



**HAL**  
open science

# Synthèse de nouveaux analogues C-glycosidiques d'alpha-galactosylcéramides : couplage des glycolipides à des anticorps spécifiques

Florian Rouzier

► **To cite this version:**

Florian Rouzier. Synthèse de nouveaux analogues C-glycosidiques d'alpha-galactosylcéramides : couplage des glycolipides à des anticorps spécifiques. Chimie organique. Le Mans Université, 2018. Français. NNT : 2018LEMA1027 . tel-04401886

**HAL Id: tel-04401886**

**<https://theses.hal.science/tel-04401886>**

Submitted on 18 Jan 2024

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

**LE MANS UNIVERSITE**  
**COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE**

ECOLE DOCTORALE N° 596  
*Matière Molécules et Matériaux*  
Spécialité : « *(Chimie Moléculaire et Macromoléculaire)* »

Par

**Florian ROUZIER**

## **Synthèse de nouveaux analogues C-glycosidiques d' $\alpha$ -galactosylcéramides - Couplage des glycolipides à un agent ciblant**

Thèse présentée et soutenue à Le Mans, le 3 décembre 2018

Unités de recherche : a) CEISAM UMR-CNRS 6230, Université de Nantes, Faculté des Sciences et Techniques, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes. b) IMMM UMR-CNRS 6283, Le Mans-Université - UFR Sciences et Techniques, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans.

Thèse N° : 2018LEMA1027

### **Rapporteurs avant soutenance**

Nadège LUBIN-GERMAIN  
Professeure, Université de  
Cergy-Pontoise  
Xavier PANNECOUCKE  
Professeur, INSA Rouen

### **Composition du Jury :**

Nadège LUBIN-GERMAIN  
Professeure, Université de Cergy-  
Pontoise  
Xavier PANNECOUCKE  
Professeur, INSA Rouen

Présidente  
Sandrine PY

Laurent LEGENTIL

Directeur de thèse  
Stéphane GUILLARME

Co-directeur de thèse  
Muriel PIPELIER

### **Invité(s)**

Arnaud NOURRY

Arnaud TESSIER

Directrice de recherche CNRS,  
Université Grenoble Alpes  
Chargé de recherche CNRS,  
ENSC Rennes

Maître de Conférences HDR, Le  
Mans-Université

Maître de conférences HDR,  
Université de Nantes

Maître de Conférences, Le Mans-  
Université  
Chargé de recherche CNRS,  
Université de Nantes

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : acétyle	éq : équivalent
ADN : acide désoxyribonucléique	EP : éther de pétrole
AGLs : agélasphines	Et : éthyle
AL : acide de Lewis	Gln : glutamine
Ar : aryle	Glu : acide glutamique
Arg : arginine	Gly : glycine
aro : aromatique	h : heure(s)
Asp : acide aspartique	HO : orbitale moléculaire la plus haute occupée
Bn : benzyle	HRMS : spectrométrie de masse haute résolution
Boc : <i>tert</i> -butyloxycarbonyle	Hz : hertz
BV : orbitale moléculaire la plus basse vacante	IFN : interféron
Cbz : carboxybenzyle	IL : interleukine
CCM : chromatographie sur couche mince	j : jour(s)
CDI : 1,1'-carbonyldiimidazole	Lys : lysine
Cp : cyclopentadiényle	<i>m</i> -CPBA : acide <i>m</i> -chloroperbenzoïque
DABCO : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane	Me : méthyle
DACH : 1,2-diaminocyclohexane	min : minute(s)
DAST : diéthylaminosulfur trifluorure	m.o. : micro-onde
DCC : dicyclohexylcarbodiimide	mol : mole(s)
DCM : dichlorométhane	Ms : méthylsulfonyle
DIEA : <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	NBS : <i>N</i> -bromosuccinimide
DMAP : 4- <i>N,N</i> -diméthylaminopyridine	<i>n</i> -Bu : <i>n</i> -butyle
DMF : diméthylformamide	NFSI : <i>N</i> -fluorobenzènesulfonimide
DMSO : diméthylsulfoxyde	NMM : <i>N</i> -méthylmorpholine
DPPA : azoture de diphenylphosphoryle	NOESY : nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
EDCI : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide	

Ph : phényle

Phe : phénylalanine

Piv : pivaloyle

PMB : *para*-méthoxybenzyle

Pyr : pyridine

Rdt : rendement

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAR : relation structure-activité

Ser : sérine

T : température

t : temps réactionnel

t.a. : température ambiante

*tert*-Bu : *tert*-butyle

TBAF : fluorure de tétrabutylammonium

TBAI : iodure de tétrabutylammonium

TBDPS : *tert*-butyldiphénylesilyle

TBS : *tert*-butyldiméthylesilyle

Tf : triflate

TFA : acide trifluoroacétique

TFAA : anhydride trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TM : tamis moléculaire

TMS : triméthylesilyle

TMSCl : chlorure de triméthylesilyle

TMSI : iodure de triméthylesilyle

UHP : peroxyde de carbamide

## Sommaire

Introduction générale.....	1
Contexte .....	6
I - Le KRN7000 et son mode d'action .....	6
I-1. Découverte du KRN 7000.....	6
I-2. Interactions moléculaires et propriétés biologiques du KRN7000 .....	7
a) Le complexe KRN7000/CD1d .....	7
b) Le complexe ternaire TCR/KRN7000/CD1d.....	8
c) La production de cytokines .....	10
I-3. Limites du KRN7000.....	11
II - Relation structure-activité des $\alpha$ -galactosylcéramides.....	12
II-1. Modifications structurales du cycle pyranosique .....	13
a) Nature du sucre.....	13
b) Modification de la position 2'' du galactose.....	14
c) Modification de la position 3'' du galactose.....	14
d) Modification de la position 4'' du galactose.....	15
e) Modification de la position 6'' du galactose.....	16
f) Modification de l'oxygène pyranique.....	17
II-2. Modification de la position anomérique.....	18
a) L' $\alpha$ -C-GalCer.....	18
b) Analogues insaturés .....	19
c) L' $\alpha$ -S-GalCer .....	20
II-3. Modification de la partie polaire .....	20
II-4. Modification des chaînes lipidiques .....	23
a) Analogues avec un profil Th1 .....	23
b) Analogues avec un profil Th2.....	23
II-5. Bilan sur l'activité des analogues du KRN7000.....	24
PARTIE A .....	25
Chapitre I.....	25
I - Travaux du laboratoire.....	25
I-1. L'analogue 4-désoxy du KRN7000 .....	25
I-2. Analogues fluorés du KRN7000.....	27
a) Le 3-fluoro-3,4-didéoxy-KRN7000 .....	27

b) Le 3,3-difluoro-3,4-didésoxy-KRN7000 .....	27
I-3. Encapsulation du KRN7000 dans les liposomes .....	28
II - Concept « Antibody-Drug Conjugate » (ADC).....	30
II.1. Rappels sur les anticorps monoclonaux.....	30
II.2. Elaboration des ADCs .....	31
a) Les espaceurs non clivables .....	32
b) Les espaceurs clivables .....	33
III - Présentation des travaux.....	37
Chapitre II - Résultats et discussions.....	39
I - Synthèse du GalCer-6''-OH 65 .....	39
I-1. Synthèse des synthons communs aux deux stratégies .....	40
a) Préparation du fluorogalactosyle 71 .....	40
b) Préparation de la phytosphingosine 5b .....	42
I-2. Vers la synthèse GalCer-6''-OH suivant la voie 1 .....	42
a) La O-glycosylation appliquée aux analogues du KRN7000 dans la littérature.....	44
b) Synthèse de l' $\alpha$ -galactosylsphingosine.....	46
I-3. Accès au GalCer-6''-OH 65 .....	47
a) Généralités sur la N-acylation.....	47
b) Synthèse du GalCer-6''-OH 65.....	52
I-4. Seconde approche de synthèse.....	53
a) Préparation du céramide 70.....	53
b) Couplage glycosidique et accès au GalCer-6''-OH 65 .....	54
II - Fonctionnalisation du GalCer-6''-OH par un espaceur covalent .....	55
II-1. Création d'un lien carbamate.....	55
a) Méthodes principales de préparation des carbamates .....	55
b) Analogues du KRN7000 via la formation d'un lien carbamate .....	58
II-2. Préparation du GalCer-PEG-NH <sub>2</sub> 63 .....	59
a) Préparation de l'espaceur 124 .....	59
b) Synthèse du GalCer-PEG-N <sub>3</sub> 131.....	60
c) Synthèse du GalCer-PEG-NH <sub>2</sub> 63 .....	62
d) Introduction de l'espaceur de type PEG.....	62
III - Fonctionnalisation du GalCer-6''-OH par un espaceur clivable.....	63
III-1. Synthèse d'une plateforme clivable modèle.....	64
a) Synthèse de la gâchette 141.....	65

b) Synthèse du GalCer-diamine-Boc 140.....	67
c) Couplage du GalCer-diamine-Boc 140 et de la gâchette 141 .....	68
d) Hydrogénolyse du GalCer-diamine 149 et couplage sur la plateforme 151 .....	70
III-2. Stratégie de synthèse de la plateforme clivable associée à l'anticorps .....	72
Conclusion et perspectives .....	75
Experimental section .....	77
PARTIE B .....	97
Chapitre I.....	98
I - Synthèses décrites dans la littérature .....	98
I-1. Première voie de synthèse.....	98
I-2. Synthèse décrite par Franck .....	98
I-3. Seconde approche décrite par Franck .....	101
I-4. Synthèse décrite par Annoura .....	102
I-5. Synthèse décrite par Wipf et Pierce .....	103
I-6. Troisième synthèse décrite par Franck .....	105
I-7. Synthèse décrite par Bittman .....	107
I-8. Synthèse décrite par Haudrechy .....	109
II - Bilan sur les synthèses existantes .....	110
Chapitre II .....	115
I - Synthèses de C-vinyl-glycosides décrites dans la littérature .....	115
I-1. A partir d'halogénures de glycosyle .....	115
a) Avec un dérivé bromé .....	115
b) Avec un dérivé iodé .....	116
I-2. A partir de lactones .....	116
I-3. A partir d'époxydes .....	117
I-4. A partir de C-glycosides .....	119
a) Par réduction contrôlée d'un alcyne .....	119
b) Par une séquence isomérisation/métathèse .....	119
I-5. A partir de structures acycliques.....	120
I-6. Bilan.....	121
II - Nos travaux.....	121
II-1. Par addition nucléophile sur une lactone .....	121
II-2. Par ouverture d'époxydes .....	123
II-3. Séquence isomérisation/métathèse .....	125

II-4. Réduction contrôlée d'un alcyne .....	126
a) Synthèse des alcynes de configuration $\alpha$ .....	126
b) Synthèse des alcynes de configuration $\beta$ .....	127
c) Synthèse des alcynes dérivés de N-acétylgalactosamines .....	129
d) Accès aux C-vinyl-glycosides.....	131
III - Cycloaddition 1,3-dipolaire des nitrones .....	132
III - 1. Généralités .....	132
a) Interactions des Orbitales Moléculaires frontières .....	133
b) Cas des réactions catalysées.....	134
c) Régiosélectivité .....	134
d) Stéréosélectivité .....	135
III - 2. Cycloaddition (3+2) de nitrones avec des oléfines dérivées de sucres .....	136
a) Avec des C-allyl-glycosides.....	137
b) Avec des O-, NH- et S-allyl-glycosides .....	137
c) Avec des exo-glycals.....	138
c) Avec des 5-C-vinyl-glycosides .....	140
d) Avec des glycals.....	141
III - 3. Nos résultats.....	142
a) Utilisation d'une nitrone acyclique .....	142
b) Utilisation d'une nitrone cyclique achirale .....	145
c) Avec une nitrone cyclique chirale .....	147
Chapitre III .....	152
I - Etude avec un substrat modèle.....	153
I-1. Préparation du modèle .....	153
I-2. Etude de la modification de l'amide du substrat modèle .....	154
a) Par addition directe d'un organomagnésien .....	154
b) Hydrolyse basique de l'amide.....	154
c) Par formation d'un nitrosamide.....	155
I-3. Etude de l'ouverture du cycle isoxazolidine.....	156
a) Par le zinc activé .....	157
b) Par l'iodure de triméthylsilane TMSI .....	157
c) Par le $\text{SmI}_2$ .....	157
d) Par le $\text{Mo}(\text{CO})_6$ .....	158
II - Fonctionnalisation du cycle isoxazolidine avec le sucre .....	159



II-1. Clivage de la copule chirale .....	159
II-2. Introduction de la chaîne acyle.....	160
II-3. Introduction de la chaîne sphingosine .....	161
a) Formation du nitrosamide .....	161
b) Formation de l'amide de Weinreb.....	161
c) Addition d'organomagnésiens.....	163
Conclusion et perspectives .....	164
Experimental section .....	168

# Introduction générale

---

La nature offre une diversité et une richesse de molécules actives capables de reconnaître des sites d'interaction spécifiques tels que les récepteurs cellulaires ou les enzymes. De nombreux principes actifs actuellement sur le marché sont issus, ou dérivés, de substances naturelles extraites principalement du milieu végétal, du milieu marin ou de micro-organismes. Dans le cas du milieu marin, un des premiers composés extraits a été la cytarabine dans les années 50, utilisée en chimiothérapie pour le traitement des leucémies et des lymphomes. Les composés naturels sont utilisés dans le traitement de nombreuses maladies dont une constitue le grand fléau de notre époque : « le cancer ».

Le cancer est la principale cause de décès dans le monde, après les maladies cardiovasculaires. En France, le nombre de décès en 2017 est estimé à 150 000 selon l'Institut National du Cancer.<sup>1</sup> Chez les hommes, le nombre de décès est estimé à 84 000 en 2017 dont les principaux cancers sont ceux du poumon, du côlon-rectum et de la prostate. Chez la femme, les cancers du sein, du poumon et du côlon-rectum représentent 66 000 décès en 2017. Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération anormale et incontrôlée de cellules de l'organisme. Celles-ci vont se multiplier de façon anarchique puis donner naissance à des tumeurs de plus en plus grosses jusqu'à détruire les cellules saines. Un cancer se développe à des vitesses différentes et répond à des traitements spécifiques selon les tissus malades. Par exemple, un cancer du sein ne peut pas être traité de la même façon qu'un cancer du poumon. Le traitement doit donc toujours être adapté aux propriétés de chaque cancer.

