrate de glucosamine se fait par diazo-transfert et une acétylation successive permet d'obtenir le composé **II-46**.^[118] La bromation de la position anomère dans les conditions habituellement utilisées (HBr/AcOH 33%) ne se fait pas, et il faut utiliser 5 équivalents de tétrabromure de titane pour parvenir à synthétiser le 2-azido-glucose bromé **II-68**.^[123] (Schéma 35). Le groupement nitrile est ensuite introduit par traitement du dérivé bromé au cyanure de mercure avec un rendement de 49%.^[124] Les deux isomères α et β sont obtenus et ne sont pas séparés. Au cours de la formation de la tosylhydrazone **II-70**, la fonction azido est réduite par le nickel. La polarité du composé **II-70** engendre des difficultés de purification sur colonne de silice. Un test de purification en phase inverse (silice greffée par des chaînes C18) n'apporte pas de meilleurs résultats. La caractérisation du produit **II-70** ne peut donc pas être faite et la structure proposée est seulement déduite d'une analyse par spectrométrie de masse. Le traitement du composé supposé **II-70** par l'hydrure de sodium permet d'obtenir l'exo-glucal

correspondant. Les mêmes problèmes de purification sont rencontrés de nouveau, la structure de **II-71** est elle aussi déduite d'une analyse par spectrométrie de masse.

Cependant, la cycloaddition réalisée sur l'*exo*-glucal présumé **II-71** permet d'obtenir après purification et caractérisation les spiroisoxazolines **II-72** et **II-73** avec un rendement de respectivement 5% et 39%. Cette fois-ci, nous ne rencontrons pas de problème de régiosélectivité et un seul isomère est formé. De plus, la partie glucose est étonnamment acétylée sur l'amine en position 2 et déprotégée sur la position 3 pour **II-72** et sur les positions 3 et 4 pour **II-73**.



Nous émettons donc l'hypothèse suivante : durant la formation de la tosylhydrazone **II-70**, la tosylhydrazine présente dans le milieu permet de faire un transfert d'acétate depuis un alcool vers l'amine réduite *in situ* par le nickel de Raney. Ceci permettrait alors d'expliquer l'acétylation de l'amine constatée dans les produits **II-72** et **II-73**.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous mettons en place une expérience simple décrite ci-dessous (Schéma 36). Le 2-azido-glucose **II-46** est soumis aux mêmes conditions réactionnelles que le dérivé cyano **II-69** et une purification du brut réactionnel permet de caractériser le produit **II-74** déprotégé en position anomère avec une acétylation de l'amine. L'obtention de ce résultat permet de confirmer notre hypothèse d'une migration d'acétate depuis l'un des alcools vers l'amine réduite.

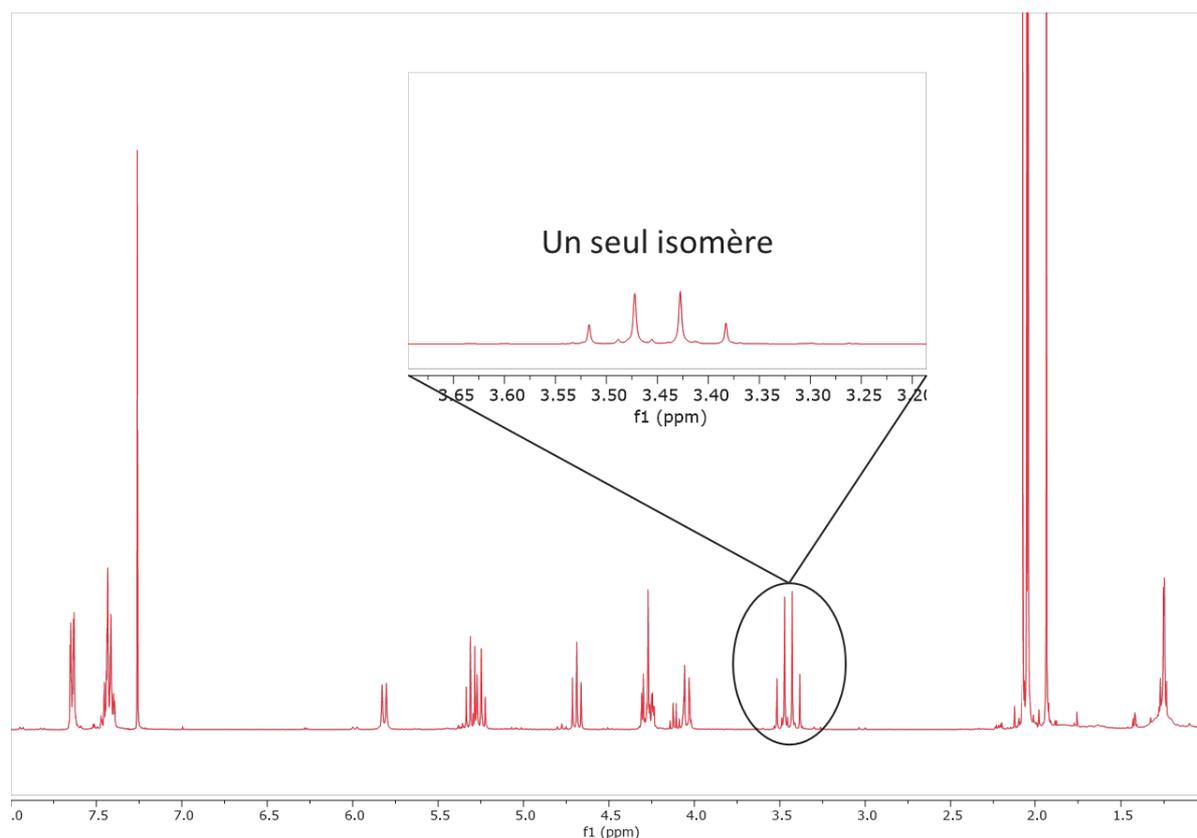


Figure 53 : Spectre RMN ¹H de **II-76**

II.4.6.4. Etude de la déprotection des groupements acétates et de l'acétamide

Nous sommes arrivés à synthétiser trois spiroisoxazolines (**II-72**, **II-73**, et **II-76**) qui possèdent toutes trois un groupement acétamide en position 2. Dans ce paragraphe nous allons énoncer les résultats obtenus lors des différents tests de conditions de déprotection de ces composés.

Les différentes conditions testées sont représentées dans le schéma ci-dessous (Schéma 38). Un premier traitement de **II-76** dans les conditions de Zemplén permet d'obtenir le composé **II-77** (structure déduite par spectrométrie de masse) qui n'est pas purifié. La déprotection des acétamides étant possible en utilisant l'hydrazine,^[125] nous testons cette méthode dans le méthanol à reflux. Une analyse du brut réactionnel en masse permet de voir la formation de traces du produit désiré **II-10** en mélange avec le dérivé *N*-acétylé **II-77**. Le brut non purifié est alors soumis à une activation micro-ondes mais la réaction de déprotection n'est toujours pas complète.

Conception et synthèse d'inhibiteurs multivalents de la glycogène phosphorylase

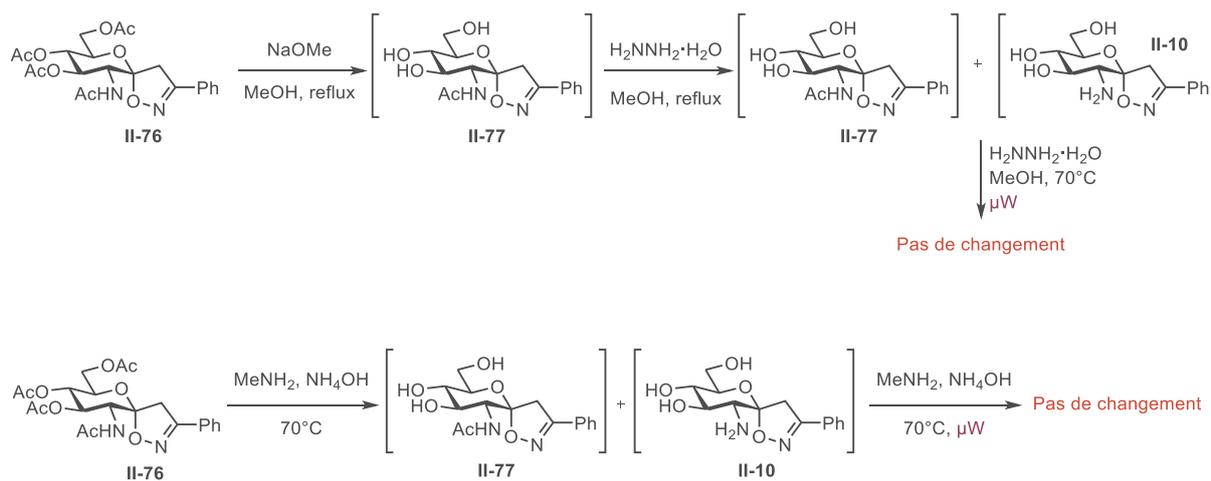


Schéma 38 : Test de déprotection des acétates

Un second test est réalisé en traitant **II-76** avec de la méthylamine et de l'ammoniaque. Une analyse par spectrométrie de masse indique des résultats semblables à ceux précédemment obtenus. Là encore, une activation par micro-ondes n'améliore pas la déprotection.

Une purification sur colonne de silice greffé en C18 est alors réalisée sur les deux bruts réactionnels obtenus, mais cela ne permet pas de fournir la spiroisoxazoline **II-10** suffisamment pure pour permettre une caractérisation par RMN.

II.4.7. Conclusion générale sur les deux voies de synthèse

Nous avons proposé et testé plusieurs voies de synthèse qui nous paraissaient raisonnables pour la synthèse des spiroisoxazoline **II-9** et **II-10** (Figure 54). Malheureusement, aucune de ces synthèses n'a abouti à l'obtention des produits purs désirés.

Fort de cet échec, nous proposons ici une autre alternative qui pourrait nous permettre d'atteindre notre but (Schéma 39). Récemment, Kawabata *et coll.* ont publié des exemples de glycosylation sur des sucres libres.^[126] En prenant leurs travaux pour référence, il pourrait être possible d'accéder au composé **II-78** protégé en position anomère. Ensuite, un diazo-transfert suivi d'une protection par des éthers silylés donnerait le composé **II-79**. La déprotection de la position anomère permettrait de pouvoir oxyder cette dernière, avec le réactif de Dess-Martin par exemple, pour synthétiser la lactone **II-81**. Les groupements silylés permettrait alors à cette étape d'éviter l'élimination en 2,3 qui a été observée en série acétate. L'application de la méthodologie développée par Gueyraud *et al.*^[94] permettrait alors d'obtenir l'*exo*-glycal **II-82**. Un changement de groupes protecteurs pour passer des éthers silylés vers des acétates sera alors indispensable afin de pouvoir faire la cycloaddition 1,3-dipolaire qui donnerait accès aux composés **II-84a** et **II-84b**. Les dernières étapes de cette synthèse consisteraient en la déprotection successive des acétates et la génération de l'amine pour ensuite obtenir les spiroisoxazolines **II-9** et **II-10**.

Conception et synthèse d'inhibiteurs multivalents de la glycogène phosphorylase

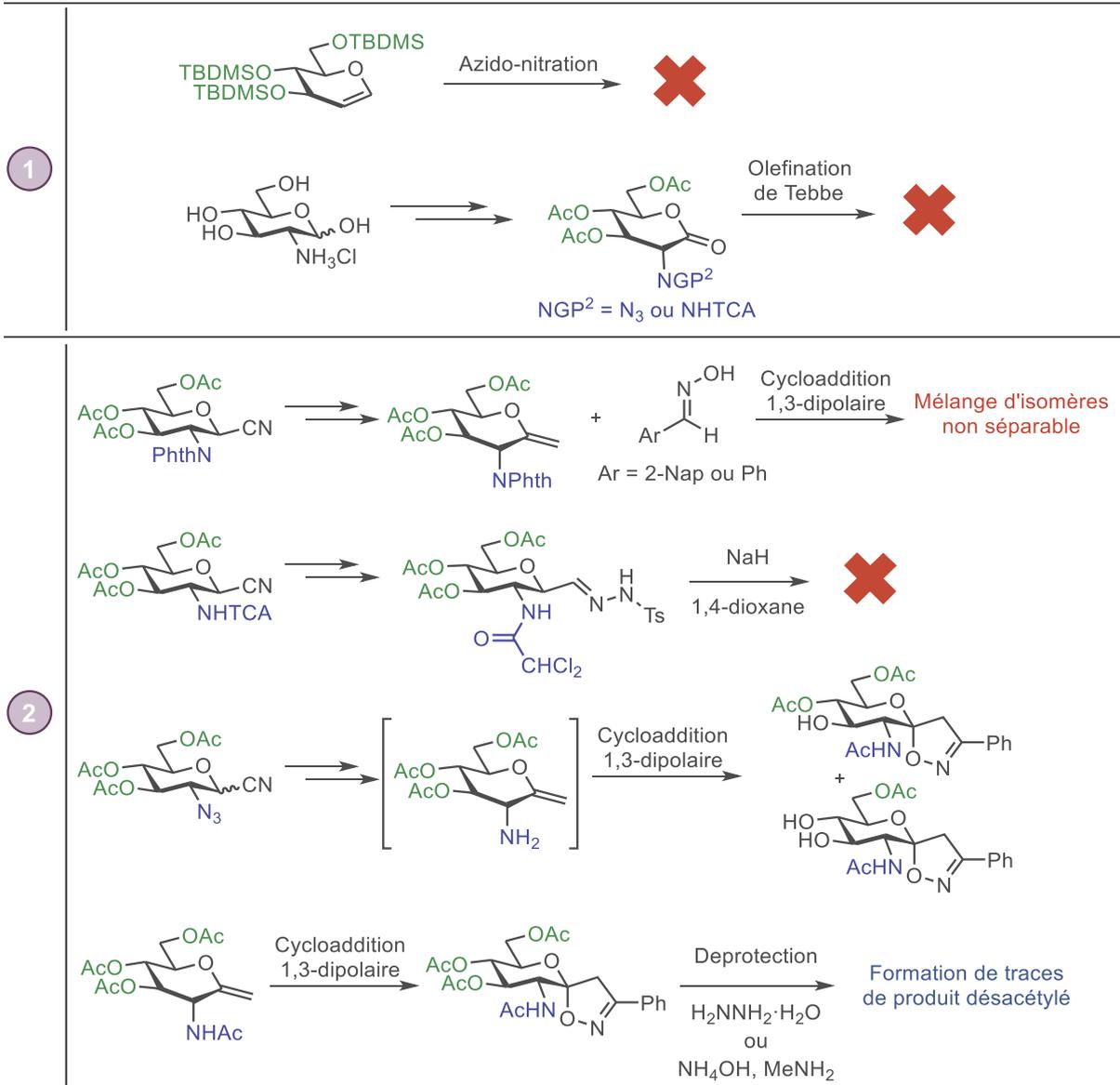
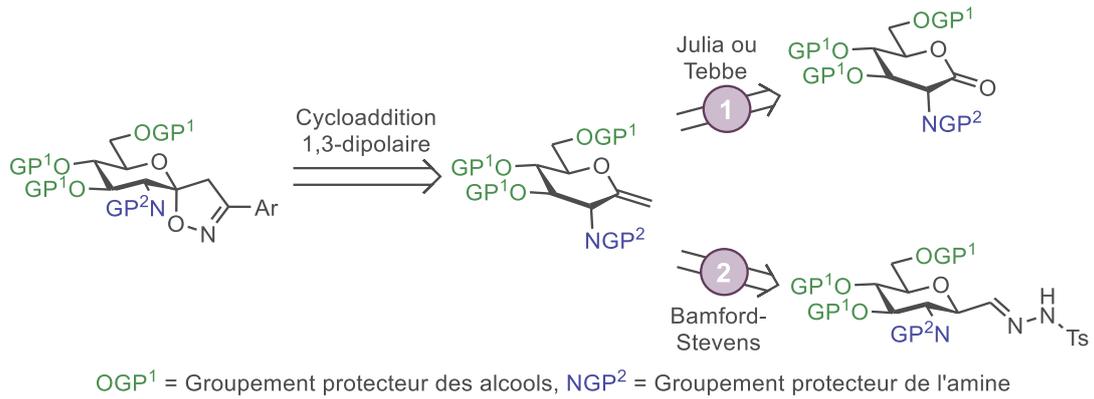
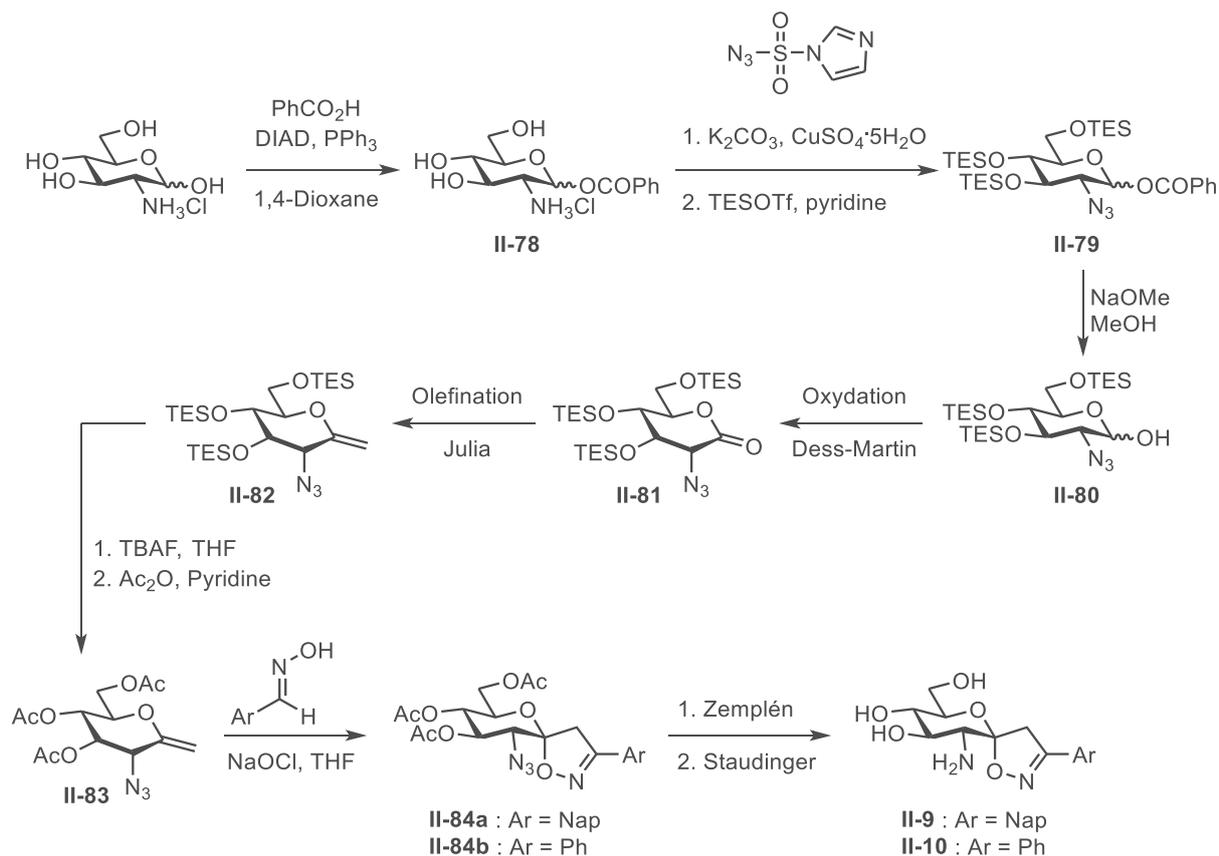


Figure 54 : Résumé des voies de synthèses effectuées pour la synthèse des composés II-9 et II-10



Malheureusement, par faute de temps cette synthèse n'a pas pu être réalisée. Une possible poursuite du projet pourrait donc être envisagée pour réaliser cette synthèse.

II.5. Synthèse du bras espaceur

Comme énoncé dans le paragraphe II.2.4, nous voulons effectuer la synthèse des deux bras espaceurs décrits ci-dessous (Figure 55). De longueur différente, ils présentent tous deux les mêmes fonctions chimiques à leurs extrémités pour permettre un greffage sur la plateforme multivalente et sur l'inhibiteur.



Figure 55 : Représentation des deux bras espaceurs

II.5.1. Synthèse du bras espaceur court II-7

A partir du 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol commercial, une azidation permet d'obtenir le glycol II-85 avec 80% de rendement (Schéma 40). Pour introduire la fonction acide carboxylique en bout de chaîne, nous faisons réagir par S_N2 le bromoacétate de *tert*-butyle sur l'alcool libre en bout de chaîne.^[127] Une dernière étape de déprotection de l'acide par traitement à l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane permet d'obtenir le produit II-7 désiré avec de bons rendements.

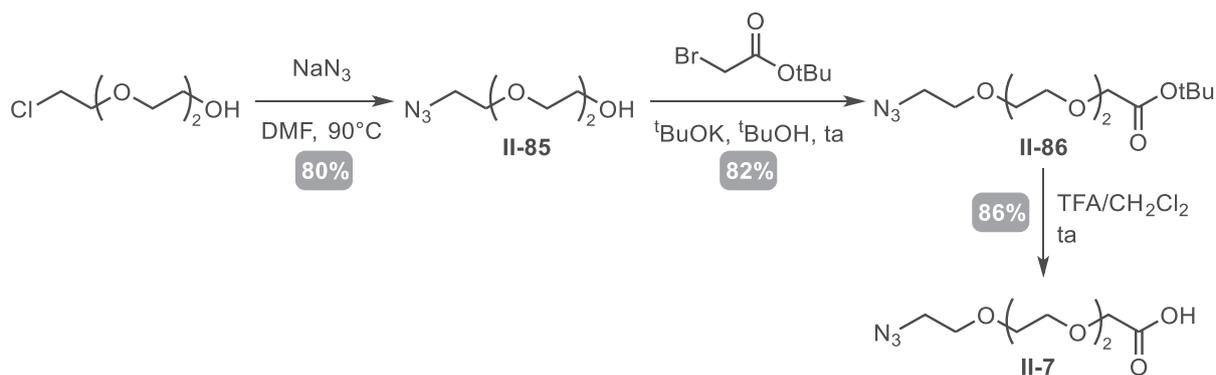


Schéma 40 : Synthèse du bras espaceur court **II-7**

II.5.2. Synthèse du bras espaceur long **II-8**

Une synthèse similaire est réalisée pour l'obtention du bras **II-8** à partir du pentaéthylène glycol commercial (Schéma 41). La première étape consiste en la mono-tosylation quantitative pour obtenir le tosylate **II-87** et le groupement azido est ensuite facilement introduit pour obtenir le dérivé **II-88** avec un rendement de 78%.^[128] Les deux dernières étapes de la synthèse sont similaires en tout point à celles décrites précédemment et permettent d'obtenir le bras **II-8** désiré avec de très bons rendements.

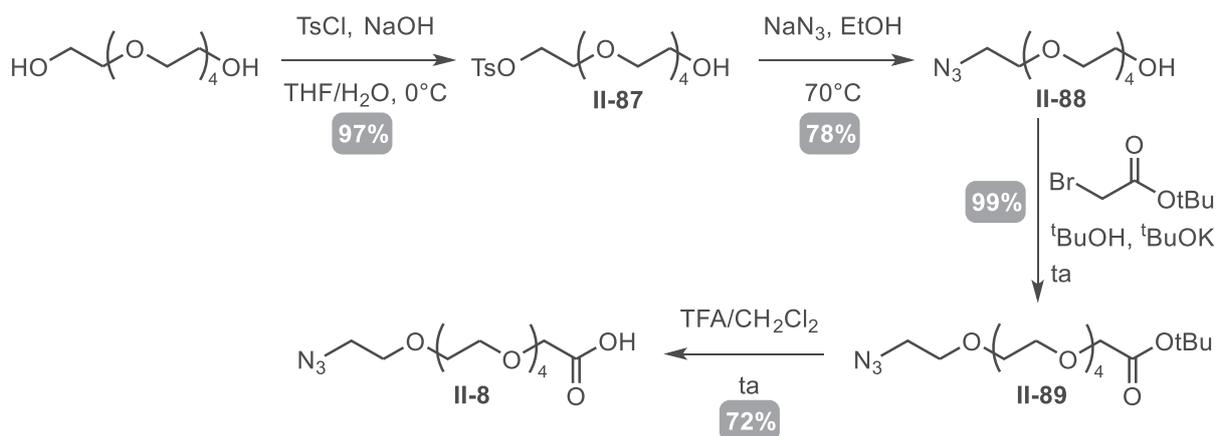


Schéma 41 : Synthèse du bras espaceur long **II-8**

II.6. Synthèse des composés multivalents

Nous avons réalisé la synthèse des deux bras espaceurs désirés et la synthèse de l'inhibiteur **II-2** décrit par Somsák *et coll.*^[32] Nous n'avons cependant pas réussi à synthétiser les deux spiroisoxazolines **II-9** et **II-10** que nous avons envisagées (Figure 56). Notre objectif initial de synthétiser les six plateformes multivalentes est donc revu à la baisse en envisageant seulement la synthèse de deux plateformes multivalentes avec l'inhibiteur **II-2**. Dans cette partie, nous détaillerons donc la synthèse de ces deux composés multivalents, la dissymétrie du bras espaceur permettant de relier plateforme et inhibiteur glucosidique avec un lien amide et une cycloaddition 1,3 dipolaire.

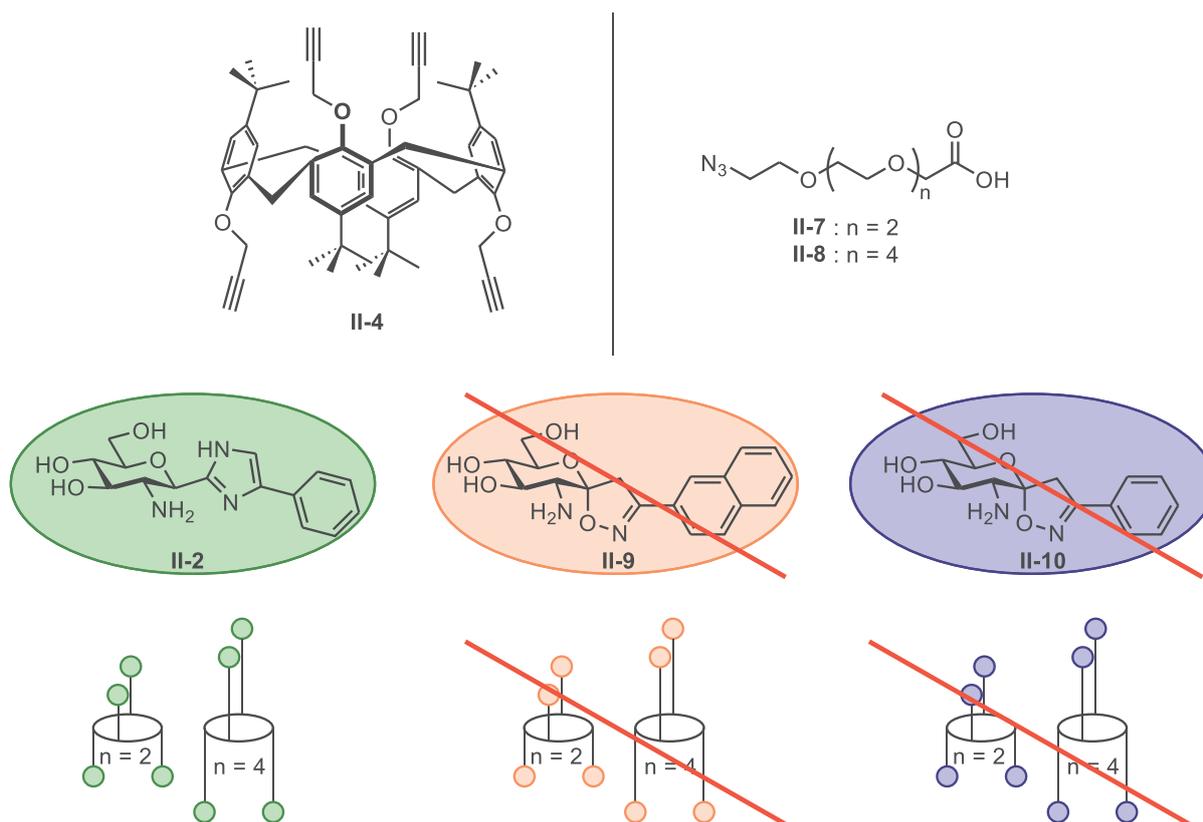


Figure 56 : Nouvel objectif de synthèse des plateformes multivalentes

II.6.1. Bref rappel sur le couplage peptidique

Dans notre synthèse, la glucosamine **II-2** sera conjuguée au bras espaceur avec un lien amide. Nous nous proposons donc de revoir brièvement quelques principes pour effectuer ce couplage. Dans la grande majorité des cas, le lien amide se fait avec une activation de l'acide carboxylique. Dans la figure ci-dessous, sont représentées quelques méthodes d'activation d'acide qui ont fait leurs preuves pour réaliser le couplage (Figure 57). Ainsi, le passage par un chlorure d'acyle, l'activation par un imidazole, un carbodiimide ou un sel d'uronium sont toutes des méthodes bien connues, bien que cette liste ne soit pas exhaustive.^[129] Toutefois, pour des synthèses sur de grandes quantités (plus de 100 mmol), les trois premières méthodes citées sont les plus utilisées, l'activation par un carbodiimide étant la méthode la plus reportée. Cette dernière représente cependant un désavantage car le carbodiimide peut se réarranger pour former une *N*-acylurée qui ne réagira plus, entraînant généralement une perte de rendement. Toutefois, l'activation par un sel d'uronium représente une alternative intéressante, un tel réarrangement n'étant alors pas possible dans ce cas.

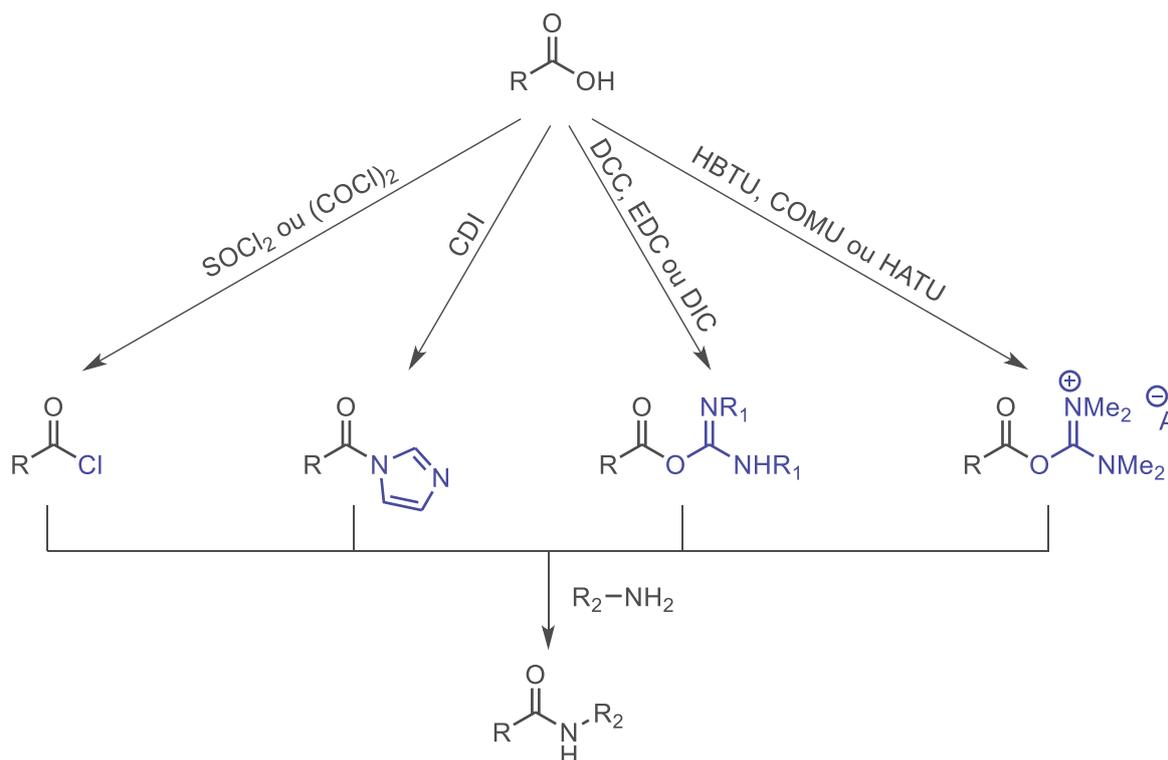
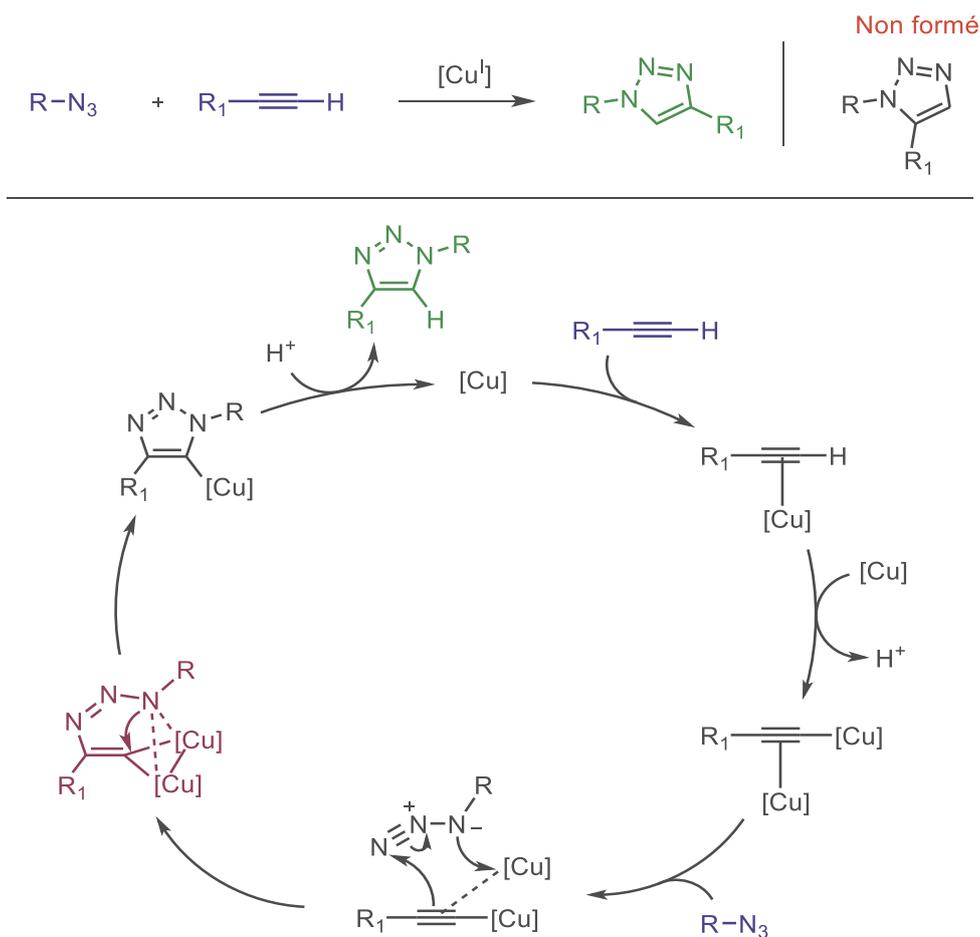


Figure 57 : Différentes activations de l'acide carboxylique

II.6.2. Bref rappel sur le couplage azide-alcyne

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen's entre un azide et un alcyne^[130] fait partie des transformations les plus utilisées en chimie click. Originellement utilisée sans cuivre, l'introduction d'un catalyseur de cuivre (I) par Meldal *et coll.* apporte un intérêt nouveau dans cette réaction.^[131] De nombreuses sources de cuivre (I) peuvent être employées. Parmi les plus utilisées, on retrouve les espèces CuI ou CuSO₄ avec l'ajout d'ascorbate de sodium permettant de générer le cuivre (I) *in situ*.^[132] Il est possible d'obtenir une totale régiosélectivité en utilisant un tel catalyseur d'après le mécanisme détaillé ci-dessous (Schéma 42).^[133] Meldal *et coll.* sont les premiers à proposer un mécanisme qui sera repris pour tard par Fokin *et al.* qui prouvent notamment le passage par un alcène gem-di-cuivre qui permet la formation du dérivé 1,4 correspondant.^[134]



II.6.3. Première voie de synthèse

Pour commencer notre étude, nous envisageons de réaliser le couplage entre les bras glycols et l'inhibiteur **II-2**, et de les greffer par la suite sur la calixarène **II-4**. Pour ce faire, les synthèses des deux acides activés **II-90** et **II-91** ont été réalisées^[135] (Schéma 43). Malheureusement, des difficultés de purification ne permettent pas d'isoler les deux produits parfaitement purs, mais qui sont identifiés par spectrométrie de masse et utilisés par la suite pour évaluer plusieurs conditions de couplage (Tableau 4).

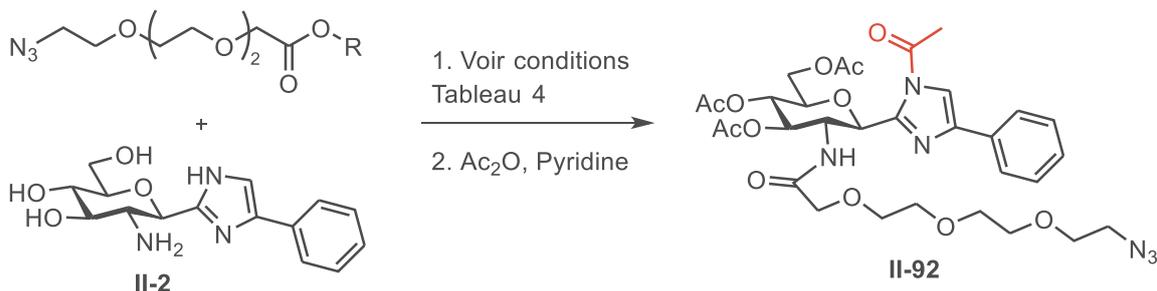
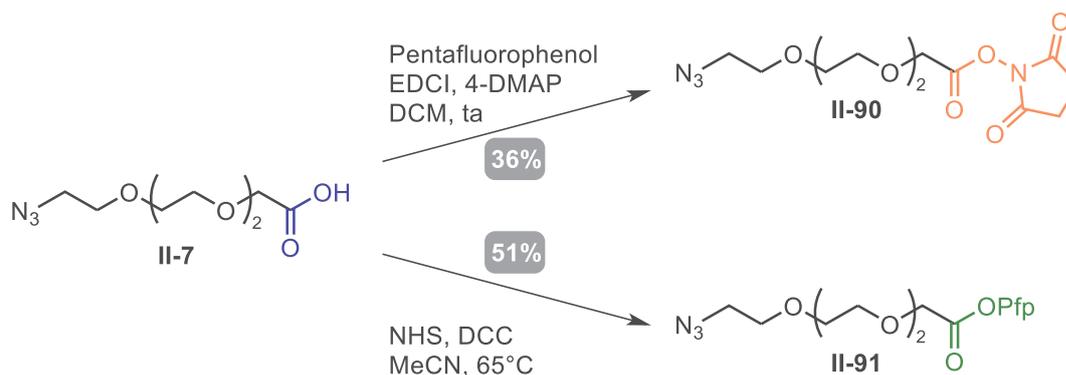


Schéma 43 : Couplage peptidique entre l'inhibiteur II-2 et le bras espaceur court

Entrée	Dérivé d'acide	Agent de couplage	Base	Solvant	Rendement
1	II-90 (1,5 eq)	-	Et ₃ N (5 eq)	DMF	9%
2	II-90 (1,5 eq)	-	-	DMSO/Tampon phosphate 0,1 M	12%
3	II-91 (1,2 eq)	-	Et ₃ N (2 eq)	DMF	25%
4	II-7 (1,5 eq)	EDCI (1,5 eq) HOBT (1,5eq)	DIPEA (3 eq)	DMF	27%
5	II-7 (1,5 eq)	EDCI (1,5 eq) HOBT (1,5eq)	DIPEA (5 eq)	DMF	43%

Tableau 4 : Résumé des conditions de couplage peptidique testées

Nous réalisons le couplage entre la glucosamine et les trois différents acides suivant les conditions décrites dans le tableau ci-dessus. Comme la présence des alcools libres sur le glucose complique grandement la purification, une acétylation du brut de réaction est effectuée. Une purification est alors réalisée avec plus de facilité pour obtenir le composé II-92 acétylé sur l'imidazole. La réaction entre II-2 et l'acide activé par un succinimide ne donne que des rendements très limités (entrées 1 et 2). Une légère amélioration de rendement est obtenue en activant l'acide carboxylique par un pentafluorophenol (entrée 3). Le meilleur rendement est atteint lorsque l'acide II-7 est activé *in situ* par EDC et HOBT en présence de cinq équivalents de DIPEA (entrée 5). Même s'il serait certainement possible d'améliorer encore le rendement de cette réaction avec d'autres conditions, nous nous contentons des 43% obtenus et réalisons le couplage de II-92 sur le calixarène II-4.

Vidal *et al.* ont développé, dans une étude antérieure, des conditions avec une activation par micro-ondes permettant de faire le couplage CuAAC avec de bons rendements.^[136] Ces conditions sont

appliquées à notre synthèse (Schéma 44), ce qui permet d'obtenir le calixarène **II-94** avec un rendement très faible de 12%. Des analyses de spectrométrie de masse sur le brut réactionnel permettent de mettre en évidence la présence de calixarènes mono-, di- et tri-substitués. Ces analyses, la récupération du réactif désacétylé **II-93** et la purification difficile pour l'obtention de **II-94** expliquent le faible rendement obtenu.

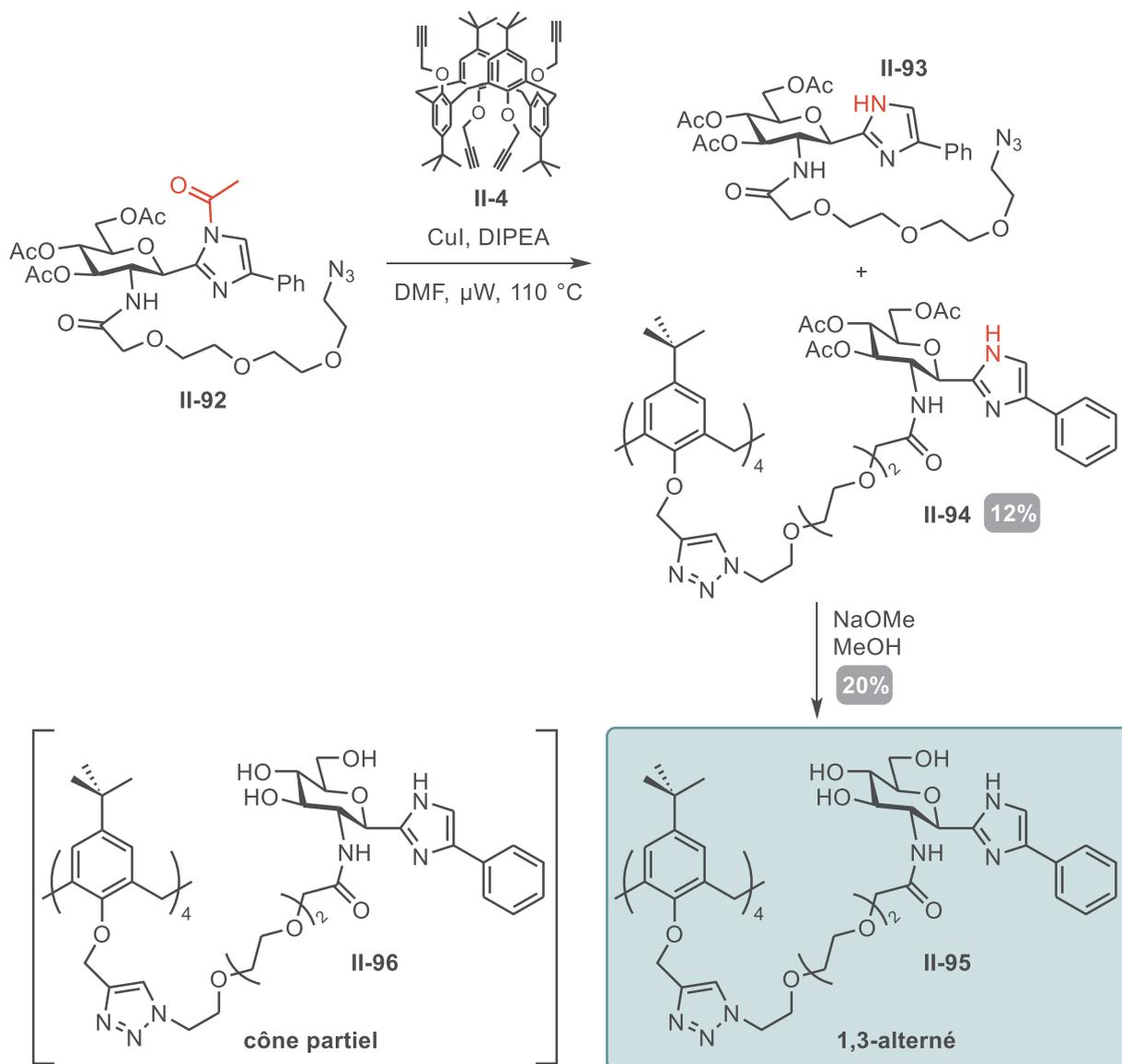


Schéma 44 : Synthèse du calixarène d'intérêt

L'hypothèse que nous énonçons pour expliquer cette génération de calixarènes partiellement substitués est la suivante : sur le composé **II-93**, l'azote en position 2 et l'azote de l'imidazole sont capables de chélater le cuivre qui n'est donc plus disponible pour promouvoir la cycloaddition (Figure 58).