Parmi les solutions thérapeutiques, la chirurgie permet de retirer les tissus malades et environnants. Ce procédé est souvent couplé à la chimiothérapie, afin de favoriser la lyse des cellules tumorales grâce aux agents anticancéreux. Un autre traitement beaucoup utilisé est la radiothérapie, qui consiste à irradier les cellules cancéreuses par des rayonnements de haute énergie (rayons  $\gamma$ , électrons, photons), altérant l'ADN de ces cellules afin de les détruire. Cependant, la radiothérapie et la chimiothérapie peuvent également attaquer les cellules saines conduisant à des effets secondaires importants.

---

<sup>1</sup> Institut National du Cancer, « Les cancers en France », <http://www.e-cancer.fr>, mars 2018.

Plus récemment, exploiter les forces du système immunitaire afin de combattre le cancer et d'autres maladies est l'objectif de l'immunothérapie,<sup>2</sup> qui est actuellement une approche en plein essor. Le principe est d'éduquer le système immunitaire afin qu'il puisse reconnaître les cellules cancéreuses. Cela peut se faire par le biais de cytokines, administrées seules ou associées à d'autres types de traitements ou bien par l'utilisation de petites molécules qui permettent aussi, une fois administrées, d'induire une production de cytokines.

Une famille de glycosphingolipides<sup>3</sup> appelés agélasphines, dérivés de galactosylcéramides (Schéma 1a), a été extraite d'une éponge marine, *Agelas mauritianus*. Ces composés naturels ont présenté une activité anticancéreuse<sup>4</sup> prometteuse grâce à une stimulation (activation) d'effecteurs immunitaires. Dans le cadre d'une étude de relation structure-activité (SAR), Morita *et al.*<sup>4</sup> ont développé la pharmacomodulation de ces galactosylcéramides pour conduire à un analogue de synthèse, le KRN7000 (Schéma 1b). Ce dernier présente la meilleure activité antitumorale par rapport aux agélasphines naturelles.

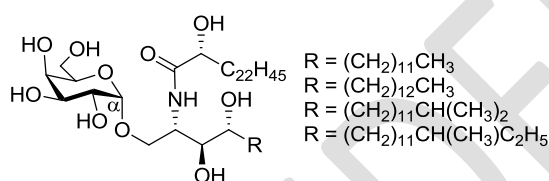


Schéma 1a - Exemples d'agélasphines naturelles

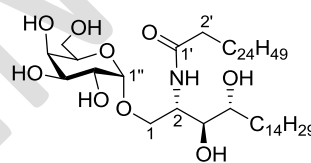


Schéma 1b – Structure du KRN7000

Cependant, le KRN7000 présente des inconvénients majeurs qui sont :

- Le manque de sélectivité dans l'activation du système immunitaire.
- L'anergie des cellules impliquées dans la réponse immunitaire.
- La faible solubilité dans le milieu physiologique.
- La dispersion de l'immunostimulant dans l'organisme.

Concernant le manque de sélectivité, il existe deux voies d'activation Th1 et Th2 définies par le profil de production de cytokines par les lymphocytes. Les cytokines de types Th1 orientent la réponse immunitaire vers une activité pro-inflammatoire et antitumorale, tandis que les cytokines de type Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps). La production simultanée de cytokines de type

<sup>2</sup> W. H. Fridman, *Bull Cancer*, **2016**, *103*, S122-S126.

<sup>3</sup> T. Natori, Y. Koesuka, T. Higa, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5591-5592.

<sup>4</sup> M. Morita, K. Motoki, K. Akimoto, T. Natori, T. Sakai, E. Sawa, K. Yamaji, Y. Koesuka, E. Kobayashi, H. Fukushima, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2176-2187.

Th1 et Th2 ne permettent pas d'avoir une thérapie efficace car elles sont antagonistes l'une de l'autre.<sup>5</sup>

Quant au phénomène d'anergie, cela correspond à un état de non réponse des cellules immunitaires après leurs stimulations, qui peut durer plusieurs semaines.<sup>6</sup> Le KRN7000 ne peut donc pas être administré une nouvelle fois pour obtenir une réponse immunitaire ce qui limite l'utilisation du KRN7000 en thérapie anticancéreuse bien que ce composé soit en test clinique phases I et II.

L'équipe de D. Dubreuil s'intéresse à cette famille de composés depuis plusieurs années<sup>7</sup> afin de pallier ces effets secondaires. Dans un premier temps, divers analogues ont été proposés pour permettre d'avoir une réponse plus sélective de la voie Th1 pour une application anticancéreuse et avoir une activité plus faible pour limiter l'anergie. Un deuxième aspect consiste à améliorer la solubilité du KRN7000 par encapsulation dans des liposomes, aspect qui a fait l'objet d'une thèse au sein de l'équipe.<sup>8</sup> Ce projet a mené à l'amélioration de la solubilité en milieu physiologique. Enfin, au sein de l'équipe, une nouvelle approche concernant la vectorisation du KRN7000, a été entreprise pour limiter le phénomène de dispersion dans l'organisme.

C'est là qu'intervient le premier objectif de ma thèse, qui vise à étudier la conjugaison du KRN7000 à un agent ciblant des cellules tumorales *via* un espaceur (Schéma 2). Notre choix d'agent ciblant s'est porté vers l'utilisation d'un anticorps spécifique de récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales.

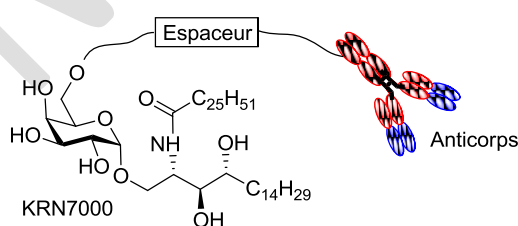


Schéma 2 - Conjugaison du KRN7000 à l'anticorps via un espaceur

Une première approche envisage le greffage covalent entre l'anticorps et le KRN7000 *via* un lien stable en milieu physiologique. Ce type de structure permettra de vérifier le

<sup>5</sup> P. Kidd, *Alter. Med. Rev.* **2003**, *8*, 223-246.

<sup>6</sup> B. A. Sullivan, M. Kronenberg, *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2328-2329.

<sup>7</sup> D. Dubreuil, M. Pipelier, L. Micouin, T. Lecourt, V. Lacone, M. Bonneville, J. Lependu, A-L. Turcot-Dubois, Brevet : WO2008047174, **2008**.

<sup>8</sup> Caroline Ballet, Thèse de doctorat en chimie, sous la direction de Thierry Benvegnu et de Muriel Pipelier, Ecole nationale supérieure de chimie (Rennes), 2014.

maintien de la fonction de reconnaissance du paratope de l'anticorps, greffé au KRN7000. Une fois cette stratégie validée, la seconde approche consiste à associer les deux partenaires (anticorps et KRN7000) *via* une plateforme auto-immolable (Schéma 3). Cette alternative permet de relarguer l'immunostimulant dans l'environnement tumoral. Une fois libéré, l'immunostimulant pourra activer librement le système immunitaire afin de conduire à la lyse de la cellule tumorale.

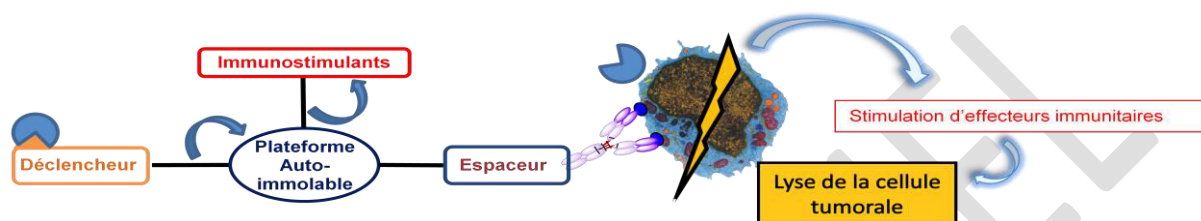


Schéma 3 – Approche auto-immolable

Une deuxième partie (Partie B) sera consacrée à la préparation de nouveaux analogues plus stables et plus sélectifs de la voie Th1, à savoir des analogues C-glycosidiques du 4-désoxy-KRN7000. Ces composés seront préparés selon une nouvelle voie de synthèse mettant en œuvre une cycloaddition (3+2) entre une nitroène et un C-vinyl-galactoside comme étape clé. Pour cela, une étude méthodologique de cette réaction sera réalisée, puis une fois maîtrisée, la fonctionnalisation du cycle isoxazolidine permettra d'accéder à des analogues C-glycosidiques du 4-désoxy-KRN7000 dont l'oxygène de la position anomérique sera remplacé par un groupement méthylène, mono ou difluorométhylène (Schéma 4).

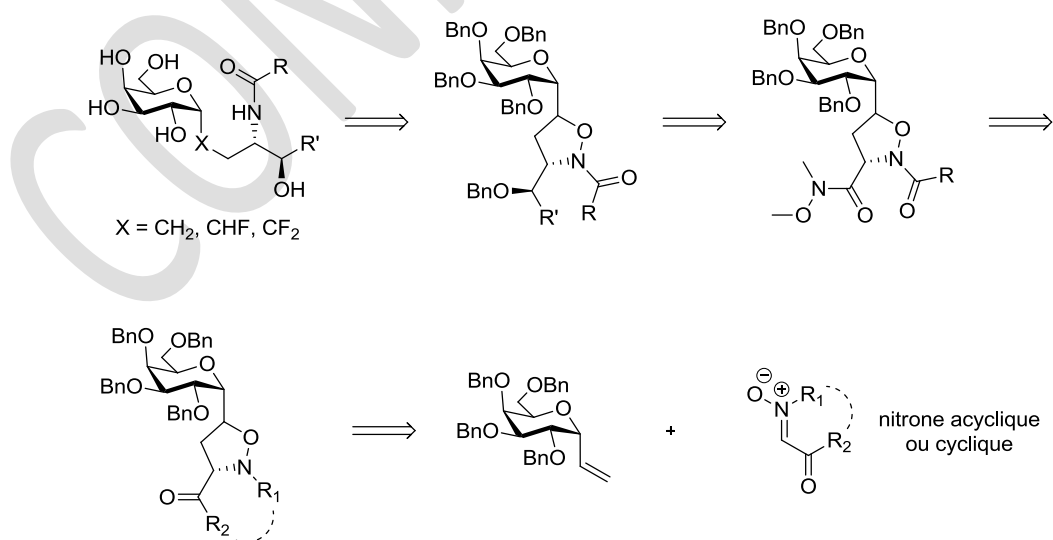


Schéma 4 - Préparation d'α-C-GalCer *via* une cycloaddition [3+2]

Cette stratégie de synthèse envisagée permettra d'introduire différentes chaînes lipidiques R et R' (Schéma 4). Il sera également possible d'accéder à des analogues contraints, induits par la présence d'un cycle isoxazolidine. Il sera notamment intéressant d'étudier l'impact d'une telle contrainte sur l'activité immunostimulante.

Dans ce mémoire, une étude bibliographique présentant le KRN7000, le mode d'action de ce glycolipide et les principaux analogues sera tout d'abord décrite. Puis, dans la première partie, une discussion sur la conjugaison des principes actifs aux anticorps sera effectuée avant de présenter les résultats sur la synthèse des cibles qui nous permettra le greffage à un anticorps, à savoir un premier glycoconjugué où le KRN7000 est greffé à l'anticorps *via* un espaceur stable. Le second glycoconjugué consistera à coupler le KRN7000 sur une plateforme *via* un espaceur clivable tandis que l'anticorps sera lié *via* un espaceur stable à la plateforme. Cette première partie a été réalisée au laboratoire CEISAM à Nantes pendant 18 mois. Dans la deuxième partie, après une étude bibliographique sur la synthèse des  $\alpha$ -C-galactosylcéramides, les résultats sur l'étude méthodologique de la réaction de cycloaddition (3+2) ainsi que l'accès aux nouveaux analogues C-glycosidiques sera décrit. Cette seconde partie a été effectuée à l'IMMM au Mans pendant 18 mois.

# Contexte

Comme mentionné dans l'introduction générale, nous nous intéressons à des galactosylcéramides immunostimulants dont le KRN7000 est le représentant synthétique le plus actif. Ces glycolipides sont constitués d'une unité galactose où le carbone anomérique est de configuration  $\alpha$  et d'une unité céramide qui est composée d'une chaîne acyle et d'un motif sphingosine (Schéma 5).

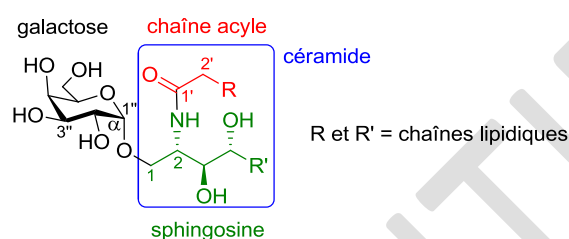


Schéma 5 - Structure d'un galactosylcéramide

Dans la littérature, la numérotation veut que la chaîne sphingosine soit numérotée 1, 2, 3..., la chaîne acyle 1', 2', 3'... et le sucre 1'', 2'', 3''... Pour faciliter la lecture, ce type de numérotation sera systématiquement conservé tout au long de ce chapitre et de la partie A.

Ce chapitre présente la découverte du KRN7000 ainsi que son mode d'action. Puis, les interactions indispensables au maintien de la réponse immunitaire seront détaillées. Enfin, les principales modifications du KRN7000 induisant majoritairement un profil Th1 ou Th2 seront décrites.

## I - Le KRN7000 et son mode d'action

### I-1. Découverte du KRN 7000

En 1993, de nouveaux glycosphingolipides ont été extraits d'une éponge marine, *Agelas mauritanus*, près d'Okinawa au Japon. De nombreuses molécules ont été isolées dont les agélasphines (AGLs) où l'agélasphine 9b est le représentant naturel le plus actif de cette famille (Schéma 6a).<sup>3</sup> Ces composés ont présenté une activité antitumorale *in vivo* sur les cellules murines B16,<sup>4</sup> cellules utilisées comme modèle pour le cancer de la peau chez l'Homme. Cependant, l'extraction naturelle de ces principes actifs ne permet pas d'avoir une quantité suffisante pour une application thérapeutique. Plusieurs analogues ont été synthétisés pour évaluer leurs activités biologiques. Parmi tous les analogues synthétisés, le KRN7000 (ou  $\alpha$ -GalCer) est celui qui a montré la meilleure activité antitumorale (Schéma 6b). Comme

les agélasphines, le KRN7000 n'est pas directement cytotoxique mais il stimule les cellules NKT restreints à la glycoprotéine CD1d, les cellules iNKT. Cette stimulation résulte d'un complexe trimoléculaire entre le récepteur des cellules iNKT, l' $\alpha$ -GalCer et la glycoprotéine CD1d.

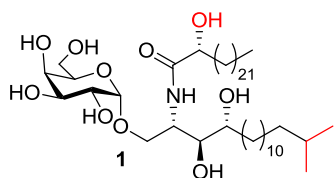


Schéma 6a - Structure de l'agélasphine 9b

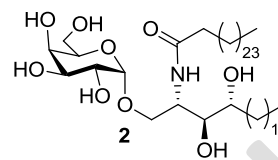


Schéma 6b - Structure du KRN7000

## I-2. Interactions moléculaires et propriétés biologiques du KRN7000

### a) Le complexe KRN7000/CD1d

Les molécules CD1 constituent une famille de 5 glycoprotéines exposées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les macrophages ou les cellules dendritiques. La glycoprotéine CD1d est la seule à pouvoir se lier à des glycolipides dont l' $\alpha$ -GalCer tandis que les autres glycoprotéines (CD1a, CD1b, CD1c et CD1e) ne se lient qu'aux lipides.<sup>9</sup>

La complexation de l' $\alpha$ -GalCer à la glycoprotéine CD1d s'effectue *via* sa partie lipidique qui va se loger dans deux poches hydrophobes de la glycoprotéine. La structure cristalline de la glycoprotéine CD1d humaine<sup>10</sup> complexée à l' $\alpha$ -GalCer (Schéma 7) montre deux cavités, appelées A' et C' (F' chez la souris), revêtues de chaînes latérales d'acides aminés très majoritairement hydrophobes adaptées aux chaînes lipidiques des  $\alpha$ -galactosylcéramides.

<sup>9</sup> A. Schiefner, I. A. Wilson, *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 3311-3317.

<sup>10</sup> M. Koch, V. S. Stronge, D. Shepherd, S. D. Gadola, B. Mathew, G. Ritter, A. R. Fersht, G. S. Besra, R. R. Schmidt, E. Y. Jones, V. Cerundolo. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 819-826.



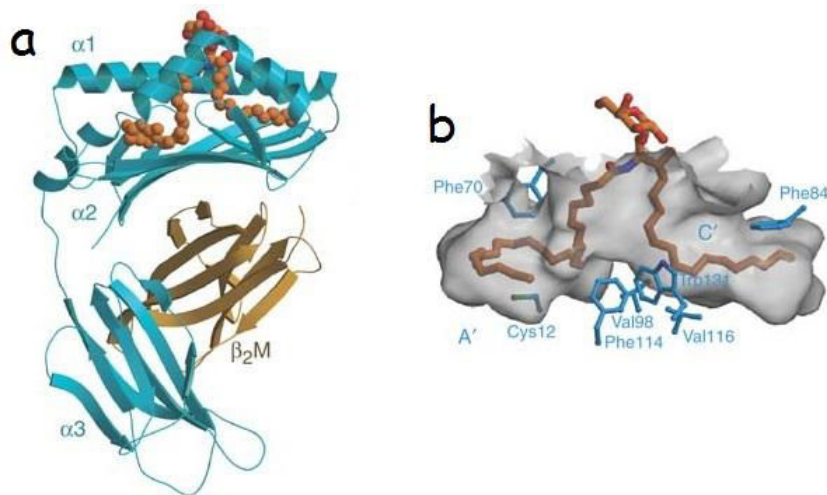


Schéma 7 - a) Complexe CD1d/KRN7000 b) Représentation des chaînes lipidiques dans les cavités du CD1d<sup>9</sup>

La chaîne acyle de l' $\alpha$ -GalCer se loge dans la cavité A' de la glycoprotéine CD1d tandis que la chaîne sphingosine remplit la cavité C'.

D'autres interactions interviennent dans la stabilisation du complexe KRN7000/CD1d (Schéma 8).<sup>9</sup> Des liaisons hydrogènes s'établissent entre l'hydroxyle en 2'' du galactose avec l'Asp151 située sur l'hélice  $\alpha 2$  (Asp153 chez la souris), entre l'oxygène anomérique avec la Thr154 (Thr156) de la même hélice et entre l'hydroxyle en 3 de la sphingosine et Asp80 (Asp80) de l'hélice  $\alpha 1$ . Ces interactions sont indispensables pour la stabilité de ce complexe qui, par la suite, est présenté au récepteur membranaire TCR (« T-Cell Receptor ») des cellules iNKT.

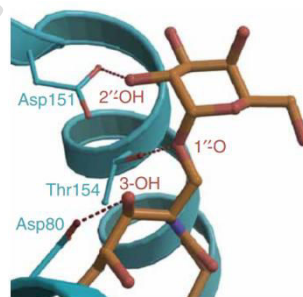


Schéma 8 - Principales interactions entre le KRN7000 et certains acides aminés de la glycoprotéine CD1d<sup>9</sup>

### b) Le complexe ternaire TCR/KRN7000/CD1d

Les lymphocytes iNKT (pour « invariant Natural Killer T ») forment une population particulière de cellules T qui exerce des fonctions immunorégulatrices variées *via* la production rapide et massive d'un large spectre de cytokines. Une particularité de ces cellules est qu'elles expriment le récepteur NK1.1 et le récepteur de cellules T (TCR), ce dernier

reconnaissant les antigènes glycolipidiques.<sup>11</sup> Ce récepteur est un hétérodimère constitué de deux chaînes peptidiques  $\alpha$  et  $\beta$ . Chacune de ces chaînes présente un domaine *N*-terminal variable appelé V (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 chez la souris, V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 chez l'Homme pour la chaîne  $\alpha$  et V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 ou V $\beta$ 2 chez la souris et V $\beta$ 11 chez l'Homme pour la chaîne  $\beta$ ) et une partie *C*-terminale constante.

Le complexe KRN7000/CD1d est reconnu par le récepteur TCR des cellules iNKT *via* le motif galactoside du glycolipide. Il faut préciser que l' $\alpha$ -GalCer seul ne peut être reconnu par le récepteur TCR. Le complexe TCR/KRN7000/CD1d a pu être cristallisé, montrant les interactions mises en jeu,<sup>12</sup> d'une part avec le récepteur TCR et le KRN7000, et d'autre part avec le TCR et la glycoprotéine CD1d.

Concernant les interactions TCR/KRN7000, trois fonctions hydroxyles du galactose établissent des liaisons hydrogènes avec la chaîne  $\alpha$  du TCR. Les groupements hydroxyles en C2'' et C4'' sont respectivement en interactions avec la Gly96 $\alpha$  et la Phe29 $\alpha$  tandis que l'hydroxyle en C3'' établit sa liaison hydrogène avec la Ser30 $\alpha$ . Une autre liaison hydrogène intervient entre l'hydroxyle en C3 de la chaîne sphingosine et l'Arg95 $\alpha$  (Schéma 9).

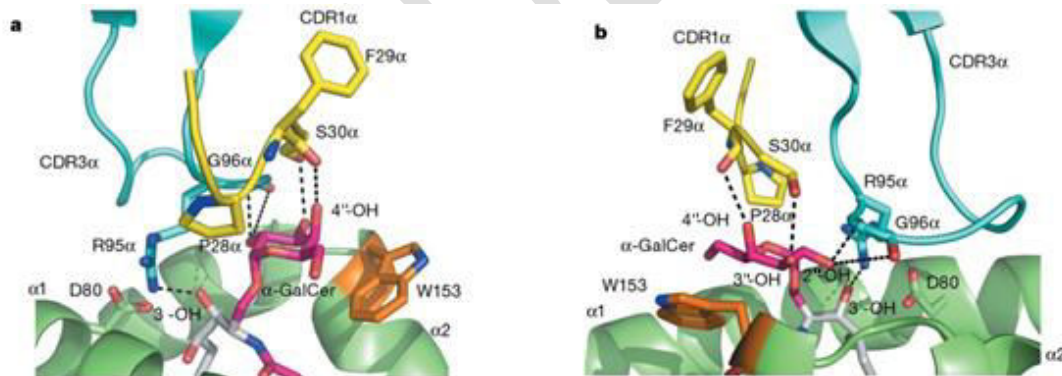


Schéma 9 - Interactions TCR/ $\alpha$ -GalCer dans deux représentations différentes<sup>11</sup>

Concernant les interactions TCR/CD1d, cinq résidus d'acides aminés de l'hélice  $\alpha$ 1 (Ser76, Arg79, Asp80, Glu83, Lys86) et un résidu de l'hélice  $\alpha$ 2 (Gln150) de la glycoprotéine CD1d sont engagés dans des interactions par liaisons hydrogènes (Schéma 10). Plus précisément, les résidus Tyr48 $\beta$  et Tyr50 $\beta$  de la boucle CDR2 $\beta$  établissent 3 liaisons hydrogènes avec le résidu Glu83. La Tyr48 $\beta$  est aussi en interaction avec la Lys86 par liaison

<sup>11</sup> D. I. Godfrey, H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, L. Van Kaer, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 231-237.

<sup>12</sup> N. A. Borg, K. S. Wun, L. Kjer-Nielsen, M. C. J. Wilce, D. G. Pellici, R. Koh, G. S. Besra, M. Bharadwaj, D. I. Godfrey, J. McCluskey, J. Rossjohn, *Nature*, **2007**, *448*, 44-49.

hydrogène. La Lys86 est engagée dans une liaison électrostatique « salt bridge » avec le résidu Glu56 $\beta$ . La dernière interaction mise en jeu pour la boucle CDR2 $\beta$  est une liaison de type Van der Waals entre le résidu Arg89 et le résidu Asn53 $\beta$  (Figure 10). Sur la boucle CDR3 $\alpha$  du récepteur TCR, les liaisons électrostatiques « salt bridge » et de Van der Waals sont les interactions majoritaires (Schéma 10).

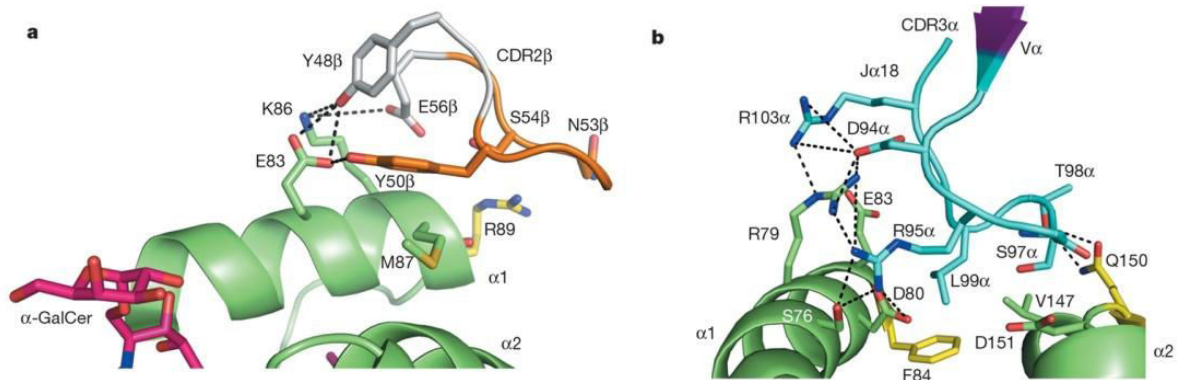


Schéma 10 - Interactions TCR/CD1d. a) Sur la boucle CDR2 $\beta$ . b) Sur la boucle CDR3 $\alpha$ .<sup>11</sup>

Toutes ces interactions participent à la stabilisation optimale du complexe ce qui influe sur la nature et le niveau de production des cytokines et par conséquent sur la stimulation (activation) du système immunitaire.

### c) La production de cytokines

Comme déjà évoqué, une propriété des cellules iNKT est la production rapide et en large quantité de différentes cytokines. Cette sécrétion est à l'origine de la prolifération, de la maturation puis de la différenciation des cellules T auxiliaires en lymphocytes Th1 et/ou Th2 qui vont à leurs tours sécréter différentes cytokines responsables de la réponse immunitaire globale. Les cytokines produites peuvent être séparées en deux catégories : les cytokines de type helper 1 (Th1) et de type helper 2 (Th2).

Les cytokines de type Th1 telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12, conduisent à une différenciation des lymphocytes T auxiliaires en lymphocytes Th1 responsable de la réponse antitumorale grâce à l'activation de cellules du système immunitaire comme les cellules T, les cellules NK ou les macrophages (Schéma 11). L'ensemble de ces processus biologiques permet d'orienter la réponse immunitaire vers une voie dite Th1.

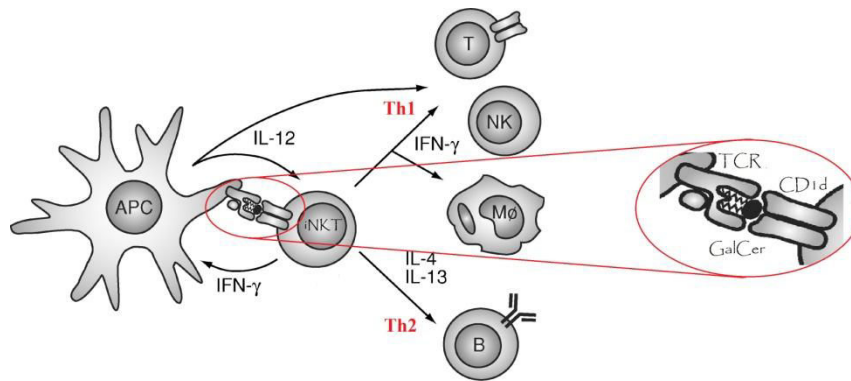


Schéma 11 - Activation de la réponse immunitaire<sup>13</sup>

Les cytokines de type Th2 telle que l'IL-4 et l'IL-13 contribuent à réguler les maladies auto-immunes comme le diabète. L'IL-4 stimule l'immunité à médiation humorale, la production d'anticorps (stimulation des lymphocytes B) (Schéma 11). Ces cytokines permettent d'orienter la réponse immunitaire vers une voie dite Th2.

Chez un individu sain, la production de cytokines pro-Th1 et pro-Th2 est en équilibre et déstabilisée chez un individu malade. Il sera nécessaire d'avoir une forte sélectivité pour avoir une réponse adéquate car le déséquilibre de la balance Th1/Th2 entraîne des effets secondaires indésirables car l'action des cytokines des différentes voies sont antagonistes l'une de l'autre.