Afin d'essayer d'optimiser le rendement de ce couplage, nous avons réalisée deux expériences supplémentaires. L'une reprenant les conditions expérimentales précédentes avec une charge catalytique en cuivre supérieure (0,8 équivalents au lieu de 0,5) et une autre avec l'ajout supplémentaire d'un agent chélatant du cuivre (TBTA). Malheureusement, aucun de ces deux essais ne permet d'obtenir un meilleur rendement.

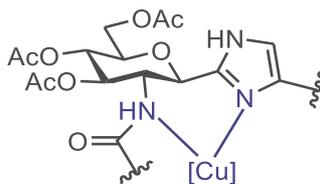


Figure 58 : Représentation de l'hypothèse du cuivre chélaté

La dernière étape de cette synthèse consiste en la déprotection des acétates du glucose dans les conditions de Zemplén pour former deux produits possédant la même masse molaire mais une polarité légèrement différente. Une séparation minutieuse par HPLC préparative permet cependant d'isoler le calixarène 1,3-alterné **II-95** souhaitée. Nous ne pouvons malheureusement pas identifier avec certitude le deuxième composé **II-96** mais nous supposons qu'il s'agit du conformère cône partiel. Nous étayons cette supposition avec l'analyse RMN ^1H et la mise en évidence de certains signaux caractéristiques de ce conformère (Figure 59). En effet, deux pics caractéristiques correspondants aux *tert*-butyls et au proton de l'imidazole et le ratio 1:3 sont observés et vérifiés par leurs intégrations. La formation du dérivé **II-96** peut aussi être expliquée du fait de la faible réactivité du couplage CuAAC. Il a été montré par Vidal *et coll.* qu'une compétition existe entre le couplage CuAAC et l'interconversion du calixarène et les auteurs démontrent la conversion du conformère 1,3-alterné en cône partiel lorsque le couplage est lent ou non réalisé.^[137] Dans notre cas, le calixarène 1,3-alterné **II-4** n'étant pas rapidement couplé, il pourrait donc effectuer une conversion vers sa forme de cône partiel. Finalement, nous avons réussi à synthétiser l'une des deux plateformes multivalentes, mais le rendement global de 1% concernant ces deux couplages (peptidique et CuAAC) n'est pas satisfaisant.

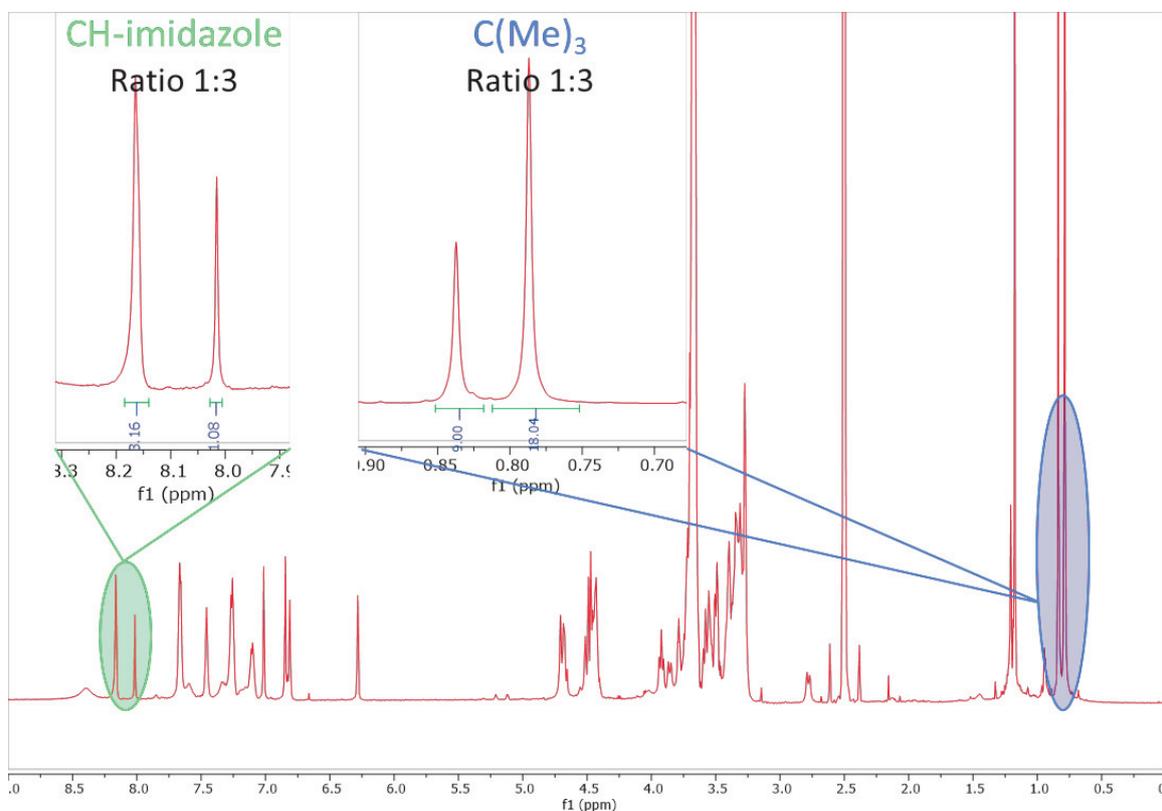


Figure 59 : Spectre RMN ^1H du conformère cône partiel **II-96**

II.6.4. Deuxième voie de synthèse

Dans le but d'améliorer la synthèse des plateformes multivalentes, nous allons réaliser les deux mêmes couplages mais de manière inversée. Nous commençons donc par coupler les dérivés azido **II-86** et **II-89** sur le calixarène **II-4** dans les conditions utilisées habituellement (Schéma 45). Cette fois, les deux produits attendus **II-97** et **II-98** sont obtenus avec de très bon rendements. La réaction de couplage étant rapide, aucune conversion vers une conformation de cône partielle n'est observée. Il s'en suit alors une déprotection de l'acide carboxylique par l'acide trifluoroacétique, qui permet la formation de **II-99** et **II-100** prêts à être couplés à l'inhibiteur **II-2**.

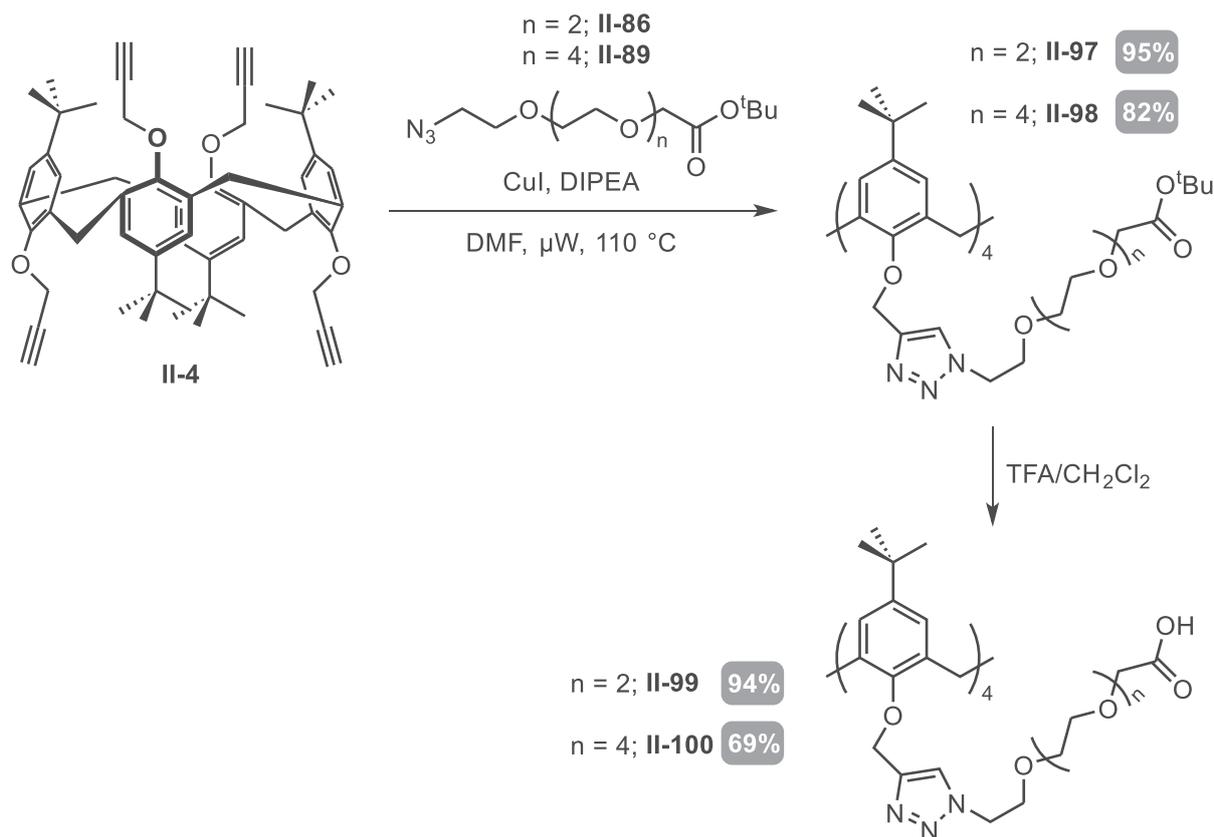


Schéma 45 : Couplage CuAAC des bras glycols sur le calixarène

Nous avons donc réalisé ce multi-couplage en essayant plusieurs conditions d'activation pour les acides (Schéma 46), qui sont synthétisées dans le tableau ci-dessous (Tableau 5). Pour chaque réaction réalisée, le suivi UHPLC de la formation de produit **II-95** permet une analyse rapide et permet de conclure objectivement sur les conditions testées. Les premiers tests furent réalisés avec une activation par EDC (entrées **1** et **2**) mais ne permettent pas d'avoir une formation significative de produit, même en augmentant la stœchiométrie de l'amine. Une activation par un chlorure d'acyle^[138] (entrées **4** et **5**) ne permet pas non plus d'effectuer le couplage et des résultats décevants sont obtenus. Toutefois, une activation de l'acide carboxylique par un mélange de dithio-dipyridine et de triphénylphosphine dans les conditions de Mukaiyama^[139] (entrée **3**) nous permet de former le produit attendu. Cependant la présence de ces agents activants en large excès complique grandement la purification, entraînant un faible rendement de 9%. La dernière méthode d'activation testée met en jeu la formation de sel d'uronium (entrées **6** et **7**) avec l'utilisation du COMU. L'utilisation de cinq équivalents de **II-2** permet alors la formation du produit désiré mais une analyse de LCMS montre aussi la présence de produit di- et tri-substitués en grandes proportions. Ce problème est néanmoins

amointri avec l'utilisation d'une plus grande quantité de réactif (huit équivalents) et une purification sur colonne de silice greffé C18 par Combi-Flash permet de fournir la plateforme multivalente ciblée avec un rendement de 13%. Ce faible rendement est de nouveau partiellement expliqué par la perte de produit lors de la purification. Une tentative d'acétylation du brut réactionnel obtenu après le couplage a été effectuée pour tenter de résoudre les problèmes de purification mais n'a pas donné de résultats probants.

Finalement, cette deuxième voie de synthèse permet d'obtenir la première plateforme multivalente depuis le calixarène **II-2** avec un rendement global de 12% sur trois étapes, ce qui est une nette amélioration par rapport à la première voie de synthèse.

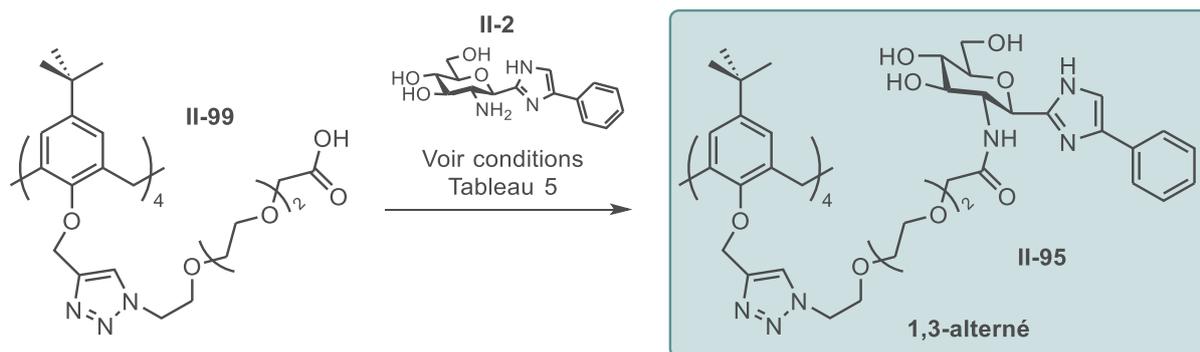
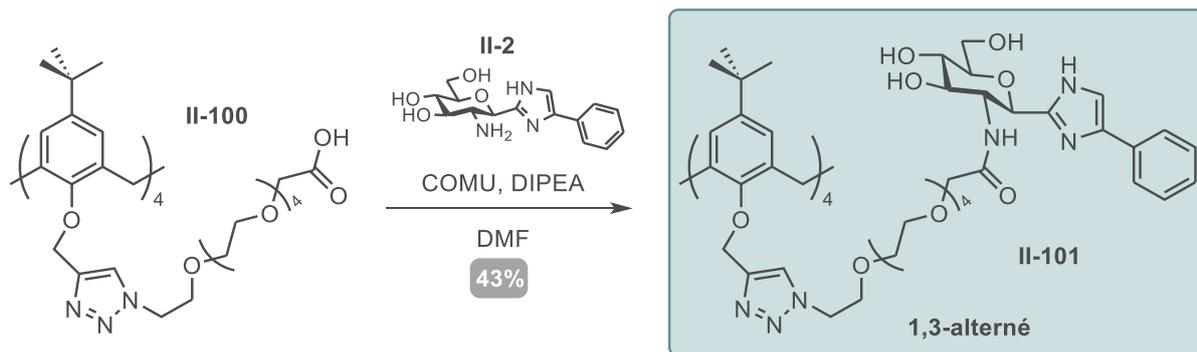


Schéma 46 : Synthèse de la première plateforme multivalente

Entrée	Amine II-2	Agent de couplage	Base	Solvant	Rendement
1	5 eq	EDC (5 eq), DMAP (1 eq)	DIPEA (6 eq)	MeCN/H ₂ O (4:1)	-
2	10 eq	EDC (5 eq), DMAP (1 eq)	DIPEA (11 eq)	MeCN/H ₂ O (4:1)	-
3	5 eq	PyS-SPy (16 eq), PPh ₃ (8 eq), DMAP (1 eq)	DIPEA (16 eq)	DMF, dry	9%
4	10 eq	SOCl ₂ (20 eq)	DIPEA (10 eq)	DMF, dry	-
5	8 eq	SOCl ₂ (20 eq)	DIPEA (8 eq)	DMF, dry	-
6	5 eq	COMU (4,8 eq)	DIPEA (8 eq)	DMF, dry	-
7	8 eq	COMU (4,8 eq)	DIPEA (14 eq)	DMF, dry	13%

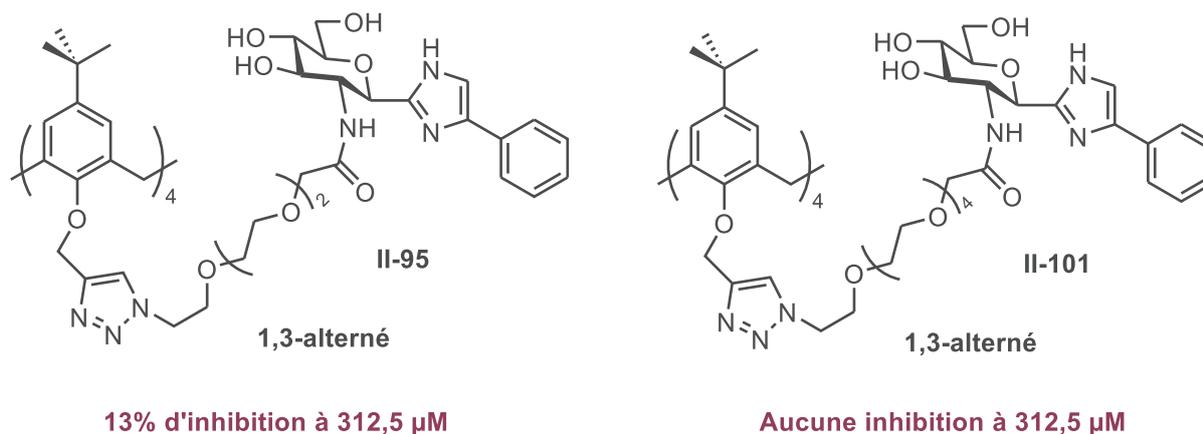
Tableau 5 : Conditions réactionnelles pour le couplage entre **II-99** et **II-2**

En prenant en compte les résultats de cette étude de conditions d'activation, nous réalisons la synthèse de la deuxième plateforme multivalente **II-101** qui est obtenue avec un rendement de 43% pour un rendement global de 24% depuis le calixarène **II-4** (Schéma 47).



II.7. Evaluation biologique des plateformes multivalentes synthétisées

Pour conclure sur la présence d'un effet multivalent pour l'inhibition de la GP, des évaluations biologiques en IC_{50} ont été réalisées pour les glycoclusters **II-95** et **II-101** sur la rmGPb (glycogène phosphorylase b issue du muscle de lapin) par le Prof Tibor Docsa et son équipe (Université de Debrecen, Hongrie), le protocole utilisé pour la mesure de ces inhibitions est détaillé en partie **IV.4**. La figure ci-dessous résume les résultats obtenus (Figure 60).



Pour le composé **II-95**, une inhibition de 13% est obtenue à 312,5 μM alors que pour la plateforme **II-101** aucune inhibition n'est observée. Ces résultats sont à comparer à l'inhibition de l'inhibiteur **II-2** de Somsák *et. coll.*^[32] qui a un K_i de 2,67 μM . A la vue de cette analyse, nous pouvons donc conclure qu'aucun effet multivalent n'est observé quant à l'inhibition de la GP. Nous pouvons aussi conclure que la plateforme multivalente avec les bras espaceurs les plus « courts » **II-95** est un meilleur candidat que celle qui comporte deux unités éthylène glycol supplémentaires **II-101**.

Cette observation contredit les résultats obtenus lors de l'étude de dynamique moléculaire que nous avons mené car le bras espaceur plus long devait permettre une meilleure disponibilité de l'unité glucosidique pour accéder au site catalytique de l'enzyme. Toutefois, ces évaluations biologiques sont à nuancer car des problèmes de solubilité ont été rencontrés lors des mesures d'inhibition réalisées. Ainsi, les composés **II-95** et **II-101** n'ont pas pu être testés à de plus hautes concentrations par manque de solubilité et donc la valeur d' IC_{50} n'a pas pu être déterminée.

Dans le cas d'une inhibition d'enzyme dimérique par un composé multivalent, il faut aussi envisager la possibilité d'effectuer une réticulation donnant lieu à la formation d'agrégats.^[46] Ces agrégats, s'ils précipitent, retirent l'enzyme du milieu d'analyse et donnent lieu à une inhibition qui ne peut plus être quantifiée *in vitro*. Pour autant, l'inhibition est bien réelle et la molécule peut être un bon inhibiteur *in vivo*, si cette précipitation ne pose pas d'autres problèmes biologiques. Une analyse par DLS permettrait de confirmer une réticulation et de mesurer la taille des agrégats en solution. Malheureusement, l'accès restreint au matériel et le manque de temps ne nous ont pas permis de mener cette étude.

Aussi, dans le but d'avoir plus d'informations sur la nature du complexe enzyme/glycocluster, une étude par ITC est en cours de réalisation. Nous attendons de cette technique qu'elle puisse nous renseigner sur la force d'association du complexe (K_a) ainsi de sa stœchiométrie (n). De telles informations nous permettraient de vérifier et de mieux conclure sur notre hypothèse de travail.

II.8. Conclusion

Notre objectif initial est de montrer la présence d'un potentiel effet multivalent pour l'inhibition de la glycogène phosphorylase. Pour cela, nous avons conçu des glycoclusters basés sur un cœur multivalent calixarène, portant au bout de chaque point de branchement un inhibiteur du site catalytique de la GP.

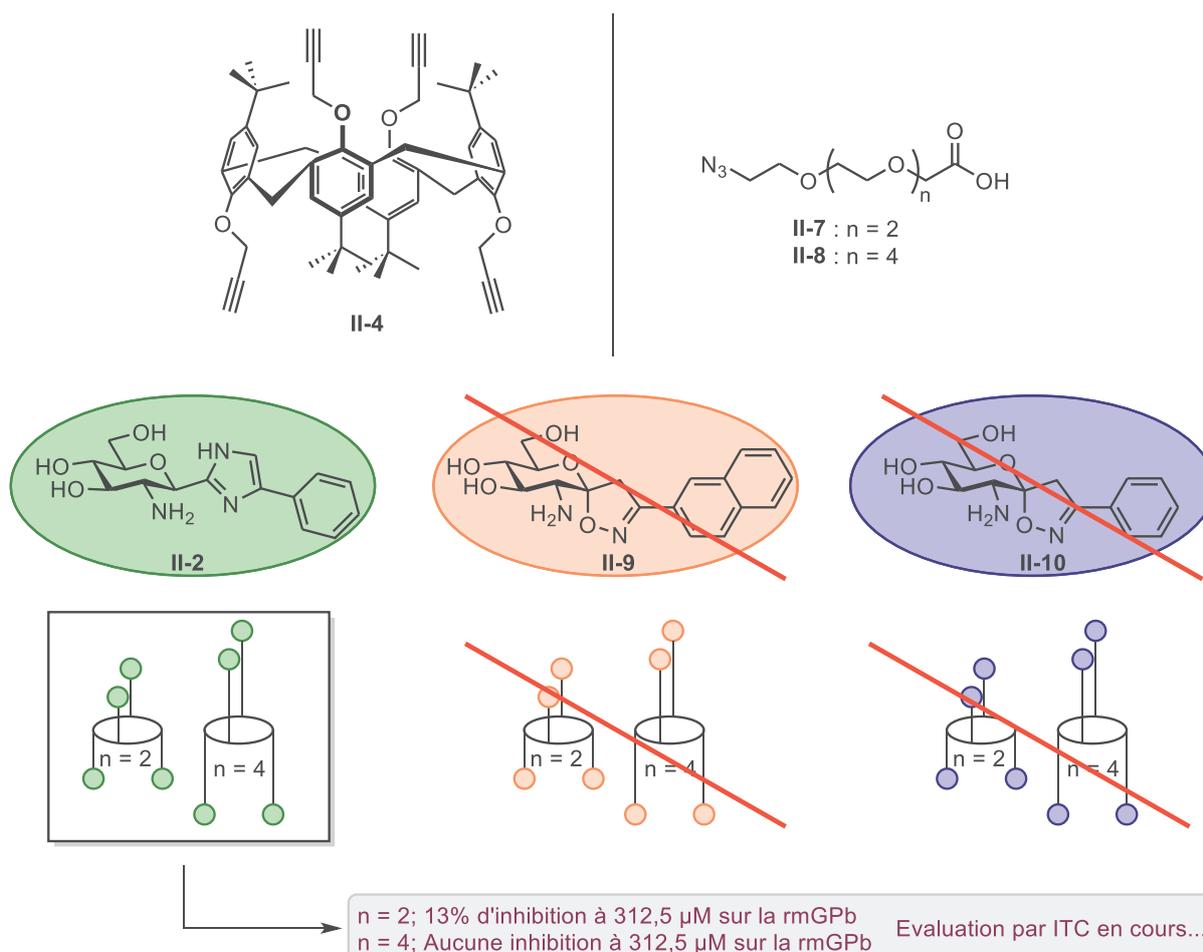


Figure 61 : Résumé des synthèses réalisées

Une méthode de calcul par docking et dynamique moléculaire nous a permis de déterminer la position la plus favorable pour le branchement d'un bras espaceur rattachant l'inhibiteur glucosidique à la plateforme multivalente. Notre objectif était donc de synthétiser six composés multivalents qui permettraient de vérifier par l'expérience les résultats obtenus par le calcul et de conclure sur la présence d'un effet multivalent vis-à-vis de l'inhibition de la GP.

Malheureusement, nous nous sommes heurtés à de nombreux problèmes pour la synthèse des deux inhibiteurs spiroisoxazolines **II-9** et **II-10**, ce qui ne nous permet pas d'obtenir les composés multivalents correspondants. Nous avons toutefois synthétisé les deux glycoclusters portant l'inhibiteur de type imidazole **II-2**, notre objectif n'est donc que partiellement atteint (Figure 61). Une évaluation biologique sur ces deux glycoclusters (IC_{50}) a été réalisée et ne montre pas la présence d'un effet multivalent pour l'inhibition de la GP. Ces premiers résultats, bien que peu encourageants, sont à nuancer. C'est pourquoi nous sommes aussi en train d'étudier les interactions entre glycocluster et GP par ITC, comme analyse complémentaire à l'évaluation par IC_{50} , ce qui permettrait notamment d'obtenir la constante d'association K_a du complexe ainsi que des informations sur sa stœchiométrie.

Chapitre III. La chimie combinatoire dynamique, un outil
pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène
phosphorylase

III.1. Rappel bibliographique et présentation de l'étude

III.1.1. Rappel bibliographique

Jusqu'à présent, les inhibiteurs du site catalytique de la glycogène phosphorylase sont construits à partir d'une structure commune (Figure 62) :

- Un glucose modifié, généralement C-glucoside, qui permet d'être reconnu par le site catalytique de l'enzyme
- Une fonction chimique ou un hétérocycle qui permet de former des liaisons hydrogènes avec les acides aminés présents dans la poche du site catalytique
- Une partie apolaire, généralement aromatique, qui fait des interactions hydrophobes avec la boucle 280s.

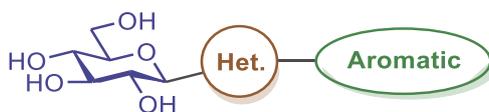


Figure 62 : Structure générale des inhibiteurs du site catalytique de la GP

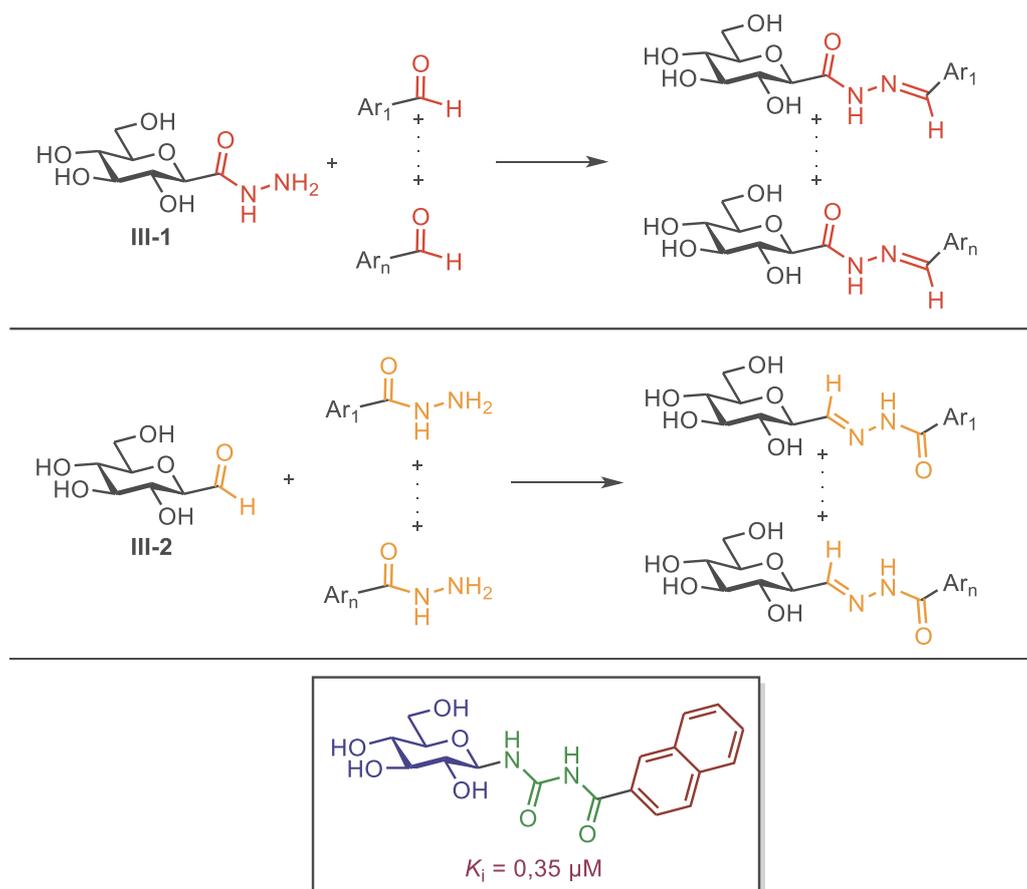
Dans notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à cette dernière partie apolaire. Pour le moment, les meilleurs inhibiteurs de la GP sont ceux qui possèdent le groupement 2-naphtyl en guise de partie apolaire. Cependant, est-il possible d'identifier rapidement et efficacement un autre pharmacophore plus adapté ?

III.1.2. Présentation de l'étude

Afin de pouvoir répondre à cette question, nous souhaitons mettre en place un outil rapide, efficace et fiable permettant la découverte et l'évaluation qualitative du potentiel d'inhibition d'une large gamme de pharmacophores. Pour cela, nous allons utiliser le principe de la chimie combinatoire dynamique (CCD) appliqué à la glycogène phosphorylase.

La CCD utilise la formation de liaisons réversibles pour créer des bibliothèques de produits qui, à l'application d'un *stimulus* voient leurs équilibres thermodynamiques s'adapter à ce *stimulus*. Dans notre cas, l'utilisation de la GP comme *stimulus* appliqué à une bibliothèque de dérivés du glucose permettrait l'amplification des meilleurs ligands sélectionnés par la GP. Cependant, pour travailler en présence d'une biomolécule, il n'est pas possible d'utiliser n'importe quelle liaison covalente réversible. Elle doit être compatible et pouvoir se former dans des conditions opératoires permettant une utilisation concomitante de la GP (milieu aqueux, pH, température, possibilité de « figer » la bibliothèque). Dans notre étude bibliographique, nous avons relevé une tendance à travailler avec des disulfures, des hydrazones ou des acylhydrazones. C'est la formation de cette dernière liaison qui nous paraît être un choix judicieux pour notre étude (Figure 63). En effet, il est possible de contrôler la vitesse de l'équilibration de la réaction avec l'emploi de catalyseurs aminés^[76] (aniline ou autres) à pH neutre ou proche de la neutralité. De plus il est aussi possible de stopper la réaction par élévation du pH, ce qui permettra de « figer » la bibliothèque pour pouvoir l'analyser. Le choix de la formation d'acylhydrazones est aussi conforté par l'inhibition sub-micromolaire des *N*-acylurées.^[140] La ressemblance de ces deux groupements nous permet d'envisager un potentiel pouvoir inhibiteur des acylhydrazones formées.

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase



Comme le site catalytique de la GP est ciblé par les inhibiteurs glucosidiques, nous envisageons donc de réaliser des bibliothèques qui seront composées des briques **III-1** ou **III-2** et d'aldéhydes ou d'hydrazides aromatiques respectivement, permettant de former les acylhydrazones correspondantes (Figure 63). L'introduction de la GP permettrait alors d'amplifier la formation de l'un des produits.

III.2. Synthèse des dérivés hydrazide et acétaldéhyde du glucose

III.2.1. Synthèse de la β -D-glucopyranosyl-hydrazide

Cette synthèse a été réalisée à partir de l'acide carboxylique dérivé du glucose benzoylé **III-3** (Schéma 48) qui peut lui-même être obtenu selon la méthode développée par Somsák *et coll.*^[141] Le couplage entre **III-3** et la Boc-hydrazide permet d'obtenir facilement le composé **III-4** avec un bon rendement. La dernière étape de cette synthèse consiste en la déprotection successive des benzoyles et du groupement Boc par la méthode de Zemplén et par traitement à l'acide trifluoroacétique respectivement. L'hydrazide **III-1** est alors obtenu quantitativement sous forme de sel de TFA. Cette synthèse courte permet d'obtenir simplement et rapidement notre première brique.

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycosylase phosphorylase

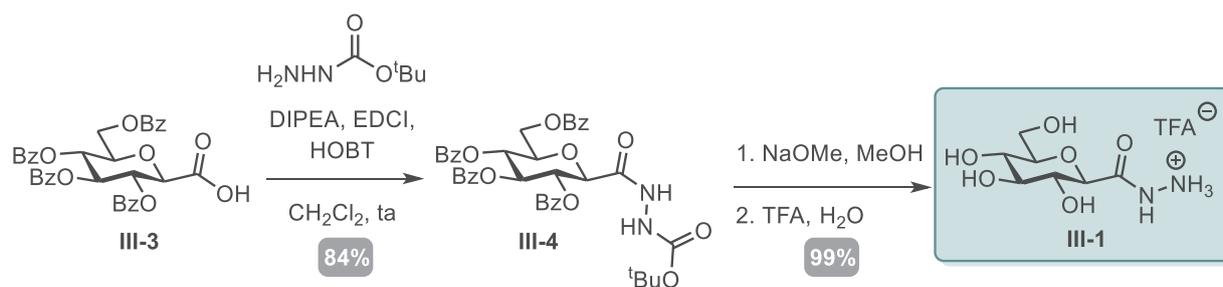


Schéma 48 : Synthèse de la première brique glucosidique

III.2.2. Synthèse du β-D-glucopyranosyl-acétaldéhyde

La synthèse de la deuxième brique **III-2** se révèle être plus compliquée que celle de la première. Nous appliquons ici les travaux de Genêt *et coll.*^{[142],[143]} en commençant par l'oxydation du glucose tétra-benzylé commercial **III-5** en lactone correspondante **III-6** (Schéma 49).^[144]

Une addition est ensuite réalisée avec le 1,3-dithiane sur cette lactone, pour offrir le composé **III-7** avec 75% de rendement global. L'hémiacétal **III-7** est ensuite réduit en C-glycoside **III-8** qui, en présence de carbonate de calcium et d'iodure de méthyle génère l'aldéhyde protégé **III-9**.

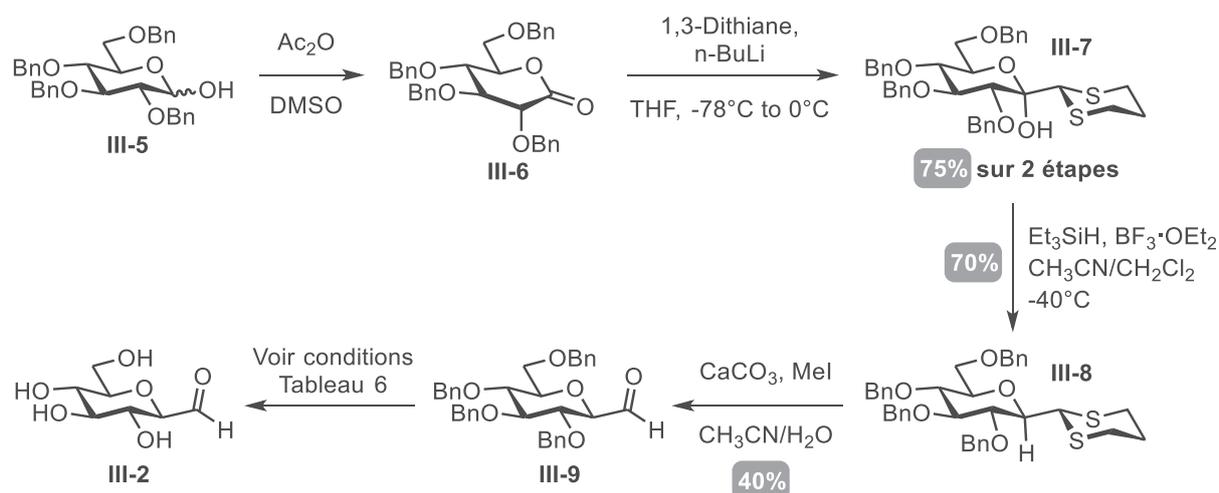


Schéma 49 : Voie de synthèse pour la formation de la deuxième brique glucosidique

Il nous a ensuite fallu réaliser la déprotection des groupements benzyles pour pouvoir avoir notre seconde brique. Pour cette étape, de nombreuses conditions opératoires ont été testées, elles sont résumées dans le tableau ci-dessous et la formation de produit est suivie en RMN ¹H et spectrométrie de masse (Tableau 6).

Une grande partie de ces conditions repose sur l'hydrogénolyse mettant en jeu un catalyseur au palladium et du dihydrogène. Dans des conditions classiques d'hydrogénolyse (entrée 1), aucune formation de produit n'est observée et les groupements benzyles sont toujours partiellement présent sur la molécule (observé en RMN). Une légère élévation de la température (entrée 2) permet de couper l'entièreté des groupements benzyles mais seules des traces du produit désiré **III-2** sont constatées. Des analyses par spectrométrie de masse nous indiquent aussi la formation de plusieurs produits secondaires qui ne peuvent pas être identifiés avec certitude. Une augmentation de la charge catalytique (entrée 3) donne des résultats similaires à ceux obtenus jusqu'alors. Une étude sur la nature du solvant a donc été menée (entrées 2, 4, 5 et 6) mais ne permet pas de former le produit attendu et pour chaque essai les éthers de benzyle ne sont que partiellement déprotégés. Notre

hypothèse est donc de dire que lors de l'étape précédente, la déprotection du dithiane pour générer l'aldéhyde engendre des traces de produits soufrés et ce même après une purification sur colonne de silice. Ces composés peuvent alors empoisonner le catalyseur au palladium, réduisant ainsi la réactivité du mélange. Toutefois, une remise en réaction de plusieurs bruts réactionnel avec une nouvelle quantité fraîche de catalyseur ne montre pas de meilleurs résultats. Nous réalisons alors deux autres tests en ajoutant une quantité faible d'acide chlorhydrique et en changeant de catalyseur (entrées **7** et **8**), sans succès. Une autre méthode de déprotection par un acide de Lewis est alors testée^[145] (entrée **9**) mais ne donne pas plus de résultats et conduit même à la dégradation complète du milieu réactionnel. Ces deux méthodes de déprotection des benzyles (hydrogénolyse et traitement au BCl₃) ont aussi été testées sur l'intermédiaire **III-8** sans succès. A la suite de ces échecs, nous décidons de ne pas persister dans cette voie de synthèse.

Entrée	Catalyseur	Solvent	Temp. (°C)	Pression de H ₂ (bar)	Acide	Formation de III-2
1	Pd/C (10wt%)	MeOH	25	6	-	-
2	Pd/C (10wt%)	MeOH	50	6	-	Traces
3	Pd/C (20wt%)	MeOH	50	6	-	-
4	Pd/C (10wt%)	THF	50	6	-	-
5	Pd/C (10wt%)	EtOH	25	6	-	-
6	Pd/C (10wt%)	CH ₂ Cl ₂	25	6	-	-
7	Pd/C (10wt%)	MeOH/AcOEt	25	1	HCl 2M (0,08 eq)	-
8	Pd(OH) ₂ /C (10wt%)	MeOH/AcOEt	25	1	HCl 2M (0,08 eq)	-
9	-	CH ₂ Cl ₂	-78	-	BCl ₃ (7 eq)	-

Tableau 6 : Résumé des conditions testées pour la déprotection des benzyles

III.2.3. Conclusion

Nous avons obtenu facilement la brique hydrazide **III-1** avec une synthèse de trois étapes. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à réaliser la synthèse de la brique aldéhyde **III-2**. Nous prenons donc la décision de poursuivre notre étude de CCD en utilisant uniquement la première brique qui sera couplée avec des aldéhydes aromatiques pour former les acylhydrazones correspondantes. Dans la suite de ce chapitre, nous allons aborder la mise en place des conditions opérationnelles pour la réalisation des bibliothèques de CCD. Ensuite, nous analyserons ces bibliothèques pour étudier l'influence que peut avoir la GP sur ces dernières.

III.3. Réalisation des bibliothèques de chimie combinatoire dynamique

III.3.1. Etude préliminaire

En milieu aqueux, la vitesse de formation des acylhydrazones dépend grandement du pH de la solution et, idéalement, ce dernier doit être proche de pH = 4. Toutefois, des catalyseurs à base d'amines aromatiques tels que l'aniline^{[146],[147]} ou plus récemment l'indoline^[77] sont utilisés pour améliorer la vitesse de formation des acylhydrazones. Récemment, un nouveau catalyseur, le dihydrochlorure de 2-(aminométhyl)-imidazole, plus efficace que l'aniline a été identifié par Kool *et coll.*^[76] Nous souhaitons nous inspirer de ces travaux et utiliser ce nouveau catalyseur pour nos bibliothèques. Pour

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

cela, nous avons étudié en RMN la réaction entre notre brique hydrazide **III-1** et le *p*-hydroxybenzaldéhyde en présence de ce catalyseur (Figure 64). Les deux réactifs sont introduits ici en quantités stœchiométriques (0,5 mM) et le catalyseur est présent en large excès (50 mM). Cette expérience nous permet de montrer que l'acylhydrazone se forme rapidement en 10 minutes. Pour compléter cette étude, le suivi cinétique de cette même réaction a été effectué sur 24 heures en UHPLC (Figure 65). Comme auparavant, la réaction est rapide et s'effectue en 30 minutes. Cette rapidité peut s'expliquer par la présence du catalyseur mais aussi par le pH de la solution qui est de 3,5. Toutefois, la réaction n'est pas complète et tout l'aldéhyde n'est pas consommé. Afin de favoriser la formation des acylhydrazones, nous faisons le choix de travailler, pour les futures expériences, en défaut de l'hydrazide **III-1** (0,7 équivalent pour 1 équivalent d'aldéhyde).