### I-3. Limites du KRN7000

Le KRN7000 est reconnu pour son activité antitumorale due à la production de cytokines de type Th1. Cependant, le KRN7000 a aussi montré la capacité d'orienter une réponse pro-Th2 favorable à une réponse humorale. La réponse immunitaire liée à une injection de KRN7000 n'est donc pas optimale car le ratio de concentration de cytokines pro-Th1 *versus* cytokines pro-Th2 est proche de 1 ce qui représente le premier inconvénient majeur du KRN7000. Le second inconvénient est le phénomène d'anergie, provoquant une forte diminution du taux de sécrétion de cytokines, ce qui empêche l'utilisation répétée du KRN000 pour stimuler à nouveau le système immunitaire. Cette anergie correspond à un état de non-réponse dû à la sous-expression du récepteur TCR, période pendant laquelle les cellules iNKT ne peuvent être stimulées de nouveau<sup>14</sup> limitant l'utilisation de ce glycolipide en thérapie anticancéreuse. Les deux autres inconvénients du KRN7000 sont d'une part, la faible solubilité du glycolipide en milieu physiologique due à la structure lipidique du

<sup>13</sup> M. Brigl, M. B. Brenner, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, 22, 817-890.

<sup>14</sup> V. V. Parekh, M. T. Wilson, D. Olivares-Villagomez, A. V. Singh, L. Wu, C. Wang, S. Joyce, L. Van Kaer, *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 2572-2583.

KRN7000 et d'autre part, comme beaucoup de principes actifs, le phénomène de dispersion qui ne permet pas de cibler les tissus malades.

Face au potentiel thérapeutique du KRN7000, de nombreuses études SAR ont été décrites dans la littérature scientifique et elles seront présentées dans les paragraphes suivants.

## II - Relation structure-activité des $\alpha$ -galactosylcéramides

Afin de pouvoir dédier une application anticancéreuse du KRN7000, l'idéal serait d'obtenir une réponse immunitaire de type Th1. De nombreux analogues ont été synthétisés pour tenter d'avoir cette sélectivité. Les modifications peuvent être séparées en quatre catégories : la modification de l'unité galactose, la configuration et la nature de la position anomérique, la modification de la partie polaire du céramide et la modification des chaînes lipidiques (Schéma 12).

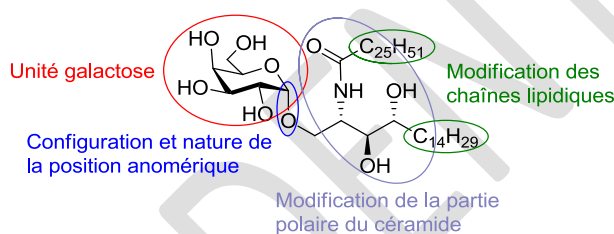
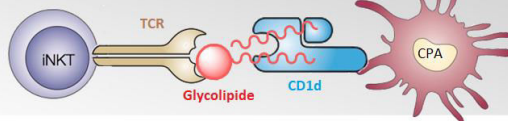


Schéma 12 - Modifications explorables du KRN7000

Les paragraphes suivants seront consacrés aux principales modifications pour accéder aux nouveaux analogues du KRN7000 et à l'étude de leurs activités biologiques. De nombreuses revues existent dans la littérature et seulement quelques unes seront mentionnées.<sup>15</sup> Au regard de toutes les études décrites dans la littérature scientifique, il est très difficile de prévoir l'orientation de la réponse immunitaire en fonction de la modification structurale effectuée. Cependant, il est communément admis de manière générale, que les glycolipides ayant une grande affinité pour le TCR et la glycoprotéine CD1d tendent vers une réponse de type Th1 alors qu'une faible interaction tend vers une réponse de type Th2 (Schéma 13).

<sup>15</sup> a) A. Banchet-Cadeddu, E. Hénon, M. Dauchez, J-H. Renault, F. Monneaux, A. Haudrechy, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3080-3104. b) X. Laurent, B. Bertin, N. Renault, A. Farce, S. Speca, O. Milhomme, R. Millet, P. Desreumaux, E. Hénon, P. Chavatte, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5489-5508. c) T. Tashiro, K. Mori, *Studies in Natural Products Chemistry*, **2014**, *42*, 1-31. d) T. Tashiro, K. Mori, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2010**, *22*, 280-295.

Interaction  
courte = voie Th2



Interaction  
Longue = voie Th1

Schéma 13 - Modulation de la réponse immunitaire selon l'affinité du glycolipide pour le TCR et la glycoprotéine CD1d

## II-1. Modifications structurales du cycle pyranosique

### a) Nature du sucre

Une première étude a été menée sur l'impact de la nature du sucre du KRN7000. L'activité biologique a également été évaluée sur le  $\beta$ -GalCer **2 $\beta$**  mais cet analogue n'a montré aucune activité biologique.<sup>16</sup> Il a été démontré que la modification par une unité mannose ( $\alpha$ -ManCer **4**) empêche toute activité alors qu'avec l'unité glucose ( $\alpha$ -GlcCer **3**), une activité plus faible que le KRN7000 est observée.

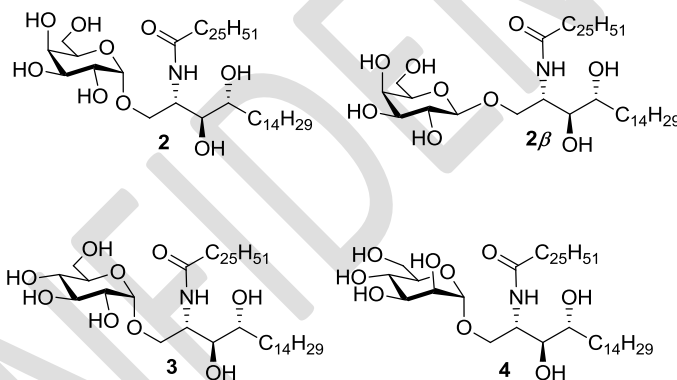


Schéma 14 - Structure de l' $\alpha$ -GalCer (**2**), du  $\beta$ -GalCer (**2 $\beta$** ),  $\alpha$ -GlcCer (**3**) et de l' $\alpha$ -ManCer (**4**)

L'évaluation biologique de l'analogue du KRN7000 avec un motif thréitol (**5**) (Schéma 15) a été décrite.<sup>17</sup> Ce composé présente *in vivo* et *in vitro*, une activité remarquable car les cellules iNKT peuvent être stimulées à nouveau avec un délai plus court (14 jours) pour sécréter les cytokines contrairement au KRN7000 où une seconde injection ne peut être administrée avant plusieurs semaines.

<sup>16</sup> T. Kawano, J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, M. Taniguchi, *Science*, **1997**, 278, 1626-1629.

<sup>17</sup> J. D. Silk, M. Salio, B. G. Reddy, D. Shepherd, U. Gileadi, J. Brown, S. H. Masri, P. Polzella, G. Ritter, G. S. Besra, E. Y. Jones, R. R. Schmidt, V. Cerundolo, *J. Immunol.* **2008**, 15, 6452-6456.

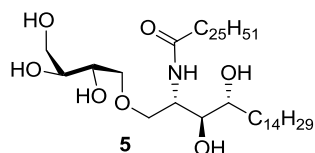


Schéma 15 - Analogue thréitol du KRN7000

### b) Modification de la position 2'' du galactose

L'équipe de Taramelli<sup>18</sup> a décrit la synthèse et l'évaluation biologique *in vitro*, sur cellules murines, des analogues du KRN7000 modifiés en position 2'' du galactose par un atome d'hydrogène (6), de fluor (7) ou un groupement méthoxy (8) (Schéma 16) mais ces analogues n'ont montré aucune activité. A noter que l'introduction d'un second sucre (9) ne modifie pas l'activité car ce dernier est clivé *in vivo* pour libérer le KRN7000.<sup>15</sup> La fonction hydroxyle en position 2'' du galactose est indispensable pour avoir une activité.

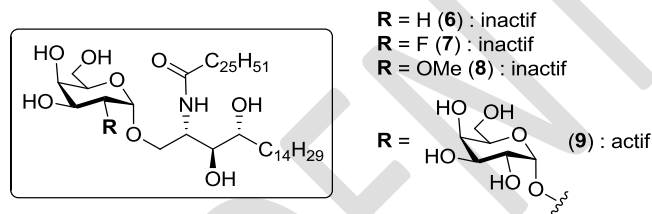


Schéma 16 - Modification de la position 2'' du galactose

### c) Modification de la position 3'' du galactose

L'équipe d'Howell<sup>19</sup> a montré que la substitution de l'hydroxyle en position 3'' par un atome d'hydrogène (10) ou de fluor (11) (Schéma 17) conduit à une activité biologique semblable au KRN7000. Il est important de noter que les auteurs ont évalué des analogues 4-désoxy et que cette modification, qui sera discutée plus tard, n'a pas d'effet sur l'activité biologique *in vivo* chez la souris et *in vitro*, sur cellules humaines. La modification de l'hydroxyle en position 3'' par un groupement sulfate (12), décrit par Wong<sup>20</sup> induit une réponse immunitaire semblable au KRN7000. D'autre part, Xia *et al.*<sup>21</sup> ont synthétisé trois analogues modifiés par un azoture (13), une amine (14) et un acétamide (15) mais ces composés n'ont montré aucune activité (Schéma 16). La modification de la position 3'' induit

<sup>18</sup> L. Barbieri, V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, N. Basilico, M. Mondani, D. Taramelli, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 15, 3279-3285.

<sup>19</sup> R. Raju, B. F. Castillo, S. K. Richardson, M. Thakur, R. Severins, M. Kronenberg, A. R. Howell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4122-4125.

<sup>20</sup> G-W. Xing, D. Wu, M. A. Poles, A. Horowitz, M. Tsuji, D. D. Ho, C-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2907-2916.

<sup>21</sup> C. Xia, W. Zhang, Y. Zhang, W. Chen, J. Nadas, R. Severin, R. Woodward, B. Wang, M. Kronenberg, P. G. Wang, *ChemMedChem*, **2009**, 4, 1810-1815.

soit une activité semblable au KRN7000, soit une perte de l'activité, il est donc préférable de ne pas modifier ce groupement hydroxyle.

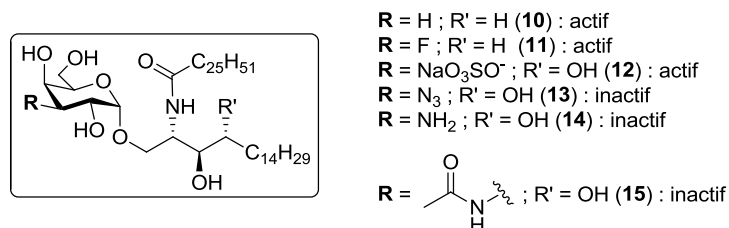


Schéma 17 - Modification de la position 3'' du galactose

#### d) Modification de la position 4'' du galactose

Xia *et al.*<sup>21</sup> ont travaillé sur la position 4'' du galactose en préparant quatre analogues. Ils ont montré que la substitution par un groupement acétamide (16) entraîne une perte de l'activité avec une très faible sélectivité Th1 (Schéma 18). La substitution par un atome de fluor (17), un groupement méthoxy (18) ou un groupement 2-hydroxyéthoxy (19) induit une perte de l'activité avec une très faible sélectivité Th2 observée (Schéma 18). En 2011, Zhang *et al.*<sup>22</sup> ont préparé trois nouveaux analogues comportant un groupement aromatique (20-22) *via* une fonction ester ou éther avec différentes longueurs de chaînes carbonées (Schéma 18). Seul l'analogue avec un motif éthoxyphényle (21) a montré une activité comparable au KRN7000 et une forte sélectivité Th1 qui peut être attribuée à la longueur de la chaîne alkyle permettant d'avoir une interaction de type  $\pi$ - $\pi$  stacking entre le groupement phényle et le récepteur TCR.

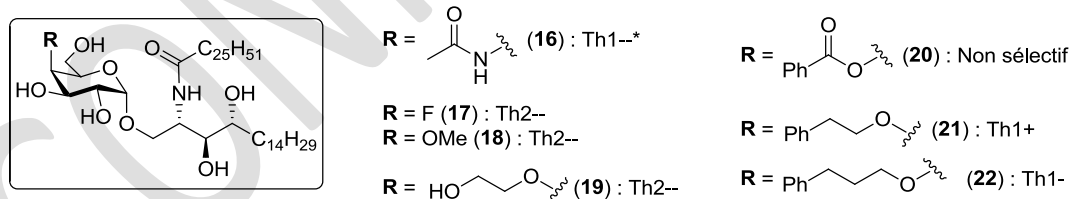


Schéma 18 - Modification de la position 4'' du galactose ; \* : ++/-- très forte/faible sélectivité ; +/- forte/faible sélectivité

Bien que le groupement hydroxyle en position 4'' soit engagé dans une liaison hydrogène avec le TCR (Phe29), la modification fonctionnelle est permise à la condition que le substituant établisse de nouvelles interactions qui permettent de conserver la stabilité du complexe ternaire.

<sup>22</sup> W. Zhang, C. Xia, J. Nadas, W. Chen, L. Gu, P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2767-2776.



### e) Modification de la position 6'' du galactose

La fonction hydroxyle en position 6'' est celle qui a subi le plus de modifications à ce jour car ce groupement n'est pas en interaction avec la glycoprotéine CD1d et le récepteur TCR. De plus, cette position est facilement modifiable par synthèse chimique. Beaucoup d'exemples dans la littérature permettent d'orienter la réponse immunitaire de type Th1 ou Th2 en conservant une activité semblable au KRN7000.

- Orientation Th1

Tashiro *et al.*<sup>23</sup> ont préparé des analogues modifiés en position 6'' du galactose par une liaison éther et des analogues 6''-désoxy. Seul le composé avec un groupement méthoxy en position 6'' (**23**) (Schéma 19) possède une activité remarquable *in vivo* chez la souris, induisant une forte sécrétion d'IFN- $\gamma$ .

La synthèse d'analogues portant un groupement aromatique a été entreprise en 2008 par Trappeniers *et al.*<sup>24</sup> Ainsi, deux composés parmi de nombreux analogues préparés, ont une activité similaire au KRN7000 et présente un profil Th1. La position 6'' de ces deux analogues est substituée par un un groupement amide avec noyau aromatique appauvri en électrons (**24**) ou par une naphtylurée (**25**) (Schéma 19).

L'équipe de Luo<sup>25</sup> a montré que la modification par un groupement amine (**26**) induit une sécrétion d'IFN- $\gamma$  comparable au KRN7000 et un niveau inférieur d'IL-4 ce qui indique que cet analogue est plus sélectif en induisant une réponse immunitaire de type Th1.

Enfin, la fonctionnalisation sous forme d'un carbamate dérivé de la 4-aminopyridine a mené au composé (**27**) et son activité biologique a induit la plus grande sélectivité Th1 (Schéma 19). Cela peut être dû à la présence d'une interaction entre l'azote de la pyridine avec le résidu Gln52 du récepteur TCR.<sup>26</sup>

---

<sup>23</sup> T. Tashiro, R. Nakagawa, S. Inoue, M. Shiozaki, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6827-6830.

<sup>24</sup> M. Trappeniers, K. Van Beneden, T. Decruy, U. Hillaert, B. Linclau, D. Elewaut, S. Van Calenbergh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16468-16469.

<sup>25</sup> J-T. Hung, R. C. Sawant, J-C. Chen, Y-F. Yen, W-S. Chen, A. L. Yu, S-Y. Luo, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 47341-47356.

<sup>26</sup> S. Aspeslagh, M. Nemčovič, N. Pauwels, K. Venken, J. Wang, S. Van Calenbergh, D. M. Zajonc, D. Elewaut, *J. Immunol.* **2013**, *191*, 2916-2925.

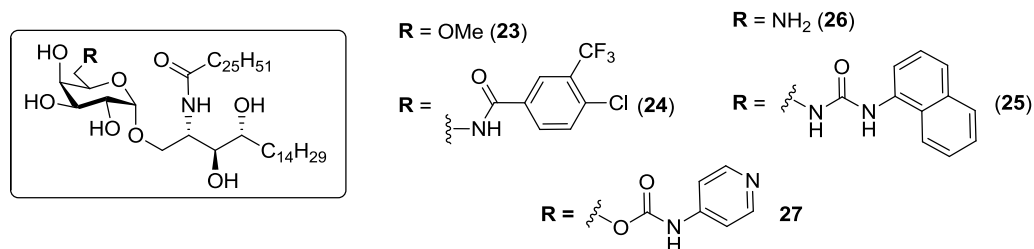


Schéma 19 - Analogues modifiés en position 6'' avec un profil Th1

- Orientation Th2

Deux analogues importants ont été mentionnés avec une activité semblable au KRN7000 et qui présente un profil Th2.<sup>26</sup> L'éthérisation de la position 6'' avec de longues chaînes alkyles augmentent la prolifération de cytokines pro-Th2. Les analogues qui présentent une longueur de chaîne avec 12 et 13 carbones (**28** et **29**) (Schéma 20) possèdent un meilleur profil Th2.

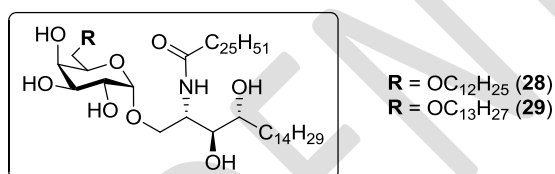


Schéma 20 - Analogues modifiés en position 6'' avec un profil Th2

## f) Modification de l'oxygène pyranique

- Les analogues carbacycles

En 2007, l'équipe de Kenji Mori<sup>27</sup> a préparé l' $\alpha$ -carba-GalCer (**30**) (Schéma 21), qui correspond à la substitution de l'oxygène du cycle pyranose par un groupement méthylène. Cet analogue oriente la réponse immunitaire vers un profil Th1. Les auteurs considèrent que la réponse pro-Th1 est due à la liaison éther, plus stable vis-à-vis de la dégradation enzymatique.

Un carbacycle dérivé du thréitol (**31**) (Schéma 21) a été évalué en 2016 par l'équipe de Cerundolo.<sup>28</sup> Ce composé présente l'avantage de limiter le phénomène d'anergie car les cellules iNKT peuvent être à nouveau stimulées *in vivo* après une seconde injection de cet analogue. De plus, une réponse immunitaire est observée à des concentrations plus faibles en ligand ce qui en fait un bon candidat pour la phase clinique.

<sup>27</sup> T. Tashiro, R. Nakagawa, T. Hirokawa, S. Inoue, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3343-3347.

<sup>28</sup> J-P. Jukes, U. Gileadi, H. Ghabbane, T-F. Yu, D. Shepherd, L. R. Cox, G. S. Besra, V. Cerundolo, *Eur. J. Immunol.* **2016**, *46*, 1224-1234.

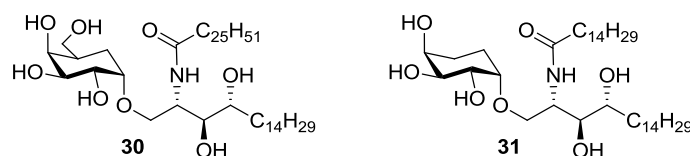


Schéma 21 - Structure de l' $\alpha$ -carba-GalCer **30** et du carbacycle dérivé du thréitol **31**

- Le 5-thio- $\alpha$ -GalCer

La synthèse d'analogues du KRN7000 avec un atome de soufre dans le cycle pyranose a été décrite.<sup>29</sup> L'analogue 5-thio- $\alpha$ -GalCer (**32**) induit un profil cytokinique semblable au KRN7000 tandis que l'analogue avec une chaîne acyle en C15 (**33**) (Schéma 22) présente une activité biologique de type Th1.

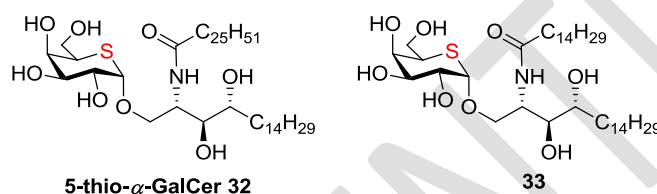


Schéma 22 - Analogues soufrés du KRN700

## II-2. Modification de la position anomérique

### a) L' $\alpha$ -C-GalCer

La modification de l'oxygène anomérique par un carbone offre la possibilité de limiter la dégradation enzymatique *in vivo* par les glycosidases. En 2003, Schmiege *et al.*<sup>30</sup> ont décrit la synthèse d'analogues C-glycosidiques dont certains présentent une forte activité antitumorale. En effet, l'analogue  $\alpha$ -C-GalCer (**34**) (Schéma 23) induit *in vivo* chez la souris une sécrétion d'IFN- $\gamma$  (cytokines de type Th1) égale au KRN7000 et une sécrétion quasi nulle d'IL-4 (cytokines de type Th1). Les auteurs considèrent que la réponse pro-Th1 est due à la liaison éther, plus stable vis-à-vis de la dégradation enzymatique, comme pour les analogues carbacycles. Bien que l' $\alpha$ -C-GalCer soit efficace chez la souris, les auteurs ont montré que cet analogue ne pouvait pas activer *in vitro*, des cellules iNKT humaines.

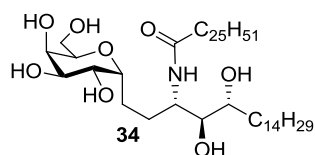


Schéma 23 - Structure de l' $\alpha$ -C-GalCer

<sup>29</sup> J. Bi, J. Wang, K. Zhou, Y. Wang, M. Fang, Y. Du, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 476-480.

<sup>30</sup> J. Schmiege, G. Yang, R.W. Franck, M. Tsuji, *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1631-1641.

Cette différence de comportement suggère que le remplacement de l'atome d'oxygène par un groupe méthylène en position anomérique provoque deux altérations possibles :

- Une légère distorsion du galactose de l' $\alpha$ -C-GalCer ne perturbe pas l'interaction avec le récepteur TCR des cellules iNKT murines alors qu'il semblerait que l'interaction avec les cellules iNKT humaines soit perturbée.

- Le groupement méthylène induit un changement de conformation du galactose à la surface de la glycoprotéine CD1d qui peut perturber la reconnaissance du complexe ligand/CD1d avec le récepteur TCR.

### b) Analogues insaturés

La synthèse et l'activité biologique d'analogues C-glycosidiques insaturés ont été décrites par l'équipe de Franck.<sup>31</sup> Seul l'isomère *E* a permis d'activer les cellules iNKTs chez la souris avec un niveau de production d'IFN- $\gamma$  légèrement inférieur à l' $\alpha$ -C-GalCer. L'analogue insaturé **35** (Schéma 24) comportant une chaîne *N*-acyle plus longue a montré la capacité à activer les cellules iNKT murines et humaines.<sup>32</sup> Le remplacement de la chaîne *N*-acyle par une chaîne comportant un noyau aromatique a conduit à l'analogue insaturé **36** (Schéma 24). Ce composé a induit une production de cytokines de type Th1 plus importante que tous les autres analogues insaturés, bien qu'inférieure au KRN7000.<sup>33</sup> Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'oléfine de configuration *E* permet de restaurer la conformation la plus optimale pour la partie sucre. Une fois le ligand insaturé chargé sur la glycoprotéine CD1d, le complexe peut être reconnu aussi bien par le récepteur TCR des cellules iNKT murines que sur le récepteur TCR des cellules humaines.

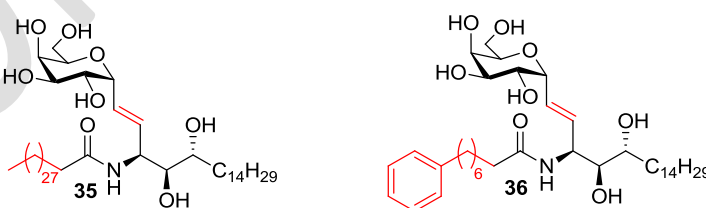


Schéma 24 - Analogues insaturés du KRN7000

L'équipe de Van Calenbergh a préparé un analogue insaturé hybride (**37**) qui comporte en position 6'' du galactose une fonction pyridin-4-ylcarbamate (Schéma 25) connue pour

<sup>31</sup> G. Chen, M. Chien, M. Tsuji, R. W. Franck, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 1017-1022.

<sup>32</sup> X. Li, G. Chen, R. Garcia-Navarro, R. W. Franck, M. Tsuji, *Immunology*, **2009**, *127*, 216-225.

<sup>33</sup> S. I. Fujii, K. Shimizu, H. Hemmi, M. Fukui, A. J. Bonito, G. Chen, R. W. Franck, M. Tsuji, R. M. Steinman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 11252-11257.

orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th1.<sup>34</sup> Cet analogue insaturé a une capacité d'activation des cellules iNKT humaines comparable au KRN7000 et avec une forte sélectivité Th1. Ce composé constitue le premier composé C-glycosidique à présenter des propriétés immunostimulantes vis-à-vis de cellules iNKT humaines supérieures au KRN7000.

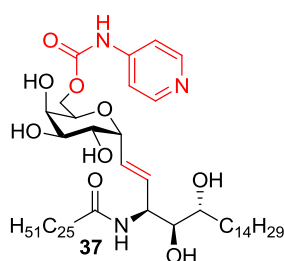


Schéma 25 - Analogue insaturé et modifié en position 6''

### c) L' $\alpha$ -S-GalCer

Étant donné qu'une plus grande activité est obtenue avec des C-glycosides pouvant être attribué à une plus grande stabilité *in vivo*, l'évaluation biologique de l'analogue S-glycoside (**38**) a été rapportée.<sup>35</sup> Cependant, l' $\alpha$ -S-GalCer **38** (Schéma 26) ne présente pas d'activité chez la souris *in vivo* mais il est actif *in vitro*, sur cellules humaines.

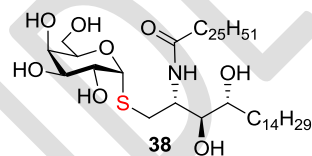


Schéma 26 - Structure de l' $\alpha$ -S-GalCer

## II-3. Modification de la partie polaire

La modification de la fonction amide a permis de développer divers analogues. A titre d'exemple, l'introduction d'un groupement triazole<sup>36</sup> (**39**) avec une longue chaîne alkyle (Schéma 27) permet une réponse de type Th2. Selon une étude de docking, le groupement triazole est en interaction avec la Thr154 de la glycoprotéine CD1d humaine par deux liaisons hydrogènes. Bien que le groupement triazole permette de nouvelles interactions, l'orientation de la réponse immunitaire est Th2. Les auteurs considèrent que le profil cytokinique est modifié à cause d'une possible altération de l'interaction entre le récepteur TCR et la glycoprotéine CD1d.

<sup>34</sup> J. Guillaume, T. Seki, T. Decruy, K. Venken, D. Elewaut, M. Tsuji, S. Van Calenbergh, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2217-2225.

<sup>35</sup> A. E. Hogan, V. O'Reilly, M. R. Dunne, R. T. Dere, S. G. Zeng, C. O'Brien, S. Amu, P. G. Fallon, M. A. Exley, C. O'Farrelly, X. Zhu, D. G. Doherty, *Clin. Immunol.* **2011**, *140*, 196-207.

<sup>36</sup> T. Lee, M. Cho, S. Ko, H. Youn, D. Jae Baek, W. Cho, C. Kang, S. Kim, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 585-589.

Mori *et al.*<sup>37</sup> ont rapporté en 2008 la synthèse de huit analogues comportant un cycle azétidine ou pyrrolidine mais tous ces composés ont présenté une activité inférieure au KRN7000 (Schéma 27). L'analogue avec un cycle azétidine (**40**) a montré un bon profil Th2 probablement dû à une déstabilisation du complexe ligand/CD1d. En revanche, une extension de cycle (**41**) ne permet pas d'avoir une stimulation des cellules iNKT.

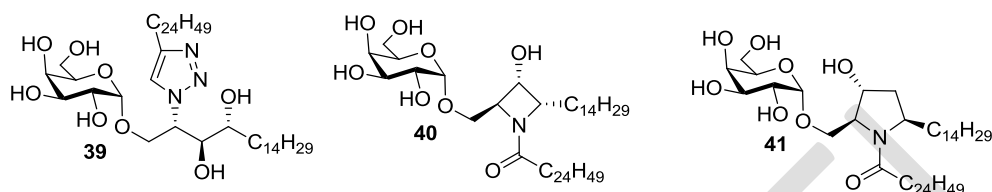


Schéma 27 - Modification de la fonction amide par des cycles azotés

En 2010, l'équipe de Kenji Mori a décrit la synthèse de l'analogue ester (**42**) (Schéma 28).<sup>38</sup> Ce composé a montré *in vivo* chez la souris une prolifération de cytokines pro-Th2. Une étude par simulation de dynamique moléculaire rapportée par Hénon *et al.*<sup>39</sup> a montré que le proton de l'amide du KRN7000 est en interaction avec la Thr154 de la glycoprotéine hCD1d par liaison hydrogène. Bien que cette interaction ne soit pas clairement établie sur la structure RX, il semblerait que la perte de la liaison hydrogène du groupement amide pourrait conduire à des analogues avec un profil Th2 comme pour l'analogue ester (**42**).