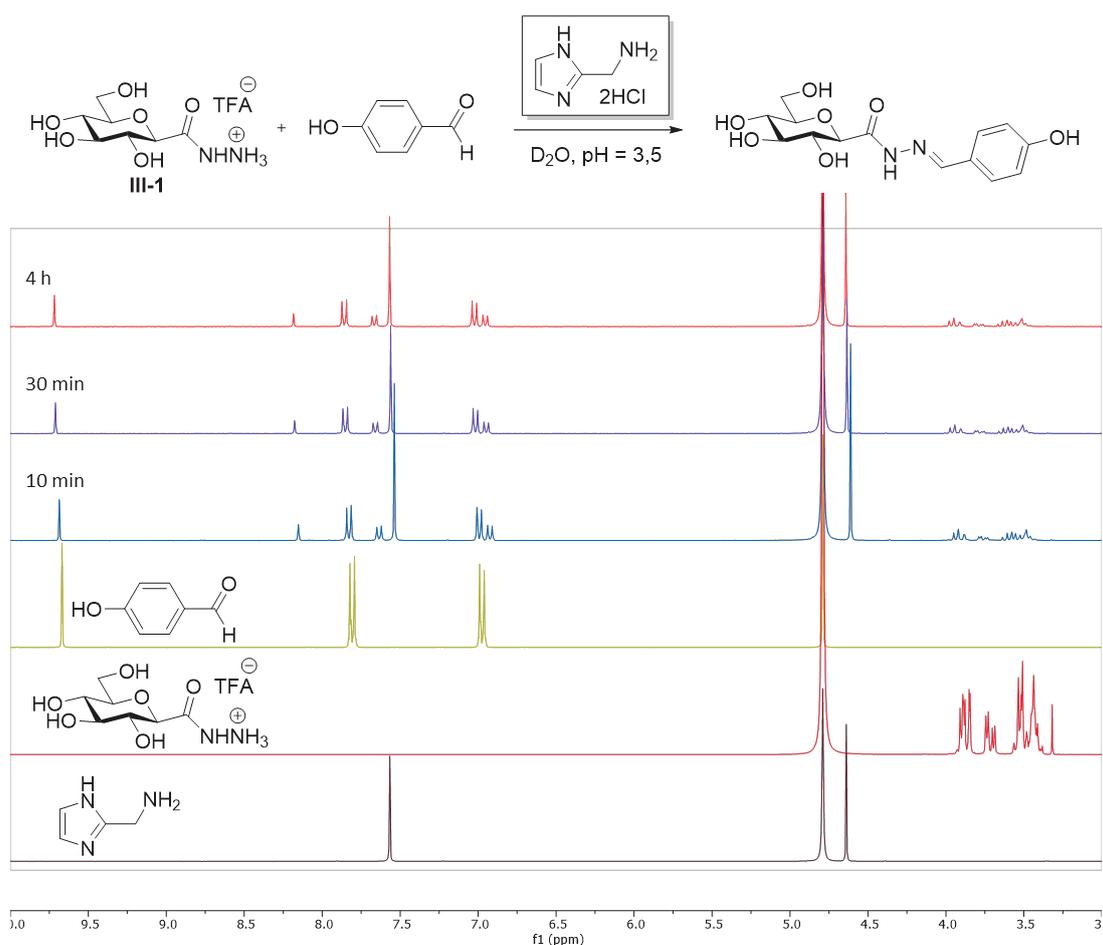


Figure 64 : Etude de la formation d'acylhydrazone en RMN ([ArCHO]=[III-1]=35mM, [Cat]=50mM, 25°C, pH = 3.5)

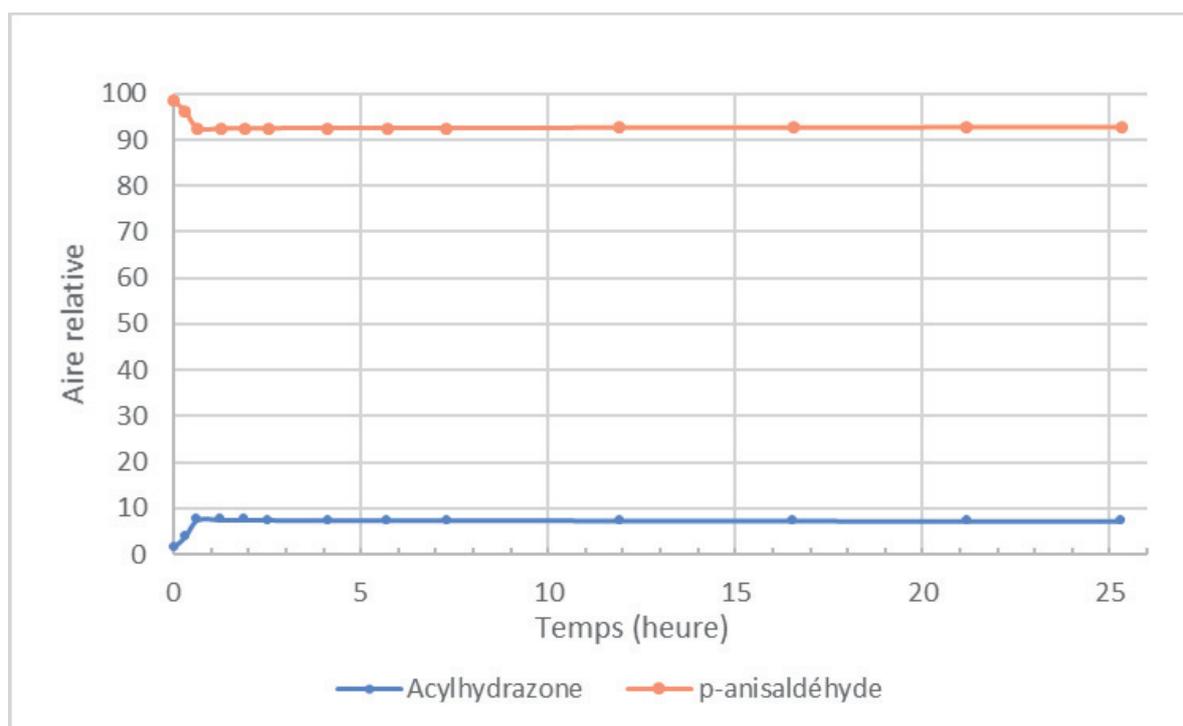


Figure 65 : Suivi cinétique de la formation d'acylhydrazone par UHPLC ([ArCHO]=[III-1]=0,5mM, [Cat]=50mM, 25°C, pH = 3.5)

III.3.2. Optimisation des conditions réactionnelles

L'étude préliminaire effectuée nous permet d'en connaître davantage sur la cinétique de la réaction en milieu aqueux. Toutefois, afin de réaliser une bibliothèque composée de plusieurs briques moléculaires, nous devons mettre en place des conditions opératoires robustes et compatibles avec l'expérience à réaliser :

- Trouver une méthode d'analyse rapide et fiable des bibliothèques
- Choisir une solution tampon adaptée qui permettra l'équilibration rapide de la bibliothèque et qui sera compatible avec la stabilité de notre enzyme
- Trouver une méthode pour figer et traiter la bibliothèque afin de pouvoir l'analyser

Dans cette partie, nous décrirons et justifierons donc les choix que nous avons pris pour mettre en place les conditions opératoires de nos bibliothèques.

III.3.2.1. Choix des aldéhydes aromatiques

Afin de pouvoir établir des conditions opératoires, il faut tout d'abord sélectionner les différents composants de notre bibliothèque. Nous avons donc choisi arbitrairement quatre aldéhydes aromatiques dérivés du benzaldéhyde, et le 2-naphtaldéhyde qui est pour le moment le meilleur pharmacophore connu. Par la suite, nous ferons de nombreuses références à ces aldéhydes, ainsi qu'aux acylhydrazones qu'ils formeront avec l'hydrazide III-1. Dans un souci de clarté, nous utiliserons la nomenclature détaillée ci-dessous (Figure 66). Afin de mettre en place les conditions expérimentales primaires telles que le choix de la méthode de suivi des bibliothèques et les tests des différentes solutions tampons, seuls les aromatiques Ar_H , Ar_{OH} , Ar_{OMe} et Ar_{Me} seront utilisés. Pour des raisons pratiques, Ar_{Nap} ne sera rajouté que lors de la bibliothèque finale car les pics de $Glc-Ar_{Me}$ et de Ar_{Nap} ont le même temps de rétention.

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

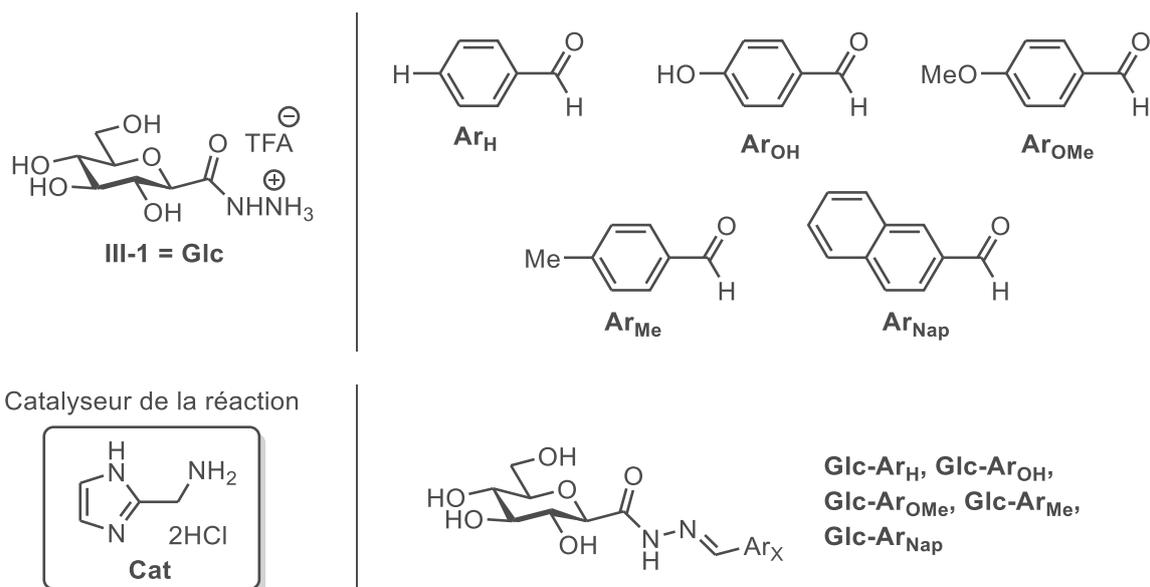


Figure 66 : Choix des aldéhydes et nomenclature

III.3.2.2. Choix de la méthode de suivi des bibliothèques

Nous devons choisir un outil analytique qui nous permet de faire un suivi précis de nos bibliothèques. Durant l'étude préliminaire, nous avons utilisé la RMN pour suivre la formation d'acylhydrazone, mais avec un mélange de plusieurs produits aromatiques, cette technique s'avère compliquée à mettre en œuvre. Nous nous tournons alors rapidement vers la méthode la plus utilisée en CCD : l'UHPLC analytique. Nous devons alors trouver des conditions d'élution permettant la séparation de toutes les espèces dans le mélange. Pour cela, nous mettons en mélange dans l'eau les aldéhydes Ar_H , Ar_{OH} , Ar_{OMe} et Ar_{Me} et un excès de l'hydrazide **Glc** pour être sûr de former toutes les acylhydrazones correspondantes.

Pour développer notre méthode UHPLC, nous allons faire varier la phase stationnaire (la colonne) et la phase mobile (le gradient d'élution). Ainsi, les différents couples de colonnes et de gradients testés sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7). Quelques exemples de ces tests de séparation, correspondant aux différentes colonnes, sont montrés sur la figure ci-après (Figure 67).

Entrée	Technologie de colonne (nature de la phase stationnaire)	Phase mobile	Séparation
1	Hypercarb (feuillets de carbone)	Gradient 5-100% (H ₂ O/ACN)	Mauvaise
2	Hypercarb (feuillets de carbone)	Gradient 5-100% (H ₂ O/ACN + 0,1% HCOOH)	Mauvaise
3	Luna Omega Polar (silice greffée C18 polaire)	Gradient 0-100% (H ₂ O/ACN + 0,1% HCOOH)	Mauvaise
4	Luna Omega Polar (silice greffée C18 polaire)	Gradient 0-100% (H ₂ O/MeOH + 0,1% HCOOH)	Mauvaise
5	Accucore C8 (silice greffée C8)	Gradient 0-100% (H ₂ O/ACN + 0,1% HCOOH)	Mauvaise
6	Kinetex Pfp (silice greffée pentafluorophényl)	Gradient 2-100% (H ₂ O/MeOH + 0,1% HCOOH)	Bonne

Tableau 7 : Résumé du développement de méthode UHPLC

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

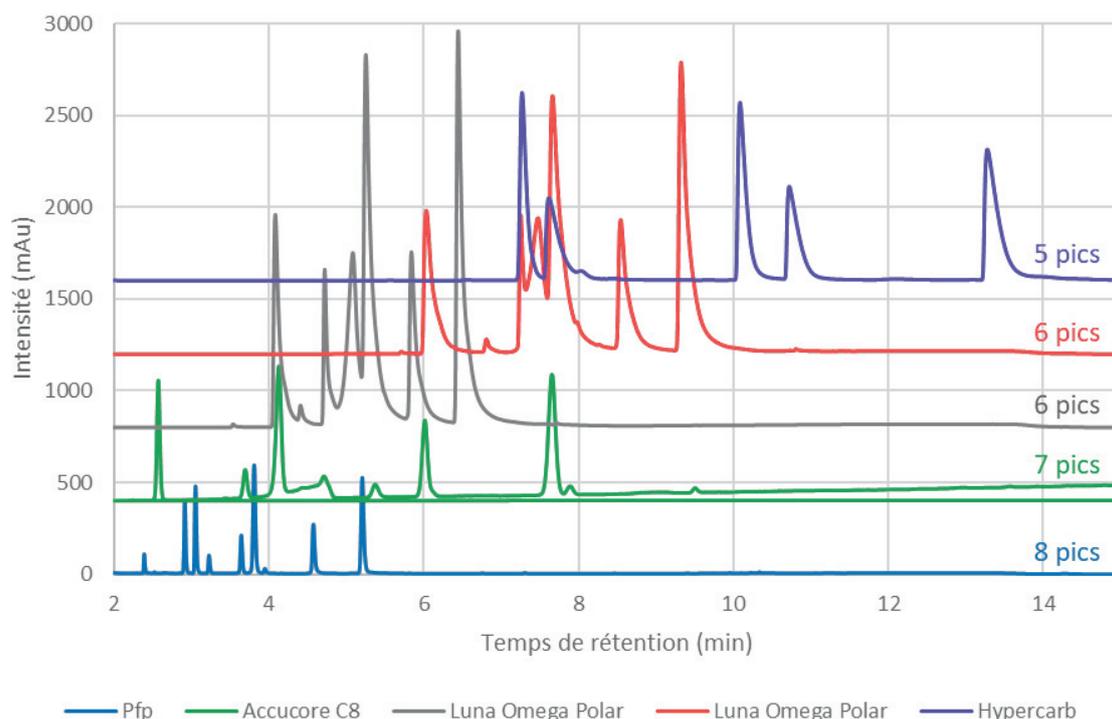


Figure 67 : Exemple des chromatogrammes obtenus lors du développement de méthode ([Glc]=1,32 mM, [Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Me}]=0,5 mM, H₂O, 25°C, pH = 3,1). Pour valider la méthode, 8 pics sont attendus.

Ce tableau résume les grandes lignes des tests qui ont été réalisés : pour chaque colonne, plusieurs gradients de même nature ont été testés et ne sont pas représentés ici dans ce tableau. Nous parvenons à mettre en place des conditions de séparation optimales pour toutes nos espèces (entrée **6**). La référence de la colonne utilisée ainsi que les conditions exactes d'élutions sont décrites dans la partie expérimentale (IV.1.8).

Nous avons donc mis au point une méthode permettant de séparer tous les produits de notre bibliothèque (Figure 68). L'attribution des pics obtenus est possible grâce à une analyse complémentaire de UHPLC couplée à la spectrométrie de masse. Tous les produits sont présents, sauf l'hydrazide **Glc** qui n'est pas visible en UV. Cependant, comme nous nous intéressons uniquement au suivi de la quantité d'acylhydrazones formées, cette absence n'est pas une limitation.

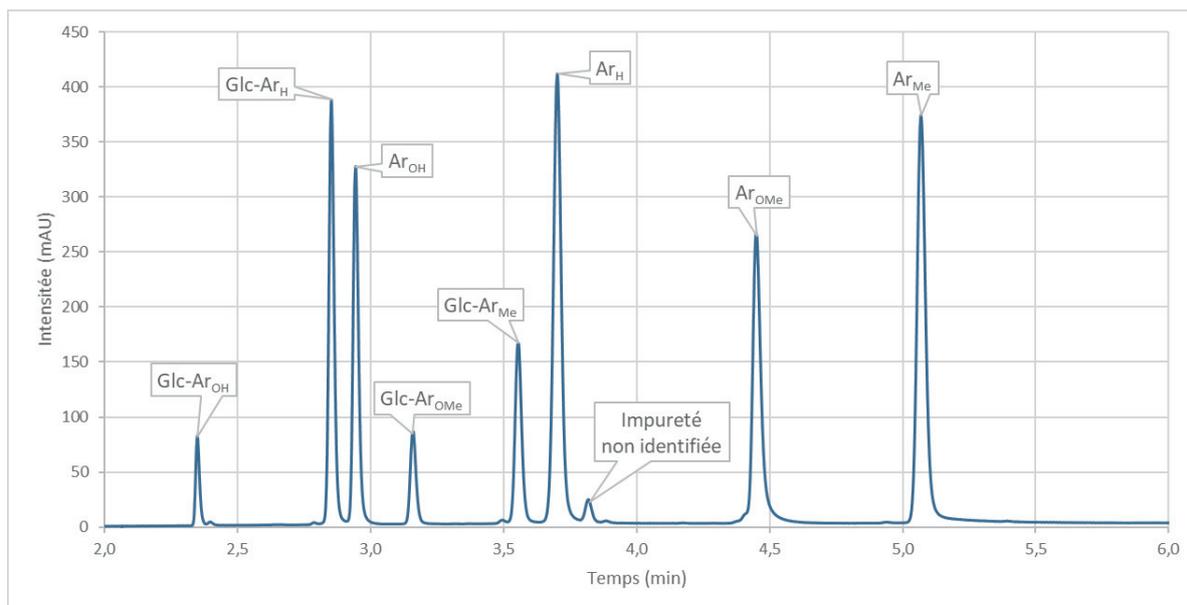


Figure 68 : Chromatogramme UHPLC du mélange ($[Glc]=1,32$ mM, $[Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Me}]=0,5$ mM, H_2O , $25^\circ C$, $pH = 3.1$)

III.3.2.3. Choix de la solution tampon

Rappelons que pour pouvoir travailler en présence de protéine, le contrôle du pH de la réaction est important, le choix de la solution tampon est donc primordial. Idéalement, il faut aussi pouvoir contrôler la vitesse de formation des acylhydrazones dans le mélange. Dans la littérature, les tampons généralement employés pour atteindre un pH physiologique sont à base de sel de phosphate ou d'acétate ou encore le tampon Tris. Ce dernier n'est cependant pas recommandé pour notre cas car il peut former des imines en présence d'aldéhydes.^[64]

Nous avons testé plusieurs tampons, en présence ou non du catalyseur **Cat** étudié précédemment :

- Eau pure, absence de tampon
- **Tampon 1** : tampon phosphate de sodium 10 mM à $pH = 7,2$
- **Tampon 2** : tampon formiate d'ammonium 100 mM à $pH = 6,5$

Pour évaluer ces tampons, nous mettons en mélange les aldéhydes **Ar_H**, **Ar_{OH}**, **Ar_{OMe}** et **Ar_{Me}** et l'hydrazide **Glc** et nous réalisons un suivi UHPLC des mélanges jusqu'à, si elle a lieu, l'équilibration de la bibliothèque (Tableau 8). La validité de ces tampons est donc basée sur les deux critères évoqués précédemment : le pH final du mélange et la cinétique de la formation des acylhydrazones.

Entrée	Nature du tampon	Catalyseur	pH solution	Commentaire sur la cinétique de réaction
1	Eau pure	-	4,6	Equilibre atteint en 36 h
2	Tampon 1 Phosphate de sodium 10 mM pH = 7,2	-	7,1	Traces d'acylhydrazones Glc-Ar après 24 h
3	Tampon 2 Formiate d'ammonium 100 mM pH = 6,5	-	6,1	Equilibre atteint en 30 h
4	Tampon 2 Formiate d'ammonium 100 mM pH = 6,5	50 mM	6,9*	Equilibre atteint en 3h

Tableau 8 : Résumé des tests des solutions tampons (*pH ajusté à 6,9 avec ajout de NaOH 1M) ([Glc]=1,32 mM, [Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Me}]=0,5 mM).

De manière prévisible, l'absence de tampon permet une équilibration de la bibliothèque mais le pH faible du mélange n'est pas compatible avec l'utilisation de l'enzyme (entrée 1). L'emploi d'un tampon phosphate permet lui de tamponner correctement le mélange mais la formation des acylhydrazones est extrêmement lente en absence de catalyseur (entrée 2). Le tampon au formiate d'ammonium répond cependant à toutes nos attentes (entrée 3 et 4). En l'absence de catalyseur, l'équilibre de la bibliothèque se fait en 30 heures à un pH raisonnable de 6,1 et avec le catalyseur, l'équilibration est réalisée en seulement 3 heures. L'utilisation de ce tampon permet donc de pouvoir contrôler la vitesse d'équilibration de notre bibliothèque tout en garantissant une stabilité de pH satisfaisante. Par la suite nous désignerons ce tampon en tant que **tampon 2**.

Nous avons aussi étudié l'influence de la quantité d'hydrazide **Glc** introduite sur la vitesse d'équilibration de la bibliothèque avec le **tampon 2** (Tableau 9).

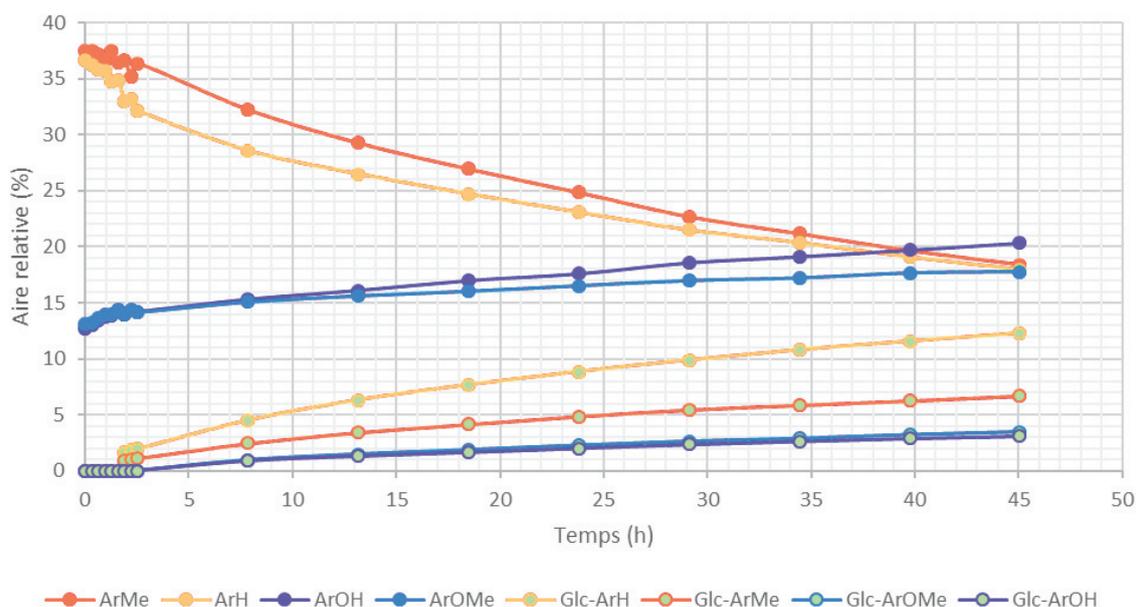
- Entrées 1 et 3 : introduction de 0,7 équivalent de **Glc** par aldéhyde dans le mélange (au total 2,8 équivalents pour les quatre aldéhydes **Ar_H**, **Ar_{OH}**, **Ar_{OMe}** et **Ar_{Me}**)
- Entrées 2 et 4 : introduction de 0,7 équivalent total de **Glc** dans le mélange des quatre aldéhydes (**Ar_H**, **Ar_{OH}**, **Ar_{OMe}** et **Ar_{Me}**) introduits à 1 équivalent chacun

Entrée	[Glc] (mM)	[ArCHO] (mM)	Solution tampon	Durée de l'équilibration (h)
1	1,32	0,5	Tampon 2	30
2	0,33	0,5	Tampon 2	30
3	1,32	0,5	Tampon 2 + Cat	3
4	0,33	0,5	Tampon 2 + Cat	3

Tableau 9 : Influence de la quantité d'hydrazine sur la vitesse d'équilibration de la bibliothèque

Dans les deux cas (en présence ou en l'absence de catalyseur), la quantité d'hydrazide **Glc** introduite n'a pas d'influence sur la cinétique de la formation des acylhydrazones (comparaison des entrées 1 *versus* 2 et 3 *versus* 4). Cette vérification était primordiale et nous permettra par la suite d'étudier l'influence de la quantité de l'hydrazide sur les potentielles amplifications. Même si la quantité d'hydrazide n'influe pas sur la cinétique de la réaction, elle impacte tout de même la quantité de produits formés (Figure 69 & Figure 70).

Entrée 1 (Tableau 9)



Entrée 2 (Tableau 9)

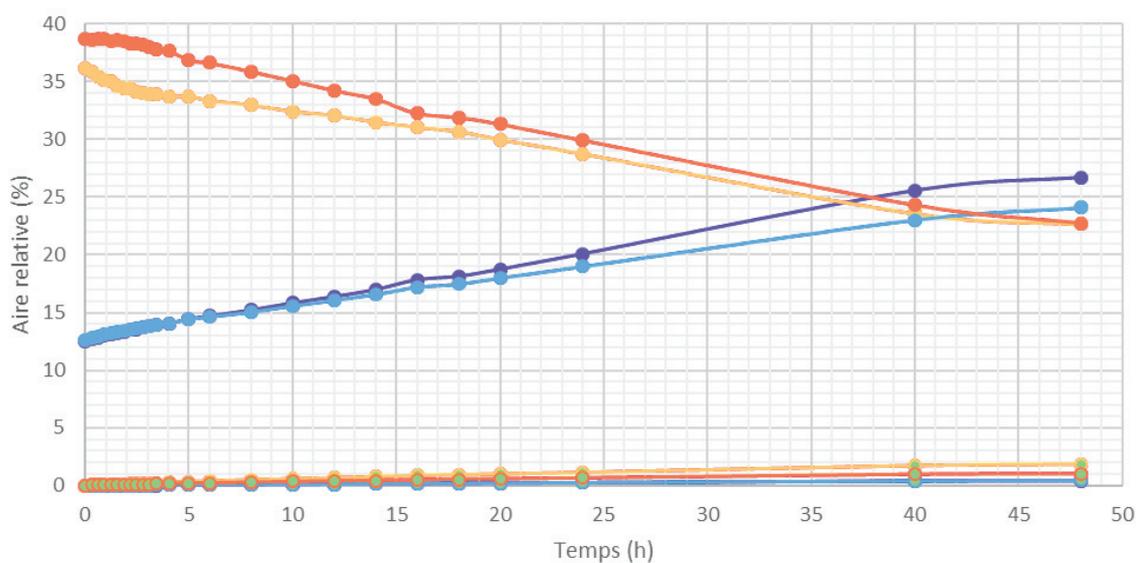
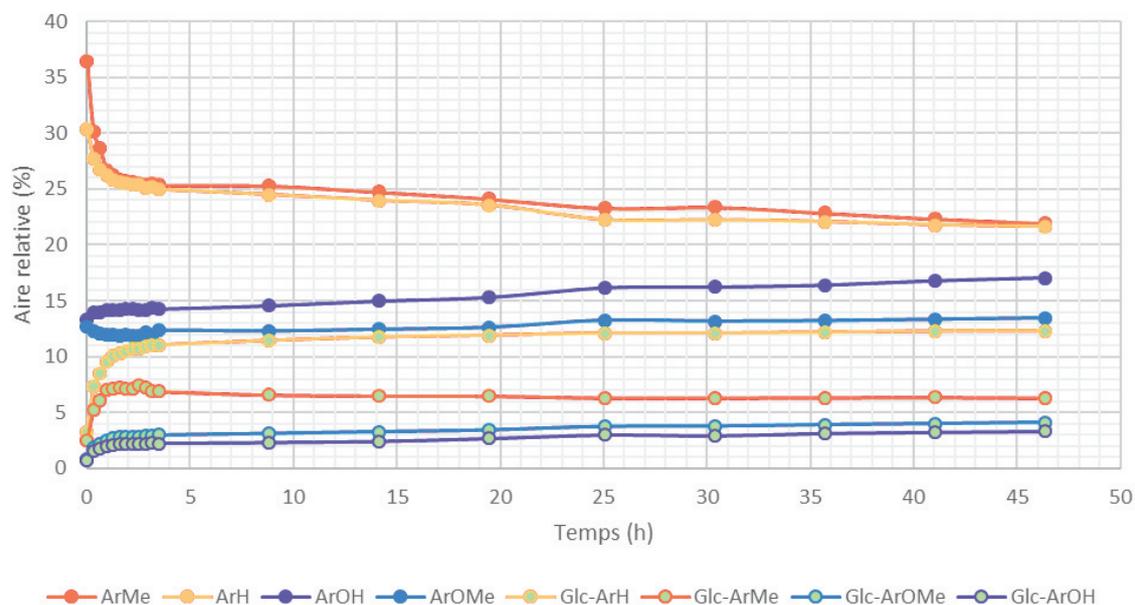


Figure 69 : Suivi des espèces pour les entrées 1 et 2 (voir conditions Tableau 9, 25°C, pH = 6,1)

Nous avons observé que les aires relatives de Ar_{OH} et Ar_{OMe} augmentent au cours du temps. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que le coefficient d'extinction molaire de la bibliothèque évolue au cours du temps avec la formation des acylhydrazones. L'aire relative de ces pics évolue donc avec ce coefficient d'extinction molaire.

Entrée 3 (Tableau 9)



Entrée 4 (Tableau 9)

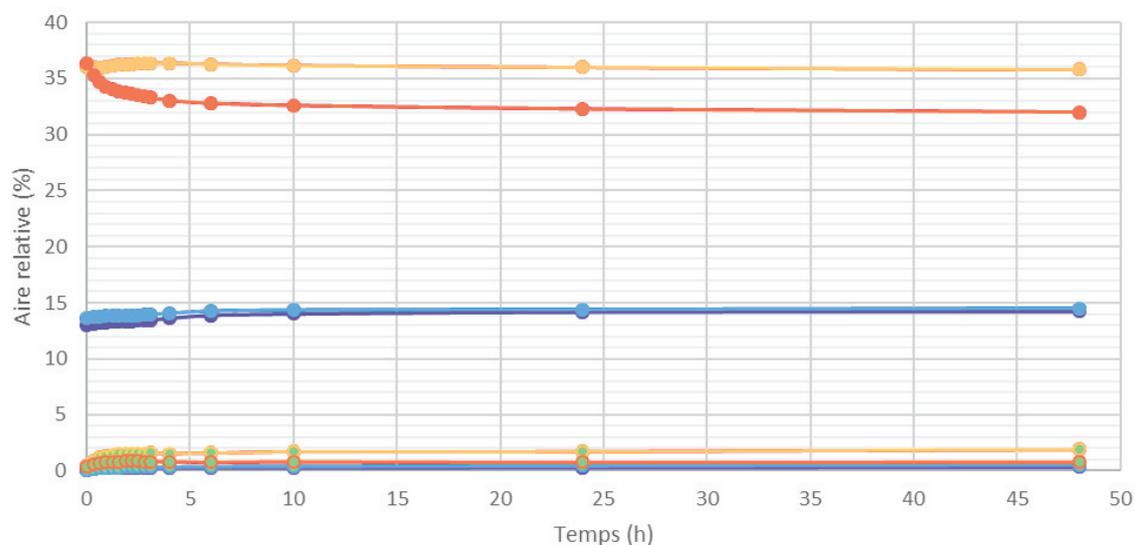


Figure 70 : Suivi des espèces pour les entrées 3 et 4 (voir conditions Tableau 9, 25°C, pH = 6,9)

III.3.2.4. Choix de la méthode de traitement des bibliothèques

Maintenant que nous pouvons suivre l'évolution des espèces de nos bibliothèques et que nous avons trouvé des conditions d'équilibration satisfaisantes, il nous faut étudier le traitement de la bibliothèque qui doit permettre de figer l'équilibre du mélange et, si besoin, de retirer la protéine qui y est présente. Dans le cas des acylhydrazones, l'équilibre de la réaction peut facilement être figé en changeant le pH et en passant en milieu légèrement basique (pH = 8,5). Nous allons donc nous concentrer ici à l'étude de quelques méthodes qui permettraient de retirer la protéine du mélange.

III.3.2.4.1. Traitement par l'acétonitrile

L'une des méthodes employées pour dénaturer et faire précipiter les protéines est le choc organique comme l'ajout d'acétonitrile.^[148] Nous avons donc voulu tester ce traitement sur notre bibliothèque. Le protocole que nous utilisons est détaillé sur la figure ci-dessous (Figure 71).

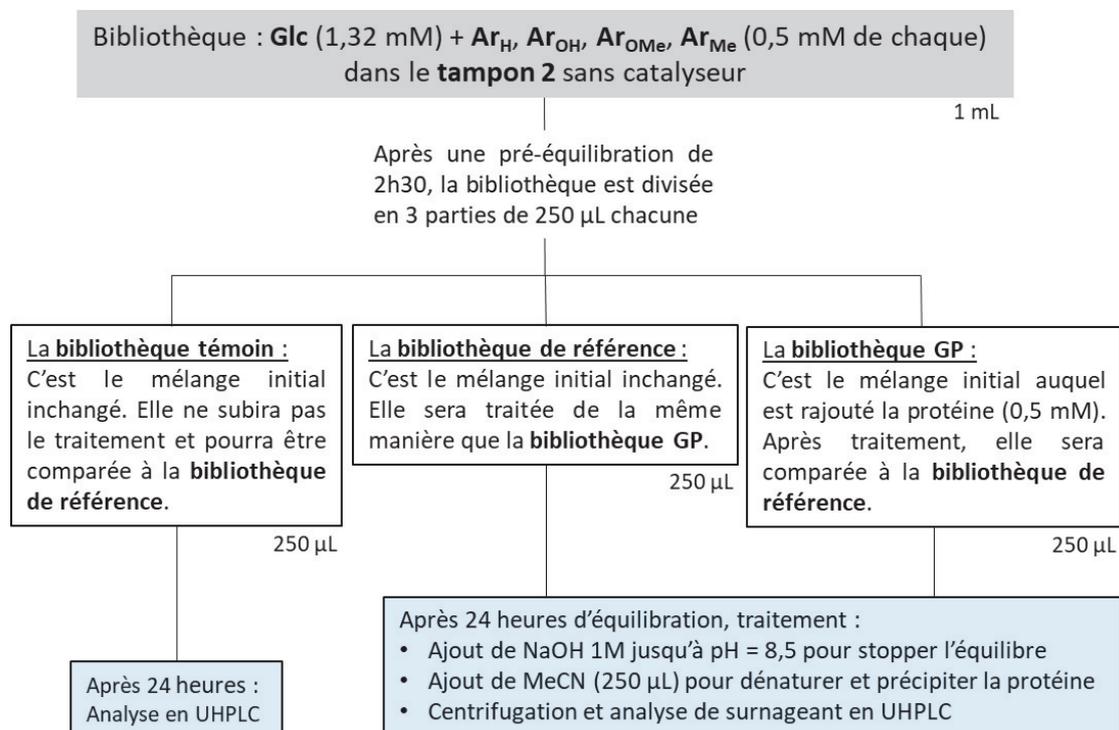


Figure 71 : Protocole expérimental pour tester la méthode par traitement à l'acétonitrile

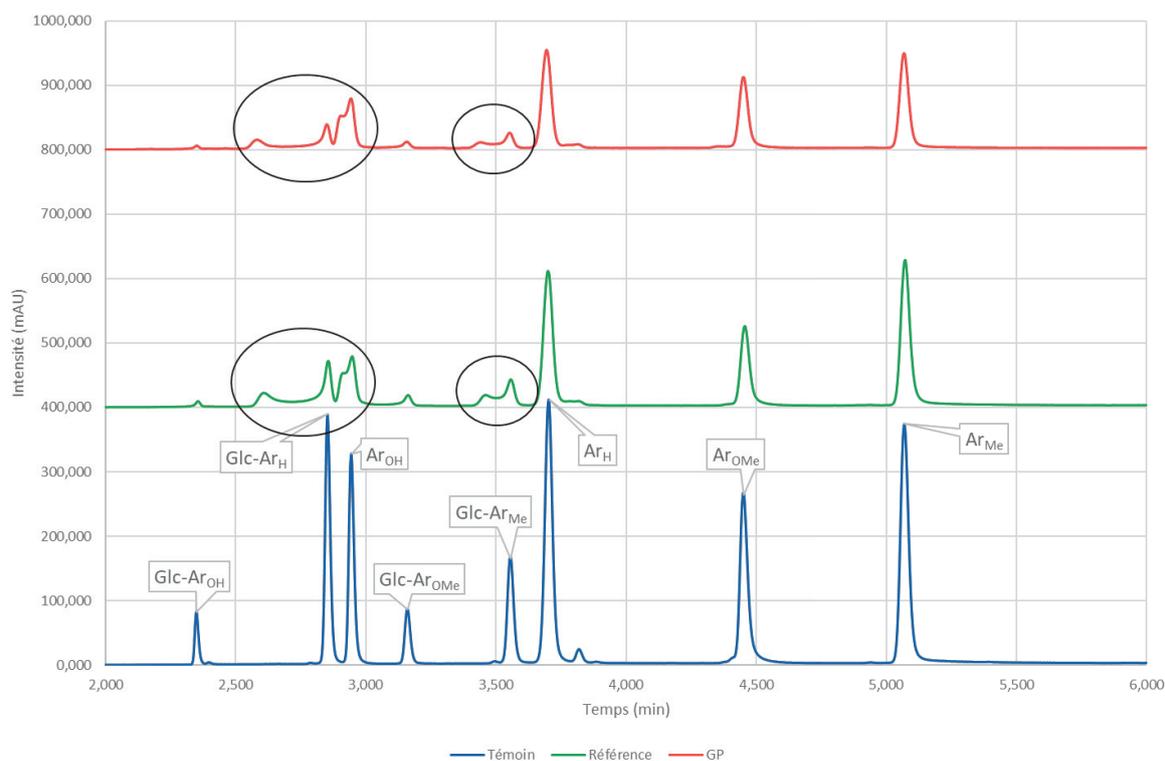


Figure 72 : Chromatogrammes UHPLC des trois bibliothèques

Pour ce test, nous faisons le choix de travailler avec le **tampon 2** sans ajout de catalyseur. Dans ces conditions, nous laissons la bibliothèque pré-équilibrer sans protéine pendant 2h30. Une équilibration de 24 heures est ensuite réalisée. Les trois bibliothèques (témoin, référence et GP) sont analysées en UHPLC selon la méthode définie précédemment (Figure 72).

Par comparaison de la référence avec le témoin, on constate que le traitement par l'acétonitrile dégrade les espèces présentes, et que plusieurs nouvelles espèces chimiques sont formées. Des résultats similaires sont obtenus pour des équilibrations de 48 et 72 heures. Comme les espèces de la bibliothèque sont dégradées, il n'est malheureusement pas possible de conclure quant à l'effet de la protéine sur la bibliothèque. Le traitement par l'acétonitrile pour la dégradation de la protéine n'est donc pas une méthode qui convient dans notre cas.

III.3.2.4.2. L'ultrafiltration de la GP

Il existe une technique de filtration par centrifugation qui permet de retenir en fonction du poids moléculaire les constituants d'un mélange. Notre enzyme étant un dimère de 92 kDa, nous optons donc pour un filtre Amicon® cellulose ayant une porosité moyenne de 10 kDa. Le protocole que nous utilisons pour tester cette technique de traitement est le suivant (Figure 73).

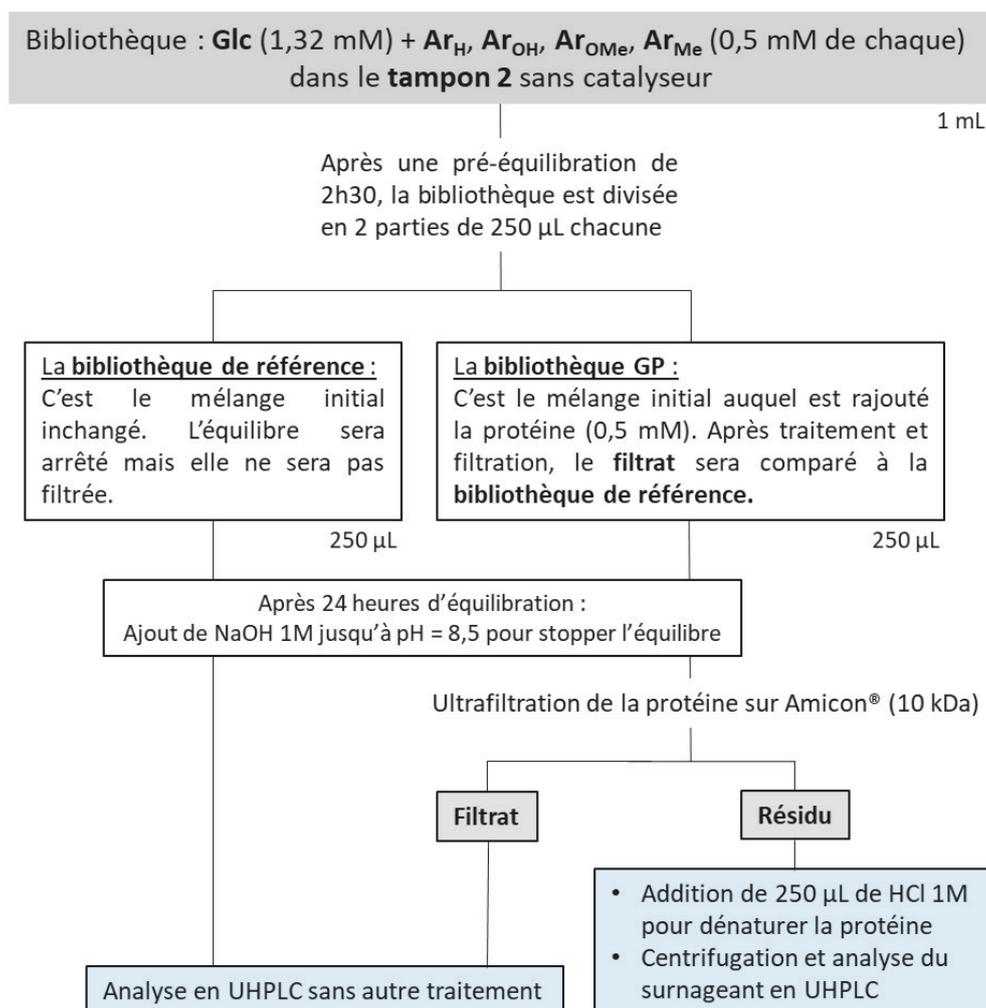


Figure 73 : Protocole expérimental pour tester la méthode par filtration

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

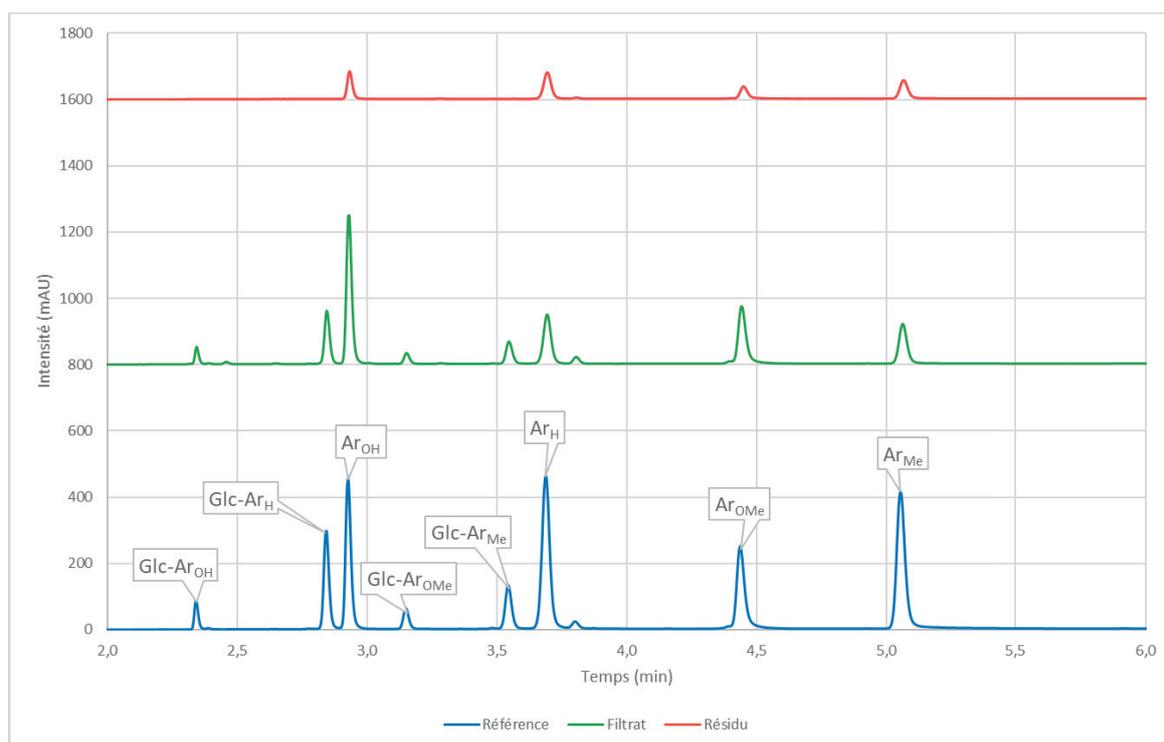


Figure 74 : Spectre UHPLC de la référence, du filtrat et du résidu de filtration

Cette fois encore, la bibliothèque est réalisée dans le **tampon 2** sans catalyseur et elle est laissée pré-équilibrer pendant 2h30. Après l'ajout de la protéine, une équilibration de 24 heures est réalisée puis les deux bibliothèques (référence et GP) sont figées par basification du milieu. La bibliothèque GP est alors filtrée sur Amicon® et le filtrat est directement analysé en UHPLC (Figure 74). Le résidu de la filtration est traité avec une solution d'acide chlorhydrique pour dénaturer et précipiter l'enzyme et le surnageant obtenu après centrifugation est lui aussi injecté en UHPLC. Le chromatogramme du résidu nous permettra donc de savoir ce qui était resté dans le filtre (Figure 74).