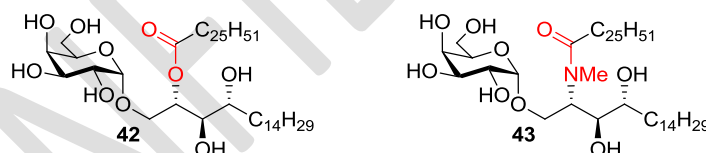


Schéma 28 - Modification de l'amide par un groupement ester **42** et l'analogue *N*-méthylé **43**

Des analogues *N*-méthylés du KRN7000 (**43**) (Schéma 28) ont été synthétisés, et ils ont également induit une production prédominante de cytokines pro-Th2<sup>40</sup> avec une perte de l'activité. Le proton du groupement amide semble donc jouer un rôle dans la sélectivité Th1/Th2.

<sup>37</sup> K. Fuhshuku, N. Hongo, T. Tashiro, Y. Masuda, R. Nakagawa, K. Seino, M. Taniguchi, K. Mori, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 950–964.

<sup>38</sup> M. Shiozaki, T. Tashiro, H. Koshino, R. Nakagawa, S. Inoue, T. Shigeura, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *Carbohydr. Res.* **2010**, 345, 1663–1684

<sup>39</sup> E. Hénon, M. Dauchez, A. Haudrechy, A. Banchet, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 9480–9489

<sup>40</sup> T. Tashiro, T. Shigeura, M. Shiozaki, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *Med. Chem. Commun.* **2013**, 4, 949–955.

En 2009, l'équipe de Linclau<sup>41</sup> a préparé un analogue difluoré (**44**) en  $\alpha$  du carbonyle de la fonction amide (Schéma 29). Leur hypothèse était de savoir si l'augmentation de l'acidité du proton de l'amide joue un rôle important dans le gain de stabilité du complexe trimoléculaire pour induire une sélectivité Th1. A leur grande surprise, cet analogue a montré un profil Th2. Les auteurs ont indiqué que des facteurs biologiques pouvaient influencer la sélectivité comme par exemple une plus forte solvation de l'amide ce qui perturberait les interactions ligand/CD1d. Un changement de conformation de l'amide où le proton n'est plus orienté vers un résidu d'acide aminé pour former une liaison hydrogène pourrait aussi être un facteur influant sur la sélectivité.

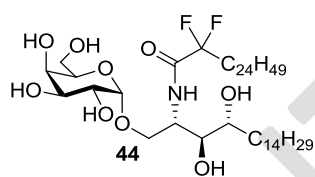


Schéma 29 - Analogue difluoré en  $\alpha$  du carbonyle de l'amide

La même équipe<sup>42</sup> a aussi préparé un analogue difluoré (**45**) en position 4 de la chaîne sphingosine (Schéma 30) pour étudier l'influence du groupement difluorométhylène sur la force de la liaison hydrogène du groupement hydroxyle en position 3 et donc sur les propriétés immunostimulantes. L'évaluation biologique a montré que cet analogue induit une réponse de type Th1 *in vivo* chez la souris. L'augmentation du caractère donneur de liaison hydrogène du groupement hydroxyle en position 3 semble favoriser la stabilité du complexe trimoléculaire ce qui mène à une sélectivité Th1.

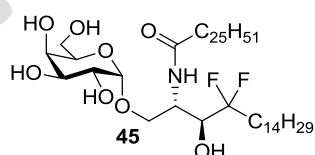


Schéma 30 - Analogue difluoré en position 4 de la chaîne sphingosine

<sup>41</sup> L. Leung, C. Tomassi, K. Van Beneden, T. Decruy, M. Trappeniers, D. Elewant, Y. Gao, T. Elliott, A. Al-Shamkhani, C. Ottensmeier, J. M. Werner, A. Williams, S. Van Calenberg, B. Linclau, *ChemMedChem*. **2009**, *4*, 329-334.

<sup>42</sup> L. Leung, C. Tomassi, K. Van Beneden, T. Decruy, D. Elewant, T. Elliott, A. Al-Shamkhani, C. Ottensmeier, S. Van Calenberg, J. Werner, T. Williams, B. Linclau, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4433-4436.

## II-4. Modification des chaînes lipidiques

### a) Analogues avec un profil Th1

Wong *et al.*<sup>43</sup> ont décrit la synthèse de différents analogues comportant un cycle aromatique sur les chaînes acyle et sphingosine (Schéma 31). La modification des chaînes alkyles par des groupements aryles induit des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  stacking dans les poches hydrophobes du CD1d augmentant la stabilité du complexe CD1d/ligand. En effet, ces analogues possèdent tous un profil Th1 avec une forte production d'IFN- $\gamma$ .

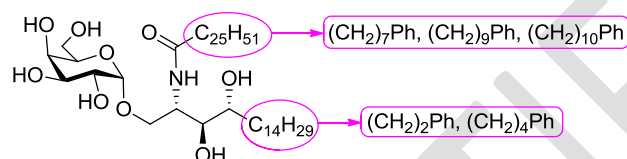


Schéma 31 - Exemples d'analogues avec un profil Th1

La substitution de la chaîne *N*-acyle par une chaîne en C12 avec un groupement hydroxyle terminal<sup>44</sup> induit aussi une prolifération d'IFN- $\gamma$  (Schéma 32). Les auteurs suggèrent que la fonction hydroxyle peut établir une liaison hydrogène avec un résidu d'acide aminé polaire ce qui permet de compenser la perte des interactions hydrophobes générées par une longue chaîne lipidique.

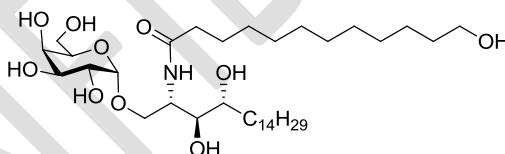


Schéma 32 - Analogue avec un groupement hydroxyle terminal sur la chaîne acyle

### b) Analogues avec un profil Th2

En 2001, Yamamura *et al.*<sup>45</sup> ont préparé l'analogue OCH (**46**) (Schéma 33) ayant une très forte activité avec une orientation Th2 *in vivo* chez la souris. Il s'agit d'un analogue dont la partie sphingosine a été raccourcie d'un C<sub>18</sub> à un C<sub>9</sub>. La production de cytokines pro-Th2 est rationalisée par le fait qu'il y ait moins d'interactions de type Van der Waals avec les résidus d'acides aminés dans la poche hydrophobe de la glycoprotéine CD1d.

<sup>43</sup> Y. Chang, J. Huang, Y. Tsai, J. Hung, D. Wu, M. Fujio, C. Wong, A. L. Yu, *Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 10299-10304.

<sup>44</sup> C. Lim, J. H. Kim, D. J. Baek, J-Y. Lee, M. Cho, Y-S. Lee, C-Y. Kang, D. H. Chung, W-J. Cho, S. Kim, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 331-335.

<sup>45</sup> K. Miyamoto, S. Miyake, T. Yamamura, *Nature*, **2001**, *413*, 531-534.



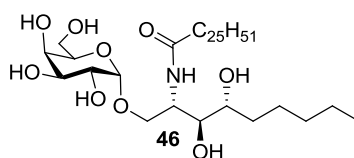


Schéma 33 - Structure de l'analogue OCH avec un profil Th2

En 2012, l'équipe de Park<sup>46</sup> a entrepris la synthèse et l'évaluation de différents analogues du KRN7000 avec des motifs aromatiques sur la chaîne sphingosine. Leur approche est basée sur une étude de docking qui montre des interactions  $\pi$ - $\pi$  stacking avec des résidus d'acides aminés comportant un noyau aromatique ce qui devrait stabiliser le complexe ligand/CD1d et induire une sélectivité Th1. A leur grande surprise, tous les analogues ont montré une sélectivité Th2 dont le composé (**47**) (Schéma 34) qui présente meilleure activité.

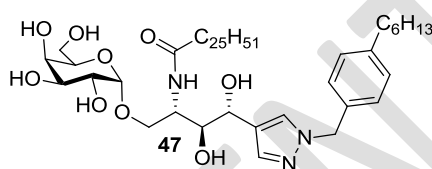


Schéma 34 - Analogue du KRN7000 avec un noyau pyrazole

## II-5. Bilan sur l'activité des analogues du KRN7000

Au regard de toutes les études SAR décrites dans la littérature, plusieurs facteurs sont essentiels au maintien d'une activité biologique. La configuration  $\alpha$  du carbone anomérique et l'hydroxyle en position 2'' du galactose sont indispensables. Les fonctions hydroxyles en position 3'' et 4'' peuvent accepter des modifications mais une diminution de l'activité biologique est souvent observée. L'hydroxyle en position 6'' accepte le plus de modulation sans impacter significativement l'activité biologique et une sélectivité Th1/Th2 peut être obtenue.

La modification de la fonction acétal par une fonction éther comme l' $\alpha$ -C-Galcer et l' $\alpha$ -carba-GalCer permet une sélectivité de type Th1 car ces analogues sont peu sensibles à la dégradation enzymatique. Enfin, la modification de la fonction amide et des chaînes lipidiques peuvent aussi entraîner une sélectivité, les chaînes courtes entraînant une sélectivité Th2. L'introduction de groupements aromatiques judicieusement positionnées peut induire des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  stacking dans les deux poches hydrophobes de la glycoprotéine CD1d et donc favoriser la sélectivité de type Th1.

<sup>46</sup> Y. Kim, J. Kim, K. Oh, D-S. Lee, S. B. Park, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 151-154.

# PARTIE A

---

La partie A sera divisée en deux chapitres. Le premier chapitre aura un aspect bibliographique qui exposera d'une part, les précédents travaux du laboratoire et d'autre part, le concept de greffage d'un principe actif à un anticorps, décrit dans la littérature. Le second chapitre sera consacré aux résultats obtenus pendant la période de ma thèse dont l'objectif est de greffer le KRN7000 à un agent ciblant *via* un espaceur de type clivable ou non clivable.

## Chapitre I

---

Dans ce chapitre, les différents travaux du laboratoire sur les galactosylcéramides seront exposés. Ces travaux décrivent d'une part, la synthèse et l'activité de différents analogues du KRN7000 et d'autre part, une première approche d'encapsulation du KRN7000 par les liposomes pour augmenter la solubilité en milieu physiologique. Enfin, le concept de conjugués anticorps-médicament (ADCs) « antibody-drug conjugate » et les types de greffages aux anticorps seront présentés avant de décrire mes travaux de thèses dans à la fin de ce chapitre.

### I - Travaux du laboratoire

L'équipe de Didier Dubreuil travaille sur les analogues du KRN7000 depuis de nombreuses années. Lorsque les travaux ont débuté, il restait une ambiguïté dans la littérature sur l'importance de l'hydroxyle en position 4 de la chaîne sphingosine sur l'activité biologique. Les premiers travaux au sein l'équipe a été d'établir le rôle de cette fonction hydroxyle.

#### I-1. L'analogue 4-désoxy du KRN7000

Dans la littérature, l'analogue 4-désoxy du KRN700 a fait l'objet d'une première étude par l'équipe de Kronenberg<sup>47</sup> en 2004. L'évaluation biologique a montré une activité semblable au KRN7000 *in vivo* chez la souris alors que son efficacité *in vitro*, sur cellules humaines restait ambiguë. La structure RX du complexe trimoléculaire, établie en 2005, montre que le groupement hydroxyle en position 4 n'établit aucune interaction avec la

---

<sup>47</sup> S. Sidobre, K. J. L. Hammond, L. Benazet-Sidobret, S. D. Maltsev, S. K. Richardson, R. M. Ndongye, A. R. Howell, T. Sakai, G. S. Besra, S. A. Porcelli, M. Kronenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 12254-12259.

glycoprotéine CD1d et par conséquent, l'analogue 4-désoxy du KRN7000 devrait aussi bien activer les cellules iNKT murines et humaines. En 2009, l'équipe de Didier Dubreuil a étudié l'activité *in vitro*, sur cellules humaines de l'analogue 4-désoxy du KRN7000<sup>48</sup> (Schéma 35).

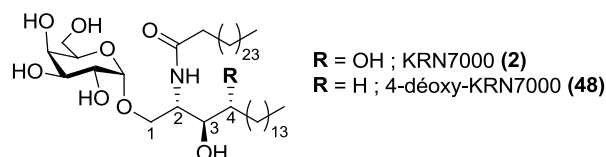


Schéma 35 - Structure du 4-désoxy-KRN7000

Dans ce contexte, une synthèse courte et efficace a été élaborée pour préparer des analogues 4-désoxy du KRN7000 et évaluer leur activité biologique. Ces composés sont préparés à partir du synthon **49** qui permet d'accéder rapidement à de nombreux analogues 4-désoxy par une réaction de métathèse avec une oléfine modulable et par l'introduction tardive de la chaîne *N*-acyle également modulable (Schéma 36). Le synthon **49**, commun aux analogues 4-désoxy du KRN7000, est obtenu par couplage glycosidique entre le fluorogalactosyle **50** et l'amino-diol éthylénique **51**.

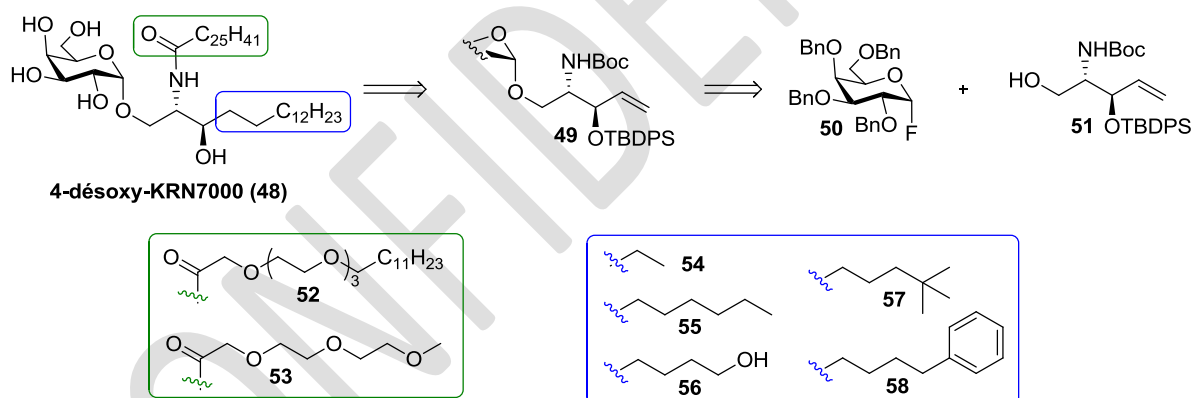


Schéma 36 - Approche rétrosynthétique d'analogues 4-désoxy du KRN7000

Le profil cytokinique a été réalisé dans un premier temps, *in vivo* chez la souris. La quantité de cytokines (IFN- $\gamma$  et IL-4) produite est semblable au KRN7000 ce qui confirme que le 4-désoxy-KRN7000 **48** a une activité similaire au KRN7000 *in vivo* chez la souris, en accord avec les résultats décrits par l'équipe de Kronenberg.<sup>47</sup>

La stimulation des cellules iNKT humaines par le 4-désoxy-KRN7000 **48** ainsi que les analogues 4-désoxy (**52-58**) ont été évaluée. L'activité biologique de tous ces analogues ne montre pas de différences significatives par rapport aux analogues hydroxylés de la littérature.

<sup>48</sup> V. Lacône, J. Hunault, M. Pipelier, V. Blot, T. Lecourt, J. Rocher, A-L. Turcot-Dubois, S. Marrionneau, J-Y. Douillard, M. Clément, J. Le Pendu, M. Bonneville, L. Micouin, D. Dubreuil, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4960-4963.

Le groupement hydroxyle en position 4 ne semble donc pas important pour avoir une réponse immunitaire.

## I-2. Analogues fluorés du KRN7000

### a) Le 3-fluoro-3,4-didésoxy-KRN7000

Il a été montré dans la littérature que la fonction hydroxyle en position 3 de la chaîne sphingosine est impliquée dans deux liaisons hydrogènes<sup>12</sup>, l'une avec un caractère donneur et l'autre avec un caractère accepteur respectivement avec la glycoprotéine CD1d et le TCR. En 2012, l'équipe de Dubreuil a voulu mettre en évidence l'importance de ces deux interactions dans la stabilité du complexe CD1d/ligand/TCR<sup>12</sup> en préparant le 3-fluoro-3,4-didésoxy-KRN7000 **59**.<sup>49</sup> En effet, l'introduction d'un atome de fluor permet de supprimer le caractère donneur de la liaison hydrogène tout en conservant le caractère accepteur de liaisons hydrogènes.<sup>50</sup> La préparation de cet analogue **59** repose sur la même stratégie que pour la synthèse du 4-désoxy-KRN7000 (Schéma 37). Le 3-fluoro-3,4-didésoxy-KRN7000 **59** est obtenu à partir du composé fluoré **60**, lui-même obtenu par fluoration de l'alcool allylique **61**.

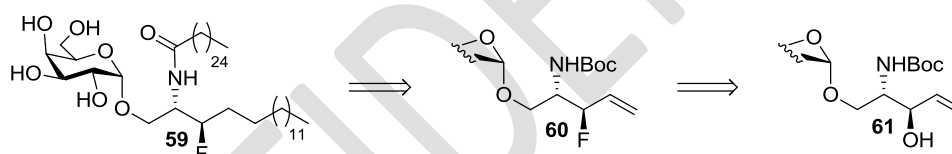


Schéma 37 - Rétrosynthèse du 3-fluoro-3,4-didésoxy-KRN7000

L'évaluation biologique *in vitro* du 3-fluoro-3,4-didésoxy-KRN7000 **59** montre une très faible activité avec une sélectivité Th2. Cette étude a montré que la liaison hydrogène à caractère donneur est importante pour la stabilisation du complexe.

### b) Le 3,3-difluoro-3,4-didésoxy-KRN7000

L'équipe de Dubreuil s'est ensuite intéressé à la synthèse et l'évaluation biologique du 3,3-difluoro-3,4-didésoxy-KRN7000 **62** (Schéma 38) pour étudier l'effet de ce groupement difluorométhylène électro-attracteur, ce qui devrait impacter le caractère acide du proton de l'amide et favoriser la liaison hydrogène entre ce proton et la Thr154 de la glycoprotéine hCD1d. L'analogue difluoré **62** montre une bonne activité biologique avec une sélectivité

<sup>49</sup> J. Hunault, M. Diswall, J-C. Frison, V. Blot, J. Rocher, S. Marrionneau-Lambot, T. Oullier, J-Y. Douillard, S. Guillaume, C. Saluzzo, G. Dujardin, D. Jacquemin, J. Graton, J-Y. Le Questel, M. Evain, J. Lebreton, D. Dubreuil, J. Le Pendu, M. Pipelier, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1227-1241.

<sup>50</sup> W. K. Hagmann, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359-4369.

Th1. Cette observation est contradictoire avec l'étude de Linclau<sup>41</sup> où l'introduction de leur groupement difluorométhylène en  $\alpha$  du carbonyle de l'amide mène à une sélectivité Th2.

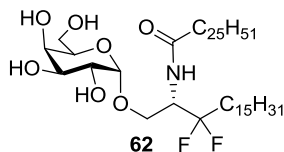


Schéma 38 - Structure du 3,4-difluoro-3,4-didéoxy-KRN7000

Une étude de modélisation a été effectuée au sein de l'équipe de D. Dubreuil pour déterminer l'impact du groupement difluorométhylène en position 3 de la chaîne sphingosine **62** et en  $\alpha$  du carbonyle de l'amide **44**. Cette étude a montré que pour l'analogue **44**, le proton de l'amide et un atome de fluor sont *syn* périplanaire,<sup>49</sup> ce qui permet une liaison hydrogène entre ces deux atomes perturbant ainsi l'interaction entre le proton de l'amide et la Thr154 qui peut justifier la sélectivité Th2 observée. Une telle interaction hydrogène-fluor intramoléculaire est inexistante pour l'analogue **62**, ce qui rend possible la liaison hydrogène entre le proton de l'amide et la Thr154 de la glycoprotéine CD1d. Il semble donc que l'effet électro-attracteur du groupement difluorométhylène vient partiellement compenser la liaison hydrogène à caractère donneur du groupement hydroxyle en position 3 et permet de restaurer une certaine stabilité du complexe.

### I-3. Encapsulation du KRN7000 dans les liposomes

Après avoir résolu l'ambiguïté sur l'hydroxyle en position 4 et les analogues fluorés, notre équipe a travaillé sur l'amélioration de la solubilité du KRN7000. De façon générale, les drogues peuvent être encapsulées dans des liposomes dont l'avantage est de solubiliser les principes actifs hydrophobes et de protéger la molécule active de la dégradation enzymatique dans le milieu physiologique. Un travail de recherche a fait l'objet d'une thèse confidentielle soutenue en 2014 soutenue par Caroline Ballet<sup>8</sup> sur l'encapsulation du KRN7000 dans des archéosomes. Les archéosomes sont des structures constituées de lipides et d'archéolipides, lipides bipolaires qui offre un gain de rigidité et de stabilité. Le taux d'archéolipides dans ce type de structure devrait permettre de moduler la stabilité de l'archéosome dans le milieu physiologique et contrôler la libération du KRN7000 au cours du temps pour éviter de relarguer l'immunostimulant en une seule fois qui induirait un phénomène d'anergie. Ces archéosomes sont fonctionnalisés par des chaînes PEG, hydrosolubles et stables en milieu physiologique, dont l'objectif est d'améliorer les problèmes de solubilités (Schéma 39).

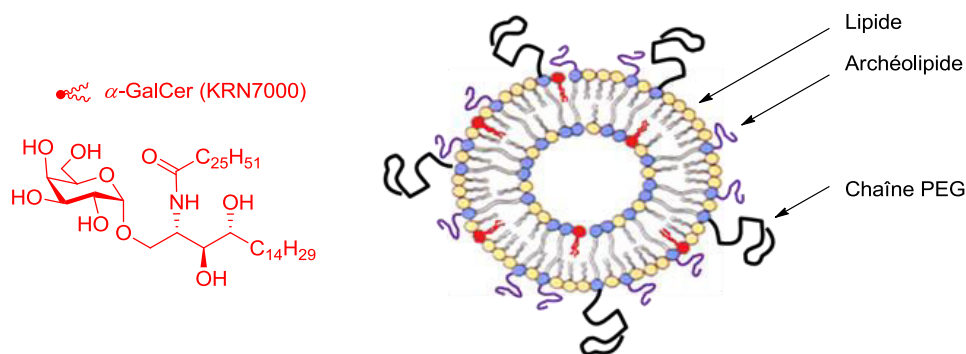


Schéma 39 - Encapsulation du KRN7000

Différents archéosomes ont été préparés avec des proportions variables de KRN7000. L'étude a montré une conservation de l'activité du KRN7000 encapsulé dans les archéosomes, et une relation dose-effet selon la quantité de glycolipide. Comme attendu, les archéosomes sont solubles en milieu aqueux. L'étude doit être complétée en faisant varier la quantité et la nature des archéolipides au sein de la structure pour observer un décalage de réponse traduisant un changement de stabilité de ces archéosomes.

Un second projet du laboratoire a pour objectif la vectorisation du KRN7000 au plus près des cellules tumorales. L'avantage de cibler l'environnement tumoral est de limiter les effets secondaires induits par l'injection du KRN7000 seul.<sup>51</sup> C'est là qu'intervient une partie de mon sujet de thèse qui consiste à réaliser le couplage du KRN7000 à un agent ciblant des cellules tumorales de manière non clivable et auto-immolable (Schéma 40). Ces travaux de vectorisation passent avant tout par la synthèse chimique des différents synthons qui seront décrits dans le chapitre II.

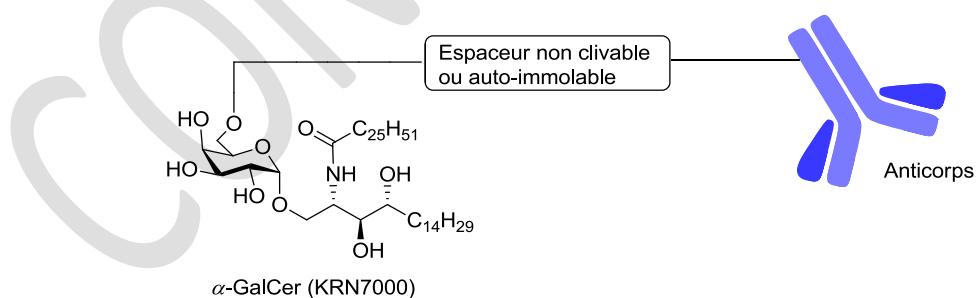


Schéma 40 - Vectorisation du KRN7000 par un anticorps

Avant cela, le concept des ADCs sera présenté et différentes méthodes de couplage entre un principe actif et un anticorps, décrites dans la littérature, seront exposées.

<sup>51</sup> Y. Tamura, A. Teng, R. Nozawa, Y. Takamoto-Matsui, Y. Ishii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 369, 485-492.

## II - Concept « Antibody-Drug Conjugate » (ADC)

Un ADC est un anticorps monoclonal couplé à un ou plusieurs agents cytotoxiques *via* un agent de liaison utilisé en thérapie ciblée limitant l'action cytotoxique sur les cellules saines.

### II.1. Rappels sur les anticorps monoclonaux

Un anticorps est un complexe protéique dont le rôle est de reconnaître un antigène étranger afin de le neutraliser. La reconnaissance s'établit grâce à la grande spécificité du paratope de l'anticorps, qui ne reconnaît qu'une partie très précise de l'antigène : l'épitope. Dès qu'un anticorps reconnaît un épitope, le lymphocyte B qui code pour cet anticorps spécifique se multiplie et subit une maturation pour pouvoir synthétiser les mêmes anticorps en grandes quantités.

Comme les anticorps, les anticorps monoclonaux sont des glycoprotéines possédant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères et forme l'immunoglobuline (Ig) dont l'IgG est la principale dans le sang. Décrit par R. R. Porter et G. M. Edelman,<sup>52</sup> les chaînes lourdes sont reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures et ont une masse d'environ 50kDa. Quant aux chaînes légères, elles sont reliées aux chaînes lourdes par des ponts disulfures et ont une masse d'environ 25kDa. Les anticorps sont constitués d'un « Fragment antigen binding » Fab, comprenant les sites de reconnaissance au récepteur (paratopes), et d'un « Fragment cristallizable » Fc, conférant l'activité biologique de l'anticorps (Schéma 41).

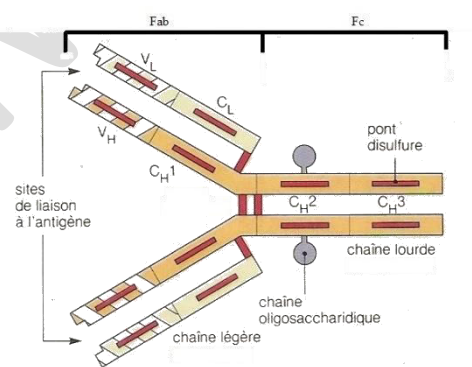


Schéma 41 - Structure d'un anticorps

De nombreux anticorps monoclonaux sont utilisés en tant qu'outils de diagnostic et outils thérapeutiques : ce sont les anticorps monoclonaux. A titre d'exemple, les tests de grossesse utilisent un anticorps monoclonal anti-hCG qui se lie à l'hormone chorionique

<sup>52</sup> D. Ribatti, Immunol. Lett. **2015**, 164, 72-75

gonadotrope humaine (hCG) secrétée par le placenta. Les anticorps monoclonaux sont produits à partir d'une cellule issue de la fusion entre un lymphocyte B et une cellule cancéreuse, appelée hybridome. Georges Köhler et César Milstein ont découvert une technique permettant d'obtenir ces anticorps monoclonaux<sup>53</sup> chez la souris à partir de cellules de la rate, source de lymphocytes B, et de cellules myélomateuses, responsables de l'immortalité de ces cellules, ce qui leur a valu le Prix Nobel de médecine en 1984. Les anticorps peuvent être obtenus en grande quantité et indéfiniment, une fois les hybridomes obtenus.