En comparant le chromatogramme de la référence avec celui du filtrat, on constate que la bibliothèque n'est pas dégradée. Cependant, une nette diminution de l'intensité de la plupart des pics correspondant aux aldéhydes est observée. L'analyse du résidu amène un élément supplémentaire de réflexion puisque les quatre aldéhydes sont retrouvés dans le résidu de filtration. Nous émettons alors deux hypothèses pour expliquer cela :

- Les aldéhydes peuvent être adsorbés à la surface de la GP, et restent avec cette dernière lors de la filtration. Puis, lors de la dégradation de la GP par le choc acide, les aldéhydes sont relibérés dans le surnageant.
- Les aldéhydes sont adsorbés à la surface du filtre et retrouvés lors du lavage du filtre pour récupérer le résidu.

La première hypothèse étant plus difficile à vérifier, nous nous proposons de réaliser une expérience permettant de confirmer ou d'invalider la seconde.

Une solution de chaque aldéhyde (**Ar_H**, **Ar_{OH}**, **Ar_{OMe}**, **Ar_{Me}** et **Ar_{Nap}**) pris séparément dans le **tampon 2** est réalisée et divisée en deux parties. La première est analysée en UHPLC sans traitement et la seconde est filtrée sur Amicon® avant d'être analysée à son tour. Les aires de toutes les espèces sont mesurées et comparées (Figure 75) indiquant une « affinité » des aldéhydes aromatiques pour ce filtre.

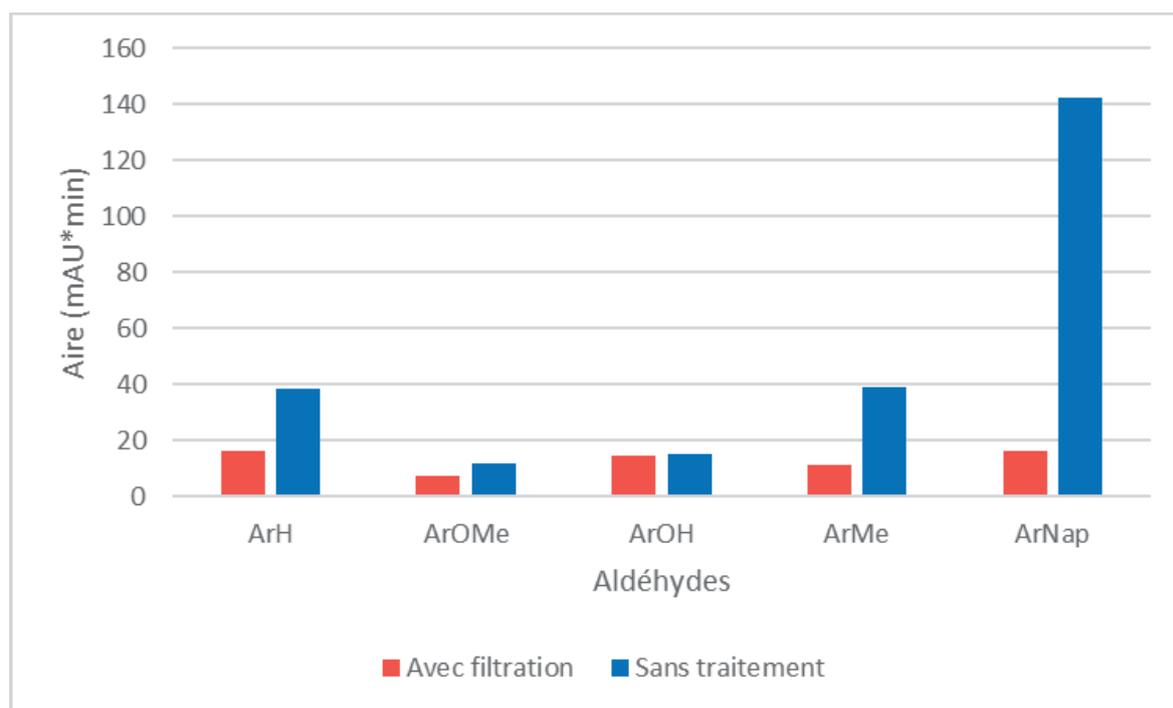


Figure 75 : « Affinité » des aldéhydes pour le filtre Amicon®

D'après le graphique, les composés qui ont le plus d'affinité avec le filtre sont les aromatiques les plus hydrophobes **Ar_H**, **Ar_{Me}** et **Ar_{Nap}**, notre deuxième hypothèse est donc vérifiée. Cette adsorption des aldéhydes sur le filtre pose cependant un problème puisqu'elle modifie la concentration des espèces dans le filtrat. La comparaison de la composition du filtrat et de la référence est donc complètement faussée et ne permet pas de conclure sur l'influence de la GP sur la bibliothèque. Cette méthode de filtration ne convient donc pas pour notre étude.

III.3.2.4.3. Analyse de la bibliothèque sans retirer la GP

Jusqu'à présent, nous étions partis du principe que la GP (introduite en quantité stœchiométrique) devait être retirée du mélange avant l'injection en UHPLC. En effet, une trop grosse quantité d'enzyme peut endommager la colonne chromatographique que nous utilisons. Cependant, si nous réduisons la quantité d'enzyme introduite dans la bibliothèque, l'analyse UHPLC en injection directe en présence de cette dernière est envisageable. Nous décidons donc de réduire la concentration de la GP de 0,5 mM à 5 µM dans la bibliothèque pour les prochains essais. Une étude portant sur la quantité d'enzyme sera effectuée par la suite. Ainsi, le protocole retenu pour traiter les bibliothèques est décrit ci-dessous (Figure 76).

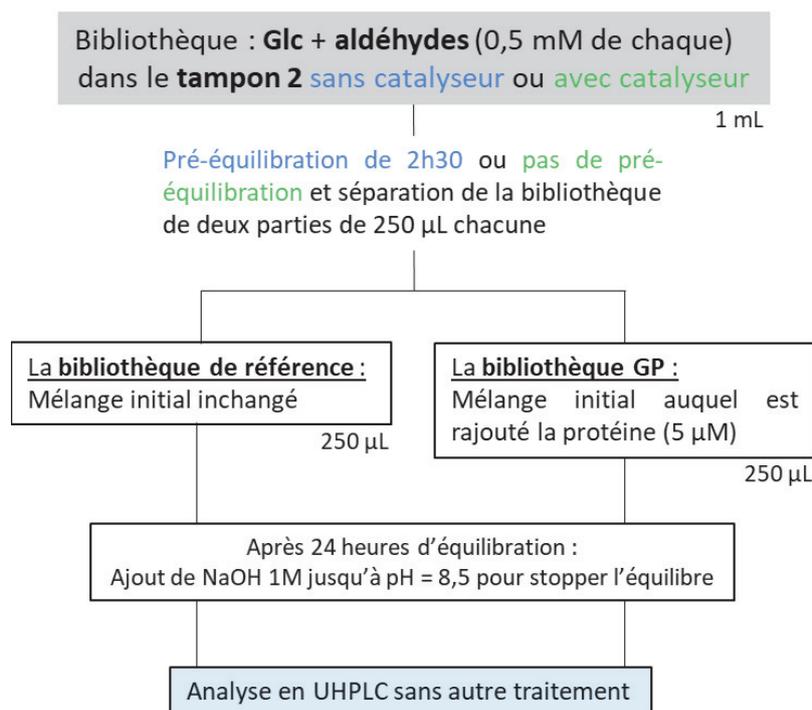


Figure 76 : Protocole final de réalisation des bibliothèques

Nous avons pu définir une méthode et des conditions expérimentales qui permettent de réaliser notre bibliothèque et de faire son analyse par UHPLC. Nous pouvons donc étudier l'effet de la GP sur la répartition des espèces dans le mélange.

Nous allons maintenant nous consacrer à étudier l'influence de la quantité d'hydrazide introduite, de la quantité de GP introduite et de la catalyse sur la répartition des espèces dans le mélange.

III.3.2.5. Etude de la quantité d'hydrazide **Glc** introduite

Cette étude est réalisée selon le protocole défini (Figure 76) avec les aldéhydes **Ar_H**, **Ar_{OH}**, **Ar_{OMe}**, et **Ar_{Nap}** sans catalyseur. La glycogène phosphorylase sera introduite à une concentration de 5 µM. Nous faisons varier la quantité d'hydrazide **Glc** introduite :

- 1^{ère} bibliothèque : [**Glc**] = 0,33 mM (soit 0,7 équivalent)
- 2^{ème} bibliothèque : [**Glc**] = 0,66 mM (soit 1,4 équivalents)
- 3^{ème} bibliothèque : [**Glc**] = 1,32 mM (soit 2,8 équivalents)

Pour chacune de ces trois bibliothèques, l'injection en UHPLC des bibliothèques de référence et de GP permet de comparer les aires relatives des différentes acylhydrazones **Glc-Ar_x** formées. Un ratio est alors calculé et permet d'en déduire le facteur d'amplification pour les espèces concernées. Toutes les expériences sont réalisées en triplicata pour pouvoir calculer la déviation standard liée à l'intégration des pics. Ainsi, pour la première bibliothèque à 0,33 mM de **Glc**, nous pouvons représenter les aires relatives des acylhydrazones par des histogrammes comme suit (Figure 77).

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

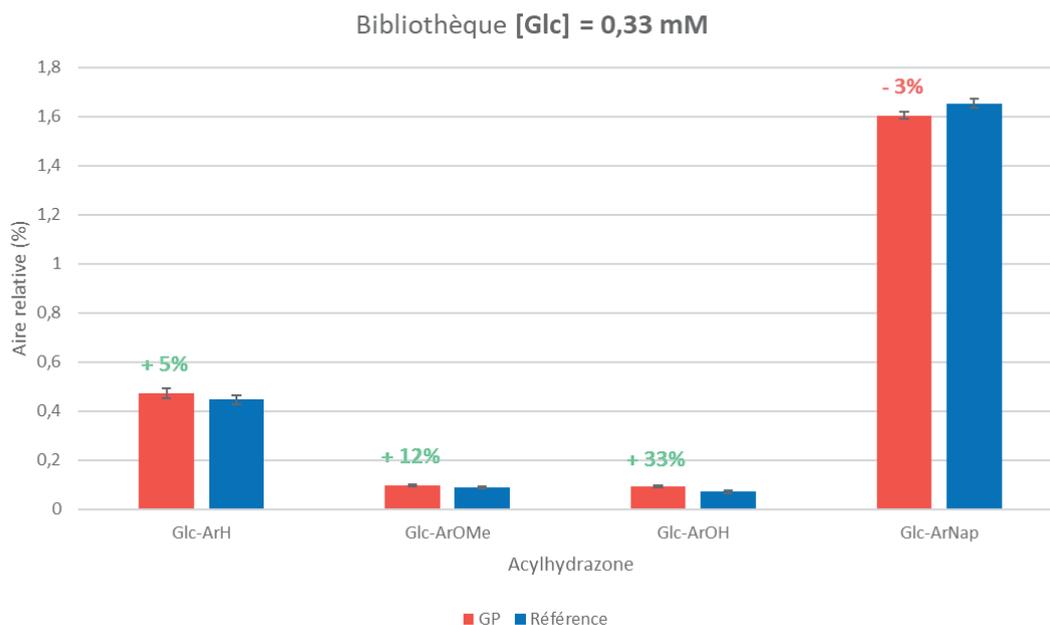


Figure 77 : Représentation en histogramme des aires relatives des acylhydrazones de la 1^{ère} bibliothèque ([Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5 mM, [GP]=5 μM, tampon 2, 25°C)

Une amplification des espèces **Glc-Ar_{OH}** et **Glc-Ar_{OMe}** de respectivement 33% et 12% est notée, une faible amplification de 5% pour l'espèce **Glc-Ar_H** est constatée alors que l'espèce **Glc-Ar_{Nap}** n'est pas amplifiée. La déviation standard due à l'intégration des pics est négligeable et ce même pour les petites aires sous courbe (**Glc-Ar_{OH}**). Les mêmes histogrammes sont tracés pour les deux autres bibliothèques et sont disponibles en annexe (V.1). Pour chaque bibliothèque, le calcul de l'amplification des espèces nous permet donc d'évaluer l'effet de la quantité d'hydrazide **Glc** sur ces amplifications (Figure 78).

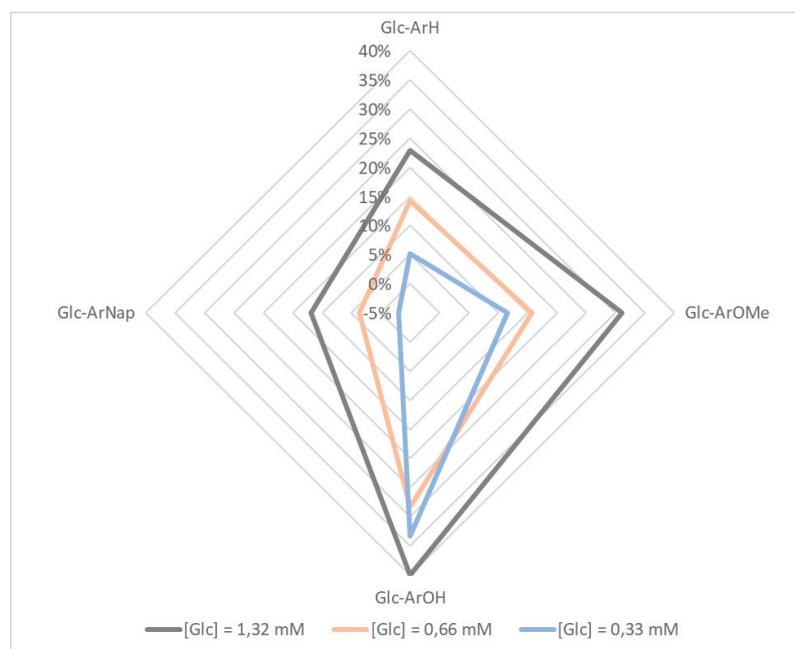


Figure 78 : Amplification des espèces en fonction de la quantité d'hydrazide **Glc** ([Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5 mM, [GP]=5 μM, tampon 2, 25°C)

Une nette tendance se dégage de ces expériences : plus la quantité d'hydrazide augmente, plus l'amplification augmente. Il faut aussi noter que, pour les trois bibliothèques, le même classement entre les espèces peut être effectué, il n'y a donc là pas d'aberrations.

Théoriquement, pour permettre à notre enzyme de sélectionner une espèce **Glc-Ar_x** parmi celles formées dans le mélange, il faut qu'il y ait une compétition de formation entre toutes les acylhydrazones. En effet, si tous les produits peuvent être formés de manière stœchiométrique, il n'est plus possible de justifier scientifiquement une amplification pour tel ou tel produit. Autrement dit, pour que l'amplification observée soit la plus représentative possible, il faut que l'hydrazide **Glc** soit introduite en défaut par rapport aux aldéhydes. Nous faisons donc le choix pour la suite de notre étude de travailler avec une concentration de 0,33 mM d'hydrazide **Glc** et $0,5 \times 5 = 2,5$ mM d'aldéhydes. Certes les amplifications obtenues seront moins élevées, mais elles seront plus représentatives de la réalité de l'expérience.

III.3.2.6. Etude de la quantité de protéine introduite

Maintenant que nous avons déterminé la quantité d'hydrazide optimale à introduire dans notre bibliothèque, nous désirons effectuer une étude sur l'influence de la quantité de GP sur les amplifications. Selon le protocole défini auparavant (Figure 76), **Glc** (0,33 mM) sera mis en mélange avec les quatre aldéhydes **Ar_H**, **Ar_{OH}**, **Ar_{OMe}**, et **Ar_{Nap}** dans le **tampon 2** sans catalyseur. Nous ferons varier la quantité de **GP** dans les bibliothèques comme suit :

- 1^{ère} bibliothèque : **[GP]** = 5 μ M
- 2^{ème} bibliothèque : **[GP]** = 50 μ M
- 3^{ème} bibliothèque : **[GP]** = 500 μ M

Nous procédons de la même manière que pour l'étude précédente et nous comparons les aires relatives des différentes acylhydrazones **Glc-Ar_x** pour les spectres de référence et en présence de GP. Le tracé des histogrammes est effectué et une amplification est calculée pour chacune des espèces (voir annexe V.2). Toutefois, nous rencontrons quelques soucis pour l'analyse UHPLC de la 3^{ème} bibliothèque puisque la trop grande quantité de protéine bouche et endommage irrémédiablement la colonne. Cet incident était effectivement prévisible, mais ne nous empêche pas de tenir un raisonnement sur les deux autres bibliothèques réalisées. Le diagramme des amplifications correspondantes à ces deux bibliothèques est présenté ci-dessous (Figure 79).

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

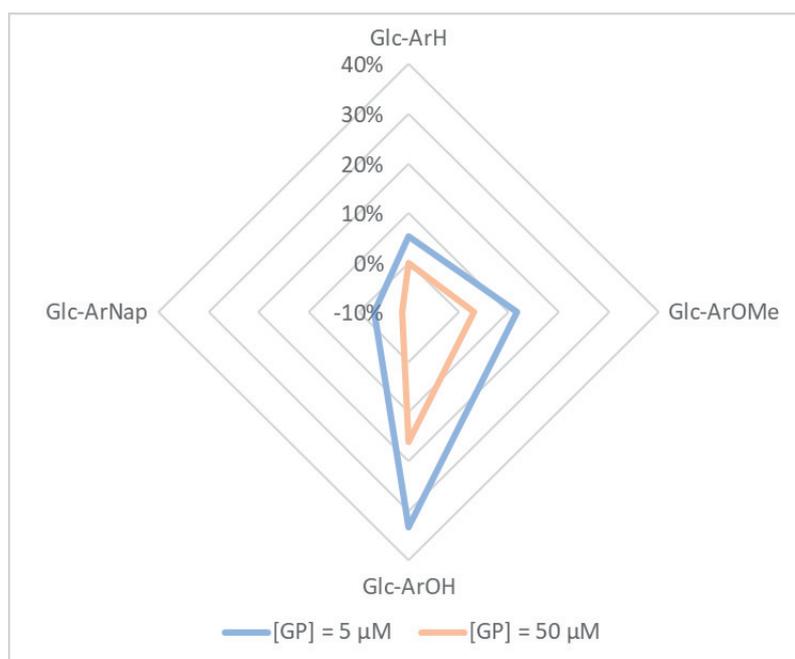


Figure 79 : Amplification des espèces en fonction de la quantité de GP ([Glc]=0,33 mM, [Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5 mM, tampon 2, 25°C)

Une nette diminution de l'amplification d'un facteur dix est observée avec l'augmentation de la quantité de GP. Toutefois, les amplifications (indépendamment de leurs valeurs) vont dans le même sens quelle que soit la quantité de GP introduite (**Glc-Ar_{OH}** ayant la plus grande amplification et **Glc-Ar_{Nap}** la plus faible). Il est cependant difficile de rationaliser une telle perte d'amplification. Pour la suite de notre étude, nous faisons le choix de travailler avec la plus petite quantité d'enzyme possible (c'est-à-dire à 5 µM). Ce choix est fait dans le but de maximiser les amplifications mais aussi dans un but économique, puisque la GP est certes commerciale mais son coût reste élevé (900 € pour 100 mg).

III.3.2.7. Etude de l'impact de la catalyse sur l'amplification

Nous avons trouvé les quantités optimales d'hydrazide **Glc** et de **GP** à introduire dans le mélange pour notre bibliothèque. Nous souhaitons maintenant aborder l'influence de la catalyse sur les amplifications des espèces dans le mélange. En effet, comme vu précédemment nous avons la possibilité de contrôler la vitesse d'équilibration de notre bibliothèque : 3 h avec catalyse et 30 h sans catalyseur. Nous réalisons donc deux bibliothèques avec **Glc** (0,33 mM) et quatre aldéhydes (**Ar_H**, **Ar_{OH}**, **Ar_{OMe}**, **Ar_{Nap}** à 0.5 mM de chaque) dans le **tampon 2** :

- 1^{ère} bibliothèque : [Cat] = 0 mM (pas de catalyseur)
- 2^{ème} bibliothèque : [Cat] = 50 mM (2-aminométhylimidazole)

Ces deux bibliothèques sont pré-équilibrées pendant 2h30, puis la **GP** (5 µM) est introduite dans le mélange et une équilibration de 24 heures est réalisée. Les bibliothèques sont ensuite analysées par UHPLC avec la méthode habituelle.

Faisons ici un aparté terminologique : dans le cas d'une bibliothèque où la protéine serait introduite lorsque l'équilibre des espèces est atteint, il faudrait normalement employer le terme de « sélection » et non « d'amplification » pour désigner l'augmentation de la présence de l'une des espèces. Le terme « d'amplification » est quant à lui réservé pour les bibliothèques qui sont équilibrées en présence de la protéine. Dans notre cas, comme nous nous situons dans un entre deux (introduction de la protéine en cours d'équilibration), nous avons choisi d'utiliser le terme « d'amplification ».

L'analyse des bibliothèques en UHPLC nous permet d'obtenir le diagramme d'amplifications suivant (Figure 80) (les histogrammes des aires relatives des différentes espèces sont disponibles en annexe V.3).

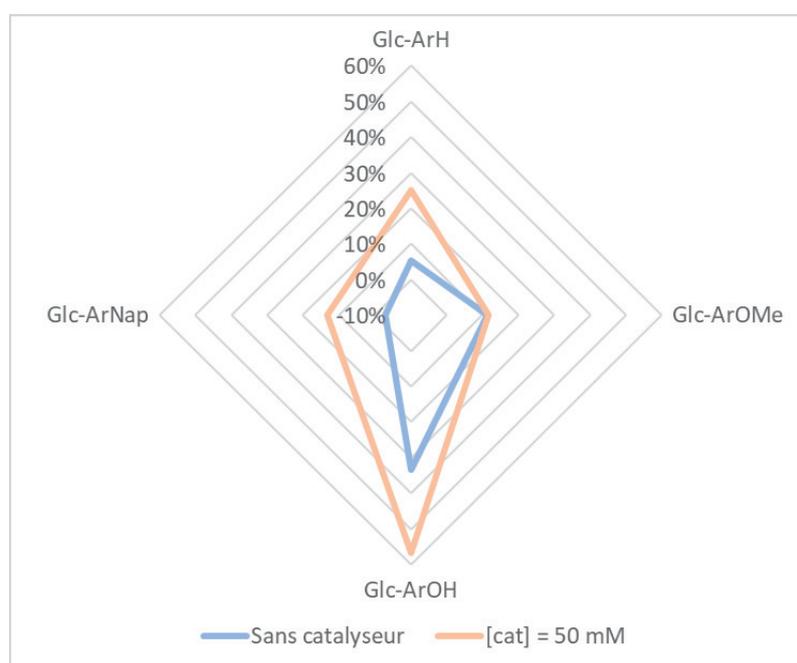


Figure 80 : Influence de la catalyse sur l'amplification des acylhydrazones ($[Glc]=0,33$ mM, $[Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5$ mM, $[GP]=5$ μ M, tampon 2, 25°C)

D'après le diagramme, l'amplification est plus forte en présence du catalyseur. Une explication peut être envisagée pour justifier cette augmentation d'amplification :

- Sans catalyse, la cinétique d'association et de dissociation du complexe acylhydrazone/enzyme est grande par rapport à celle de la formation des acylhydrazones. Quand l'enzyme adsorbe une espèce, l'équilibre de la bibliothèque est perturbé. La cinétique de l'équilibre étant lente, l'enzyme va relarguer l'espèce avant que le nouvel équilibre ne soit atteint.
- Avec catalyse, la cinétique d'association et de dissociation du complexe acylhydrazone/enzyme est faible par rapport à celle de la formation des acylhydrazones. Quand l'enzyme adsorbe une espèce, l'équilibre en solution est rapidement rétabli et lorsque l'enzyme relargue l'espèce en solution, la concentration de cette dernière sera plus grande.

Toutefois, il est difficile de mettre en place une expérience pouvant réellement prouver ce phénomène car d'autres mécanismes peuvent aussi rentrer en ligne de compte, comme la catalyse de la réaction par l'enzyme elle-même. L'explication que nous apportons ici, bien qu'elle puisse permettre d'expliquer les résultats expérimentaux observés, est donc à relativiser.

Cette expérience nous permet toutefois de conclure qu'une catalyse permet de favoriser l'amplification des espèces. Nous utiliserons donc ce catalyseur pour réaliser les expériences finales de notre étude, qui sont décrites ci-après.

III.3.3. Réalisation de la première bibliothèque de CCD

Précédemment, nous avons déterminé les quantités optimales d'hydrazide **Glc**, de **GP** pour la bibliothèque, et montrer que la catalyse jouait un rôle important dans l'amplification. L'ultime expérience consiste donc à mettre en mélange les cinq aldéhydes sélectionnés au départ (**Ar_H**, **Ar_{OH}**,

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

Ar_{OMe}, **Ar_{Me}** et **Ar_{Nap}** à 0,5 mM de chaque) avec **Glc** (0,33 mM) dans le **tampon 2** en présence du catalyseur **Cat** (50 mM). La **GP** (5 µM) est introduite dans le mélange dès le départ sans pré-équilibration et le suivi de l'amplification des espèces est réalisé sur 24 heures.

Une seconde bibliothèque est réalisée dans les mêmes conditions à ceci près qu'une pré-équilibration de 2h30 est réalisée avant l'introduction de la GP dans le mélange. Pour cette bibliothèque, une seule analyse est réalisée au bout de 24h d'équilibration.

Comme précédemment, l'analyse en UHPLC de ces deux bibliothèques nous permet de tracer les histogrammes qui sont disponibles en annexe (V.4). En calculant le facteur d'amplification des acylhydrazones, nous pouvons une nouvelle fois tracer les diagrammes en étoile pour résumer les résultats obtenus (Figure 81).

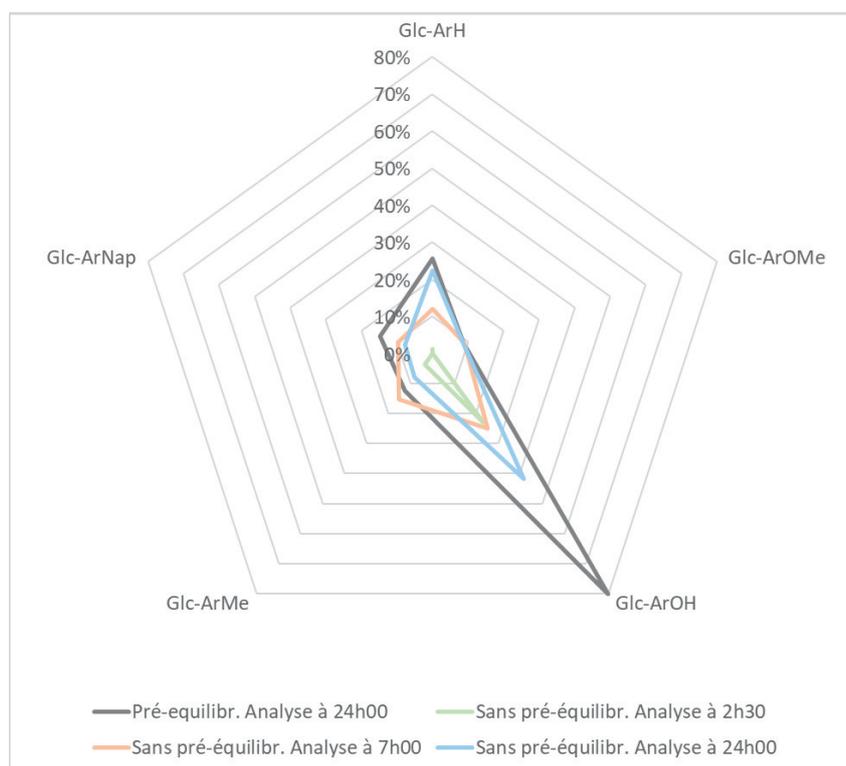


Figure 81 : Amplification des acylhydrazones en présence de la GP ([Glc]=0,33 mM, [Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5 mM, [Cat]=50 mM, [GP]=5 µM, tampon 2, 25°C)

D'après le précédent diagramme, nous constatons que peu importe le temps d'équilibration de la bibliothèque ou la présence ou non d'une pré-équilibration, l'acylhydrazone la plus amplifiée est toujours **Glc-Ar_{OH}**. Notons aussi que la tendance d'amplification est la même pour toutes les espèces, indépendamment du temps d'équilibration.

L'objectif de l'étude était de mettre en place des bibliothèques de CCD avec notre enzyme, la GP, afin d'interroger directement cette dernière pour trouver le meilleur ligand présent dans le mélange. D'après l'expérience que nous venons de réaliser, nous pouvons donc établir un classement d'affinité des acylhydrazones avec la GP : **Glc-Ar_{OH}** >> **Glc-Ar_H** > **Glc-Ar_{Nap}** ≈ **Glc-Ar_{Me}** > **Glc-Ar_{OMe}**. Notre expérience permet donc de faire la conclusion que l'espèce **Glc-Ar_{OH}** aurait la meilleure affinité pour la GP parmi les cinq espèces présentes en solution.

III.3.4. Réalisation de la seconde bibliothèque de CCD

Avec la première bibliothèque que nous avons réalisée, nous avons pu mettre en avant une espèce **Glc-Ar_{OH}** par amplification. Toutefois, nous souhaitons étendre cette étude à d'autres aldéhydes aromatiques. Nous choisissons donc une série de quatre autres aldéhydes pour mettre en place une seconde bibliothèque de CCD (Figure 82). Une nomenclature similaire à celle précédemment établie sera appliquée à cette nouvelle série d'aldéhydes.

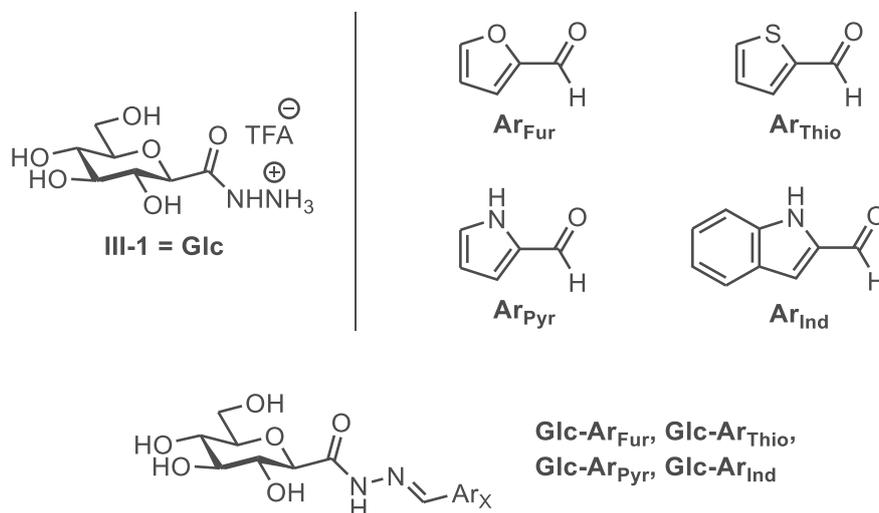


Figure 82 : Nouvelle série d'aldéhydes aromatiques

Afin de pouvoir analyser la bibliothèque en UHPLC d'une manière équivalente à celle employée précédemment, nous devons adapter le gradient d'élution pour permettre une séparation des nouveaux produits. Malheureusement, après plusieurs essais, nous ne parvenons pas à séparer toutes les espèces. Le chromatogramme suivant montre les co-élutions de certains produits (Figure 83).

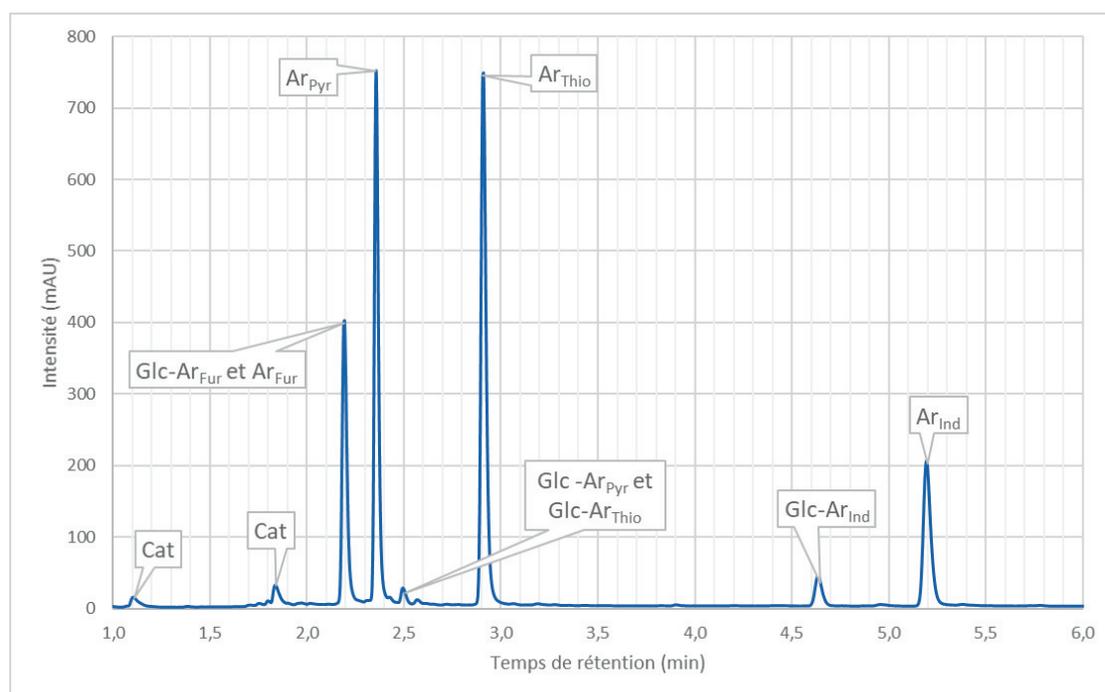


Figure 83 : Chromatogramme UHPLC de la nouvelle série d'aldéhydes et des acylhydrazones correspondantes

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

Pour pouvoir analyser notre bibliothèque, il nous est impossible d'avoir des co-élutions, nous ne pouvons donc pas utiliser les aldéhydes **Ar_{Fur}** et **Ar_{Pyr}**. Nous décidons alors de réaliser la deuxième bibliothèque CCD avec les aldéhydes **Ar_{Thio}** et **Ar_{Ind}** et en rajoutant **Ar_{OH}** puisque c'est celui qui avait été sélectionné par la GP dans la précédente expérience. Ces trois aldéhydes sont donc mis en mélange avec **Glc** dans le **tampon 2** en présence du catalyseur. La GP est introduite sans pré-équilibre et la bibliothèque est analysée au bout de 24 heures. Le tracé des histogrammes des aires relatives est disponible en annexe (V.5) et le calcul des amplifications nous donne le diagramme suivant (Figure 84).

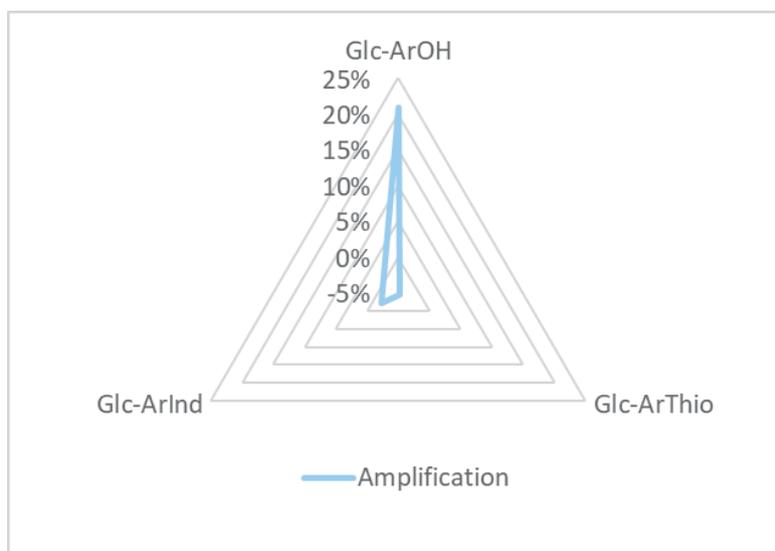


Figure 84 : Amplification des acylhydrazones en présence de la GP ([**Glc**]=0,33 mM, [**Ar_{OH}**]=[**Ar_{Thio}**]=[**Ar_{Ind}**]=0,5 mM, [**Cat**]=50 mM, [**GP**]=5 μ M, tampon 2, 25°C)

L'expérience montre une nette amplification pour l'espèce **Glc-Ar_{OH}** alors que les deux autres produits ne sont pas amplifiés. Nous pouvons donc conclure une nouvelle fois que cette acylhydrazone serait le meilleur inhibiteur de la GP parmi les espèces présentes dans le mélange.

III.3.5. Conclusion

L'objectif initial que nous nous étions fixés était de développer un outil permettant de trouver, parmi un mélange de plusieurs composés, le meilleur inhibiteur pour la glycogène phosphorylase. Notre étude a permis de mettre en place des conditions expérimentales robustes pour effectuer la réalisation de bibliothèques de CCD en présence de la GP. Grace aux conditions que nous avons développées, nous avons pu réaliser deux bibliothèques de CCD ayant des pharmacophores différents. Les résultats de ces bibliothèques montrent que la GP sélectionne en priorité une espèce parmi toutes celles qui sont formées : **Glc-Ar_{OH}**.

Afin de pouvoir valider notre outil, il nous faut maintenant vérifier à l'aide d'un test biologique que l'acylhydrazone **Glc-Ar_{OH}** est bien celle possédant la meilleure inhibition. Pour cela, nous envisageons de réaliser la synthèse de trois acylhydrazones et de les évaluer par IC_{50} avec une méthode validée.

III.4. Synthèse des acylhydrazones

Nous faisons donc le choix de synthétiser trois acylhydrazones : **Glc-Ar_{OH}**, **Glc-Ar_{OMe}** et **Glc-Ar_{Nap}**. Les deux premières sont choisies car ce sont respectivement la plus et la moins amplifiée dans notre

expérience de CCD (Figure 81). **Glc-Ar_{Nap}** est aussi sélectionnée car les meilleurs inhibiteurs du site catalytique de la GP actuellement connus possèdent le groupement 2-naphtyl. Nous souhaitons donc confirmer par un test biologique le classement obtenu par la CCD. Nous détaillons ci-après la synthèse de ces trois composés.

III.4.1. Synthèse

Afin de pouvoir synthétiser nos trois acylhydrazones cibles avec les meilleurs rendements possibles, nous faisons une optimisation rapide des conditions réactionnelles en prenant pour aldéhyde test le *p*-anisaldéhyde (Schéma 50 et Tableau 10). Pour chaque condition testée, l'avancement de la réaction est suivi en UHPLC.

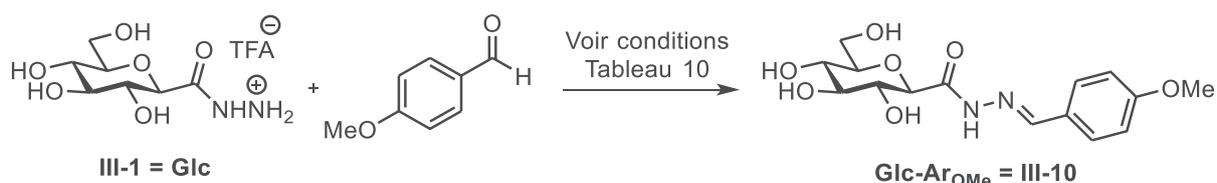


Schéma 50 : Optimisation des conditions réactionnelles

Entrée	ArCHO (équivalents)	Solvant	Acide	Base	Temp. (°C)	Durée (h)	Rendement
1	1,5	H ₂ O	HCl concentré (2 gouttes)	-	25	24	< 5%
2	1,5	DMSO (anhydre)	-	-	65	24	< 5%
3	15	MeOH	TFA (0,4 eq)	-	25	24	Formation de sous-produits
4	15	MeOH (anhydre)	-	-	25	16	7%
5	1,5	MeOH (anhydre)	-	Et ₃ N (0,7 eq)	25	16	16%

Tableau 10 : Conditions expérimentales testées

Nous avons premièrement voulu catalyser la formation de l'acylhydrazone dans l'eau par de l'acide chlorhydrique (entrée 1) mais sans succès. Ce résultat était néanmoins attendu car nous savions déjà que la réaction n'était pas complète. Nous avons donc décidé de passer dans un solvant organique en conditions anhydres et en chauffant le mélange réactionnel pour essayer de pousser la conversion (entrée 2). Cette fois encore, peu de produit est formé en 24 heures de réaction et l'allongement du temps de réaction à 4 jours ne permet d'améliorer l'avancement. Le troisième test que nous réalisons (entrée 3) ne nous donne pas non plus le produit désiré, mais il permet de mettre en lumière la formation de sous-produits. Une analyse de spectrométrie de masse permet de les identifier comme étant les produits issus de la protection de **III-10** par l'anisaldéhyde (Figure 85).

Finalement, nous parvenons à former l'acylhydrazone désirée en utilisant l'aldéhyde en large excès dans le méthanol en conditions anhydre (entrée 4).^{[149],[150],[151]} La difficulté de cette réaction réside dans la purification qui est réalisée sur colonne de silice greffée C18, le large excès d'aldéhyde ne permettant pas une séparation optimale. Des lavages sont alors effectués pour retirer la plus grande partie de l'aldéhyde et la purification est réalisée. Le faible rendement de cette réaction peut être

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

expliqué par plusieurs facteurs : la conversion qui n'est pas complète, la formation de benzylidènes (détecté en masse) et la perte de produit lors de la purification. Les benzylidènes étant formés en conditions acide, nous décidons de rajouter une base (entrée 5) pour défavoriser leur formation. Le rendement alors obtenu est amélioré (16% au lieu de 7%) mais reste toujours relativement faible.

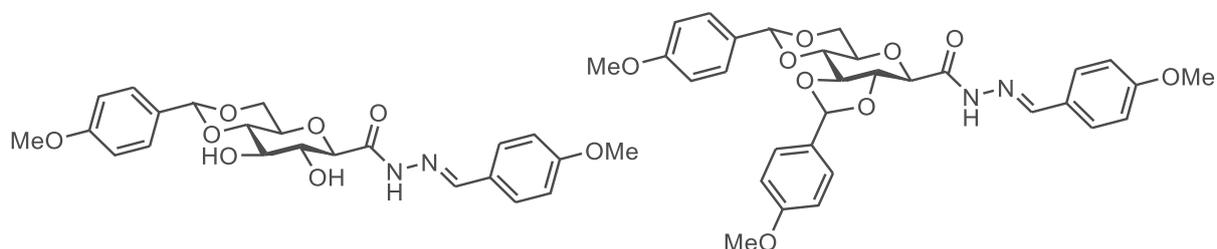


Figure 85 : Sous-produits détectés en masse

Après avoir trouvé des conditions acceptables de réaction, nous réalisons donc la synthèse des trois acylhydrazones cibles (Schéma 51). En utilisant les conditions opératoires précédentes (entrée 4 Tableau 10), les produits **III-11** et **III-12** sont obtenus avec de meilleurs rendements (respectivement 21% et 28%) et une quantité suffisante de produit est obtenue pour effectuer les tests biologiques. Pour le dérivé **III-10**, le faible rendement limite l'obtention de produit, c'est pourquoi la réaction est réalisée en présence de Et_3N (entrée 5 Tableau 10).

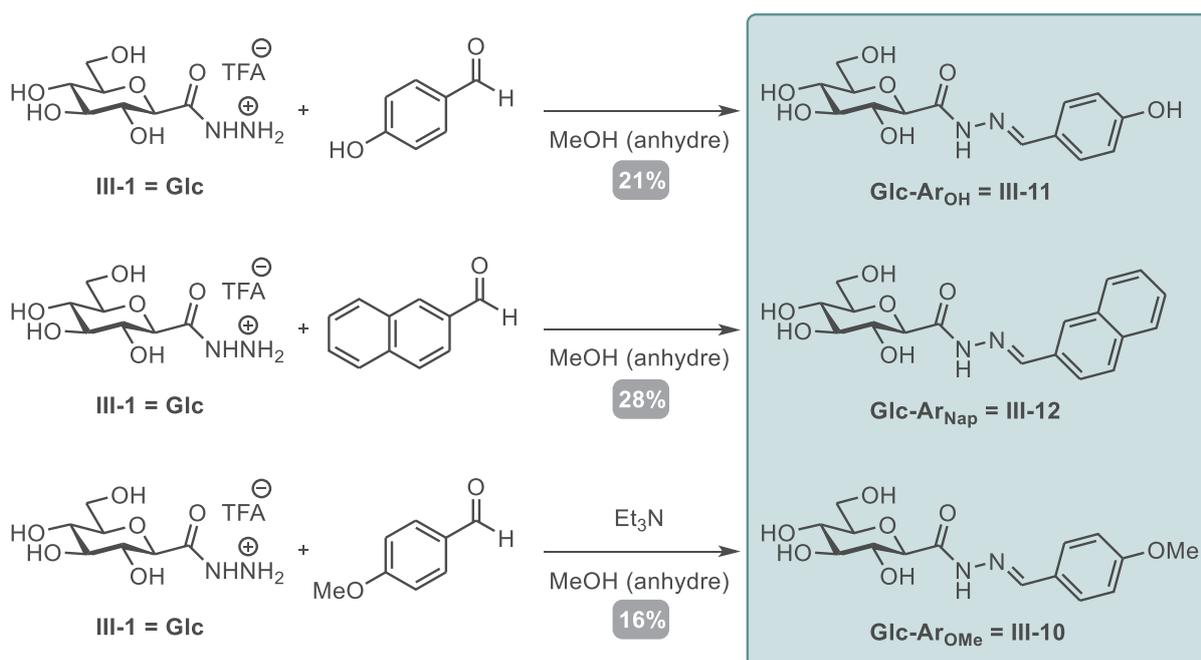


Schéma 51 : Synthèse des acylhydrazones

III.4.2. Evaluation biologique

Afin de prouver la validité de notre expérience de CCD, il nous faut maintenant évaluer l'inhibition des trois acylhydrazones synthétisées (**III-10**, **III-11** et **III-12**). Ainsi, des mesures d'inhibition ont été réalisées sur la rmGPb (glycogène phosphorylase b issue du muscle de lapin) par le Prof Tibor Docsa et son équipe (Université de Debrecen, Hongrie). Le résultat de ces analyses est résumé ci-dessous (Figure 86).

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

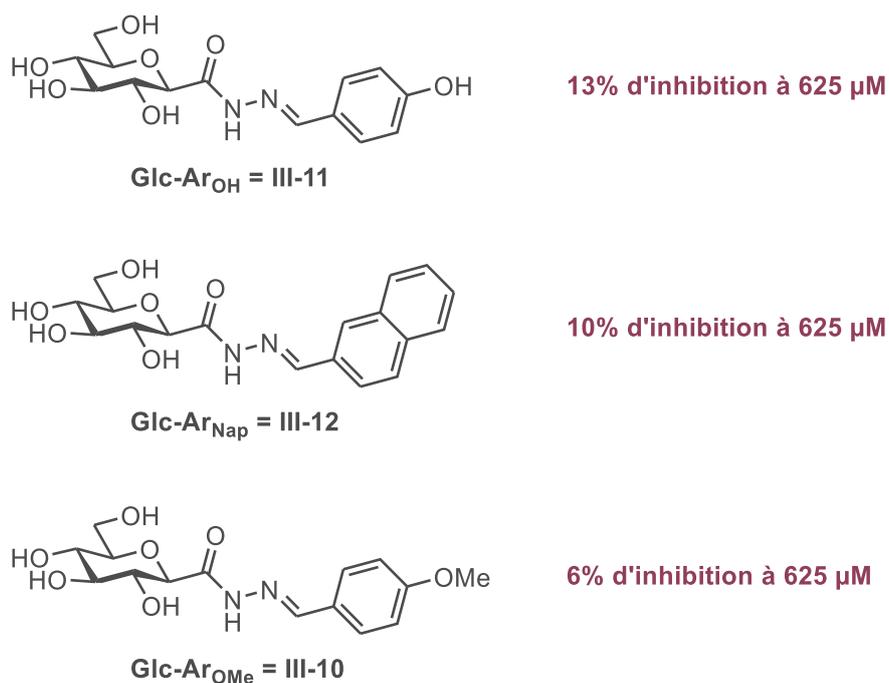


Figure 86 : Evaluation biologique des acylhydrazones III-10, III-11, III-12

Pour chaque composé, un premier test d'inhibition à 625 μM est réalisé et permet d'obtenir un pourcentage d'inhibition. Cela permet d'avoir une idée de la force d'inhibition pour les molécules testées.^[55] Si une bonne inhibition est observée, une autre expérience est réalisée et un IC₅₀ précis est mesuré pour les composés correspondants. Dans notre cas, l'inhibition à 625 μM est trop faible et trop peu intéressante pour la détermination d'un IC₅₀, mais elle nous permet tout de même de classer le pouvoir inhibiteur des composés comme suit : **Glc-Ar_{OH} > Glc-Ar_{Nap} > Glc-Ar_{OMe}**. Le classement ainsi obtenu est le même que celui observé lors de notre expérience de CCD et il nous permettrait donc de valider notre expérience et notre hypothèse.

Toutefois, ces premiers résultats positifs sont à nuancer par le faible écart d'inhibition observé. Une étude complémentaire par ITC est actuellement en cours pour confirmer ces résultats préliminaires obtenus.

III.5. Conclusion

L'objectif de cette étude était de découvrir le meilleur inhibiteur pour la GP parmi une nouvelle classe de glucosyl-hydrazones, en utilisant le principe de la chimie combinatoire dynamique. A l'inverse d'une approche de synthèse classique, cette méthode permet, en une seule expérience, d'interroger directement l'enzyme qui sélectionne elle-même le meilleur inhibiteur parmi un mélange de composés. La mise en place d'une telle expérience représente donc un gain considérable de temps et de moyens.

La chimie combinatoire dynamique utilise des réactions réversibles pour former une bibliothèque de molécules à partir de plusieurs briques moléculaires introduites initialement. Il existe plusieurs liaisons réversibles pour la réalisation de bibliothèque de CCD et, parmi le panel disponible, nous avons choisi de travailler avec la formation d'acylhydrazones. Pour commencer, il nous a fallu effectuer la synthèse des briques constituant la bibliothèque (dans notre cas le C-glucosyl-hydrazide **III-1**). Cette hydrazide, mis en réaction avec plusieurs aldéhydes, forme la bibliothèque d'acylhydrazones correspondantes.

La chimie combinatoire dynamique, un outil pour la découverte d'inhibiteurs de la glycogène phosphorylase

Nous avons donc développé des conditions expérimentales permettant de réaliser notre bibliothèque à pH neutre et en contrôlant la cinétique de la réaction. Nous avons aussi mis en place une méthode d'analyse de cette bibliothèque par UHPLC-MS, permettant de faire le suivi des espèces qui la composent.

Une fois que tous les paramètres expérimentaux ont été fixés, nous avons réalisé l'expérience de CCD en présence de la GP. Les résultats de cette expérience montrent l'amplification de l'espèce **Glc-Ar_{OH}** parmi les cinq présentes dans le mélange. L'expérience nous permet aussi de définir un classement d'affinité des acylhydrazones pour notre enzyme (**Glc-Ar_{OH}** >> **Glc-Ar_H** > **Glc-Ar_{Nap}** ≈ **Glc-Ar_{Me}** > **Glc-Ar_{OMe}**).

La deuxième partie de cette étude consiste en la synthèse et l'évaluation biologique de trois acylhydrazones précédemment étudiées pour vérifier leurs propriétés inhibitrices sur la GP, et ainsi conclure sur la validité de l'outil que nous avons mis en place. La synthèse des composés **Glc-Ar_{OH}**, **Glc-Ar_{OMe}** et **Glc-Ar_{Nap}** a donc été réalisée. L'évaluation biologique menée sur ces trois acylhydrazones permet de proposer un classement relatif en fonction de leur pouvoir inhibiteur (**Glc-Ar_{OH}** > **Glc-Ar_{Nap}** > **Glc-Ar_{OMe}**). Bien que l'écart observé entre les inhibitions soit faible, le classement reste néanmoins le même que celui de l'expérience de CCD.

IV. Experimental section

IV.1. General information

IV.1.1. Reagents and solvents

Commercially available reagents were purchased from Sigma-Aldrich, ThermoFisher Scientific, TCI chemicals, Fluorochem or Carbosynth. The GP enzyme was purchased from Sigma-Aldrich (phosphorylase b from rabbit muscle, catalogue number: P6635). The solvents (both dry and technical) were purchased from ThermoFisher Scientific and VWR and were used without further purification if not mentioned. Water for HPLC was obtained from an ACCU 20 Ultra-Pure Water from Fisher Scientific. Analytical Thin Layer Chromatography (TLC) was carried on Macherey-Nagel silica gel 60 F254 aluminum plates and revealed with a UV lamp at 254 nm and by dipping into an acidic solution (10% concentrated sulfuric acid in ethanol) and drying. Flash silica gel column chromatography was performed with a Macherey-Nagel silica 60 M (0.04-0.063 mm) under moderate pressure.

IV.1.2. Micro-wave

Micro-wave experiments were performed on a Biotage initiator 2.0 apparatus. The solvent absorption level was set to high for all experiments.

IV.1.3. C18 Column chromatography

Reverse phase C18 silica gel column chromatography was performed on a PuriFlash 210 from Interchim with cartridges of 4g or 40g using 40 μ m or 20 μ m silica grade quality.

IV.1.4. Lyophilization

Lyophilization was carried out in a CHRIST Alpha 2-4 LDPlus apparatus.

IV.1.5. Nuclear Magnetic Resonance

^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC experiments were performed on Bruker spectrometers (AV 300, AVL 300, AV 400 and AV 500) at 298K at the CCRMN (University of Lyon) and spectrometer Varian Inova 600 MHz with HCN cryoprobe at the ISA (University of Lyon). The chemical shifts are indicated in ppm (parts per million) in reference to the TMS. Coupling constants (J) are indicated in Hz (Hertz). The abbreviations used for the multiplicity are: s (singlet), b (broad), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), td (triplet of doublet), dt (doublet of triplet), q (quadruplet) and m (multiplet). When a dd is expected but a triplet is observed, the multiplicity is called pseudo t (pseudo triplet).

IV.1.6. Mass spectrometry

Low resolution mass spectrometry was performed on an LCQ advantage (50-20 000 m/z) apparatus from Thermofinnigan. High resolution mass spectrometry was performed on a MicroTOFQ II (50-20 000 m/z) apparatus from Bruker. Electrospray ionization was used in all cases.

IV.1.7. HPLC-MS

Analyses were performed on a Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 system equipped with a binary pump, an auto-sampler, a variable wavelength UV detector. The chromatographic separation was performed at 30°C on various columns. The chromatograms were recorded at 210 and 250 nm. High

resolution mass spectrometry was performed on a QTOF Impact II (50-20 000 m/z) apparatus from Bruker.

IV.1.8. High Performance Liquid Chromatography - HPLC

IV.1.8.1. HPLC systems

All HPLC analyses were performed on UPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 system equipped with a binary pump, an auto-sampler and a variable multi-wavelength UV detector. The chromatograms were recorded at both 210 and 250 nm.

Preparative HPLC was performed on a semi-preparative HPLC Shimadzu prominence 20A system equipped with a binary pump, a manual injection manifold and a variable multi-wavelength UV detector. The chromatograms were recorded at both 210 and 250 nm.

IV.1.8.2. Columns

For analytical HPLC:

Column A: Phenomenex, Kinetex, 1.7 μm F5 100 Å, 100 \times 2.1 mm.

Column B: Phenomenex, Luna Omega Polar C18, 3 μm 100 Å, 150 \times 3.0 mm.

Column C: Agilent, Poroshell 120, EC-C8 2.7 μm , 50 \times 2.1 mm.

For preparative HPLC:

Column D: Phenomenex, Luna Omega Polar C18, 5 μm 100 Å, 250 \times 10 mm.

IV.1.8.3. Gradients

Gradients used for the different HPLC experiments are detailed in the following tables. The eluants used were HPLC or LCMS grade and acidified with formic acid (FA) or trifluoroacetic acid (TFA).

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% FA	MeOH + 0.1% FA	Oven Temp. (°C)
0,0	0.4	98	2	45
1,0	0.4	70	30	45
8,0	0.4	35	65	45
10,0	0.4	0	100	45
12,0	0.4	0	100	45
13,0	0.4	98	2	45
18,0	0.4	98	2	45

Tableau 11 : **Gradient A** (Injection volume = 5 μL)

Experimental section

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% FA	MeCN + 0.1% FA	Oven Temp. (°C)
0,0	0.6	65	35	30
4,0	0.6	54	46	30
12,0	0.6	49	51	30
17,0	0.6	35	65	30
20,0	0.6	0	100	30
22,0	0.6	0	100	30
23,0	0.6	65	35	30
33,0	0.6	65	35	30

Tableau 12 : **Gradient B** (Injection volume = 5 µL)

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% FA	MeCN + 0.1% FA	Oven Temp. (°C)
0,0	0,8	95	5	30
7,0	0,8	20	80	30
7,5	0,8	0	100	30
8,5	0,8	0	100	30
9,0	0,8	95	5	30
11,5	0,8	95	5	30

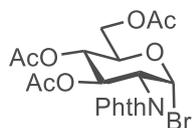
Tableau 13 : **Gradient C** (Injection volume = 5 µL)

Time (min)	Flow (mL/min)	H ₂ O + 0.1% TFA	MeCN + 0.1% TFA	Oven Temp. (°C)
0,0	9	70	30	25
18,0	9	50	50	25
22,0	9	0	100	25
25,0	9	0	100	25
26,0	9	70	30	25
30,0	9	70	30	25

Tableau 14 : **Gradient D** (Injection volume = 1500 µL)

IV.2. Synthesis

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- α -D-glucopyranosyl bromide **II-12**



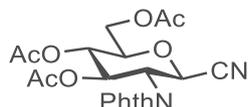
To a solution of **II-11** (10 g, 20.9 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (75 mL) cooled at 0°C was slowly added HBr/AcOH 33% (25.3 mL, 443.3 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere and monitored by TLC (cyclohexane/EtOAc 50:50). Upon completion, the reaction mixture was cooled to 0°C and a saturated NaHCO₃ solution (500 mL) was gently poured into the mixture. The aqueous layer was then separated and extracted with CH₂Cl₂ (4×100 mL). Then, the combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford crude compound **II-12** (10.7 g) as a brownish amorphous solid which was used without further purification.

R_f = 0.74 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.91-7.85 (m, 2H, H_{Ar}), 7.80-7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 6.41 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H₁), 5.76 (dd, *J* = 9.2; 10.3 Hz, 1H, H₃), 5.26 (dd, *J* = 9.2; 10.3 Hz, 1H, H₄), 4.63 (dd, *J* = 9.6; 10.3 Hz, 1H, H₂), 4.33 (dd, *J* = 4.7; 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), 4.19 (dd, *J* = 2.2; 12.5 Hz, 1H, H_{6b}), 4.00-3.92 (m, 1H, H₅), 2.13, 2.04, 1.87 (3s, 3×3H, 3×COCH₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[91]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl cyanide II-13



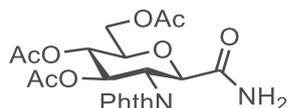
A solution of the crude **II-12** (20.9 mmol) in anhydrous CH₃NO₂ (40 mL, obtained via a distillation over CaCl₂ under vacuum) was added to Hg(CN)₂ (6.6 g, 26.1 mmol, dried at 150°C under vacuum during 8 h). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. The reaction mixture was then filtered over celite and the filtrate was dissolved in EtOAc (150 mL) and washed with 1.6 M KBr (9×140 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-13** (8.88 g, 96%) as a white amorphous solid.

R_f = 0.64 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.92-7.86 (m, 2H, H_{Ar}), 7.82-7.76 (m, 2H, H_{Ar}), 5.74 (dd, *J* = 9.2; 10.3 Hz, 1H, H₃), 5.37 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H₁), 5.19 (dd, *J* = 9.2; 10.3 Hz, 1H, H₄), 4.66 (dd, *J* = 10.3; 10.8 Hz, 1H, H₂), 4.30 (dd, *J* = 4.7; 12.6 Hz, 1H, H_{6a}), 4.18 (dd, *J* = 2.2; 12.6 Hz, 1H, H_{6b}), 3.92-3.84 (m, 1H, H₅), 2.13, 2.03, 1.86 (3s, 3×3H, 3×COCH₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[91]

C-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-formamide II-14

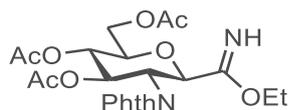


To **II-13** (8.884 g, 20 mmol) was added HBr/AcOH 33% (21.2 mL, 372.1 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Then, iced water (45 mL) was added into the reaction mixture and the aqueous layer was separated and extracted with CH₂Cl₂ (3×30 mL). The combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ (3×40 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated under vacuum. The crude material was then diluted in Et₂O (50 mL) and the resulting suspension was stirred under reflux for 30 minutes and then cooled to room temperature. The solid was filtered off and washed with cold Et₂O (10 mL) to afford **II-14** (7.49 g, 81%) as a white amorphous solid.

R_f = 0.43 (cyclohexane/EtOAc 35:65).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.89-7.80 (m, 2H, H_{Ar}), 7.75-7.67 (m, 2H, H_{Ar}), 6.45 (bs, 1H, NH₂), 5.94 (dd, *J* = 9.2; 10.4 Hz, 1H, H₃), 5.38 (bs, 1H, NH₂), 5.16 (dd, *J* = 9.2; 10.3 Hz, 1H, H₄), 4.85 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H₁), 4.45 (dd, *J* = 10.4; 10.8 Hz, 1H, H₂), 4.33 (dd, *J* = 4.8; 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), 4.23 (dd, *J* = 2.2; 12.5 Hz, 1H, H_{6b}), 3.97-3.90 (m, 1H, H₅), 2.13, 2.05, 1.88 (3s, 3×3H, 3×COCH₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[92]

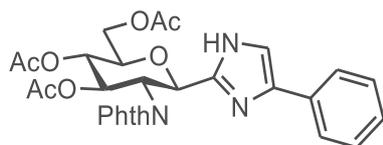
Ethyl C-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-formimidate II-15

To a solution of **II-14** (1 g, 2.16 mmol) and 4 Å molecular sieves (powdered form, 500 mg) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL), Et₃OBF₄ (1M in CH₂Cl₂, 6.48 mL, 6.48 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature and monitored by TLC (cyclohexane/EtOAc 40:60). Upon completion, molecular sieves were filtered off. The filtrate was diluted in CH₂Cl₂ (40 mL) and washed with saturated NaHCO₃ (3×40 mL) and brine (1×40 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-15** (330 mg, 31%) as a yellowish amorphous solid, which was used without further purification.

R_f = 0.35 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.84-7.68 (m, 5H, H_{Ar} + NH), 5.95 (dd, *J* = 9.2; 10.3 Hz, 1H, H₃), 5.16 (dd, *J* = 9.2; 10.1 Hz, 1H, H₄), 4.77 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H₁), 4.38-4.28 (m, 2H, H₂ + H_{6a}), 4.21 (dd, *J* = 2.2; 12.4 Hz, 1H, H_{6b}), 4.01-3.92 (m, 1H, H₅), 3.91-3.83 (m, 2H, CH₂), 2.13, 2.05, 1.88 (3s, 3×3H, 3×COCH₃), 0.6 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[32]

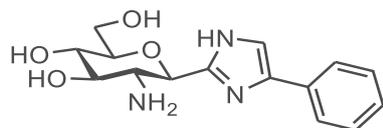
2-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-5-phenyl-imidazole II-16

To a solution of **II-15** (527 mg, 1.07 mmol) in anhydrous pyridine (29 mL) was added 2-aminoacetophenone hydrochloride (372.4 mg, 2.14 mmol) and 4 Å molecular sieves (powdered form, 250 mg). The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 24 h and the molecular sieves were filtered off. The filtrate was diluted with CH₂Cl₂ (100 mL) and washed with water (2×60 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 50:50) to obtain **II-16** (246 mg, 41%) as a colourless oil.

R_f = 0.45 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 9.51 (bs, 1H, NH), 7.98-7.01 (m, 10H, H_{Ar} + CH-imidazole), 6.10 (dd, *J* = 9.2; 10.5 Hz, 1H, H₃), 5.59 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H₁), 5.25 (dd, *J* = 9.2; 10.2 Hz, 1H, H₄), 4.52 (pseudo t, *J* = 10.5; 10.5 Hz, 1H, H₂), 4.38 (dd, *J* = 4.7; 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), 4.27 (dd, *J* = 2.1; 12.5 Hz, 1H, H_{6b}), 4.12-4.04 (m, 1H, H₅), 2.12, 2.07, 1.91 (3s, 3×3H, 3×COCH₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[32]

2-(2-Amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-5-phenyl-imidazole II-2

To a solution of **II-16** (762 mg, 1.36 mmol) in MeOH (20 mL) was added hydrazine monohydrate 50% in water (0.85 mL, 27.2 mmol). The mixture was stirred under reflux for 2 h, cooled at room temperature and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by reverse

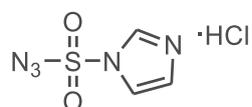
phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 40 μm , gradient: 3 CV 100% H₂O + 0.1% TFA, 21 CV 0% to 100% MeOH + 0.1% TFA, 3CV 100% MeOH + 0.1% TFA; Flow = 18 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **II-2** (414 mg, 99%) as a white amorphous solid.

Retention time: 0.86 minutes (**column C** and **gradient C**).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): 7.75 (bd, 2H, H_{Ar}), 7.70 (s, 1H, CH-imidazole), 7.45 (bt, 2H, H_{Ar}), 7.36 (bt, 1H, H_{Ar}), 4.93 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H₁), 3.95 (dd, *J* = 2.1; 11.9 Hz, 1H, H_{6a}), 3.77 (dd, *J* = 5.3; 11.9 Hz, 1H, H_{6b}), 3.73 (dd, *J* = 8.3; 10.3 Hz, 1H, H₃), 3.58 (m, 1H, H₅), 3.50 (dd, *J* = 8.3; 9.6 Hz, 1H, H₄), 3.42 (t, *J* = 10.3 Hz, 1H, H₂).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[32]

Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride **II-45**

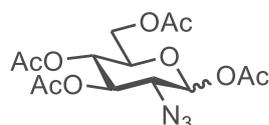


Sulfonyl chloride (10 mL, 123.4 mmol) was added dropwise to a solution of sodium azide (8.02 g, 123.4 mmol) in anhydrous MeCN (125 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. Then, the mixture was cooled down to 0°C and imidazole (15.96 g, 234.5 mmol) was added portion-wise and the mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 3 h. The reaction mixture was then diluted with EtOAc (250 mL) and the organic layer was separated and subsequently washed with water (2×250 mL), saturated NaHCO₃ (2×250 mL), dried (MgSO₄) and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by a dropwise addition of acetyl chloride (13.2 mL, 185.1 mmol) into anhydrous EtOH (47 mL) at 0°C] was added dropwise to the filtrate under stirring. While precipitation begins, the mixture was chilled to 0°C and the obtained precipitate was filtered off. The filter cake was washed with cold AcOEt (3×60 mL) and dried under vacuum to afford **II-45** (16.13 g, 62%) as white needles.

¹H NMR (300 MHz, D₂O): 9.35 (m, 1H, H_{Ar}), 8.02 (bt, 1H, H_{Ar}), 7.61 (m, 1H, H_{Ar}).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[118]

1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-glucopyranose **II-46**



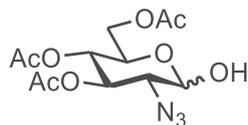
To a solution of glucosamine hydrochloride (13.714 g, 63.6 mmol) in MeOH (300 mL) was subsequently added K₂CO₃ (23.731 g, 171.7 mmol), CuSO₄•5H₂O (160 mg, 0.64 mmol) and **II-45** (16 g, 76.3 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h until full conversion was observed with TLC (CH₂Cl₂/MeOH 80:20). The reaction mixture was then evaporated under vacuum and dissolved in pyridine (80 mL). Ac₂O (160 mL) was added dropwise to the resulting solution cooled at 0°C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solvent was then removed under vacuum and the crude material was dissolved in EtOAc (600 mL) and subsequently washed with HCl 2M (2×250 mL), saturated NaHCO₃ (2×250 mL) and brine (2×250 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and evaporated under vacuum to afford **II-46** (21.83 g, 92%) as a dark brown oil.

R_f = 0.70 (CH₂Cl₂/MeOH 80:20).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (anomers α/β 40:60): 6.30 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\alpha}$), 5.55 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\beta}$), 5.45 (dd, $J = 9.5, 10.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\alpha}$), 5.16-4.99 (m, 3H, $\text{H}_{3\beta} + \text{H}_{4\alpha} + \text{H}_{4\beta}$), 4.35-4.25 (m, 2H, $\text{H}_{6a\alpha} + \text{H}_{6a\beta}$), 4.17-4.01 (m, 3H, $\text{H}_{5\alpha} + \text{H}_{6b\alpha} + \text{H}_{6b\beta}$), 3.84-3.77 (m, 1H, $\text{H}_{5\beta}$), 3.70-3.63 (m, 2H, $\text{H}_{2\alpha} + \text{H}_{2\beta}$), 2.20, 2.19, 2.10, 2.09, 2.07, 2.06, 2.04, 2.02 (8s, 8 \times 3H, 8 \times COCH₃).

^1H NMR data was in agreement with the literature.^[118]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-glucopyranose II-47



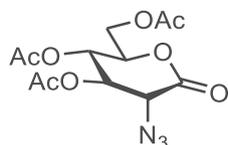
To a solution of **II-46** (2 g, 5.36 mmol) in anhydrous DMF (5.5 mL) was added hydrazinium acetate (592 mg, 6.43 mmol) and the reaction mixture was stirred at 50°C under argon atmosphere for 20 minutes. Once cooled down, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (50 mL) and subsequently washed with water (2 \times 20 mL), saturated NaHCO_3 (3 \times 20 mL) and brine (1 \times 20 mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and evaporated under vacuum. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to obtain **II-47** (832 mg, 47%) as a colourless oil.

$R_f = 0.28$ (cyclohexane/EtOAc 70:30).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (anomers α/β 45:55): 5.53 (dd, $J = 9.3, 10.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{3\alpha}$), 5.40 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\alpha}$), 5.11-4.99 (m, 2H), 4.74 (dd, $J = 3.4, 7.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\beta}$), 4.33-4.19 (m, 3H), 4.18-4.06 (m, 3H), 3.74-3.68 (m, 1H, $\text{H}_{4\beta}$), 3.52-3.47 (m, 1H, $\text{H}_{2\beta}$), 3.44 (dd, $J = 3.4, 10.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{2\alpha}$), 3.35 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, OH), 2.09 (s, 9H, 3 \times COCH₃), 2.04 (s, 9H, 3 \times COCH₃).

^1H NMR data was in agreement with the literature.^[119]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-gluconolactone II-48



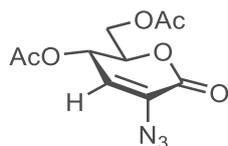
To a solution of **II-47** (200 mg, 0.6 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (5 mL) was added Dess-martin periodinane (280 mg, 0.66 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 2 h until TLC showed complete conversion (cyclohexane/EtOAc 70:30). The solvent was then evaporated under vacuum and the crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to obtain **II-48** (80 mg, 41%) as a colourless oil.

$R_f = 0.41$ (cyclohexane/EtOAc 70:30).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.27 (pseudo t, $J = 8.3, 8.3$ Hz, 1H, H_3), 5.22 (pseudo t, $J = 8.3, 8.3$ Hz, 1H, H_4), 4.61-4.51 (m, 1H, H_5), 4.34-4.28 (m, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_{6a}$), 4.22 (dd, $J = 2.8, 12.7$ Hz, 1H, H_{6b}), 2.09, 2.08, 2.06 (3s, 3 \times 3H, 3 \times COCH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 169.4-169.3 (m, 3C, 3 \times COCH₃), 165.3 (s, 1C, C_1), 76.0 (s, 1C, C_5), 70.6 (s, 1C, C_4), 66.7 (s, 1C, C_3), 61.5 (s, 1C, C_6), 60.9 (s, 1C, C_2), 20.7-20.5 (m, 3C, 3 \times COCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{112}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_8$ 330.0921; found 330.0915.

(5S,6R)-5-acetoxy-6-(acetoxymethyl)-3-azido-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one II-49

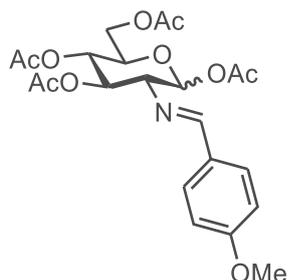
To a solution of **II-47** (735 mg, 2.22 mmol) in DMSO (5 mL) was added dropwise Ac₂O (3.3 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Once TLC showed complete conversion (cyclohexane/EtOAc 70:30), water (5 mL) was added and the reaction mixture was stirred for one additional hour. Afterwards, water (15 mL) was added into the solution and the product was extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined organic layers were washed with water (5×10 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-49** (598 mg, 99%) as a colourless oil.

R_f = 0.33 (cyclohexane/EtOAc 70:30).

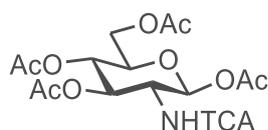
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 6.18 (dd, *J* = 0.7, 4.7 Hz, 1H, H₃), 5.51 (dd, *J* = 4.7, 5.1 Hz, 1H, H₄), 4.75-4.68 (m, 1H, H₅), 4.39 (dd, *J* = 5.1, 12.3 Hz, 1H, H_{6a}), 4.24 (dd, *J* = 4.3, 12.3 Hz, 1H, H_{6b}), 2.12, 2.10 (2s, 2×3H, 2×COCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.4, 169.9 (2s, 2C, 2×COCH₃), 161.7 (s, 1C, C₁), 131.4 (s, 1C, C₂), 120.7 (s, 1C, C₃), 78.3 (s, 1C, C₅), 64.2 (s, 1C, C₄), 62.1 (s, 1C, C₆), 20.9, 20.7 (2s, 2C, 2×COCH₃).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + Na]⁺ 292.0.

1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-*N*-(*p*-methoxybenzylidene)-*D*-glucopyranose II-50

To a solution of glucosamine hydrochloride (25 g, 116 mmol) in NaOH 1M (120 mL) was added dropwise anisaldehyde (15.5 mL, 127.6 mmol) and the reaction was stirred at room temperature for 20 minutes upon precipitation and then cooled into an ice bath for 1 hour. The precipitate was filtered off and subsequently washed with iced water (4×50 mL), iced MeOH/Et₂O (50:50) (4×75 mL) and dried under vacuum. The dry solid obtained was dissolved in pyridine (100 mL) and DMAP (281 mg, 2.3 mmol) was added. The mixture was cooled down to 0°C and Ac₂O (95 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was then precipitated onto ice cubes and the obtained solid was filtered off, washed with iced water (3×70 mL) and cold Et₂O (2×30 mL) and dried under vacuum to afford **II-50** (35.5 g) as a white amorphous solid, which was used in the next reaction without further identification.

1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trichloroacetamido-β-*D*-glucopyranose II-51

To a refluxed solution of **II-50** (35.5 g, 76.7 mmol) in acetone (180 mL) was added HCl 5M (18 mL) dropwise and the reaction mixture was cooled down to room temperature once the addition ends. The formed precipitate was filtered off and washed with iced acetone (2×50 mL) and Et₂O (4×50 mL) and

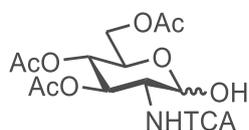
dried under vacuum. The white obtained solid was then dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 at 0°C and Et_3N (16.8 mL, 120.4 mmol) and trichloroacetyl chloride (8.9 mL, 79.7 mmol) were subsequently added into the solution. The obtained mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 30 minutes and diluted with CH_2Cl_2 (180 mL). The crude solution was washed with saturated NaHCO_3 (100 mL) and water (3×100 mL) and the organic layer was dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The crude material was purified by recrystallisation (*n*-hexane/ EtOAc 50:50) to obtain **II-51** (21.2 g, 37% yield from glucosamine hydrochloride) as a white amorphous solid.

$R_f = 0.65$ (cyclohexane/ EtOAc 50:50).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.02 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, NH), 5.80 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H_1), 5.34 (dd, $J = 9.6, 10.7$ Hz, 1H, H_3), 5.17 (pseudo t, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H, H_4), 4.36-4.23 (m, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_{6a}$), 4.15 (dd, $J = 2.2, 12.5$ Hz, 1H, H_{6b}), 3.92-3.82 (m, 1H, H_5), 2.11, 2.10, 2.07, 2.05 (4s, 4 \times 3H, 4 \times COCH_3).

^1H NMR data was in agreement with the literature.^[121]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trichloroacetamido-D-glucopyranose II-52



To a solution of **II-51** (2 g, 4.06 mmol) in anhydrous DMF (4.5 mL) was added hydrazinium acetate (449 mg, 4.87 mmol) and the reaction mixture was stirred at 50°C under argon atmosphere during 20 minutes. Once cooled down, the mixture was diluted in CH_2Cl_2 (50 mL) and subsequently washed with water (2×20 mL), saturated NaHCO_3 (3×20 mL) and brine (1×20 mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and evaporated to afford **II-52** (1.64 g, 89%) as a colourless oil which was used without further purification.

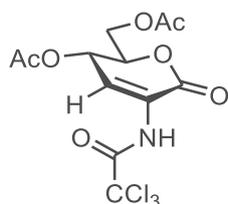
$R_f = 0.44$ (cyclohexane/ EtOAc 50:50).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.00 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH), 5.41 (dd, $J = 9.6, 10.7$ Hz, 1H, H_3), 5.40 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H_1), 5.17 (pseudo t, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H, H_4), 4.31-4.10 (m, 4H, $\text{H}_5 + \text{H}_2 + \text{H}_{6a} + \text{H}_{6b}$), 2.11, 2.05, 2.03 (3s, 3 \times 3H, 3 \times COCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 171.2, 170.8, 169.4 (3s, 3C, 3 \times COCH_3), 91.1 (s, 1C, C_1), 70.3 (s, 1C, C_3), 68.0 (s, 1C, C_2 or C_5), 67.9 (s, 1C, C_4), 61.9 (s, 1C, C_6), 54.1 (s, 1C, C_2 or C_5), 20.8, 20.7, 20.6 (3s, 3C, 3 \times COCH_3), COCCl_3 and COCCl_3 are not observed.

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{NNaO}_9$ 471.9939; found 471.9935.

(5*S*,6*R*)-5-acetoxy-6-(acetoxymethyl)-5,6-dihydro-3-trichloroacetamido-2*H*-pyran-2-one II-53



To a solution of **II-52** (395 mg, 0.88 mmol) in DMSO (1.5 mL) was added dropwise Ac_2O (1 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Once TLC showed complete conversion (cyclohexane/ EtOAc 70:30), water (1.5 mL) was added and the reaction mixture was stirred for one additional hour. Afterwards, water (15 mL) was added into the solution and the product was extracted

with EtOAc (3×30 mL). The combined organic layers were washed with water (5×10 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-53** (223 mg, 65%) as a colourless oil.

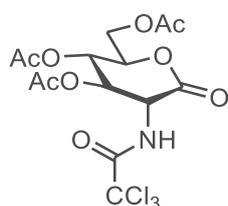
R_f = 0.89 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 9.08 (s, 1H, NH), 7.47 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H₃), 5.70 (dd, *J* = 4.6, 5.5 Hz, 1H, H₄), 4.83-4.75 (m, 1H, H₅), 4.44 (dd, *J* = 4.9, 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), 4.27 (dd, *J* = 4.0, 12.5 Hz, 1H, H_{6b}), 2.14, 2.08 (2s, 2×3H, 2×COCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.4, 169.7 (2s, 2C, 2×COCH₃), 160.0 (s, 1C, C₁ or COCCl₃), 159.6 (s, 1C, C₁ or COCCl₃), 126.1 (s, 1C, C₂), 120.9 (s, 1C, C₃), 78.5 (s, 1C, C₅), 63.5 (s, 1C, C₄), 62.1 (s, 1C, C₆), 20.9, 20.7 (2s, 2C, 2×COCH₃).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + Na]⁺ 409.8.

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trichloroacetamido-D-gluconolactone **II-54**



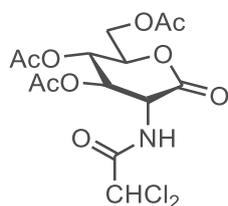
To a solution of **II-52** (1.830 g, 4.06 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (35 mL) was added Dess-martin periodinane (1.895 mg, 4.47 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 5 h until TLC showed complete conversion (cyclohexane/EtOAc 50:50). The solvent was then evaporated under vacuum and the crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to obtain **II-54** (771 mg, 39%) as a colourless oil with 22% unknown impurities. **II-54** was used without further purification in the next reaction.

R_f = 0.29 (cyclohexane/EtOAc 70:30).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.50 (dd, *J* = 9.0, 10.3 Hz, 1H, H₃), 5.41 (dd, *J* = 7.1, 9.0 Hz, 1H, H₄), 4.77 (dd, *J* = 8.2, 10.3 Hz, 1H, H₂), 4.69-4.62 (m, 1H, H₅), 4.47 (dd, *J* = 3.6, 12.7 Hz, 1H, H_{6a}), 4.31 (dd, *J* = 2.6, 12.7 Hz, 1H, H_{6b}), 2.16, 2.11, 2.08 (3s, 3×3H, 3×COCH₃).

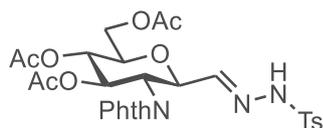
ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 448.0.

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-dichloroacetamido-D-gluconolactone **II-55**



In a micro-wave sealed tube containing a solution of **II-54** (251 mg, 0.56 mmol) in anhydrous THF (1.5 mL) was added dimethyltitanocene (5wt% in toluene, 0.36 mL, 1.68 mmol). The tube was heated at 150 °C under micro-wave irradiation for 1h30. Thereafter, the solvent was removed under vacuum and the crude product analysed by mass spectrometry which showed the presence of the dichlorinated compound **II-55** and trichlorinated **II-54**.

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 412.0.

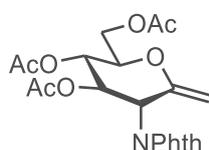
C-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-glucopyranosyl)-formyl tosylhydrazone II-59

To a solution of Raney nickel (50% in water, 6 g) in water (13.6 mL), pyridine (22.8 mL) and AcOH (13.6 mL) was subsequently added tosylhydrazine (894 mg, 4.8 mmol), $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.56 g, 33.6 mmol) and **II-13** (1.78 g, 4.0 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h and filtered over celite. The celite cake was washed with CH_2Cl_2 (2×20 mL) and the organic layer of the filtrate was separated, washed with water (2×20 mL), 1M HCl (2×25 mL), iced NaHCO_3 (2×25 mL), dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 60:40) to afford **II-59** (1.23 g, 50%) as a yellowish oil.

$R_f = 0.38$ (cyclohexane/EtOAc 50:50).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.89-7.70 (m 4H, H_{Phth}), 7.66 (s, 1H, NH), 7.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.14 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.98 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, HC=N), 5.86 (dd, $J = 9.2, 10.5$ Hz, 1H, H_3), 5.13 (dd, $J = 9.2, 10.0$ Hz, 1H, H_4), 5.01 (dd, $J = 5.1, 10.5$ Hz, 1H, H_1), 4.40 (pseudo t, $J = 10.5, 10.5$ Hz, 1H, H_2), 4.27 (dd, $J = 4.9, 12.5$ Hz, 1H, H_{6a}), 4.11 (dd, $J = 2.1, 12.5$ Hz, 1H, H_{6b}), 3.91-3.83 (m, 1H, H_5), 2.36 (s, 3H, ArCH_3), 2.09, 2.03, 1.86 (3s, 3×3H, 3× COCH_3).

$^1\text{H NMR}$ data was in agreement with the literature.^[116]

4,5,7-Tri-O-acetyl-2,6-anhydro-1,3-dideoxy-3-phthalimido-D-glycero-D-gluco-hept-1-enitol II-56

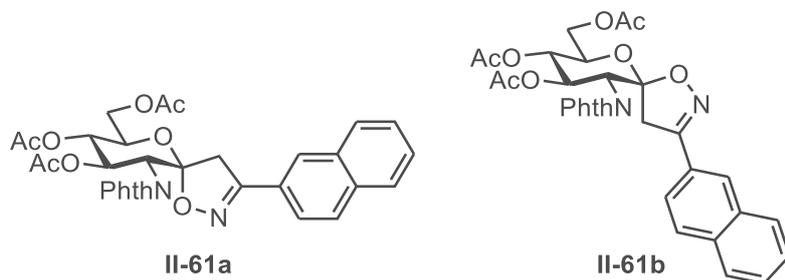
To a refluxed solution of NaH 90% (144 mg, 5.99 mmol) in anhydrous 1,4-dioxane (40 mL) was added dropwise a solution of **II-59** (1.05 g, 1.71 mmol) in anhydrous 1,4-dioxane (40 mL). The reaction mixture was stirred at 105 °C under argon atmosphere for 1 h until TLC showed complete conversion (cyclohexane/EtOAc 50:50). The reaction mixture was cooled down to room temperature, filtered over celite and the celite cake was washed with anhydrous 1,4-dioxane (2×20 mL). The filtrate was evaporated to afford **II-56** (709 mg, 96%) as a colourless oil which was used without further purification.

$R_f = 0.78$ (cyclohexane/EtOAc 50:50).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): 7.91 (s, 4H, H_{Phth}), 5.90 (dd, $J = 9.4, 10.3$ Hz, 1H, H_3), 5.30 (dd, $J = 9.4, 10.2$ Hz, 1H, H_4), 5.06 (td, $J = 2.3, 10.3$ Hz, 1H, H_2), 4.71 (pseudo t, $J = 2.3, 2.3$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}_a$), 4.41 (pseudo t, $J = 2.3, 2.3$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}_b$), 4.38 (dd, $J = 4.6, 12.6$ Hz, 1H, H_{6a}), 4.23 (dd, $J = 2.4, 12.6$ Hz, 1H, H_{6b}), 4.06-3.98 (m, 1H, H_5), 2.06, 2.02, 1.81 (3s, 3×3H, 3× COCH_3).

$^1\text{H NMR}$ data was in agreement with the literature.^[116]

(5R,7R,8R,9S,10R)-7-(acetoxymethyl)-3-(2-naphthyl)-1,6-dioxo-2-azaspiro[4,5]dec-2-ene-8,9-di-O-acetyl-10-phthalimido II-61a and **(5S,7R,8R,9S,10R)-7-(acetoxymethyl)-3-(2-naphthyl)-1,6-dioxo-2-azaspiro[4,5]dec-2-ene-8,9-di-O-acetyl-10-phthalimido II-61b**



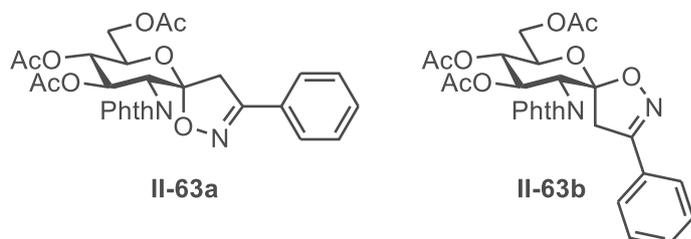
An aqueous solution of NaOCl (5 mL, 9°C) was added during 16 h at room temperature with a syringe pump to a solution of *exo*-glucal **II-56** (100 mg, 0.23 mmol) and 2-naphthaldoxime (79 mg, 0.46 mmol) in THF (10 mL). The mixture was then diluted with water (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3×20 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to afford a mixture of the two regioisomers **II-61a** and **II-61b** (43 mg, 31%).

R_f = 0.49 (cyclohexane/EtOAc 60:40).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 4.11 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.64 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.63 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.46 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, CH₂CPh).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 601.3.

(5R,7R,8R,9S,10R)-7-(acetoxymethyl)-3-(phenyl)-1,6-dioxo-2-azaspiro[4,5]dec-2-ene-8,9-di-O-acetyl-10-phthalimido II-63a and **(5S,7R,8R,9S,10R)-7-(acetoxymethyl)-3-(phenyl)-1,6-dioxo-2-azaspiro[4,5]dec-2-ene-8,9-di-O-acetyl-10-phthalimido II-63b**

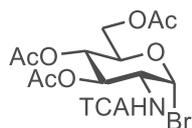


An aqueous solution of NaOCl (5 mL, 9°C) was added for 16 h at room temperature with a syringe pump to a solution of *exo*-glucal **II-56** (120 mg, 0.28 mmol) and **II-62** (68 mg, 0.56 mmol) in THF (10 mL). The mixture was then diluted with water (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3×20 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to afford a mixture of the two regioisomers **II-63a** and **II-63b** (46 mg, 30%).

R_f = 0.32 (cyclohexane/EtOAc 60:40).

¹H NMR (300 MHz, CD₃CN): 3.98 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.85 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.57 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.40 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, CH₂CPh).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 551.2.

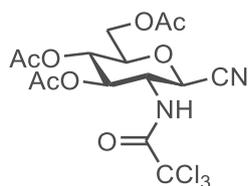
3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trichloroacetamido- α -D-glucopyranosyl bromide II-64

To a solution of **II-51** (10 g, 20.3 mmol) in CH_2Cl_2 (75 mL) at 0°C was added HBr/AcOH 33% (24.5 mL, 430.6 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. Saturated NaHCO_3 (470 mL) was gently poured in the mixture at 0°C , followed by extractions with CH_2Cl_2 (4×100 mL). The combined organic layers were dried (MgSO_4), filtered and evaporated to afford **II-64** (11.01 g, 99%) as a dark brown oil which was used without further purification.

$R_f = 0.74$ (cyclohexane/ EtOAc 50:50).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH), 6.7 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H_1), 5.44 (pseudo t, $J = 9.9$, 9.9 Hz, 1H, H_3), 5.29 (pseudo t, $J = 9.9$, 9.9 Hz, 1H, H_4), 4.39-4.23 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_5 + \text{H}_{6a}$), 4.14 (dd, $J = 2.0$, 10.5 Hz, 1H, H_{6b}), 2.12, 2.08, 2.06 (3s, $3 \times 3\text{H}$, $3 \times \text{COCH}_3$).

^1H NMR data was in agreement with the literature.^[122]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trichloroacetamido- β -D-glucopyranosyl cyanide II-65

A solution of the crude **II-64** (11.014 g, 20.3 mmol) in anhydrous CH_3NO_2 (40 mL, obtained via a distillation over CaCl_2 under vacuum) was added to $\text{Hg}(\text{CN})_2$ (6.4 g, 25.4 mmol, dried at 150°C under vacuum for 8 h). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. The reaction mixture was then filtered over celite and the filtrate was dissolved in EtOAc (150 mL) and washed with KBr [1.6 M] (9×140 mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/ EtOAc 70:30) to afford **II-65** (4.1 g, 44%) as an off-white amorphous solid.

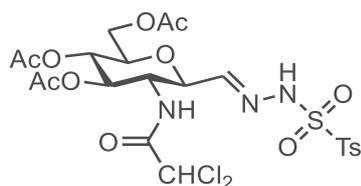
$R_f = 0.47$ (cyclohexane/ EtOAc 60:40).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.05 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 5.38 (dd, $J = 9.4$, 10.5 Hz, 1H, H_3), 5.13 (pseudo t, $J = 9.4$, 9.4 Hz, 1H, H_4), 4.64 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H_1), 4.36-4.12 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_{6a} + \text{H}_{6b}$), 3.81-3.73 (m, 1H, H_5), 2.12, 2.06, 2.05 (3s, $3 \times 3\text{H}$, $3 \times \text{COCH}_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 170.9, 170.7, 170.1 (3s, 3C, $3 \times \text{COCH}_3$), 77.4 (s, 1C, C_5), 71.2 (s, 1C, C_3), 67.5 (s, 1C, C_4), 66.5 (s, 1C, C_1), 61.7 (s, 1C, C_6), 54.3 (s, 1C, C_2), 20.8, 20.7, 20.6 (3s, 3C, $3 \times \text{COCH}_3$), COCCl_3 and COCCl_3 are not observed.

ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 459.0.

C-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-deoxy-2-dichloroacetamido-β-D-glucopyranosyl)-formyl tosylhydrazone II-67



To a solution of Raney nickel (50% in water, 16 g) in water (19.2 mL), pyridine (32.3 mL) and AcOH (19.2 mL) was subsequently added tosylhydrazine (1.581 g, 8.49 mmol), NaH₂PO₄·H₂O (5.039 g, 47.54 mmol) and **II-65** (2.6 g, 5.66 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h and filtered on celite. Celite cake was washed with CH₂Cl₂ (2×30 mL) and the organic layer of the filtrate was separated, washed with water (2×30 mL), HCl 1M (2×35 mL), iced NaHCO₃ (2×35 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to afford **II-65** (878 mg, 26%) as a colourless oil.

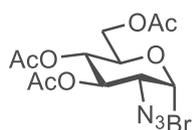
R_f = 0.43 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.99 (s, 1H, NHTs), 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, HC=N), 6.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NHCO), 5.60 (s, 1H, CHCl₂), 5.23-5.06 (m, 2H, H₃ + H₄), 4.24 (dd, *J* = 5.4, 12.6 Hz, 1H, H_{6a}), 4.14-4.03 (m, 2H, H₂ + H_{6b}), 3.97 (dd, *J* = 6.8, 10.2 Hz, 1H, H₁), 3.73-3.63 (m, 1H, H₅), 2.43 (s, 3H, ArCH₃), 2.04 (bs, 9H, 3×COCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 171.7, 170.8, 169.5 (3s, 3C, 3×COCH₃), 165.3 (s, 1C, COCHCl₂), 144.6 (s, 1C, ¹⁴C_{Ar}), 143.8 (s, 1C, HC=N), 135.6 (s, 1C, ¹⁴C_{Ar}), 129.9 (s, 2C, C_{Ar}), 128.1 (s, 2C, C_{Ar}), 79.2 (s, 1C, C₁), 76.2 (s, 1C, C₅), 72.7 (s, 1C, C₃), 67.9 (s, 1C, C₄), 65.8 (s, 1C, CHCl₂), 62.2 (s, 1C, C₆), 53.1 (s, 1C, C₂), 21.7 (s, 1C, ArCH₃), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 3C, 3×COCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ calcd. for C₂₂H₂₈Cl₂N₃O₁₀S 596.0867; found 596.0859.

3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-glucopyranosyl bromide II-68

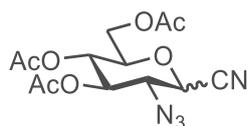


To a solution of **II-46** (1 g, 2.68 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (40 mL) and anhydrous EtOAc (8 mL) was added TiBr₄ (4.924 g, 13.4 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 72 h. MeCN (20 mL) and NaOMe (3.5 g) were added and the mixture was stirred for 30 minutes, filtered and evaporated. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to afford **II-68** (680 mg, 64%) as a white amorphous solid.

R_f = 0.72 (cyclohexane/EtOAc 60:40).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) (anomers α/β 40:60): 6.40 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H₁), 5.50 (pseudo t, *J* = 9.6, 9.6 Hz, 1H, H₃), 5.14 (dd, *J* = 9.6, 10.2 Hz, 1H, H₄), 4.39-4.26 (m, 2H, H₂ + H_{6a}), 4.17-4.07 (m, 1H, H₅), 3.80 (dd, *J* = 3.9, 10.2 Hz, 1H, H_{6b}), 2.10, 2.09, 2.06 (3s, 3×3H, 3×COCH₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[123]

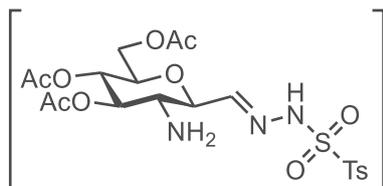
3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-glucopyranosyl cyanide II-69

A solution of **II-68** (814 mg, 2.07 mmol) in anhydrous CH_3NO_2 (10 mL, obtained via a distillation over CaCl_2 under vacuum) was added to $\text{Hg}(\text{CN})_2$ (654 mg, 2.59 mmol, dried at 150°C under vacuum for 8 h). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. The reaction mixture was then filtered over celite and the filtrate was dissolved in EtOAc (25 mL) and washed with 1.6 M KBr (9×20 mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to afford **II-69** (343 mg, 49%) as a white amorphous solid.

$R_f = 0.61$ (cyclohexane/EtOAc 60:40).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (anomers α/β 50:50): 5.38 (pseudo t, $J = 9.7, 9.7$ Hz, 1H), 5.14-4.98 (m, 3H), 4.93 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\alpha}$), 4.37-4.21 (m, 2H), 4.17-4.07 (m, 3H), 4.04 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\beta}$), 3.98-3.85 (m, 2H), 3.73-3.64 (m, 1H, $\text{H}_{5\alpha}$ or $\text{H}_{5\beta}$), 2.12, 2.11, 2.10, 2.09, 2.06, 2.03 (6s, 6×3H, 6× COCH_3).

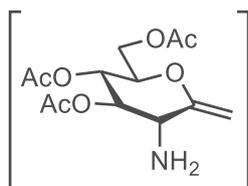
^1H NMR data was in agreement with the literature.^[124]

Synthesis of intermediate II-70

To a solution of Raney nickel (50% in water, 3 g) in water (3.4 mL), pyridine (5.7 mL) and AcOH (3.4 mL) was subsequently added tosylhydrazine (317 mg, 1.7 mmol), $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (890 mg, 8.4 mmol) and **II-69** (343 mg, 1.0 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h and filtered over celite. The celite cake was washed with CH_2Cl_2 (2×10 mL) and the organic layer of the filtrate was separated, washed with water (2×6 mL), 1M HCl (2×7 mL), iced NaHCO_3 (2×7 mL), dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 70:30) to afford **II-70** (130 mg) as colourless gum which was not pure therefore not characterised by ^1H NMR and used in the next reaction without further purification.

$R_f = 0.14$ (cyclohexane/EtOAc 5:95).

ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 486.1.

Synthesis of intermediate II-71

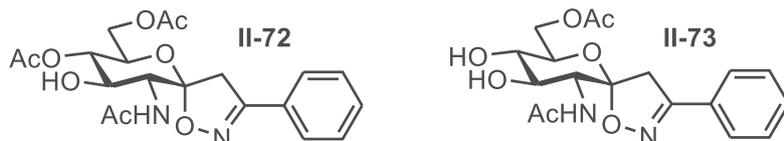
To a refluxed solution of NaH 90% (28.6 mg, 1.19 mmol) in anhydrous 1,4-dioxane (8 mL) was added dropwise a solution of **II-70** (167 mg, 0.34 mmol) in anhydrous 1,4-dioxane (9 mL). The reaction mixture was stirred at 105°C under argon atmosphere for 1 hour until TLC showed complete conversion (cyclohexane/EtOAc 50:50). Then, the reaction mixture was cooled down to room temperature,

filtered over celite and the celite cake was washed with anhydrous 1,4-dioxane (2×10 mL). The filtrate was evaporated to afford **II-71** (101 mg) as a yellowish oil which was not characterised by ¹H NMR and used without further purification.

R_f = 0.29 (cyclohexane/EtOAc 5:95).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 302.3.

(5*R*,7*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-7-(acetoxymethyl)-3-(phenyl)-1,6-dioxo-2-azaspiro[4,5]dec-2-ene-8-*O*-acetyl-9-hydroxy-10-acetamido **II-72 and (5*R*,7*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-7-(acetoxymethyl)-3-(phenyl)-1,6-dioxo-2-azaspiro[4,5]dec-2-ene-8,9-di-hydroxy-10-acetamido **II-73****



An aqueous solution of NaOCl (13 mL, 9°C) was added for 16 hours at room temperature with a syringe pump to a solution of *exo*-glucal **II-71** (200 mg, 0.66 mmol) and **II-62** (160 mg, 1.32 mmol) in THF (24 mL). The solvent was evaporated and the residue was purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μm, gradient: 5% to 100% MeCN with H₂O + TFA over 50 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **II-72** (13mg, 5%) and **II-73** (97 mg, 39%) as a colourless amorphous solid.

Analytical data for **II-72**:

Retention time: 2.86 minutes (**column C** and **gradient C**).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): 7.72-7.67 (m, 2H, H_{Ar}), 7.50-7.41 (m, 3H, H_{Ar}), 6.74 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NH), 4.94 (dd, *J* = 9.4, 10.2 Hz, 1H, H₄), 4.35 (dd, *J* = 9.5, 10.6 Hz, 1H, H₂), 4.16 (dd, *J* = 5.0, 12.3 Hz, 1H, H_{6a}), 4.11-4.06 (m, 1H, H₅), 3.98 (dd, *J* = 2.3, 12.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.82 (dd, *J* = 9.4, 10.6 Hz, 1H, H₃), 3.52 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.25 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, CH₂CPh), 2.06, 1.97 (2s, 2×3H, 2×OCOCH₃), 1.87 (s, 3H, NHCOCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): 171.9 (s, 1C, NHCOCH₃), 171.4, 171.0 (2s, 2C, 2×OCOCH₃), 159.4 (s, 1C, ¹³C-isoxasoline), 131.7 (s, 1C, C_{Ar}), 129.9 (s, 2C, C_{Ar}), 127.8 (s, 2C, C_{Ar}), 109.9 (s, 1C, C₁), 71.7 (s, 1C, C₄), 71.6 (s, 1C, C₃), 70.8 (s, 1C, C₅), 63.3 (s, 1C, C₆), 54.5 (s, 1C, C₂), 44.6 (s, 1C, CH₂CPh), 23.1 (s, 1C, NHCOCH₃), 21.2, 20.9 (2s, 2C, 2×OCOCH₃), ¹³C_{Ph} not observed.

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ calcd. for C₂₀H₂₅N₂O₈ 421.1659; found 421.1652.

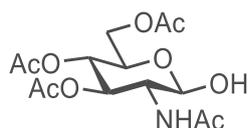
Analytical data for **II-73**:

Retention time: 2.40 minutes (**column C** and **gradient C**).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): 7.71-7.66 (m, 2H, H_{Ar}), 7.49-7.41 (m, 3H, H_{Ar}), 6.72 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH), 4.27 (dd, *J* = 1.9, 12.2 Hz, 1H, H_{6a}), 4.23 (dd, *J* = 9.7, 10.2 Hz, 1H, H₂), 4.18 (dd, *J* = 5.3, 12.2 Hz, 1H, H_{6b}), 3.95-3.90 (m, 1H, H₅), 3.65 (dd, *J* = 8.8, 10.2 Hz, 1H, H₃), 3.51-3.43 (m, 2H, H₄ + CH₂CPh), 3.20 (d, *J* = 17.8 Hz, 1H, CH₂CPh), 1.99 (s, 3H, OCOCH₃), 1.88 (s, 3H, NHCOCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN): 171.7 (s, 1C, NHCOCH₃), 171.1 (s, 1C, OCOCH₃), 159.2 (s, 1C, ¹³C-isoxasoline), 131.6 (s, 1C, C_{Ar}), 129.8 (s, 2C, C_{Ar}), 127.8 (s, 2C, C_{Ar}), 110.1 (s, 1C, C₁), 73.8 (s, 1C, C₃), 73.1 (s, 1C, C₅), 71.2 (s, 1C, C₄), 64.2 (s, 1C, C₆), 54.5 (s, 1C, C₂), 44.6 (s, 1C, CH₂CPh), 23.1 (s, 1C, NHCOCH₃), 21.0 (s, 1C, OCOCH₃), ¹³C_{Ph} not observed.

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ calcd. for C₁₈H₂₃N₂O₇ 379.1500; found 379.1497.

2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranose II-74

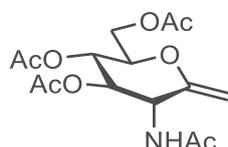
To a solution of Raney nickel (50% in water, 8.2 g) in water (9.1 mL), pyridine (15.2 mL) and AcOH (9.1 mL) was subsequently added tosylhydrazine (849 mg, 4.56 mmol), $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.38 g, 22.51 mmol) and **II-46** (1.0 g, 2.68 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h and filtered over celite. The celite cake was washed with CH_2Cl_2 (2×35 mL) and the organic layer of the filtrate was separated, washed with water (2×20 mL), HCl 1M (2×25 mL), iced NaHCO_3 (2×25 mL), dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The crude material was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 50:50) to afford **II-74** (302 mg, 48%) as colourless gum.

R_f = 0.43 (cyclohexane/EtOAc 60:40).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 5.98 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.29 (dd, J = 9.5, 10.6 Hz, 1H, H_3), 5.25 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H_1), 5.12 (pseudo t, J = 9.5, 9.5 Hz, 1H, H_4), 4.31-4.24 (m, 1H, H_2), 4.23-4.09 (m, 3H, H_5 + H_{6a} + H_{6b}), 2.08, 2.02, 2.01 (3s, 3×3H, 3× OCOCH_3), 1.96 (s, 3H, NCOCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 171.6, 171.1, 169.6 (3s, 3C, 3× OCOCH_3), 170.7 (s, 1C, NCOCH_3), 91.7 (s, 1C, C_1), 71.1 (s, 1C, C_3), 68.4 (s, 1C, C_4), 67.7 (s, 1C, C_5), 62.2 (s, 1C, C_6), 52.5 (s, 1C, C_2), 23.3 (s, 1C, NCOCH_3), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 3C, 3× OCOCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NNaO}_9$ 370.1109; found 370.1097.

3-Acetamido-4,5,7-tri-O-acetyl-2,6-anhydro-1,3-dideoxy-D-glycero-D-gluco-hept-1-enitol II-75

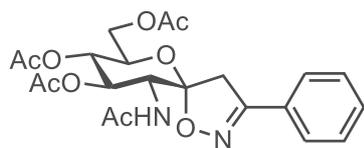
II-56 (100 mg, 0.23 mmol) was dissolved in methylamine 41% (5 mL) and 35% aqueous ammonia (5 mL) and the mixture was stirred at 70°C for 4 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in pyridine (5 mL) and Ac_2O (2.5 mL) was added dropwise to the solution at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. EtOAc (50 mL) was added and the mixture was subsequently washed with 1M HCl (2×15 mL), saturated NaHCO_3 (2×15 mL) and brine (2×15 mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered, evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 40:60) to afford **II-75** (26 mg, 33%) as a colourless gum.

R_f = 0.11 (cyclohexane/EtOAc 40:60).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 5.74 (d, J = 8.7 Hz, 1H, NH), 5.28 (pseudo t, J = 9.4, 9.4 Hz, 1H, H_4), 4.93 (dd, J = 9.4, 10.5 Hz, 1H, H_3), 4.85-4.72 (m, 2H, H_2 + $\text{C}=\text{CH}_a$), 4.56 (pseudo t, J = 1.8, 1.8 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}_b$), 4.27 (dd, J = 4.2, 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), 4.19 (dd, J = 2.4, 12.5 Hz, 1H, H_{6b}), 3.74-3.66 (m, 1H, H_5), 2.11, 2.05, 2.04, 2.01 (4s, 4×3H, 4× COCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 171.1, 170.8, 170.5, 169.2 (4s, 4C, 4× COCH_3), 96.4 (s, 1C, $\text{C}=\text{CH}_2$), 76.7 (s, 1C, C_5), 73.5 (s, 1C, C_3), 67.6 (s, 1C, C_4), 61.8 (s, 1C, C_6), 51.4 (s, 1C, C_2), 23.7, 20.7, 20.6, 20.5 (4s, 4C, 4× COCH_3), C_1 not observed.

ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 344.1.

(5R,7R,8R,9S,10R)-7-(acetoxymethyl)-3-(phenyl)-1,6-dioxo-2-azaspiro[4,5]dec-2-ene-8,9-di-O-acetyl-10-acetamido II-76

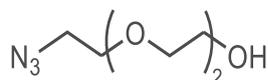
An aqueous solution of NaOCl (3 mL, 9°Cl) was added for 16 h at room temperature with a syringe pump to a solution of *exo*-glucal **II-75** (26 mg, 0.076 mmol) and **II-62** (18 mg, 0.152 mmol) in THF (24 mL). The solvent was evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 50:50) to afford **II-76** (16 mg, 46%) as a colourless amorphous solid.

R_f = 0.36 (cyclohexane/EtOAc 40:60).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.68-7.61 (m, 2H, H_{Ar}), 7.48, 7.37 (m, 3H, H_{Ar}), 5.81 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, NH), 5.36-5.20 (m, 2H, H₃ + H₄), 4.69 (pseudo t, *J* = 10.1, 10.1 Hz, 1H, H₂), 4.33-4.22 (m, 2H, H₅ + H_{6a}), 4.05 (dd, *J* = 2.8, 12.7 Hz, 1H, H_{6b}), 3.66 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, CH₂CPh), 3.40 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, CH₂CPh), 2.07, 2.05, 2.04, 1.93 (4s, 4×3H, 4×COCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 171.3, 170.8, 170.6, 169.4 (4s, 4C, 4×COCH₃), 158.9 (s, 1C, ¹³C-isoxasoline), 131.2 (s, 1C, C_{Ar}), 129.1 (s, 2C, C_{Ar}), 128.4 (s, 1C, ¹³C_{Ph}), 127.1 (s, 2C, C_{Ar}), 108.5 (s, 1C, C₁), 72.2 (s, 1C, C₃), 69.9 (s, 1C, C₅), 67.6 (s, 1C, C₄), 61.7 (s, 1C, C₆), 52.4 (s, 1C, C₂), 44.1 (s, 1C, CH₂CPh), 23.3, 20.9, 20.8, 20.7 (4s, 4C, 4×COCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd. for C₂₂H₂₆N₂NaO₉ 485.1535; found 485.1527.

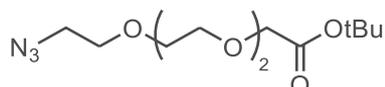
2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethanol II-85

To a solution of 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (20.0 g, 118.6 mmol) in anhydrous DMF (120 mL) was added NaN₃ (23.1 g, 355.8 mmol) and the reaction mixture was stirred at 90°C under argon atmosphere for 16 h. The solution was then filtered and evaporated and the residue was dissolved in water (400 mL) and extracted with EtOAc (3×200 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-85** (16.6 g, 80%) as a yellowish oil.

R_f = 0.22 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 3.76-3.57 (m, 10H, OCH₂), 3.39 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂N₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[127]

***Tert*-butyl 2-[2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy]acetate II-86**

To a solution of **II-85** (6.5 g, 37.1 mmol), in *tert*-BuOH (200 mL) was added *tert*-BuOK (6.25 g, 55.7 mmol) and the resulting solution was stirred at room temperature for 15 minutes. *Tert*-butyl bromoacetate (11 mL, 74.2 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was evaporated and the residue dissolved in water (150 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3×100 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The obtained oil was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 50:50) to afford **II-86** (8.8 g, 82%) as a colourless oil.

R_f = 0.22 (cyclohexane/EtOAc 50:50).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 4.02 (s, 2H, CH₂COOtBu), 3.75-3.64 (m, 10H, OCH₂), 3.39 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂N₃), 1.47 (s, 9H, CMe₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[127]

2-[2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy]acetic acid II-7



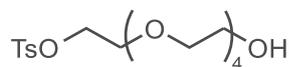
To a solution of **II-86** (440 mg, 1.52 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TFA (5 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Both TFA and solvent were removed under vacuum and the residue was dissolved in water (40 mL). The pH of the obtained solution was adjusted to pH = 11 with 1M NaOH and washed with EtOAc (3×40 mL). The aqueous layer was separated and pH adjusted to pH = 2 with 1M HCl and extracted with EtOAc (5×50 mL). These combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-7** (304 mg, 86%) as a colourless oil.

R_f = 0.86 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.36 (bs, 1H, COOH), 4.19 (s, 2H, CH₂COOtBu), 3.82-3.63 (m, 10H, OCH₂), 3.41 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂N₃).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[127]

2-[2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy]ethyl tosylate II-87



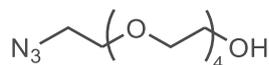
To a solution of pentaethylene glycol (7 g, 29.38 mmol) in THF (1.5 mL), was added a solution of NaOH (188 mg, 4.7 mmol) in water (1.1 mL) and the resulting mixture was cooled down to 0°C. A solution of tosyl chloride (561 mg, 2.94 mmol) in THF (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred at 0°C for 3 h. The solution was diluted with iced water (50 mL), extracted with CH₂Cl₂ (4×30 mL) and the combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-87** (1.1 g, 97%) as a yellowish oil which was not characterised and used without further purification.

R_f = 0.21 (cyclohexane/EtOAc 10:90).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.83-7.76 (m, 2H, H_{Ar}), 7.38-7.31 (m, 2H, H_{Ar}), 4.19-4.12 (m, 2H, CH₂OTs), 3.76-3.55 (m, 18H, OCH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 393.2.

2-[2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy]ethanol II-88



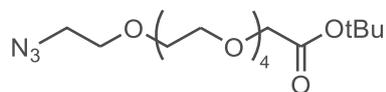
To a solution of **II-87** (1.519 g, 3.87 mmol) in EtOH (30 mL) was added NaN₃ (629 mg, 9.68 mmol) and the reaction mixture was stirred at 90°C for 16 h. The solvent was partially evaporated (about 20 mL) and water (20 mL) was added into the residue, followed by extractions with EtOAc (3×25 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-88** (798 mg, 78%) as a yellowish oil which was used without further purification.

R_f = 0.25 (pure EtOAc).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 3.75-3.59 (m, 18H, OCH₂), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂N₃).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 264.3.

Tert-butyl 2-[2-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy]acetate II-89



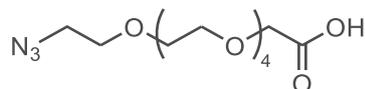
To a solution of **II-88** (798 mg, 3.03 mmol), in *tert*-BuOH (16 mL) was added *tert*-BuOK (511 mg, 4.55 mmol) and the resulting solution was stirred at room temperature for 15 minutes. *Tert*-butyl bromoacetate (0.9 mL, 6.06 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was evaporated and the residue dissolved in water (40 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3×30 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The crude oil was purified by silica gel column chromatography (EtOAc) to afford **II-89** (1.14 g, 99%) as a colourless oil.

R_f = 0.33 (pure EtOAc).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 4.02 (s, 2H, CH₂COOtBu), 3.72-3.63 (m, 18H, OCH₂), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂N₃), 1.47 (s, 9H, CMe₃).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 378.2.

2-[2-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy]acetic acid II-8



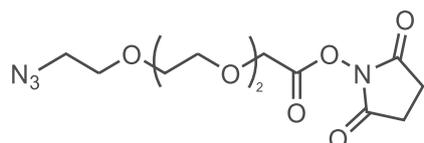
To a solution of **II-89** (1.231 g, 3.26 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TFA (5 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Both TFA and solvent were removed under vacuum and the residue was dissolved in water (40 mL). The pH of the obtained solution was adjusted to pH = 11 with 1M NaOH and washed with EtOAc (3×40 mL). The aqueous layer was separated and pH adjusted to pH = 2 with 1M HCl and extracted with EtOAc (5×50 mL). These combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **II-8** (753 mg, 72%) as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.43 (bs, 1H, COOH), 4.17 (s, 2H, CH₂COOtBu), 3.78-3.61 (m, 18H, OCH₂), 3.40 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂N₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 173.2 (s, 1C, COOH), 71.4-70.1 (massif, 9C, OCH₂), 69.1 (s, 1C, CH₂COOH), 50.8 (s, 1C, CH₂N₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd. for C₁₂H₂₃N₃NaO₇ 344.1428; found 344.1436.

***N*-Hydroxysuccinimidyl 2-[2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy]acetate II-90**



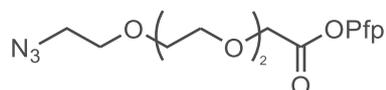
To a solution of **II-7** (500 mg, 2.14 mmol) in anhydrous MeCN (20 mL) was added *N*-hydroxysuccinimide (246 mg, 2.14 mmol) and DCC (485 mg, 2.35 mmol) and the resulting mixture was stirred at 65°C under argon atmosphere for 7 h. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature then filtered over celite and evaporated to give crude **II-90** (360 mg, 51%) as a yellowish oil which was used without further purification.

R_f = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 4.52 (s, 2H, CH₂COOtBu), 3.85-3.60 (m, 10H, OCH₂), 3.39 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.85 (s, 4H, H-succinimide).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 353.4.

Pentafluorophenyl 2-[2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy]acetate **II-91**



To a solution of **II-7** (304 mg, 1.30 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) at 0°C was added pentafluorophenol (287 mg, 1.56 mmol), EDC (242 mg, 1.56 mmol) and 4-DMAP (16 mg, 0.13 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 5 h. Saturated NaHCO₃ (40 mL) was added in the reaction and the product was extracted with CH₂Cl₂ (3×30 mL). The combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried (MgSO₄) and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography to afford **II-91** (186 mg, 36%) as a colourless oil.

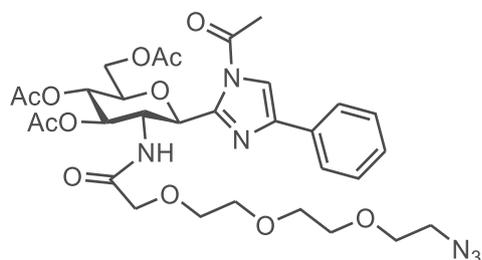
R_f = 0.86 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 4.55 (s, 2H, CH₂COOPfp), 3.85-3.80 (m, 2H, OCH₂), 3.77-3.72 (m, 2H, OCH₂), 3.71-3.65 (m, 6H, OCH₂), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂N₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 166.80 (s, 1C, COOPfp), 71.4, 70.9, 70.8, 70.7, 70.2 (5s, 5C, OCH₂), 68.0 (s, 1C, CH₂COOPfp), 50.8 (CH₂N₃), C_{Ar} were not observed.

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd. for C₁₄H₁₄F₅N₃NaO₅ 422.0746; found 422.0766.

2-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-[2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)acetamido]-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-3-*N*-acetyl-5-phenyl-imidazole **II-92**



From NHS activated acid **II-90**:

To a solution of **II-2** (50 mg, 0.16 mmol) in water (1 mL) and Na-phosphate buffer 0.1 M (1 mL) was added **II-90** (264.24 mg, 0.8 mmol). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature and evaporated. The residue was dissolved in pyridine (3 mL), Ac₂O (2 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. EtOAc (20 mL) was added and the crude mixture was washed with 1M HCl (2×10 mL), saturated NaHCO₃ (2×10 mL), brine (2×10 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 50:50 then pure EtOAc) to obtain **II-92** (13 mg, 12%) as a colourless oil.

From Pfp activated acid **II-91**:

To a solution of **II-2** (41 mg, 0.13 mmol) in anhydrous DMF (3.5 mL) was added **II-91** (63.9 mg, 0.16 mmol) and Et₃N (36 μL, 0.26 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 7 h. The solvent was evaporated and the residue dissolved in pyridine (3 mL) and Ac₂O (2 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h.

Experimental section

EtOAc (20 mL) was added and the crude mixture was washed with 1M HCl (2×10 mL), saturated NaHCO₃ (2×10 mL), brine (2×10 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 50:50 then pure EtOAc) to obtain **II-92** (22 mg, 25%) as a colourless oil.

From free acid **II-7**:

To a solution of **II-7** (173 mg, 0.74 mmol) in anhydrous DMF (4.5 mL) was added EDC (142 mg, 0.74 mmol) and HOBT (100 mg, 0.74 mmol) and the mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 10 minutes. Then, **II-2** (150 mg, 0.49 mmol) and DIPEA (0.42 mL, 2.45 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h until TLC (CH₂Cl₂/MeOH 90:10) showed complete conversion. The solvent was removed under vacuum, the residue dissolved in pyridine (4 mL) and Ac₂O (3 mL) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h. EtOAc (30 mL) was added and the crude mixture was washed with 1M HCl (2×15 mL), saturated NaHCO₃ (2×15 mL), brine (2×15 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The resulting oil was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 50:50 then pure EtOAc) to obtain **II-92** (145 mg, 43%) as a colourless oil.

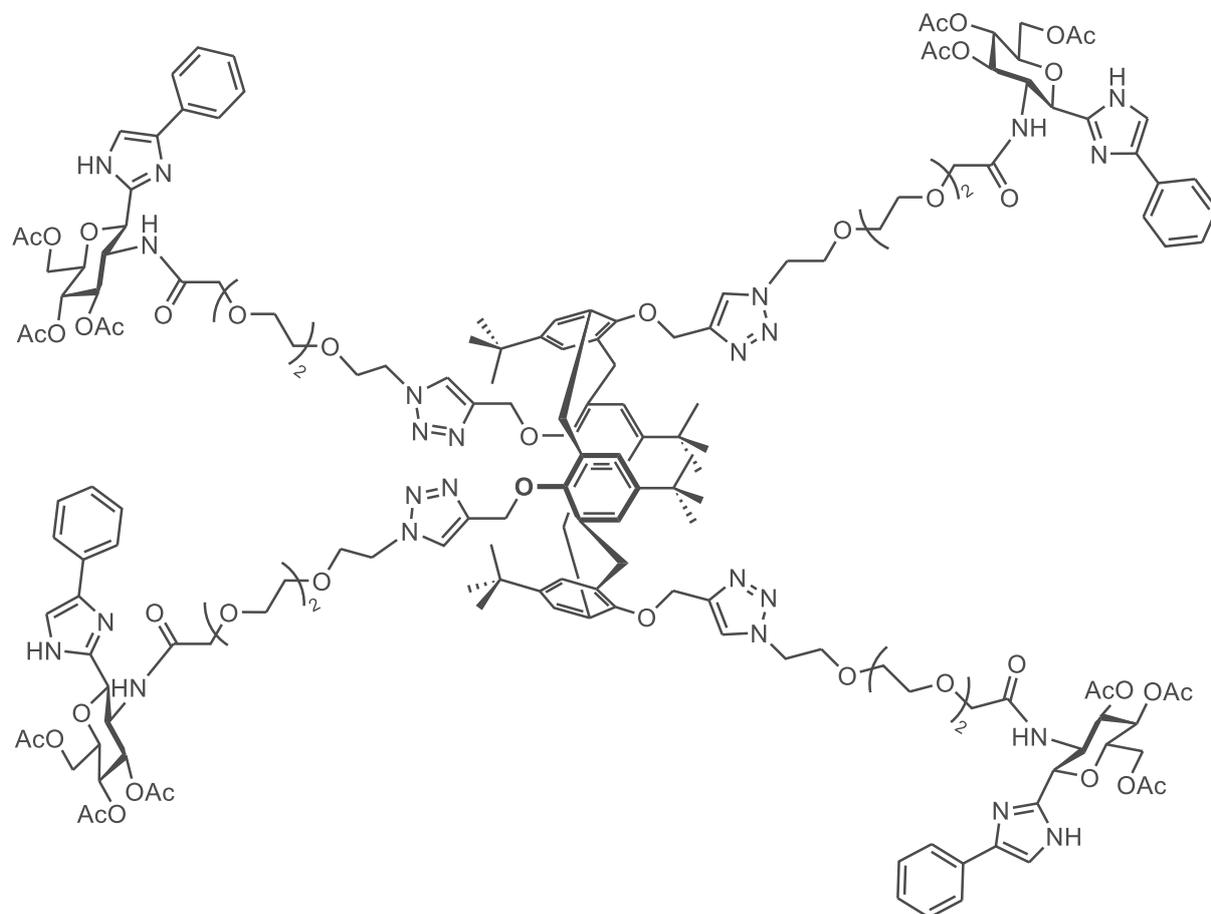
R_f = 0.81 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.77-7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 7.5 (s, 1H, CH-imidazole), 7.38-7.32 (m, 2H, H_{Ar}), 7.29-7.23 (m, 1H, H_{Ar}), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 5.63 (dd, *J* = 9.3, 10.1 Hz, 1H, H₃), 5.54 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H₁), 5.17 (dd, *J* = 9.5, 10.1 Hz, 1H, H₄), 4.81-4.71 (m, 1H, H₂), 4.24 (dd, *J* = 4.9, 12.4 Hz, 1H, H_{6a}), 4.12 (dd, *J* = 2.1, 12.4 Hz, 1H, H_{6b}), 3.97-3.91 (m, 1H, H₅), 3.75 (s, 2H, CH₂CON), 3.72-3.29 (m, 12H, OCH₂ + CH₂N₃), 2.61 (s, 3H, NCOCH₃), 2.04, 2.03, 2.01 (3s, 3×3H, 3×OCOCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 170.8, 170.6, 170.2, 169.7, 167.1 (5s, 5C, 4×COCH₃ + COCH₂), 145.1 (s, 1C, C^{IV}-imidazole), 141.1 (s, 1C, C^{IV}-imidazole), 132.3 (s, 1C, C^{IV}-phenyl), 128.8 (s, 2C, C_{Ar}), 128.0 (s, 1C, C_{Ar}), 125.4 (s, 2C, C_{Ar}), 113.8 (s, 1C, CH-imidazole), 76.1 (s, 1C, C₅), 73.6 (s, 1C, C₃), 72.8 (s, 1C, C₁), 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 70.2, 69.9 (6s, 6C, 5×OCH₂ + COCH₂), 69.0 (s, 1C, C₄), 62.3 (s, 1C, C₆), 52.2 (s, 1C, C₂), 50.7 (s, 1C, CH₂N₃), 24.5 (s, 1C, NCOCH₃), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 3C, 3×OCOCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ calcd. for C₃₁H₄₁N₆O₁₂ 689.2777; found 689.2777.

25,26,27,28-Tetra-[3,6,9-trioxa-undecamido-*N*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-dideoxy-*C*-(5-phenyl-imidazole)- β -D-glucopyranose)-11-yl]-1',2',3'-triazol-4'-ylmethyleneoxy]-*p*-*tert*-butyl calix[4]arene (1,3 alternate conformation) II-94



In a microwave tube containing **II-62** (200 mg, 0.29 mmol) in DMF (2 mL) was added calixarene **II-4** (28.8 mg, 0.036 mmol), CuI (3.43 mg, 0.018 mmol) and DIPEA (50.5 μ L, 0.29 mmol). The tube was sealed and heated at 110°C upon microwave irradiation for 30 minutes. The solvent was then evaporated and the crude product dissolved in MeOH (5 mL) and quadra-pure resin (300 mg) was added. The solution was stirred for 16 h, filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc then CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford **II-94** (15 mg, 12%) as a colourless solid.

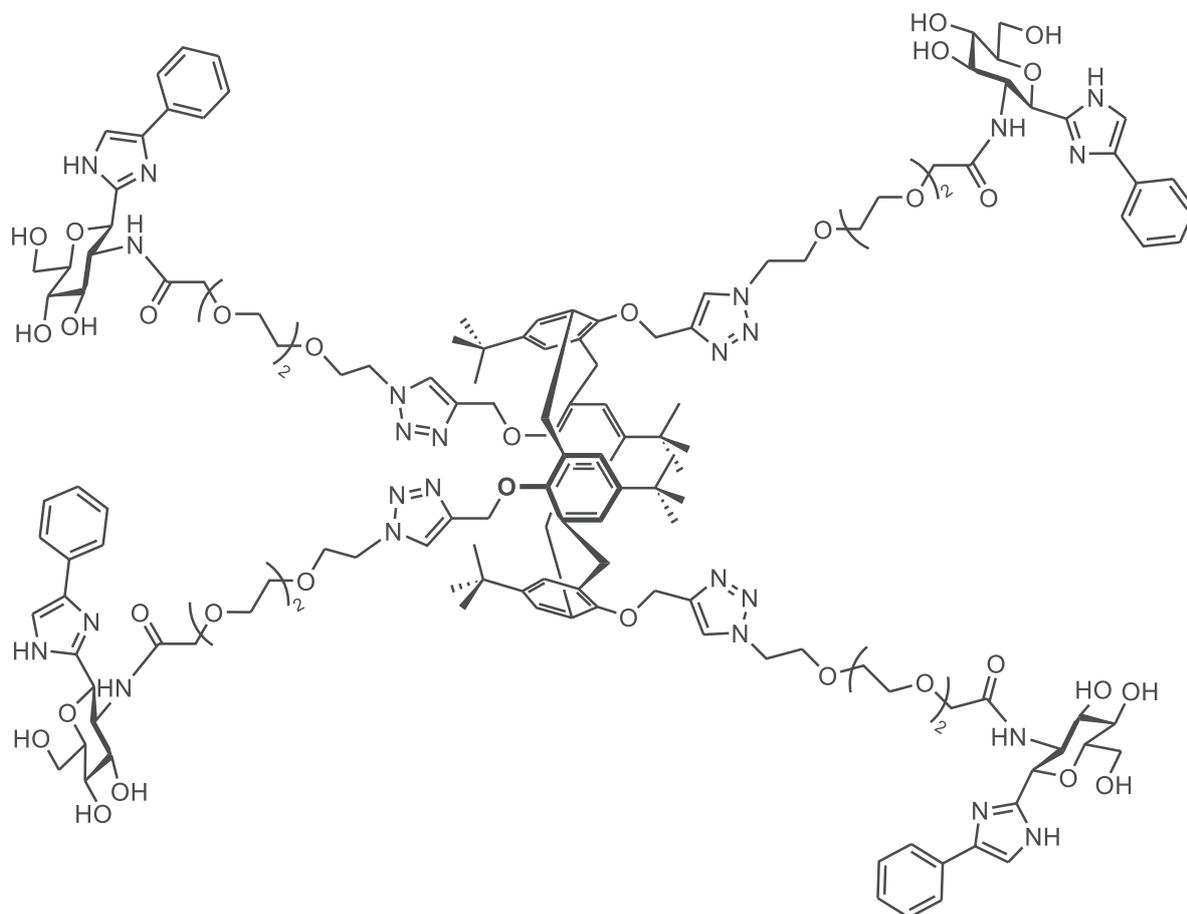
R_f = 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.68-7.53 (m, 2H), 7.49-7.39 (m, 1H), 7.36-7.16 (m, 4H), 6.85 (s, 2H, H_{Ar}-calix), 5.38 (bt, 1H, H₃), 5.16 (bt, 1H, H₄), 4.98-4.88 (m, 1H, H₁), 4.64-4.41 (m, 5H, H₂ + 4H), 4.28 (bd, 1H, H_{6a}), 4.09 (bd, 1H, H_{6b}), 3.95-3.70 (m, 5H, H₅ + 4H), 3.68-3.30 (m, 10H, OCH₂), 2.02 (s, 9H, 3×COCH₃), 1.04 (s, 9H, CMe₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 171.6, 170.9, 170.6, 169.6 (4s, 4C, CONH + 3×COCH₃), 153.5, 144.8, 144.6, 143.5, 133.7 (5s, 5C, C_{Ar}), 128.7 (s, 2C, C_{Ar}), 127.3 (s, 1C, C_{Ar}), 127.1 (s, 2C, C_{Ar}), 124.9 (s, 2C, C_{Ar}), 124.0 (s, 1C, C_{Ar}), 76.3 (s, 1C, C₅), 74.6 (s, 1C, C₁), 73.6 (s, 1C, C₃), 70.8, 70.6, 70.4, 70.3, 70.1, 69.5 (6s, 6C, 5×OCH₂ + COCH₂), 68.8 (s, 1C, C₄), 62.3 (s, 1C, C₆), 52.2 (s, 1C, C₂), 50.0 (s, 1C, CH₂-triazole), 38.3 (s, 1C, ArCH₂Ar), 33.9 (s, 1C, CMe₃), 31.5 (s, 3C, CMe₃), 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 3C, 3×COCH₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + 4H]⁴⁺ calcd. for C₁₇₂H₂₂₀N₂₄O₄₈ 847.3872; found 847.3865.

25,26,27,28-Tetra-[3,6,9-trioxa-undecamido-*N*-(1,2-dideoxy-*C*-(5-phenyl-imidazole)- β -D-glucopyranose)-11-yl]-1',2',3'-triazol-4'-ylmethyleneoxy]-*p*-*tert*-butyl-calix[4]arene (1,3 alternate conformation) II-95



From calixarene II-94:

To a solution of **II-94** (38 mg, 0.011 mmol) in MeOH (1.5 mL) was added NaOMe (0.7 mg, 0.013 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solvent was evaporated and the residue was purified by preparative HPLC (semi-preparative HPLC Shimadzu prominence 20A) using **column D** and **gradient D**. Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded compound **II-95** (3.6 mg, 11%) as a white amorphous solid.

From calixarene II-99:

To a solution of **II-99** (40 mg, 0.023 mmol) and COMU (47.1 mg, 0.11 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added a solution of **II-2** (56 mg, 0.185 mmol) and DIPEA (48 μ L, 0.27 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 2 h until HPLC (**column C** and **gradient C**) showed complete conversion of calixarene **II-99**. The crude mixture was directly purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μ m, gradient: 20% to 50% MeCN with H₂O + TFA over 30 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **II-95** (8.4 mg, 13%) as a white amorphous solid.

Retention time: 4.22 minutes (**column C** and **gradient C**) and 8.17 minutes (**column B** and **gradient B**).
¹H NMR (600 MHz, (CD₃)₂SO + ϵ D₂O): 7.85 (s, 1H, CH-imidazole), 7.66 (bs, 2H, C_{Ar}-phenyl), 7.45 (bs, 1H, CH-triazole), 7.28 (bs, 2H, C_{Ar}-phenyl), 7.12 (bs, 1H, C_{Ar}-phenyl), 6.83 (s, 2H, C_{Ar}-calix), 4.55 (s, 2H,

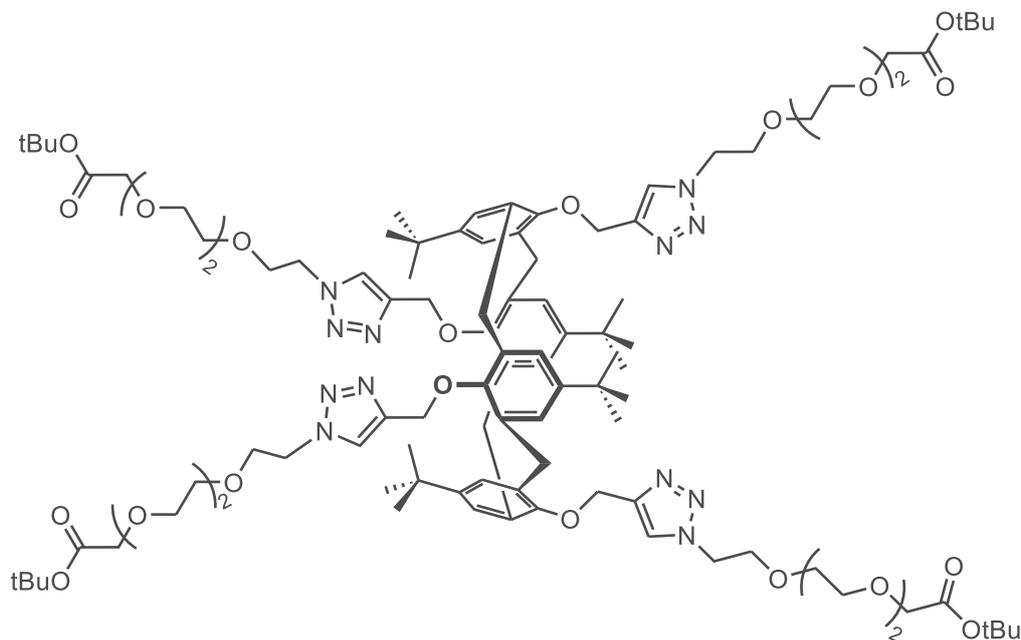
Experimental section

ArOCH₂), 4.49 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H₁), 4.44 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 3.93 (bt, 1H, H₂), 3.75 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 3.72-3.24 (m, 17H), 0.94 (s, 9H, CMe₃).

¹³C NMR (150 MHz, (CD₃)₂SO + D₂O): 168.9 (s, 1C, CONH), 153.8, 145.6, 143.5, 142.5, 139.1, 135.2, 132.7 (7s, 8C, ¹⁴C_{Ar}), 128.3 (s, 2C, C_{Ar}-phenyl), 127.0 (s, 2C, C_{Ar}-calix), 125.7 (s, 1C, C_{Ar}-phenyl), 124.7 (s, 1C, CH-imidazole), 124.1 (s, 2C, C_{Ar}-phenyl), 113.1 (s, 1C, CH-triazole), 81.2 (s, 1C, C₃ or C₄ or C₅), 74.7 (s, 1C, C₃ or C₄ or C₅), 74.2 (s, 1C, C₁), 70.6 (s, 1C, C₃ or C₄ or C₅), 69.8-69.5 (massif, 5C, 4×OCH₂ + CH₂CONH), 68.8 (s, 1C, NCH₂CH₂O), 64.4 (s, 1C, ArOCH₂), 61.3 (s, 1C, C₆), 54.3 (s, 1C, C₂), 49.2 (s, 1C, NCH₂CH₂O), 33.3 (s, 1C, CMe₃), 31.2 (s, 3C, CMe₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + 4H]⁴⁺ calcd. for C₁₄₈H₁₉₆N₂₄O₃₆ 721.3556; found 721.3554.

25,26,27,28-Tetra-[11-(*tert*-butoxy)-11-oxo-3,6,9-trioxa-undecyl]-1',2',3'-triazol-4'-ylmethyleneoxy]-*p*-*tert*-butyl-calix[4]arene (1,3 alternate conformation) II-97



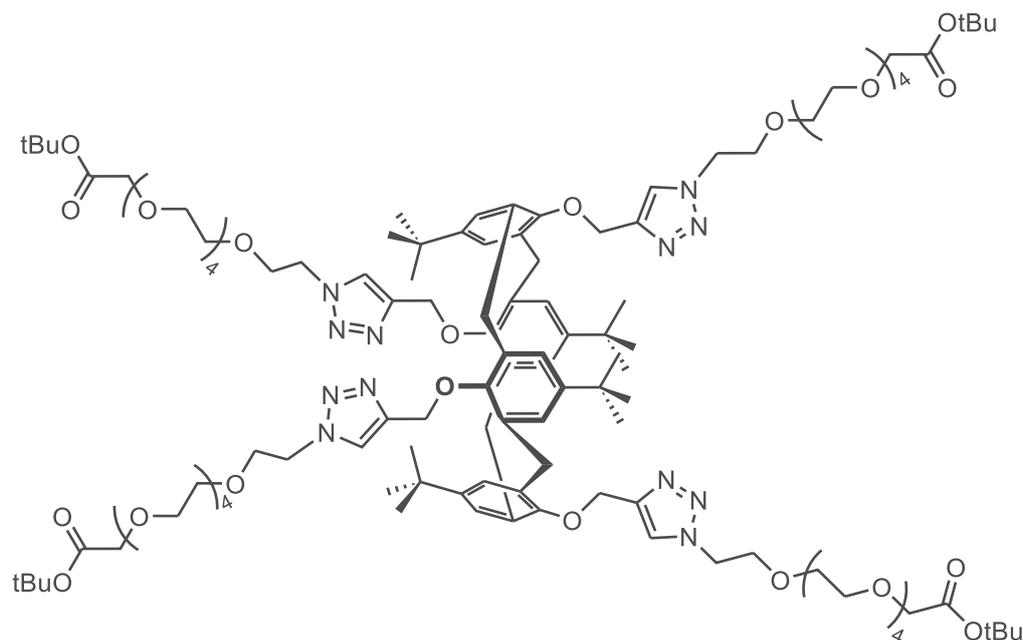
In a microwave tube containing **II-86** (278 mg, 0.96 mmol) in DMF (3 mL) was added calixarene **II-4** (100 mg, 0.12 mmol), CuI (11.4 mg, 0.06 mmol) and DIPEA (0.17 mL, 0.96 mmol). The tube was sealed and heated at 110°C upon microwave irradiation for 30 minutes. The solvent was then evaporated and the crude product dissolved in EtOAc (50 mL), washed with saturated EDTA (3×20 mL) and brine (20 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc then CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford **II-97** (224 mg, 95%) as a colourless gum.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.28 (bs, 1H, H-triazole), 6.86 (s, 1H, H_{Ar}), 4.56-4.46 (m, 4H, NCH₂CH₂O + ArOCH₂), 3.99 (s, 2H, CH₂COO^tBu), 3.88 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 3.71-3.58 (m, 8H, OCH₂), 3.47 (s, 2H, ArCH₂Ar), 1.46 (s, 9H, COOCMe₃), 1.06 (s, 9H, ArCMe₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 169.7 (s, 1C, COO^tBu), 153.5 (s, 2C, C_{Ar}), 144.7 (s, 1C, C^{IV}-triazole), 144.6 (s, 1C, C_{Ar}), 133.7 (s, 1C, C_{Ar}), 127.0 (s, 2C, C_{Ar}), 124.1 (s, 1C, CH-triazole), 81.7 (s, 1C, COOCMe₃), 70.8-70.7 (massif, 4C, OCH₂), 69.6 (s, 1C, NCH₂CH₂O), 69.1 (s, 1C, CH₂COO^tBu), 64.6 (s, 1C, ArOCH₂), 50.2 (s, 1C, NCH₂CH₂O), 38.4 (s, 1C, ArCH₂Ar), 33.9 (s, 1C, ArCMe₃), 31.5 (s, 3C, ArCMe₃), 28.3 (s, 3C, COOCMe₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + 2H]²⁺ calcd. for C₁₀₄H₁₅₈N₁₂O₂₄ 979.5738; found 979.5751.

25,26,27,28-Tetra-[11-(*tert*-butoxy)-11-oxo-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecyl]-1',2',3'-triazol-4'-ylmethyleneoxy]-*p*-*tert*-butyl-calix[4]arene (1,3 alternate conformation) **II-98**



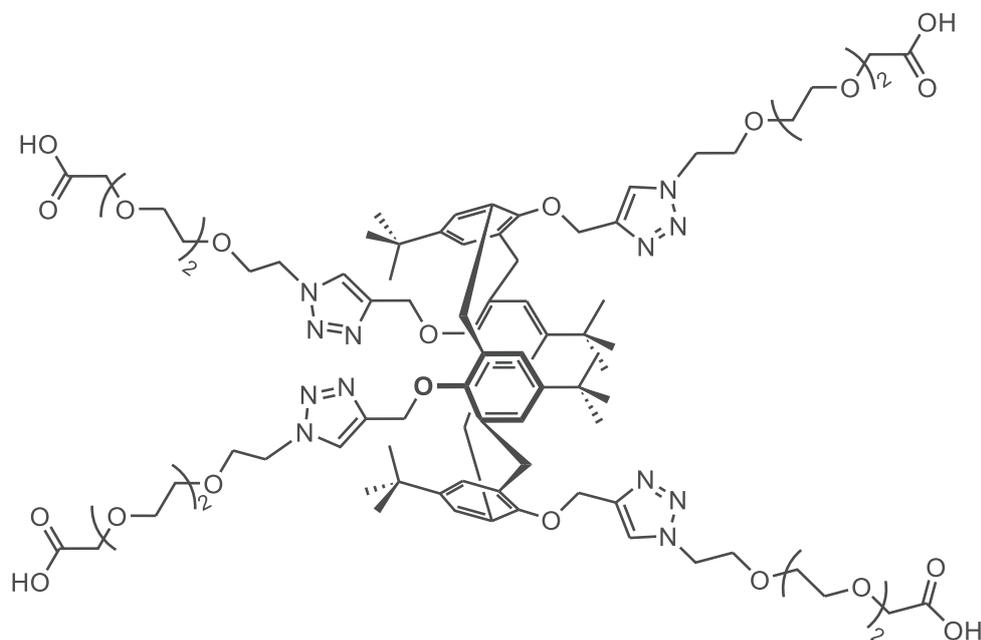
In a microwave tube containing **II-89** (225 mg, 0.60 mmol) in DMF (2.5 mL) was added calixarene **II-4** (60 mg, 0.075 mmol), CuI (7.2 mg, 0.038 mmol) and DIPEA (0.11 mL, 0.60 mmol). The tube was sealed and heated at 110°C upon microwave irradiation for 30 minutes. The solvent was then evaporated and the crude product dissolved in EtOAc (30 mL), washed with saturated EDTA (3×7 mL) and brine (7 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc then CH₂Cl₂/MeOH 95:5) to afford **II-98** (142 mg, 82%) as a colourless gum.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.23 (s, 1H, H-triazole), 6.83 (s, 1H, H_{Ar}), 4.51-4.40 (m, 4H, NCH₂CH₂O + ArOCH₂), 3.97 (s, 2H, CH₂COO^tBu), 3.84 (bt, 2H, NCH₂CH₂O), 3.69-3.53 (m, 16H, OCH₂), 3.43 (s, 2H, ArCH₂Ar), 1.43 (s, 9H, COOCMe₃), 1.03 (s, 9H, ArCMe₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 169.7 (s, 1C, COO^tBu), 153.4 (s, 2C, C_{Ar}), 144.7 (s, 1C, C^{IV}-triazole), 144.4 (s, 1C, C_{Ar}), 133.6 (s, 1C, C_{Ar}), 127.0 (s, 2C, C_{Ar}), 123.9 (s, 1C, CH-triazole), 81.5 (s, 1C, COOCMe₃), 71.0-70.5 (massif, 8C, OCH₂), 69.5 (s, 1C, NCH₂CH₂O), 69.0 (s, 1C, CH₂COO^tBu), 64.6 (s, 1C, ArOCH₂), 49.9 (s, 1C, NCH₂CH₂O), 38.2 (s, 1C, ArCH₂Ar), 33.8 (s, 1C, ArCMe₃), 31.4 (s, 3C, ArCMe₃), 28.1 (s, 3C, COOCMe₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + 2H]²⁺ calcd. for C₁₂₀H₁₉₀N₁₂O₃₂ 1155.6799; found 1155.6744.

25,26,27,28-Tetra-[10-carboxy-2,5,8-trioxa-decyl]-1',2',3'-triazol-4'-ylmethyleneoxy]-p-tert-butyl-calix[4]arene (1,3 alternate conformation) II-99



To a solution of compound **II-97** (224 mg, 0.11 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was added TFA (3 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 30 minutes and then evaporated under vacuum. The crude product was diluted in CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with 1M HCl (3×30 mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The resulting oil was purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μm , gradient: 5% to 80% MeCN with H_2O + TFA over 30 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **II-99** (179 mg, 94%) as a colourless amorphous solid.

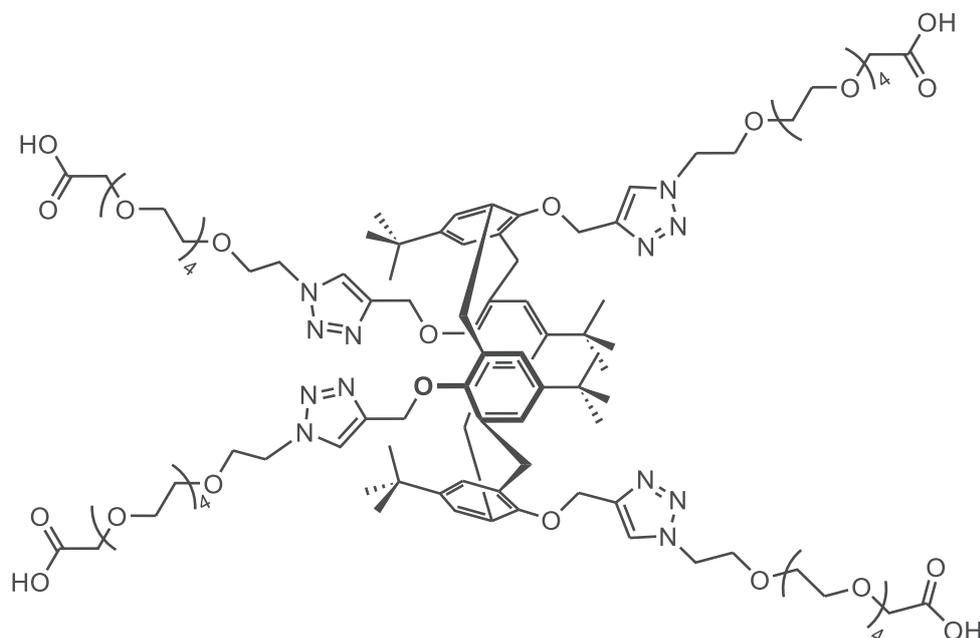
Retention time: 5.48 minutes (**column C** and **gradient C**).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.31 (s, 1H, H-triazole), 6.84 (s, 1H, H_{Ar}), 5.84 (bs, 1H, COOH), 4.63-4.51 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ + ArOCH_2), 4.13 (s, 2H, CH_2COOH), 3.91 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.75-3.57 (m, 8H, OCH_2), 3.53 (s, 2H, ArCH_2Ar), 1.04 (s, 9H, CMe_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 172.7 (s, 1C, COOH), 153.3 (s, 2C, C_{Ar}), 145.4 (s, 1C, C_{Ar}), 144.1 (s, 1C, C^{IV} -triazole), 133.7 (s, 1C, C_{Ar}), 126.6 (s, 2C, C_{Ar}), 124.6 (s, 1C, CH-triazole), 71.1-70.5 (massif, 4C, OCH_2), 69.3 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 68.8 (s, 1C, CH_2COOH), 63.9 (s, 1C, ArOCH_2), 50.6 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 38.6 (s, 1C, ArCH_2Ar), 33.9 (s, 1C, CMe_3), 31.5 (s, 3C, CMe_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ calcd. for $\text{C}_{88}\text{H}_{126}\text{N}_{12}\text{O}_{24}$ 867.4453; found 867.4489.

25,26,27,28-Tetra-[16-carboxy-2,5,8,11,14-pentaoxa-hexadecyl]-1',2',3'-triazol-4'-ylmethyleneoxy]-p-tert-butyl-calix[4]arene (1,3 alternate conformation) II-100



To a solution of compound **II-98** (140 mg, 0.06 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was added TFA (3 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 30 minutes and then evaporated under vacuum. The crude product was diluted in CH_2Cl_2 (30 mL) and washed with 1M HCl (3×10 mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The resulting oil was purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μm , gradient: 5% to 80% MeCN with H_2O + TFA over 30 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **II-100** (87 mg, 69%) as a colourless amorphous solid.

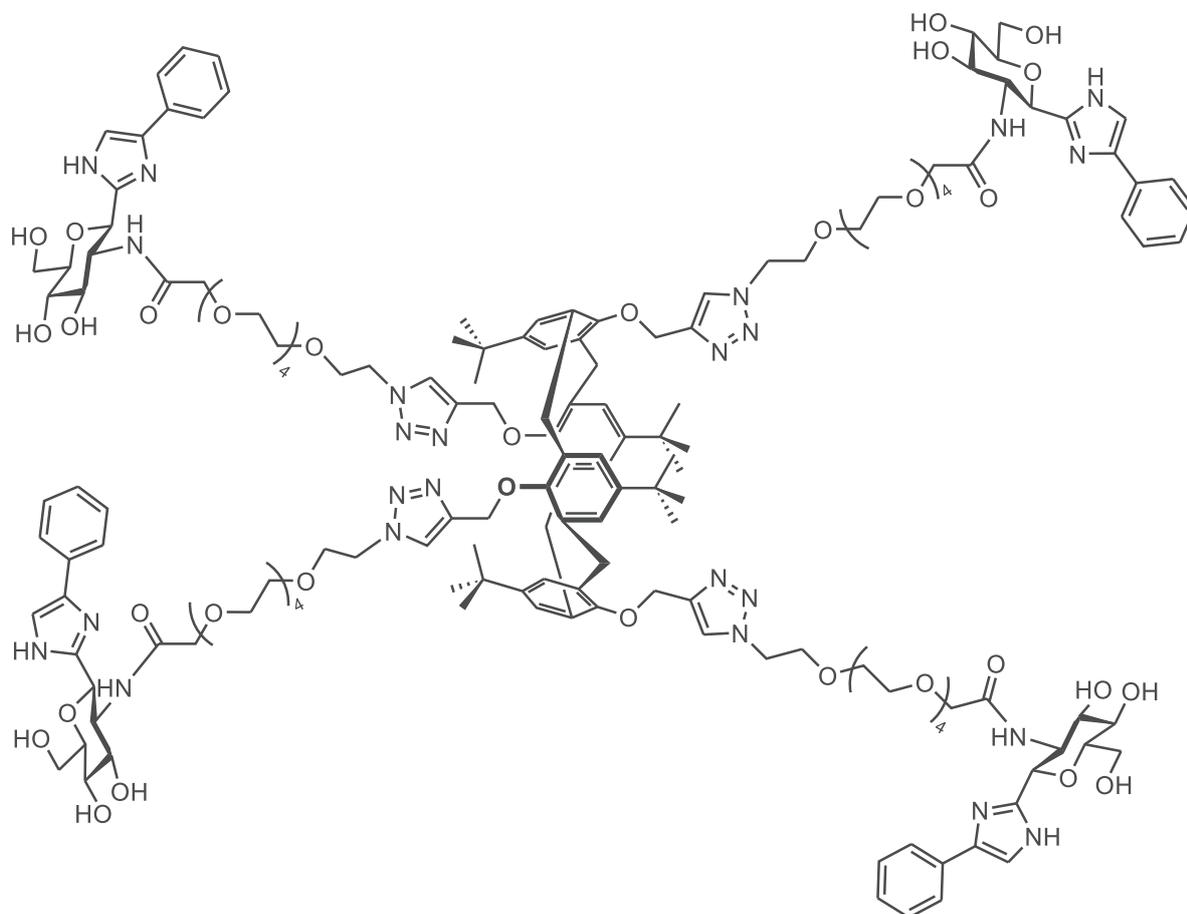
Retention time: 4.44 minutes (**column C** and **gradient C**).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 9.54 (bs, 1H, COOH), 7.35 (s, 1H, H-triazole), 6.83 (s, 1H, H_{Ar}), 4.59 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.50 (s, 2H, ArOCH_2), 4.12 (s, 2H, CH_2COOH), 3.89 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.73-3.58 (m, 16H, OCH_2), 3.51 (s, 2H, ArCH_2Ar), 1.0 (s, 9H, CMe_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 172.5 (s, 1C, COOH), 153.3 (s, 2C, C_{Ar}), 145.6 (s, 1C, C_{Ar}), 143.8 (s, 1C, C^{IV} -triazole), 133.6 (s, 1C, C_{Ar}), 126.6 (s, 2C, C_{Ar}), 124.7 (s, 1C, CH-triazole), 71.1-70.4 (massif, 8C, OCH_2), 69.1 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 68.9 (s, 1C, CH_2COOH), 63.7 (s, 1C, ArOCH_2), 50.8 (s, 1C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 38.5 (s, 1C, ArCH_2Ar), 33.9 (s, 1C, CMe_3), 31.4 (s, 3C, CMe_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ calcd. for $\text{C}_{104}\text{H}_{159}\text{N}_{12}\text{O}_{32}$ 696.0389; found 696.0408.

25,26,27,28-Tetra-[3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecamido-*N*-(1,2-dideoxy-*C*-(5-phenyl-imidazole)- β -D-glucopyranose)-11-yl]-1',2',3'-triazol-4'-ylmethyleneoxy]-*p*-*tert*-butyl-calix[4]arene (1,3 alternate conformation) II-101



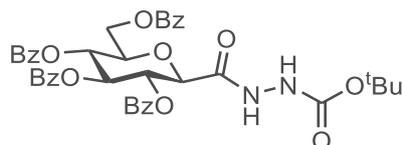
To a solution of **II-100** (44 mg, 0.021 mmol) and COMU (42.8 mg, 0.10 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added a solution of **II-2** (51.3 mg, 0.168 mmol) and DIPEA (49 μ L, 0.28 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 5 h until HPLC (**column C** and **gradient C**) showed complete conversion of calixarene **II-99**. The crude mixture was directly purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μ m, gradient: 20% to 50% MeCN with H₂O + TFA over 30 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **II-101** (29 mg, 43%) as a white amorphous solid.

Retention time: 3.57 minutes (**column C** and **gradient C**).

¹H NMR (500 MHz, D₂O): 7.64 (s, 1H, CH-imidazole), 7.54 (s, 1H, CH-triazole), 7.52-7.48 (m, 2H, C_{Ar}-phenyl), 7.39-7.25 (bs, 3H, C_{Ar}-phenyl), 6.80 (s, 2H, C_{Ar}-calix), 4.82 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, H₁), 4.51-4.41 (m, 4H, NCH₂CH₂O + ArOCH₂), 4.04 (pseudo t, *J* = 10.4, 10.4 Hz 1H, H₂), 3.97-3.78 (m, 7H), 3.74-3.42 (m, 17H), 0.94 (s, 9H, ArCMe₃).

¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 172.7 (s, 1C, CONH), 153.6, 145.2, 144.0, 143.6, 133.6 (5s, 6C, ¹³C_{Ar}), 129.8 (s, 1C, C_{Ar}-phenyl), 129.7 (s, 2C, C_{Ar}-phenyl), 127.4 (s, 2C, C_{Ar}-calix), 125.7 (s, 2C, C_{Ar}-phenyl), 125.4 (s, 1C, CH-imidazole), 115.3 (s, 1C, CH-triazole), 80.4 (s, 1C, C₃ or C₄ or C₅), 73.5 (s, 1C, C₃ or C₄ or C₅), 71.8 (s, 1C, C₁), 70.2-69.0 (m, 11C, C_{Glc} + NCH₂CH₂O 8 \times OCH₂ + CH₂CONH), 64.5 (s, 1C, ArOCH₂), 60.5 (s, 1C, C₆), 55.0 (s, 1C, C₂), 50.1 (s, 1C, NCH₂CH₂O), 33.6 (s, 1C, ArCMe₃), 31.2 (s, 3C, ArCMe₃).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + 4H]⁴⁺ calcd. for C₁₆₄H₂₂₈N₂₄O₄₄ 809.4080; found 809.4080.

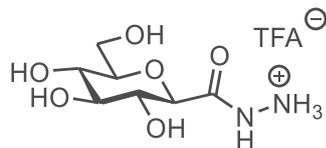
***N'*-Tert-butyloxycarbonyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl)-carboxyhydrazide III-4**

To a solution of (2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl)-carboxylic acid **III-3** (1.0 g, 1.6 mmol), HOBT (281 mg, 2.08 mmol) and EDC (323.1 mg, 2.08 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (100 mL) was added *tert*-butyl carbazate (275 mg, 2.08 mmol) and DIPEA (0.36 mL, 2.08 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. Water (100 mL) was added to the mixture and the product was extracted with CH₂Cl₂ (3×100 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 60:40) to afford **III-4** (993 mg, 84%) as a white amorphous solid which was not characterised and used like this in the next reaction.

R_f = 0.77 (cyclohexane/EtOAc 70:30).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 8.18 (bs, 1H, NH), 8.11-7.78 (m, 8H, H_{Ar}), 7.62-7.25 (m, 12H, H_{Ar}), 5.94 (pseudo t, *J* = 9.4, 9.4 Hz, 1H, H₃), 5.75-5.66 (m, 2H, H₂ + H₄), 4.71 (dd, *J* = 2.6, 12.4 Hz, 1H, H_{6a}), 4.51 (dd, *J* = 4.9, 12.4 Hz, 1H, H_{6b}), 4.43 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H₁), 4.23-4.16 (m, 1H, H₅), 1.42 (s, 9H CMe₃).

ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ 739.3.

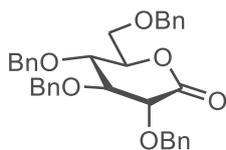
(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl)-carbahydrazidium trifluoroacetate salt III-1

To a solution of **III-4** (915 mg, 1.24 mmol) in MeOH (20 mL) was added NaOMe (120 mg, 2.23 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solvent was evaporated and the residue dissolved in water (15 mL). Then TFA (5 mL) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. The solvent was evaporated and the crude material was purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 40 μ m, gradient: 0% to 100% MeOH with H₂O + TFA over 30 minutes, Flow 18 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **III-1** (400 mg, 99%) as a white amorphous solid.

¹H NMR (300 MHz, D₂O): 5.90 (s, 1H, NH), 3.97 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H₁), 3.87 (dd, *J* = 2.0, 12.4 Hz, 1H, H_{6a}), 3.71 (dd, *J* = 5.0, 12.4 Hz, 1H, H_{6b}), 3.56-3.35 (m, 4H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅).

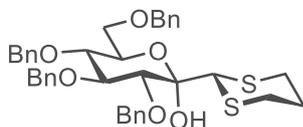
¹³C NMR (75 MHz, D₂O): 169.5 (s, 1C, CONH), 162.9 (q, *J* = 34.2 Hz, 1C, COCF₃), 116.3 (q, *J* = 291.2 Hz, 1C, COCF₃), 79.6 (s, 1C, C_{Glc}), 77.4 (s, 1C, C₁), 76.7 (s, 1C, C_{Glc}), 71.4 (s, 1C, C_{Glc}), 69.1 (s, 1C, C_{Glc}), 60.6 (s, 1C, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ calcd. for C₇H₁₅N₂O₆ 223.0925; found 223.0920.

2,3,4,6-tetra-*O*-Benzyl-gluconolactone III-6

To a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- β -D-glucofuranose **III-5** (5.0 g, 9.25 mmol) in anhydrous DMSO (15 mL) was added dropwise Ac₂O (10 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. Then, water (50 mL) was added to the reaction and the solution was stirred for one additional hour. The product was extracted with EtOAc (3×50 mL) and the combined organic layers were washed with water (3×40 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated to afford **III-6** (5.5 g) as colourless amorphous gum which was used without further purification.

R_f = 0.51 (cyclohexane/EtOAc 80:20).^[144]

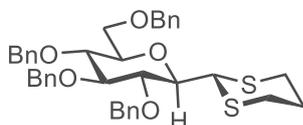
2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1-*C*-(1,3-dithiane-2-yl)-D-glucofuranose III-7

To a solution of 1,3-dithiane (516 mg, 4.29 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was added *n*-BuLi (2.5 M in hexane, 1.72 mL, 4.29 mmol) at -78°C and the mixture was stirred at -78°C under argon atmosphere for 15 minutes. Then, a solution of lactone **III-6** (2.1 g, 3.9 mmol) in THF (15 mL) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at 0°C for 3 h. The reaction was stopped by addition of saturated NH₄Cl (10 mL) and extracted with Et₂O (3×20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (toluene/EtOAc 95:5) to afford **III-7** (1.930 mg, 75% from **III-5**) as a colourless gum.

R_f = 0.25 (toluene/EtOAc 95:5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.38-7.15 (m, 20H, H_{Ar}), 4.98-4.84 (m, 4H, ArCH₂), 4.72-4.46 (m, 4H, ArCH₂), 4.35-4.27 (m, 2H), 4.15-4.03 (m, 2H), 3.73-3.59 (m, 4H), 3.48-3.29 (m, 2H), 2.25-2.21 (m, 2H), 2.04-1.82 (m, 2H).

¹H NMR data was in agreement with the literature.^[142]

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1-*C*-(1,3-dithiane-2-yl)- β -D-glucofuranose III-8

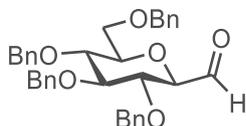
To a solution of **III-7** (933 mg, 1.42 mmol) in anhydrous MeCN/CH₂Cl₂ (50:50, 22 mL) was added dropwise Et₃SiH (2.27 mL, 14.2 mmol) at -40°C and the mixture was stirred at -40°C under argon atmosphere for 1 hour. Then BF₃•OEt₂ (1.40 mL, 11.36 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at -40°C for 2 h. The reaction was quenched with Et₃N (4.3 mL) and the mixture was diluted with CH₂Cl₂ (100 mL), washed with water (40 mL), 1M HCl (2×40 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:5) to afford **III-8** (640 mg, 70 %) as a colourless gum.

R_f = 0.45 (cyclohexane/EtOAc 90:10).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.40-7.17 (m, 20H, H_{Ar}), 4.98-4.79 (m, 4H, ArCH_2), 4.76-4.56 (m, 4H, ArCH_2), 4.05 (bs, 1H, H_1), 4.92-3.46 (m, 7H), 3.30-3.11 (m, 2H), 2.72-2.47 (m, 2H), 2.04-1.94 (m, 2H).

^1H NMR data was in agreement with the literature.^[142]

(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosyl)-acetaldehyde III-9



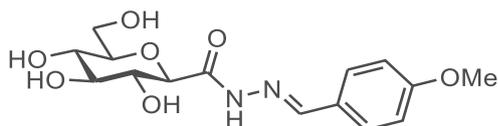
To a solution of **III-8** (550 mg, 0.86 mmol) in MeCN/ H_2O (5:1, 48 mL) was added MeI (1.1 mL, 17.2 mmol) and CaCO_3 (258 mg, 2.58 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 72 h. The solvent was evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc 90:10 then 80:20) to afford **III-9** (190 mg, 40%) as a colourless gum.

R_f = 0.11 (cyclohexane/EtOAc 80:20).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.29-7.06 (m, 20H, H_{Ar}), 4.85-4.69 (m, 4H, ArCH_2), 4.61-4.44 (m, 4H, ArCH_2), 3.79-3.52 (m, 6H), 3.50-3.42 (m, 1H, H_5).

^1H NMR data was in agreement with the literature.^[142]

2-(β -D-glucopyranosyl)-*N'*-(4-methoxybenzylidene)acetohydrazide III-10



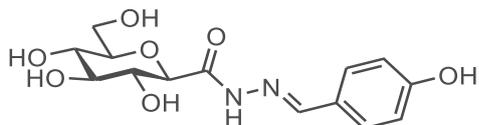
To a solution of **III-1** (110 mg, 0.33 mmol) in anhydrous MeOH (5 mL) was added *p*-anisaldehyde (40 μL , 0.33 mmol) and Et_3N (32 μL , 0.23 mmol) and the reaction was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. The solvent was evaporated and the residue purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μm , gradient: 10% to 100% MeCN with H_2O + TFA over 30 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **III-10** (18 mg, 16%) as a white amorphous solid.

Retention time: 3.21 minutes (**column A** and **gradient A**).

^1H NMR (400 MHz, D_2O): 8.23 (s, 1H, ArCHN), 7.78-7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 7.11-7.05 (m, 2H, H_{Ar}), 3.96 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_1), 3.93 (dd, J = 1.6, 12.4 Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{a}}$), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (dd, J = 4.9, 12.4 Hz, 1H, $\text{H}_{6\text{b}}$), 3.64 (pseudo t, J = 9.2, 9.2 Hz, 1H, H_2), 3.58 (pseudo t, J = 9.2, 9.2 Hz, 1H, H_3), 355-3.46 (m, 2H, $\text{H}_4 + \text{H}_5$).
 ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): 167.5 (s, 1C, CONH), 161.5 (s, 1C, $^{13}\text{C}_{\text{Ar}}$), 152.4 (s, 1C, ArCHN), 129.7 (s, 2C, C_{Ar}), 125.8 (s, 1C, $^{13}\text{C}_{\text{Ar}}$), 114.5 (s, 2C, C_{Ar}), 79.6 (s, 1C, C_5), 78.0 (s, 1C, C_1), 76.8 (s, 1C, C_3), 71.5 (s, 1C, C_2), 69.1 (s, 1C, C_4), 60.6 (s, 1C, C_6), 55.5 (s, 1C, OCH_3).

HR-ESI-MS (positive mode) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7$ 341.1343; found 341.1347.

2-(β -D-glucopyranosyl)-*N'*-(4-hydroxybenzylidene)acetohydrazide III-11



To a solution of **III-1** (110 mg, 0.33 mmol) in anhydrous MeOH (6 mL) was added *p*-hydroxybenzaldehyde (560.6, 5.0 mmol) and the reaction was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. The solvent was evaporated and the obtained solid dissolved in water and

washed with EtOAc (3×30 mL). The aqueous layer was collected, evaporated and the residue was purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μm, gradient: 5% to 100% MeCN with H₂O + TFA over 30 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **III-11** (23 mg, 21%) as a white amorphous solid.

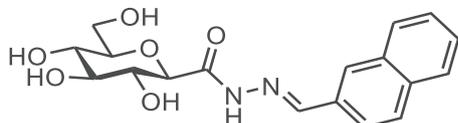
Retention time: 2.38 minutes (**column A** and **gradient A**).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): 8.12 (s, 1H, ArCHN), 7.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.96-3.89 (m, 2H, H₁ + H_{6a}), 3.79 (dd, *J* = 4.5, 12.5 Hz, 1H, H_{6b}), 3.65-3.45 (m, 4H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O): 167.2 (s, 1C, CONH), 159.9 (s, 1C, ¹³C_{Ar}), 152.4 (s, 1C, ArCHN), 130.0 (s, 2C, C_{Ar}), 124.9 (s, 1C, ¹³C_{Ar}), 115.9 (s, 2C, C_{Ar}), 79.6 (s, 1C, C₅), 77.8 (s, 1C, C₁), 76.8 (s, 1C, C₃), 71.5 (s, 1C, C₂), 69.0 (s, 1C, C₄), 60.6 (s, 1C, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ calcd. for C₁₄H₁₉N₂O₇ 327.1187; found 327.1175.

2-(β-D-glucopyranosyl)-N'-(2-naphthylidene)acetohydrazide **III-12**



To a solution of **III-1** (110 mg, 0.33 mmol) in anhydrous MeOH (12 mL) was added *p*-hydroxybenzaldehyde (781, 5.0 mmol) and the reaction was stirred at room temperature under argon atmosphere for 16 h. The solvent was evaporated and the obtained solid dissolved in water and washed with EtOAc (3×30 mL). The aqueous layer was collected, evaporated and the residue was purified by reverse phase C18 silica gel column chromatography (40g-cartridge, 20 μm, gradient: 10% to 100% MeCN with H₂O + TFA over 30 minutes, Flow 20 mL/min). Solvents and TFA were then removed under vacuum and a subsequent lyophilization afforded **III-12** (33 mg, 28%) as a white amorphous solid.

Retention time: 5.13 minutes (**column A** and **gradient A**).

¹H NMR (400 MHz, MeOD): 8.39 (s, 1H, ArCHN), 8.13-8.07 (m, 2H, H_{Ar}), 7.95-7.85 (m, 3H, H_{Ar}), 7.58-7.49 (m, 2H, H_{Ar}), 3.96-3.86 (m, 2H, H₁ + H_{6a}), 3.76 (dd, *J* = 4.6, 12.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.58 (pseudo t, *J* = 9.0, 9.0 Hz, 1H, H₂), 3.50-3.35 (m, 3H, H₃ + H₄ + H₅).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD): 169.2 (s, 1C, CONH), 151.3 (s, 1C, ArCHN), 136.1, 134.6, 133.0, 130.9, 129.7, 129.6, 128.9, 128.5, 127.8, 124.1 (10s, 10C, C_{Ar}), 82.0 (s, 1C, C₅), 79.5 (s, 1C, C₁), 79.2 (s, 1C, C₃), 73.6 (s, 1C, C₂), 70.8 (s, 1C, C₄), 62.5 (s, 1C, C₆).

HR-ESI-MS (positive mode) *m/z*: [M + H]⁺ calcd. for C₁₈H₂₁N₂O₆ 361.1394; found 361.1401.

IV.3. Dynamic combinatorial libraries

IV.3.1. Buffers

Buffer 1: Na-phosphate buffer 10 mM, pH = 7.2

Buffer 2: Ammonium formiate buffer 100 mM, pH = 6.5

IV.3.2. Reagent stock solution

Solution 1: 13 mM solution of hydrazide **III-1** in H₂O

Solution 2: 5 mM solution of aldehyde **Ar_H** in H₂O

- Solution 3:** 5 mM solution of aldehyde **Ar_{OH}** in H₂O
Solution 4: 5 mM solution of aldehyde **Ar_{OMe}** in H₂O
Solution 5: 5 mM solution of aldehyde **Ar_{Me}** in H₂O
Solution 6: 50 mM solution of aldehyde **Ar_{Nap}** in DMSO (HPLC grade)
Solution 7: 5 mM solution of aldehyde **Ar_{Thio}** in H₂O
Solution 8: 25 mM solution of aldehyde **Ar_{Ind}** in DMSO (HPLC grade)
Solution 9: 0.125 mM solution of rmGPb in **Buffer 2**

IV.3.3. Procedures

First library with 2h30 pre-equilibration:

Solution 1 (25 µL), solution 2 (100 µL), solution 3 (100 µL), solution 4 (100 µL), solution 5 (100 µL), solution 6 (10 µL) and 2-aminomethyl imidazole dihydrochloride (8.5 mg) were dissolved in buffer 2 (665 µL) and the pH of the solution was set to 6.9 by addition of NaOH 1M (60 µL). The solution was equilibrated at room temperature for 2h30 and two aliquots (250 µL each) of the solution were taken. In the first one (**reference**), buffer 2 (10 µL) was added and in the second one (**GP**), solution 9 (10 µL) was added and the libraries were equilibrated at room temperature for an additional 24 h before analysis.

These two libraries (**reference** and **GP**) were analysed by HPLC with the following procedure: a 80 µL aliquot was taken, the pH was adjusted to 8.5 by addition of NaOH 1M (2.5 µL) and the sample was analysed in HPLC with **column A** using **gradient A**.

First library without pre-equilibration:

Solution 1 (25 µL), solution 2 (100 µL), solution 3 (100 µL), solution 4 (100 µL), solution 5 (100 µL), solution 6 (10 µL) and 2-aminomethyl imidazole dihydrochloride (8.5 mg) were dissolved in buffer 2 (665 µL) and the pH of the solution was set to 6.9 by addition of NaOH 1M (60 µL). Two aliquots (250 µL each) of the solution were taken. In the first one (**reference**), buffer 2 (10 µL) were added and in the second one (**GP**), solution 9 (10µL) was added and the libraries were equilibrated at room temperature and followed by HPLC (2h30, 7h, 24h).

These two libraries (**reference** and **GP**) were analysed by HPLC with the following procedure: a sample of 80 µL was taken, the pH was raised to 8.5 by addition of NaOH 1M (2.5 µL) and the sample was analysed in HPLC with **column A** using **gradient A**.

Second library:

Solution 1 (25 µL), solution 3 (100 µL), solution 7 (100 µL), solution 8 (20 µL) and 2-aminomethyl imidazole dihydrochloride (8.5 mg) were dissolved in buffer 2 (755 µL) and the pH of the solution was set to 6.9 by addition of NaOH 1M (50 µL). Two aliquots (250 µL each) of the solution were taken. In the first one (**reference**), buffer 2 (10 µL) were added and in the second one (**GP**), solution 9 (10µL) was added and the libraries were equilibrated at room temperature for 24 h before analysis.

These two libraries (**reference** and **GP**) were analysed by HPLC with the following procedure: a sample of 80 µL was taken, the pH was raised to 8.5 by addition of NaOH 1M (2.5 µL) and the sample was analysed in HPLC with **column A** using **gradient A**.

IV.4. Inhibition assays

The inhibition assays were performed according the previously reported procedure by Prof Docsa.^[152] The inhibition data of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b by monosaccharide compounds

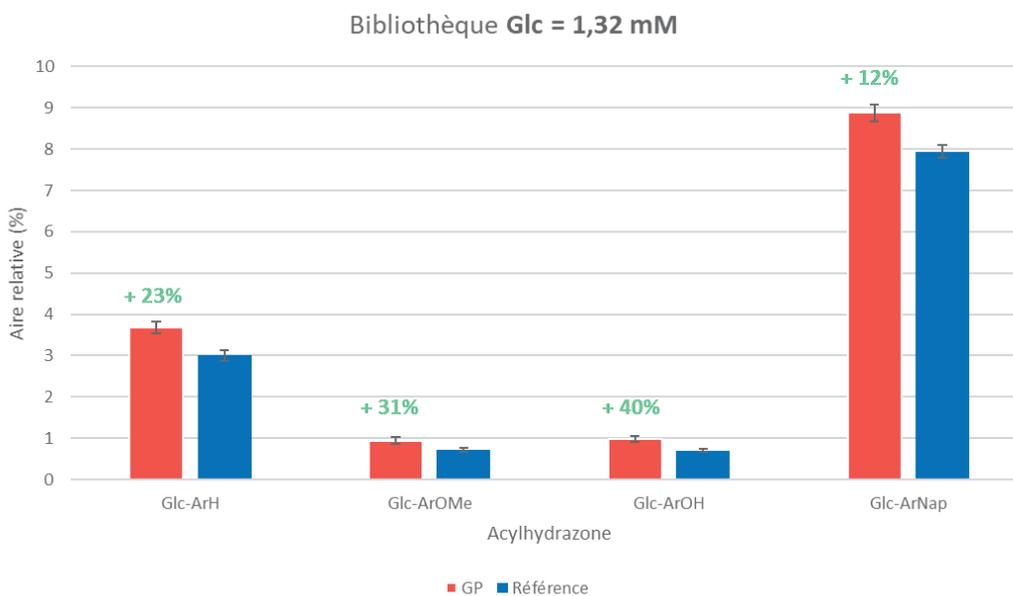
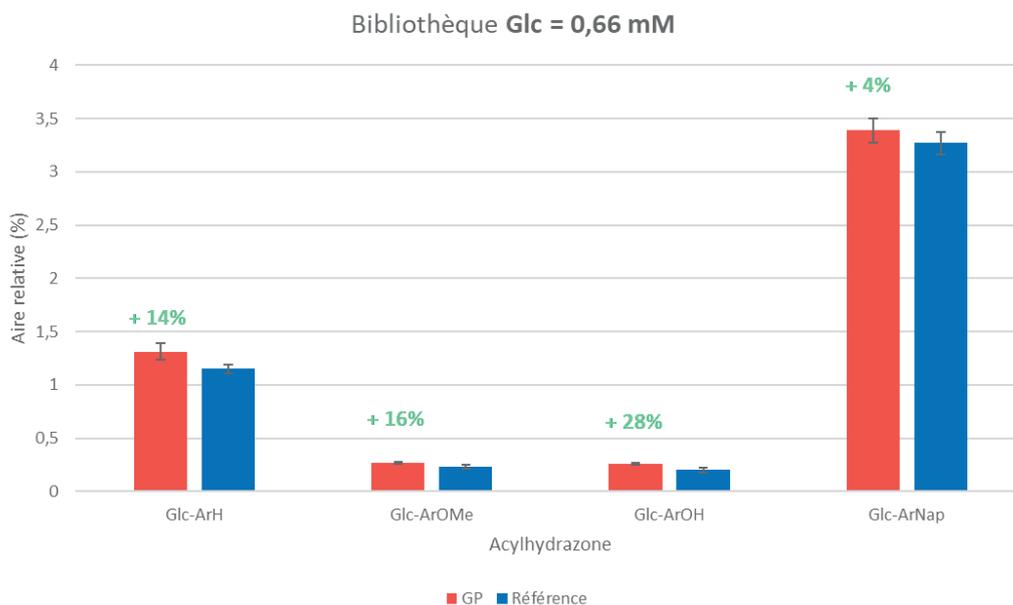
Experimental section

were collected using different concentrations of α -D-glucose-1-phosphate (4, 6, 8, 10, 12, and 14 mM) and constant concentrations of glycogen (1%, w/v) and AMP (1 mM). Compounds were dissolved in DMSO in a final concentration of 250 mM then diluted in a buffer for the phosphorylase inhibition assay so that the DMSO concentration would not be higher than 0.25%. Consequently, the highest inhibitor concentration applied was 625 μ M.

V. Annexes

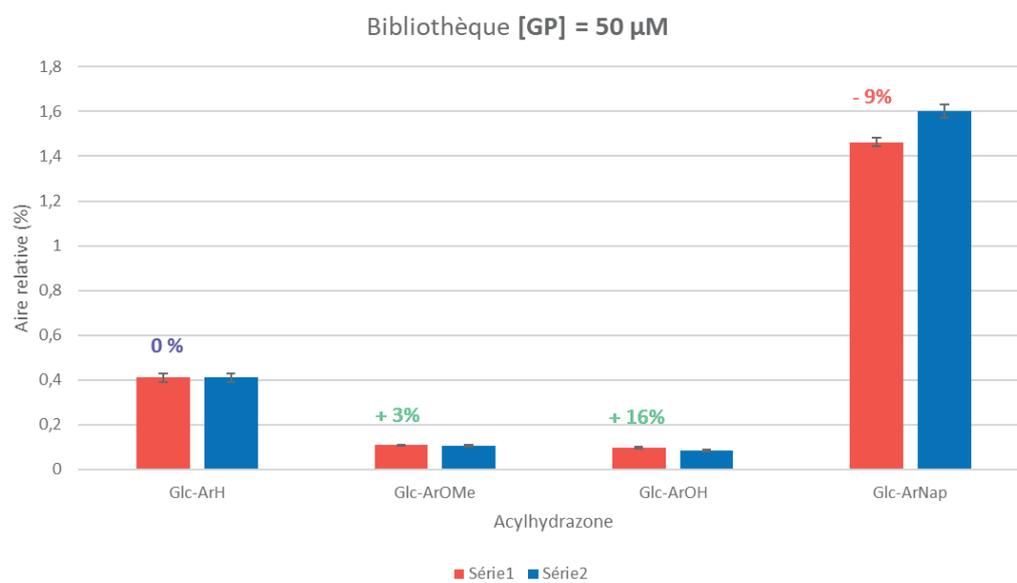
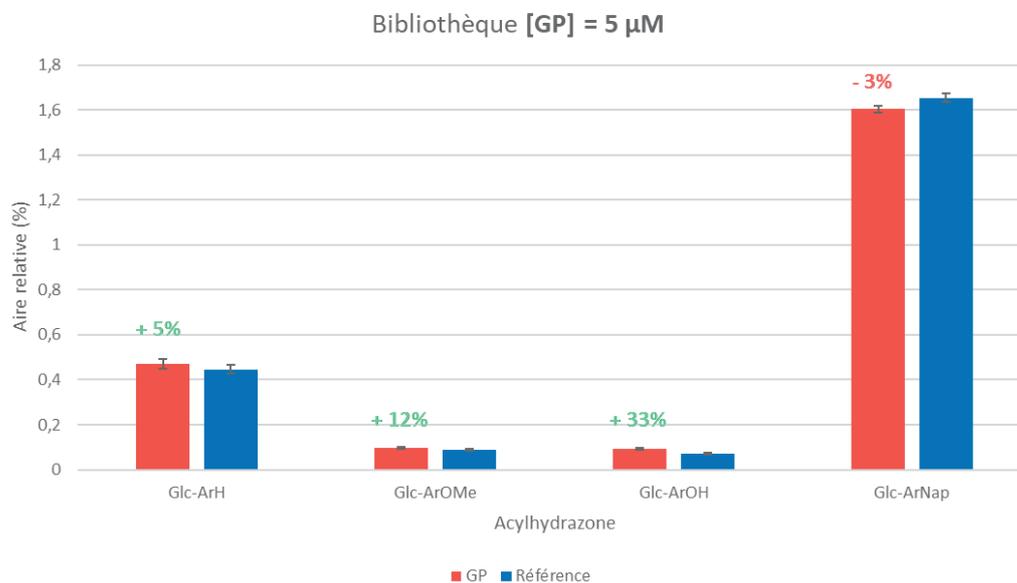
V.1. Etude de la quantité d'hydrazide Glc introduite

Représentation des histogrammes des bibliothèques réalisées dans les conditions suivantes : $[Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5$ mM, $[GP]=5$ μ M, tampon 2, 25°C.



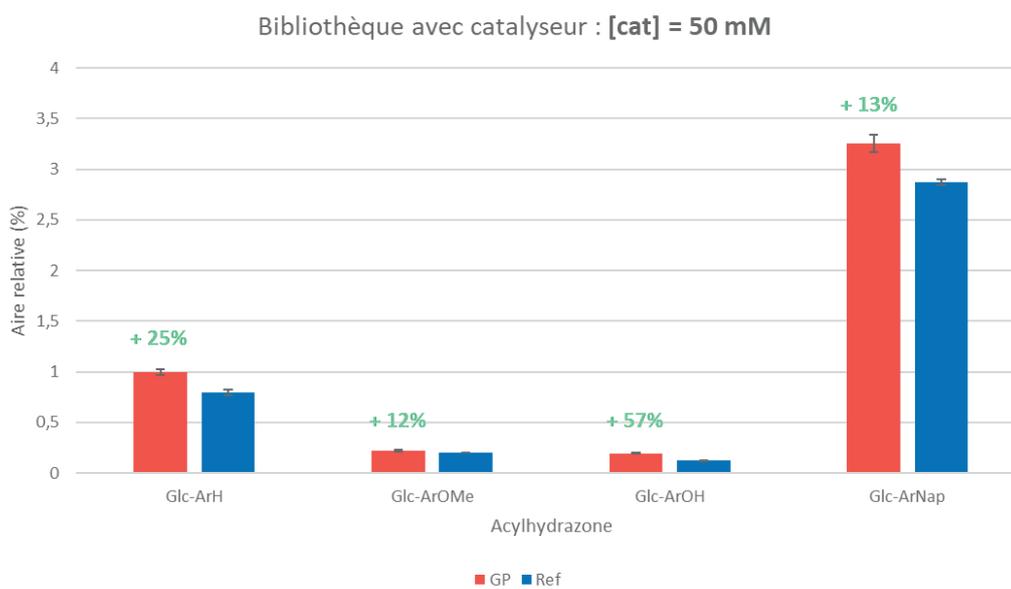
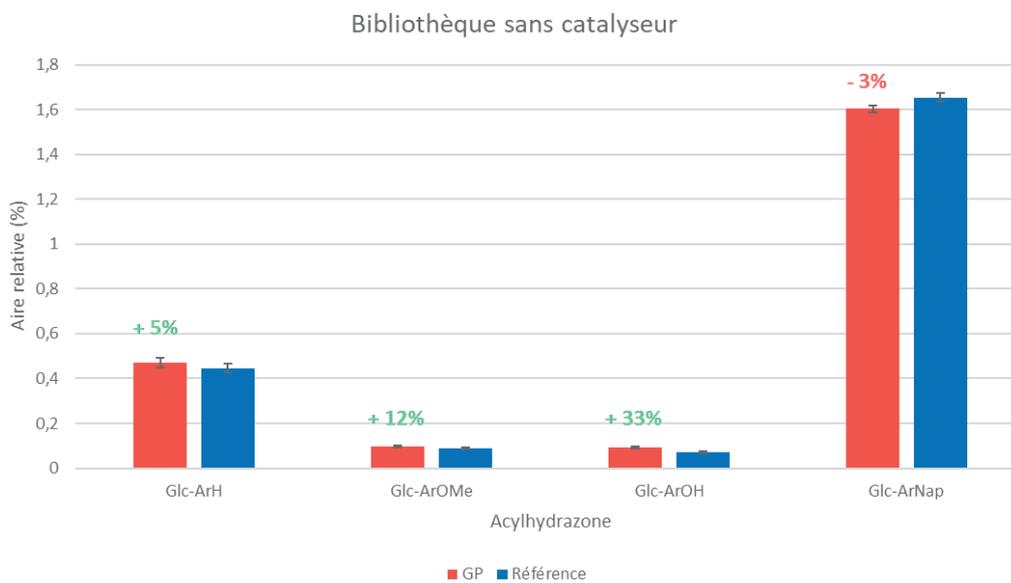
V.2. Etude de la quantité de protéine introduite

Représentation des histogrammes des bibliothèques réalisées dans les conditions suivantes :
 [Glc]=0,33 mM, [Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5 mM, tampon 2, 25°C.



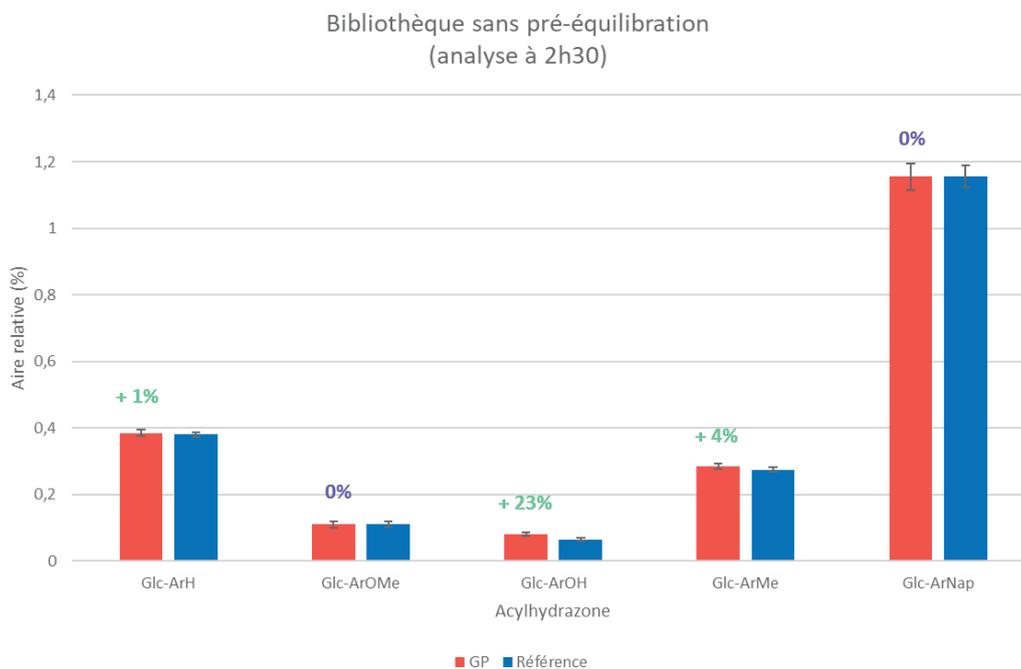
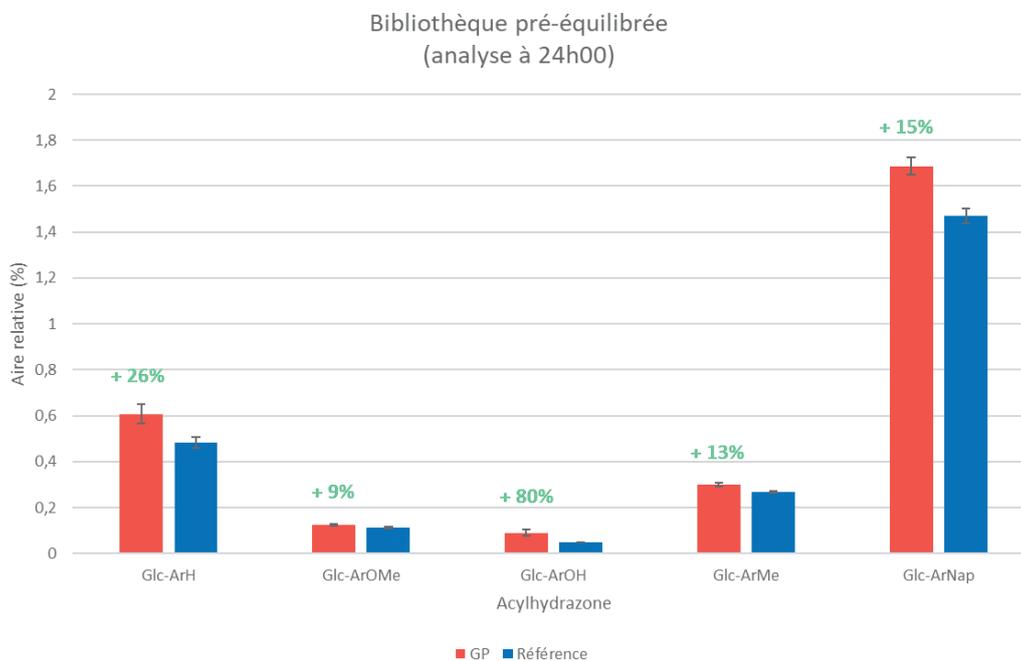
V.3. Etude de l'impact de la catalyse sur l'amplification

Représentation des histogrammes des bibliothèques réalisées dans les conditions suivantes : $[\text{Glc}] = 0,33 \text{ mM}$, $[\text{Ar}_\text{H}] = [\text{Ar}_\text{OH}] = [\text{Ar}_\text{OMe}] = [\text{Ar}_\text{Nap}] = 0,5 \text{ mM}$, $[\text{GP}] = 5 \mu\text{M}$, tampon 2, 25°C .



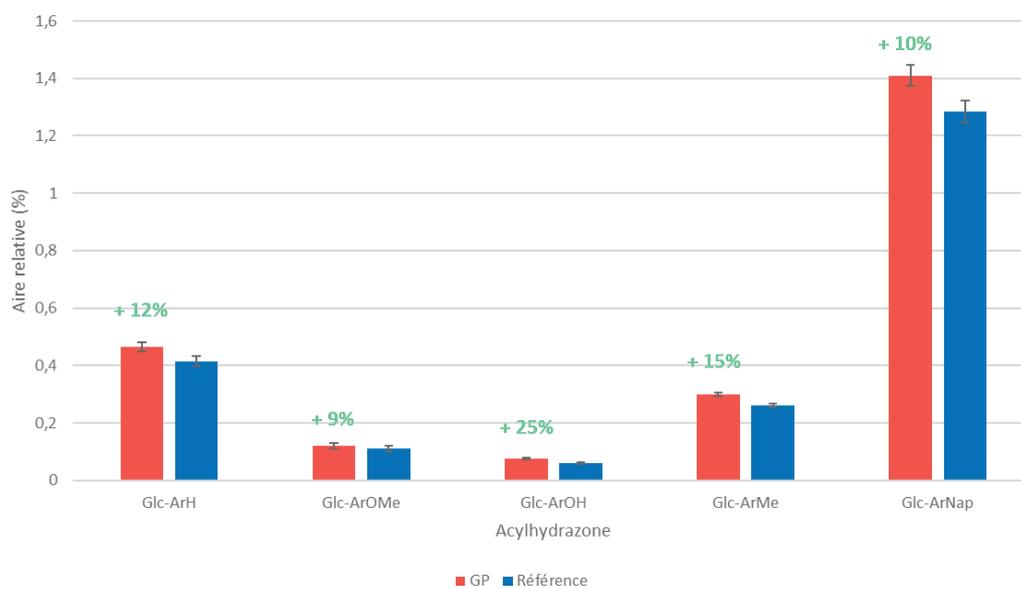
V.4. Réalisation de la première bibliothèque de CCD

Représentation des histogrammes des bibliothèques réalisées dans les conditions suivantes :
 $[Glc]=0,33$ mM, $[Ar_H]=[Ar_{OH}]=[Ar_{OMe}]=[Ar_{Nap}]=0,5$ mM, $[Cat]=50$ mM, $[GP]=5$ μ M, tampon 2, 25°C.

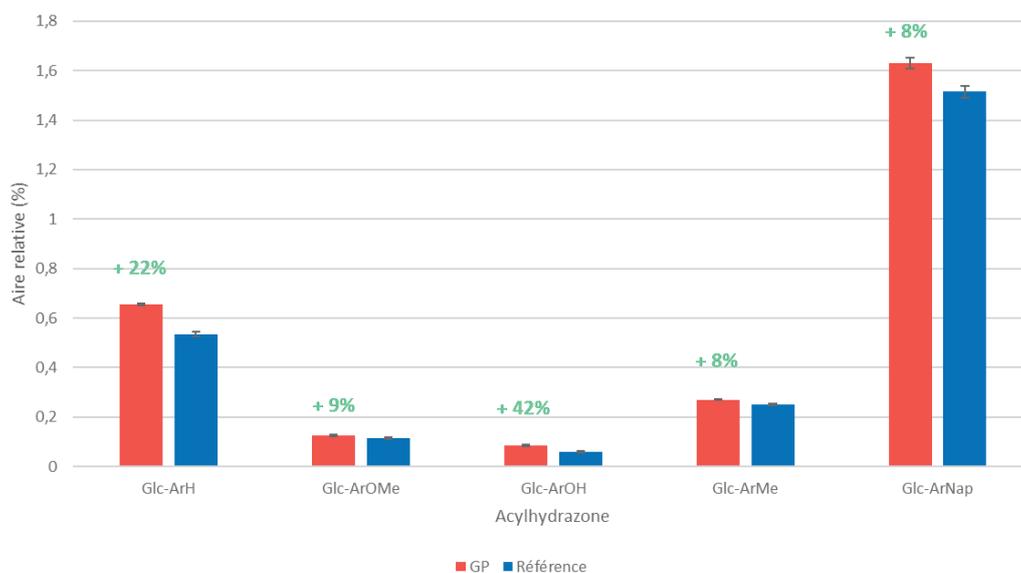


Annexes

Bibliothèque sans pré-équilibrage
(analyse à 7h00)

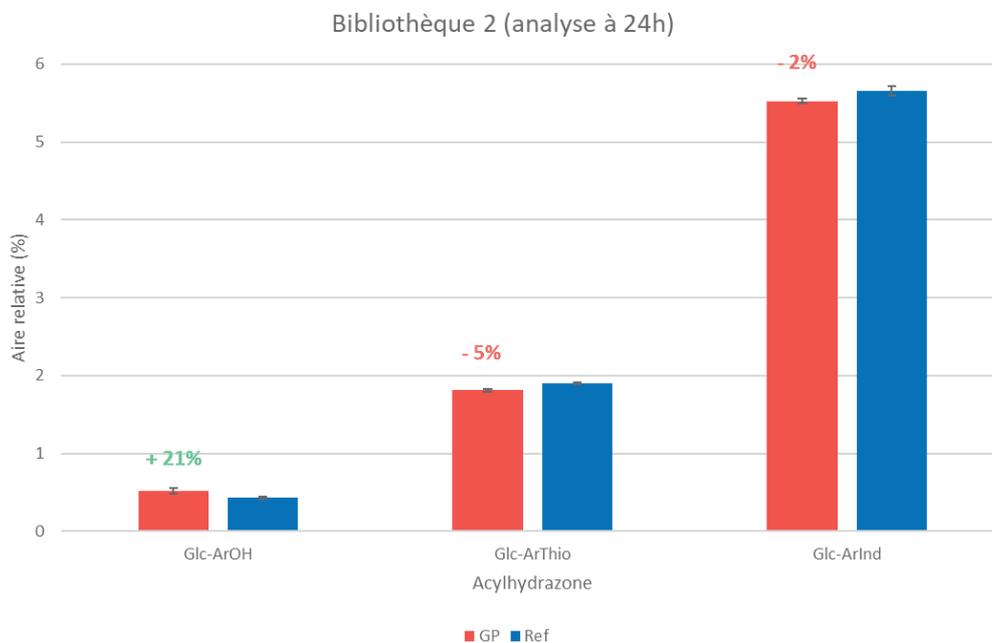


Bibliothèque sans pré-équilibrage
(analyse à 24h00)



V.5. Réalisation de la deuxième bibliothèque de CCD

Représentation des histogrammes des bibliothèques réalisées dans les conditions suivantes :
[Glc]=0,33 mM, [Ar_{OH}]=[Ar_{Thio}]=[Ar_{Ind}]=0,5 mM, [Cat]=50 mM, [GP]=5 μM, tampon 2, 25°C.



VI. Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes atlas*, **2019**.
- [2] S. I. Taylor, *Cell* **1999**, *97*, 9-12.
- [3] R. A. DeFronzo, *Diabetes* **1988**, *37*, 667-687.
- [4] R. A. DeFronzo, A. M. Goodman, *J. Med.* **1995**, *333*, 541-549.
- [5] A. Natali, E. Ferrannini, *Diabetologia* **2006**, *49*, 434-441.
- [6] H. S. Hundal, T. Ramlal, R. Reyes, L. A. Leiter, A. Klip, *Endocrinology* **1992**, *131*, 1165-1173.
- [7] C. R. Sirtori, C. Pasik, *Pharmacol. Res.* **1994**, *30*, 187-228.
- [8] J. Girard, *Diabetes Metab.* **2001**, *27*, 271-278.
- [9] J. F. Blickle, J. M. Brogard, *Diabetes Metab.* **1998**, *24*, 276-280.
- [10] J. C. Henquin, *Diabetologia* **1992**, *35*, 907-912.
- [11] D. J. Drucker, J. Philippe, S. Mojssov, W. L. Chick, J. F. Habener, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 3434-3438.
- [12] D. J. Drucker, *Cell Metab.* **2006**, *3*, 153-165.
- [13] R. Kela, K. Khunti, M. J. Davies, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11*, 951-959.
- [14] S. E. Inzucchi, D. K. McGuire, *Circulation* **2008**, *117*, 574-584.
- [15] K.-S. Song, S. H. Lee, M. J. Kim, H. J. Seo, J. Lee, S.-H. Lee, M. E. Jung, E.-J. Son, M. Lee, J. Kim, J. Lee, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 182-187.
- [16] N. Harada, N. Inagaki, *J. Diabetes Investig.* **2012**, *3*, 352-353.
- [17] T. Madaan, M. Akhtar, A. K. Najmi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *93*, 244-252.
- [18] É. Bokor, S. Kun, D. Goyard, M. Tóth, J.-P. Praly, S. Vidal, L. Somsák, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 1687-1764.
- [19] A. R. Aguillón, A. Mascarello, N. D. Segretti, H. F. Z. de Azevedo, C. R. W. Guimaraes, L. S. M. Miranda, R. O. M. A. de Souza, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 467-488.
- [20] L. N. Johnson, *FASEB* **1992**, *6*, 2274-2282.
- [21] E. G. Krebs, E. H. Fischer, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *20*, 150-157.
- [22] R. J. Fletterick, S. R. Sprang, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*.
- [23] N. G. Oikonomakos, V. T. Skamnaki, K. E. Tsitsanou, N. G. Gavalas, L. N. Johnson, *Structure* **2000**, *8*, 575-584.
- [24] J.-P. Changeux, *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 103-133.
- [25] K. E. Tsitsanou, V. T. Skamnaki, N. G. Oikonomakos, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *384*, 245-254.
- [26] S. E. Zographos, N. G. Oikonomakos, K. E. Tsitsanou, D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, V. T. Skamnaki, H. Bischoff, S. Goldmann, K. A. Watson, L. N. Johnson, *Structure* **1997**, *5*, 1413-1425.
- [27] M. Donnier-Maréchal, S. Vidal, *Exp. Opin. Ther. Patents* **2016**, *26*, 199-212.
- [28] N. Pinotsis, D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, N. G. Oikonomakos, I. M. Mavridis, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1914-1924.
- [29] L. N. Johnson, S. H. Hu, D. Barford, *Faraday Discuss.* **1992**, *93*, 131-142.
- [30] L. He, Y. Zhi Zhang, M. Tanoh, G.-R. Chen, J.-P. Praly, E. D. Chrysina, C. Tiraidis, M. Kosmopoulou, D. D. Leonidas, N. G. Oikonomakos, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 596-606.
- [31] K.-M. Alexacou, Y. Z. Zhang, J.-P. Praly, S. E. Zographos, E. D. Chrysina, N. G. Oikonomakos, D. D. Leonidas, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5125-5136.
- [32] É. Bokor, E. Kyriakis, T. G. A. Solovou, C. Koppány, A. L. Kantsadi, K. E. Szabó, A. Szakács, G. A. Stravodimos, T. Docsa, V. T. Skamnaki, S. E. Zographos, P. Gergely, D. D. Leonidas, L. Somsák, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 9251-9262.
- [33] É. Bokor, S. Kun, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsák, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1215-1219.
- [34] S. Kun, J. Begum, E. Kyriakis, E. C. V. Stamati, T. A. Barkas, E. Szennyes, É. Bokor, K. E. Szabó, G. A. Stravodimos, Á. Sipos, T. Docsa, P. Gergely, C. Moffatt, M. S. Patraskaki, M. C. Kokolaki, A. Gkerdi, V. T. Skamnaki, D. D. Leonidas, L. Somsák, J. M. Hayes, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *147*, 266-278.
- [35] J. P. Praly, S. Vidal, *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1102-1126.
- [36] M. Gregoriou, M. E. Noble, K. A. Watson, E. F. Garman, T. M. Krulle, C. de la Fuente, G. W. Fleet, N. G. Oikonomakos, L. N. Johnson, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 915-927.

Références bibliographiques

- [37] M. Benlifa, J. M. Hayes, S. Vidal, D. Gueyrard, P. G. Goekjian, J.-P. Praly, G. Kizilis, C. Tiraidis, K.-M. Alexacou, E. D. Chrysinia, S. E. Zographos, D. D. Leonidas, G. Archontis, N. G. Oikonomakos, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7368-7380.
- [38] J.-P. Praly, R. Faure, B. Joseph, L. Kiss, P. Rollin, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6559-6568.
- [39] D. Goyard, B. Kónya, A. S. Chajistamatiou, E. D. Chrysinia, J. Leroy, S. Balzarin, M. Tournier, D. Tusch, P. Petit, C. Duret, P. Maurel, L. Somsák, T. Docsa, P. Gergely, J.-P. Praly, J. Azay-Milhau, S. Vidal, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 444-454.
- [40] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- [41] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [42] J. C. Sacchettini, L. G. Baum, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3009-3015.
- [43] J. M. Gargano, T. Ngo, J. Y. Kim, D. W. K. Acheson, W. J. Lees, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12909-12910.
- [44] S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 525-561.
- [45] V. L. Rath, M. Ammirati, D. E. Danley, J. L. Ekstrom, E. M. Gibbs, T. R. Hynes, A. M. Mathiowetz, R. K. McPherson, T. V. Olson, J. L. Treadway, D. J. Hoover, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 677-682.
- [46] S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11616-11628.
- [47] T. K. Dam, T. A. Gerken, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3822-3827.
- [48] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- [49] D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966-979.
- [50] P. Compain, *Chem. Rec.* **2019**, *19*, 1-14.
- [51] G. T. Noble, F. L. Craven, J. Voglmeir, R. Šardžík, S. L. Flitsch, S. J. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13010-13017.
- [52] J. Diot, M. I. García-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357-363.
- [53] P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazeldard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.
- [54] C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.
- [55] S. Cecioni, O.-A. Argintaru, T. Docsa, P. Gergely, J.-P. Praly, S. Vidal, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 148-156.
- [56] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- [57] K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, A. J. Roecker, G. Q. Cao, S. Barluenga, H. J. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9939-9953.
- [58] K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G. Q. Cao, R. L. Affleck, J. E. Lillig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954-9967.
- [59] K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, S. Barluenga, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, G. Q. Cao, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9968-9976.
- [60] J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2455-2463.
- [61] Q. Ji, R. C. Lirag, O. Š. Miljanić, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1873-1884.
- [62] A. Herrmann, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1899-1933.
- [63] P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652-3711.
- [64] A. M. Hartman, R. M. Gierse, A. K. H. Hirsch, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 3581-3590.
- [65] B. Hasenknopf, J.-M. Lehn, N. Boumediene, A. Dupont-Gervais, A. Van Dorsselaer, B. Kneisel, D. Fenske, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10956-10962.
- [66] D. Larsen, M. Pittelkow, S. Karmakar, E. T. Kool, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 274-277.
- [67] O. Ramström, J.-M. Lehn, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 41-48.
- [68] O. Ramström, J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1*, 26-36.
- [69] P. Frei, L. Pang, M. Silbermann, D. Eriş, T. Mühlethaler, O. Schwardt, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 11570-11577.

Références bibliographiques

- [70] P. Frei, R. Hevey, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 60-73.
- [71] M. Mondal, A. K. H. Hirsch, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2455-2488.
- [72] I. Huc, J.-M. Lehn, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 2106-2110.
- [73] J. K. M. Sanders, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 2265-2274.
- [74] V. Berl, I. Huc, J.-M. Lehn, A. DeCian, J. Fischer, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3089-3094.
- [75] T. J. Hauke, G. Höfner, K. T. Wanner, *ChemMedChem* **2019**, *14*, 583-593.
- [76] D. Larsen, A. M. Kietrys, S. A. Clark, H. S. Park, A. Ekebergh, E. T. Kool, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 5252-5259.
- [77] Y. Zhou, I. Piergentili, J. Hong, M. P. van der Helm, M. Macchione, Y. Li, R. Eelkema, S. Luo, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 6035-6040.
- [78] G. R. L. Cousins, S.-A. Poulsen, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1999**, 1575-1576.
- [79] R. L. E. Furlan, Y.-F. Ng, S. Otto, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8876-8877.
- [80] J. Liu, K. R. West, C. R. Bondy, J. K. M. Sanders, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 778-786.
- [81] V. T. Bhat, A. M. Caniard, T. Luksch, R. Brenk, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490-497.
- [82] J. Fu, H. Fu, M. Dieu, I. Halloum, L. Kremer, Y. Xia, W. Pan, S. P. Vincent, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 10632-10635.
- [83] P. García, V. L. Alonso, E. Serra, A. M. Escalante, R. L. E. Furlan, *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 1002-1006.
- [84] F. Pan, M. Jackson, Y. Ma, M. McNeil, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 3991-3998.
- [85] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.
- [86] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W252-W258.
- [87] D. Case, D. S. Cerutti, T. Cheatham, T. Darden, R. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. Götz, D. Greene, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T.-S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, P. A. Kollman, *Amber 2017, University of California, San Francisco*, **2017**.
- [88] J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696-3713.
- [89] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
- [90] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, P. A. Kollman, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
- [91] R. W. Myers, Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **1984**, *132*, 61-82.
- [92] S.-C. Áts, E. Lausberg, J. Lehmann, K. Sandhoff, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, *1990*, 1261-1264.
- [93] T. V. RajanBabu, G. S. Reddy, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5458-5461.
- [94] D. Gueyraud, R. Haddoub, A. Salem, N. S. Bacar, P. G. Goekjian, *Synlett* **2005**, *2005*, 520-522.
- [95] M. Benlifa, S. Vidal, D. Gueyraud, P. G. Goekjian, M. Msaddek, J.-P. Praly, *Tetrahedron. Lett.* **2006**, *47*, 6143-6147.
- [96] K. Omura, D. Swern, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660.
- [97] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
- [98] K. E. Harding, L. M. May, K. F. Dick, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1664-1665.
- [99] E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2647-2650.
- [100] J. D. Albright, L. Goldman, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1107-1110.
- [101] G. Wittig, U. Schöllkopf, *Chem. Ber.* **1954**, *87*, 1318-1330.
- [102] C. Taillefumier, Y. Chapleur, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 263-292.
- [103] M. Lakhri, Y. Chapleur, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5752-5757.
- [104] W. B. Motherwell, M. J. Tozer, B. C. Ross, *Chem. Commun.* **1989**, 1437-1439.
- [105] J. Młynarski, A. Banaszek, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5425-5428.
- [106] D. Gueyraud, P. Fontaine, P. G. Goekjian, *Synthesis* **2006**, *2006*, 1499-1503.
- [107] B. Bourdon, M. Corbet, P. Fontaine, P. G. Goekjian, D. Gueyraud, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 747-749.
- [108] F. N. Tebbe, G. W. Parshall, G. S. Reddy, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3611-3613.

Références bibliographiques

- [109] H. Woodward, N. Smith, T. Gallagher, *Synlett* **2010**, 2010, 869-872.
- [110] M. J. Cook, D. W. Fleming, T. Gallagher, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 297-300.
- [111] O. R. Martin, F. Xie, *Carbohydr. Res.* **1994**, 264, 141-146.
- [112] W.-B. Yang, Y.-Y. Yang, Y.-F. Gu, S.-H. Wang, C.-C. Chang, C.-H. Lin, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3773-3782.
- [113] F. K. Griffin, P. V. Murphy, D. E. Paterson, R. J. K. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8179-8182.
- [114] P. S. Belica, R. W. Franck, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8225-8228.
- [115] M. Tóth, L. Somsák, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 942-943.
- [116] M. Tóth, K. E. Kövér, A. Bényei, L. Somsák, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 4039-4046.
- [117] S. Lee, J. P. N. Rosazza, *Org. Lett.* **2004**, 6, 365-368.
- [118] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800.
- [119] H. Liang, K. E. DeMeester, C.-W. Hou, M. A. Parent, J. L. Caplan, C. L. Grimes, *Nat. Commun.* **2017**, 8, 15015-15025.
- [120] C. J. M. Frédéric, J. Cornil, M. Vandamme, L. Dumitrescu, A. Tikad, R. Robiette, S. P. Vincent, *Org. Lett.* **2018**, 20, 6769-6773.
- [121] Y. Lin, Y. Li, X. Wang, T. Gong, L. Zhang, X. Sun, *J. Controlled Release* **2013**, 167, 148-156.
- [122] M. Virlovet, M. Gartner, K. Koroniak, J. P. Sleeman, S. Bräse, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 2657-2662.
- [123] A. S. Rowan, N. I. Nicely, N. Cochrane, W. A. Wlassoff, A. Claiborne, C. J. Hamilton, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4029-4036.
- [124] J. N. BeMiller, V. J. Blazis, R. W. Myers, *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, 9, 38-57.
- [125] D. P. G. Emmerson, R. Villard, C. Mugnaini, A. Batsanov, J. A. K. Howard, W. P. Hems, R. P. Tooze, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3826-3838.
- [126] H. Takeuchi, Y. Fujimori, Y. Ueda, H. Shibayama, M. Nagaishi, T. Yoshimura, T. Sasamori, N. Tokitoh, T. Furuta, T. Kawabata, *Org. Lett.* **2020**, 22, 4754-4759.
- [127] C. Devigny, F. Perez-Balderas, B. Hoogeland, S. Cuboni, R. Wachtel, C. P. Mauch, K. J. Webb, J. M. Deussing, F. Hausch, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8927-8933.
- [128] C. A. DeForest, D. A. Tirrell, *Nature Mater.* **2015**, 14, 523-531.
- [129] J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, 20, 140-177.
- [130] R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 613-628.
- [131] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [132] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [133] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952-3015.
- [134] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, 340, 457-460.
- [135] M. L. Gening, D. V. Titov, S. Cecioni, A. Audfray, A. G. Gerbst, Y. E. Tsvetkov, V. B. Krylov, A. Imberty, N. E. Nifantiev, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 9272-9285.
- [136] S. Cecioni, R. Lalor, B. Blanchard, J.-P. Praly, A. Imberty, S. E. Matthews, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 13232-13240.
- [137] S. E. Matthews, S. Cecioni, J. E. O'Brien, C. J. MacDonald, D. L. Hughes, G. A. Jones, S. H. Ashworth, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 4436-4444.
- [138] D. Zhang, J. Wang, T. R. Lawson, R. A. Bartsch, *Tetrahedron* **2007**, 63, 5076-5082.
- [139] T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11, 1901-1904.
- [140] L. Somsák, N. Felföldi, B. Kónya, C. Hüse, K. Telepó, É. Bokor, K. Czifrák, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 2083-2093.
- [141] K. Czifrák, P. Szilágyi, L. Somsák, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 127-141.
- [142] M. E. L. Sánchez, V. Michelet, I. Besnier, J. P. Genêt, *Synlett* **1994**, 1994, 705-708.
- [143] F. Labégère, J.-P. Lavergne, J. Martinez, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7271-7272.
- [144] L.-T. Li, L.-F. Zhou, Y.-J. Li, J. Huang, R.-H. Liu, B. Wang, P. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 642-644.

Références bibliographiques

- [145] M. Imamura, K. Nakanishi, T. Suzuki, K. Ikegai, R. Shiraki, T. Ogiyama, T. Murakami, E. Kurosaki, A. Noda, Y. Kobayashi, M. Yokota, T. Koide, K. Kosakai, Y. Ohkura, M. Takeuchi, H. Tomiyama, M. Ohta, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3263-3279.
- [146] A. M. Hartman, W. A. M. Elgaher, N. Hertrich, S. A. Andrei, C. Ottmann, A. K. H. Hirsch, *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1041-1046.
- [147] A. M. Hartman, V. R. Jumde, W. A. M. Elgaher, E. M. Te Poele, L. Dijkhuizen, A. K. H. Hirsch, *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1-12.
- [148] M. Mondal, N. Radeva, H. Fanlo-Virgós, S. Otto, G. Klebe, A. K. H. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9422-9426.
- [149] B. Buchs, W. Fieber, F. Vigouroux-Elie, N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn, A. Herrmann, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2906-2919.
- [150] L. A. Baltina, Y.-T. Tasi, S.-H. Huang, H.-C. Lai, L. A. Baltina, S. F. Petrova, M. S. Yunusov, C.-W. Lin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126645.
- [151] J. Becher, I. Seidel, W. Plass, D. Klemm, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5675-5681.
- [152] M. Benltifa, S. Vidal, B. Fenet, M. Msaddek, P. G. Goekjian, J.-P. Praly, A. Brunyánszki, T. Docsa, P. Gergely, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4242-4256.

Conclusion Générale

Cette étude décrit l'utilisation de deux approches différentes pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de la glycogène phosphorylase. La première approche repose sur l'élaboration et la synthèse de composés multivalents pour essayer d'améliorer l'inhibition de l'enzyme. La seconde approche emploie le concept de la chimie combinatoire dynamique appliquée à la GP pour la découverte de nouveaux inhibiteurs.

Dans une première partie, nous avons étudié la conception de glycoclusters construits à partir d'un cœur multivalent de type calixarène sur lequel est attaché un bras espaceur qui est relié à une unité glucosidique reconnue par le site catalytique de la GP. Trois inhibiteurs glucosidiques sont sélectionnés pour effectuer la synthèse de ces plateformes. L'un d'entre eux, une glucosamine imidazole, est un inhibiteur connu de la GP. Les deux autres sont les dérivés glucosamines d'inhibiteurs de type spiroisoxazolines reportés lors de précédentes études au laboratoire.

La synthèse de ces dérivés glucosamines représente donc le premier challenge de cette étude. Elle est effectuée à partir d'un *exo*-glucal qui peut être obtenu de deux façons différentes : l'oléfination de la lactone correspondante ou le passage par une tosylhydrazone. Les deux chemins réactionnels ont été explorés et n'ont pas permis d'obtenir la spiroisoxazoline désirée. Dans le premier cas, la formation de la lactone en série glucosamine a engendré des complications et l'*exo*-glucal n'a pas été obtenu. L'utilisation de la deuxième méthode permet de synthétiser l'*exo*-glucal et la spiroisoxazoline voulue. Cependant, des problèmes rencontrés lors de la déprotection empêchent l'obtention du produit final. Nous proposons alors une voie de synthèse qui permettrait de synthétiser le composé désiré, donnant accès aux plateformes multivalentes correspondantes.

Finalement, deux glycoclusters présentant la glucosamine imidazole sont tout de même synthétisés. Les premiers résultats de l'évaluation biologique ne montrent cependant pas d'effet multivalent lors de l'inhibition de la GP. Toutefois, nous sommes en attente d'autres analyses qui nous permettraient d'obtenir plus d'informations et de conclure définitivement.

La deuxième partie de cette thèse décrit la mise en place d'une étude par chimie combinatoire dynamique permettant la découverte de nouveaux inhibiteurs de la GP. Cette étude se base sur la réalisation de bibliothèques d'acylhydrazones à base de glucose. Nous avons donc réalisé la synthèse d'un dérivé hydrazide du glucose, que nous avons mis en réaction avec plusieurs aldéhydes aromatiques pour générer la bibliothèque d'acylhydrazones correspondante. Après avoir étudié et défini des conditions opératoires robustes pour la mise en place de notre expérience, l'introduction de la GP dans la bibliothèque permet d'influencer l'équilibre et de classer les différentes acylhydrazones en fonction de leur affinité.

Dans un second temps, nous avons réalisé la synthèse de ces acylhydrazones afin de vérifier par un test d'inhibition (IC_{50}) le classement précédemment établi. Les premiers résultats des mesures d'inhibition ont montré un classement des affinités similaire à celui obtenu par CCD, ce qui indiquerait la validité de l'outil que nous avons développé. Toutefois, nous sommes en train d'étudier ces interactions par ITC afin de confirmer les résultats obtenus.

Inhibiteurs glucosidiques de la glycogène phosphorylase : vers une approche multivalente et dynamique

La Glycogène Phosphorylase (GP) est une enzyme qui intervient dans la régulation de la glycémie. Chez les patients atteints du diabète de type 2, la GP est donc une cible thérapeutique. Le site catalytique de la GP est ciblé par des analogues du glucose et de nombreux inhibiteurs ont été synthétisés au laboratoire. Dans ce projet, nous avons envisagé de nouveaux inhibiteurs en employant deux stratégies distinctes : (1) la conception et la synthèse de composés multivalents, et (2) l'emploi de la chimie combinatoire dynamique (CCD) pour l'identification rapide de nouveaux inhibiteurs.

Pour cela, des glycoclusters multivalents ont été conçus *in silico* puis synthétisés. Deux 2-amino-glucosides ont été étudiés en série C-glucosyl-imidazole et glucosyl-spiroisoxazoline et conjugués au cœur multivalent calixarène. Les premières évaluations biologiques de ces glycoclusters ne montrent pas d'effet multivalent mais nous sommes actuellement en attente de plus de résultats pour statuer définitivement sur notre étude.

La CCD utilise des briques moléculaires qui s'associent via des liaisons covalentes réversibles pour générer à l'équilibre thermodynamique une bibliothèque de composés. Nous avons appliqué ce principe avec une brique de glucosyl-hydrazide modifié pour d'obtenir une bibliothèque d'acylhydrazones. L'introduction de la GP dans ces bibliothèques en équilibre permet de classer les différentes espèces de la bibliothèque en fonction de leur affinité pour la GP. La synthèse et l'évaluation biologique de ces composés nous a permis de vérifier le classement obtenu par l'expérience.

Mots-clés : Glycogène phosphorylase, Multivalence, Chimie combinatoire dynamique, Glycochimie, Acylhydrazone, Olefination, C-glycosides.

Glucose based inhibitors of glycogen phosphorylase: toward a multivalent and dynamic approach

Glycogen Phosphorylase (GP) is an enzyme involved in the regulation of glycemia and therefore is a therapeutic target in the context of type 2 diabetes. The catalytic site of GP is targeted by glucose analogues and many inhibitors have been synthesized in the laboratory. In this project, we proposed novel inhibitors by employing two distinct strategies: (1) the design and synthesis of multivalent compounds, and (2) the design of dynamic combinatorial libraries (DCLs) for the rapid identification of novel inhibitors.

Multivalent glycoclusters were designed *in silico* and then synthesized. Two 2-amino-glucosides were studied in C-glucosyl-imidazole and glucosyl-spiroisoxazoline series and conjugated to a multivalent calixarene core. Preliminary biological evaluations of these glycoclusters did not show any multivalent effect but we are currently investigating further the binding properties of these multivalent species.

DCLs are composed of molecular building blocks that self-condense via reversible covalent bonds to generate a library of compounds at thermodynamic equilibrium. We applied this principle to a modified glucosyl hydrazide to obtain acylhydrazones libraries. The introduction of GP into these equilibrating libraries provides a ranking of the different species according to their affinity for GP. The synthesis and biological evaluation of these compounds allowed us to verify the ranking obtained by our experimental study.

Keywords: Glycogen phosphorylase, Multivalency, Dynamic combinatorial chemistry, Carbohydrate chemistry, Acylhydrazone, Olefination, C-glycosides.