Les premières applications thérapeutiques des anticorps monoclonaux ont vu le jour en 1981 avec le muromonab inhibant le rejet de greffes.<sup>54</sup> Cependant les premiers anticorps monoclonaux issus d'hybridomes murins présentent un temps de demi-vie court et sont immunogènes. Le progrès de la biologie moléculaire a permis la production d'anticorps humanisés limitant les effets secondaires.

Actuellement, une trentaine d'anticorps monoclonaux sont utilisés en thérapeutique et presque une centaine en essais cliniques.<sup>55</sup> Ils sont utilisés dans diverses pathologies notamment en oncologie (Rituximab), immunosuppression (Basiliximab), infectiologie (Palivizumab) et allergologie (Omalizumab).

## II.2. Elaboration des ADCs

En 2016, une soixantaine d'ADCs étaient utilisés dans les différentes phases cliniques<sup>56</sup> et une centaine de structure sont en développement. Les premiers ADCs mis sur le marché sont Adcetris® (Brentuximab vedotin) en 2011 contre le cancer du système lymphatique et Kadcylla® (Trastuzumab emtansine) en 2013 contre le cancer du sein. En 2017 et sur l'année 2018 en cours, deux autres ADCs obtiennent leurs autorisations de mise sur le marché (AMM). Il s'agit de Besponsa® (Inotuzumab ozogamicin), produit par Pfizer/Wyeth<sup>57</sup> et utilisé en monothérapie dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique (LAL) et du Mylotarg® contre la leucémie aigüe myéloïde (LAM) chez l'enfant.

---

<sup>53</sup> G. Köhler, C. Milstein, *Nature*, **1975**, 256, 495-497.

<sup>54</sup> B. Vanhove, *Med. Sci.* **2009**, 25, 1121-1125

<sup>55</sup> A. Mahmuda, F. Bande, K. J. K. Al-Zihiry, N. Abdulhaleem, R. A. Majid, R. A. Hamt, W. O. Abdullah, Z. Unyah, *Trop. J. Pharm. Res.* **2017**, 16, 713-722.

<sup>56</sup> K. Tsuchikama, *Z. An, Protein Cell*, **2018**, 9, 33-46.

<sup>57</sup> <https://www.adcreview.com>.



L'espaceur utilisé pour greffer l'anticorps au principe actif peut être distingué en deux familles : les espaceurs non clivables et clivables. Le rôle de cet espaceur est crucial pour le maintien de l'ADC qui doit être stable en milieu physiologique jusqu'à l'environnement tumoral. Plus précisément, les espaceurs clivables utilisent une propriété de l'environnement tumoral pour le relargage du principe actif due à plusieurs facteurs (enzyme, pH, taux de glutathion).<sup>58</sup> Quant aux espaceurs non clivables, les mécanismes de dégradation ne sont pas évidents. L'ADC est dégradé dans le lysosome après son internalisation pour libérer une forme active du cytotoxique.

### a) Les espaceurs non clivables

Il existe différents espaceurs commerciaux non clivables avec des chaînes carbonées ou des chaînes PEG (SM(PEG)<sub>n</sub>) (Schéma 42). Le point commun de ces espaceurs est la fonction chimique à chaque extrémité de la chaîne, à savoir une fonction maléimide qui permet de réagir sélectivement avec une fonction thiol de l'anticorps ou éventuellement du principe actif. L'autre extrémité de la chaîne est un groupement ester activé qui permet de greffer le principe actif ou éventuellement l'anticorps *via* un groupement amine.

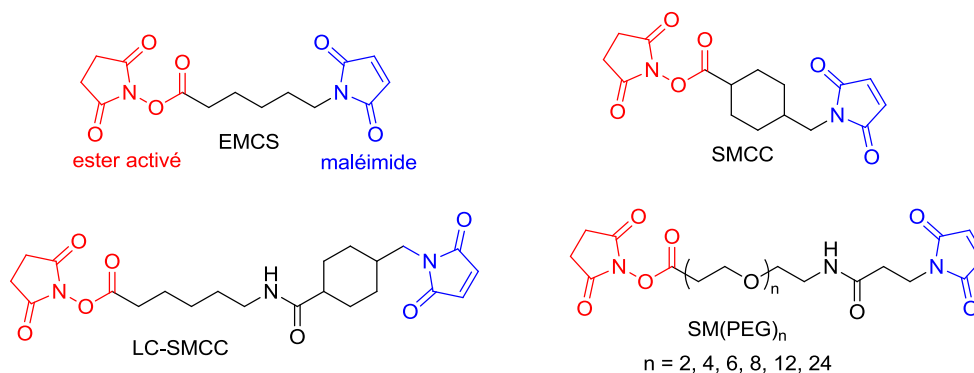


Schéma 42 - Exemples d'espaceurs commerciaux utilisés pour le design d'ADCs

A titre d'exemple, le trastuzumab emtansine<sup>59</sup> est un anticorps conjugué ciblant le récepteur HER2, une protéine impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire. Le trastuzumab est lié de façon covalente au DM1 (dérivé de la maytansine), un inhibiteur de microtubules, *via* une liaison thioéther stable sur le motif MCC (4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) (Schéma 43). Dans ce cas, les fonctions amines des résidus lysines de l'anticorps réagissent sur l'ester activé de l'espaceur SMCC tandis que le principe actif réagit par sa fonction thiol sur le maléimide de l'espaceur SMCC. Cette conjugaison confère à l'agent cytotoxique une sélectivité pour les cellules tumorales

<sup>58</sup> N. Jain, S. W. Smith, S. Ghone, B. Tomczuk, *Pharm. Res.* **2015**, 32, 3526-3540.

<sup>59</sup> S. Verma, D. Miles, L. Gianni, I. E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D-Y. Oh, V. Diéra, E. Guardino, L. Fang, M. W. Lu, S. Olsen, K. Blackwell, *New Engl. J. Med.* **2012**, 367, 1783-1791.

surexprimant le récepteur HER2. Suite à la complexation au récepteur, le trastuzumab emtansine est internalisé, puis s'en suit une dégradation lysosomale, conduisant à la libération de catabolites cytotoxiques contenant du DM1 (essentiellement le dérivé lysine-MCC-DM1).<sup>58</sup>

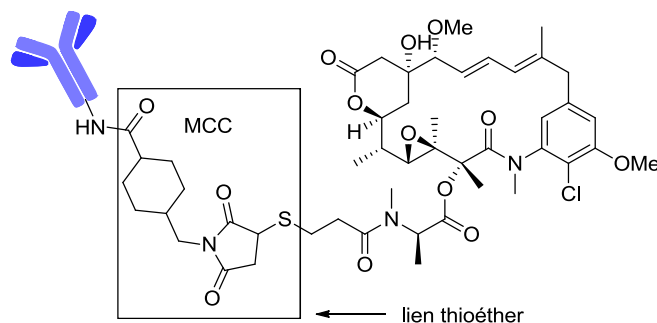


Schéma 43 - Structure du trastuzumab emtansine

## b) Les espaceurs clivables

Les espaceurs clivables jouent un rôle primordial dans l'efficacité d'un ADC dont l'objectif est d'être suffisamment stable dans la circulation sanguine pour atteindre l'environnement tumoral afin d'être dégradé par divers processus.

- Lien hydrazone

Les fonctions hydrazones sont par exemple stables au pH neutre du système sanguin mais s'hydrolysent sous conditions acides observées dans l'environnement tumoral ou des compartiments cytoplasmiques. A titre d'exemple, le gemtuzumab ozogamicin, un anticorps monoclonal conjugué à la calichéamycine (Schéma 44), est utilisé dans le traitement de leucémie myéloïde aiguë (LMA). Cet ADC, actuellement en autorisation temporaire d'utilisation (ATU) sous le nom Mylotarg®, est composé d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD33 exprimé sur la plupart des cellules souches hématopoïétiques. Cet antigène se retrouve à la surface des cellules leucémiques chez environ 90% des patients avec une LMA ce qui en fait une cible intéressante en thérapie ciblée.<sup>60</sup> Quant à la calichéamycine, elle se lie à des séquences spécifiques de l'ADN entraînant une rupture irréversible aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. Sa forte toxicité interdit l'emploi direct en thérapie d'où le greffage à un anticorps monoclonal.

<sup>60</sup> ANSM, « Protocole d'utilisation thérapeutique et recueil d'informations », <http://www.anism.sante.fr>, 10 avril 2015.

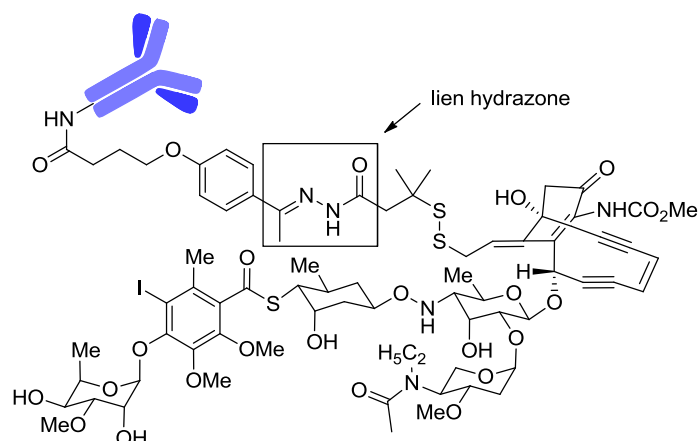


Schéma 44 - Structure du gemtuzumab ozogamicin

- Lien disulfure

La réduction d'une fonction disulfure prend son avantage par la différence du potentiel de réduction entre les compartiments intracellulaires et le plasma. Cette approche permet d'avoir une grande stabilité dans la circulation sanguine jusqu'au clivage grâce à une haute concentration d'enzymes réductrices comme le glutathion au voisinage des cellules tumorales. Les molécules cytotoxiques majoritairement utilisées avec un pont disulfure sont les maytansinoïdes conjuguées avec différents anticorps monoclonaux. En particulier, le conjugué huC242-SPDB-DM4<sup>61</sup> (IMGN242) est un nouvel ADC prometteur contenant anticorps monoclonal huC242, ciblant les cellules pancréatiques, greffé au maytansinoïde DM4 (Schéma 45) qui est ensuite relargué dans les cellules tumorales.

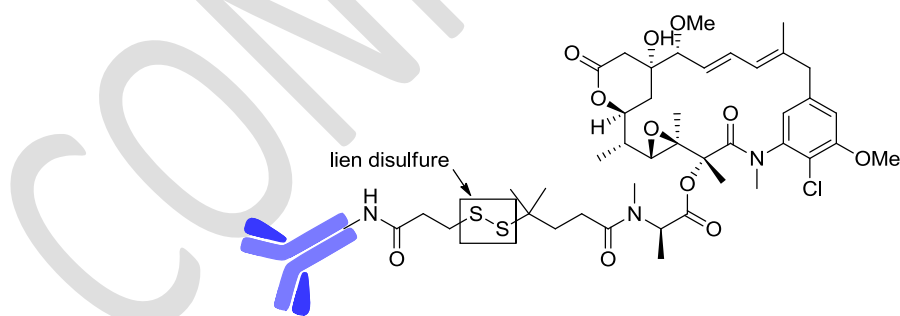


Schéma 45 - Structure de huC242-SPDB-DM4

- Lien peptidique

Les liens peptidiques sont extrêmement stables en milieu sanguin. Le clivage est réalisé en milieu intracellulaire par action de protéases comme la cathepsine B. Les espaceurs les plus utilisés pour l'élaboration d'ADCs sont le dipeptide valine-citrulline (Val-Cit) et

<sup>61</sup> H. K. Erickson, P. U. Park, W. C. Widdison, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4426-4433.

phénylalanine-lysine (Phe-Lys). A titre d'exemple, le brentuximab vedotine est un ADC composé de l'anticorps monoclonal brentuximab dirigé contre l'antigène CD30 conjugué à la monométhyl aurisatine E (MMAE) (Schéma 46), un agent antimétabolite, dans le traitement du cancer du système lymphatique. Une fois l'anticorps fixé au CD30, l'ADC est internalisé et le MMAE est libéré au sein de la cellule par clivage protéolytique. Cette molécule cytotoxique perturbe le réseau de microtubules se traduisant par la mort apoptotique des cellules tumorales exprimant l'antigène CD30.

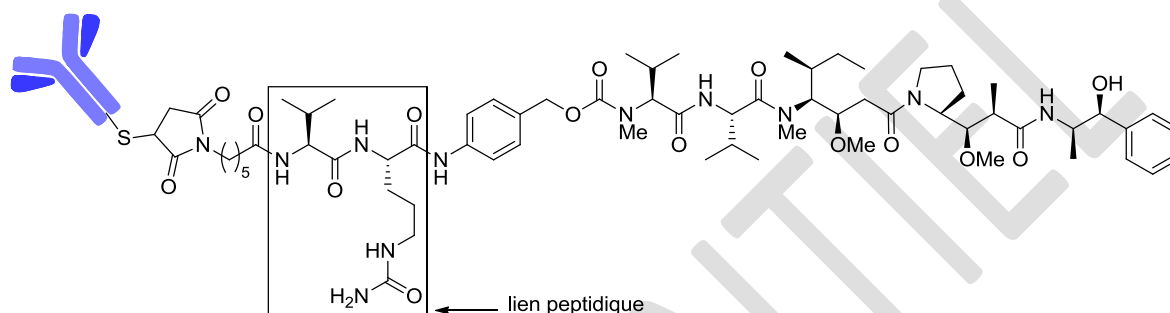


Schéma 46 - Structure du brentuximab vedotine

- Gâchette aromatique

Ce type de gâchette est constitué d'un noyau aromatique substitué par un  $\beta$ -glucuronide, le principe actif et l'anticorps. Le clivage du lien  $\beta$ -glucuronide est réalisé par l'action spécifique de la  $\beta$ -glucuronidase, une enzyme présente dans le lysosome et surexprimée dans l'environnement tumoral.<sup>62</sup> Après clivage du lien osidique, il en résulte une cascade électronique *via* une élimination 1,4 ou 1,6 ce qui permet de libérer le principe actif. Ce dernier peut être éloigné du noyau aromatique pour limiter l'encombrement stérique, par un espaceur clivable de type diamine, qui par cyclisation spontanée et irréversible permet de libérer le principe actif (Schéma 47).<sup>63</sup>

<sup>62</sup> T. Connors, M. L. Whisson, *Nature*, **1966**, 210, 866-867.

<sup>63</sup> S. C. Jeffrey, J. De Brabander, J. Miyamoto, P. D. Senter, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, 1, 277-280.

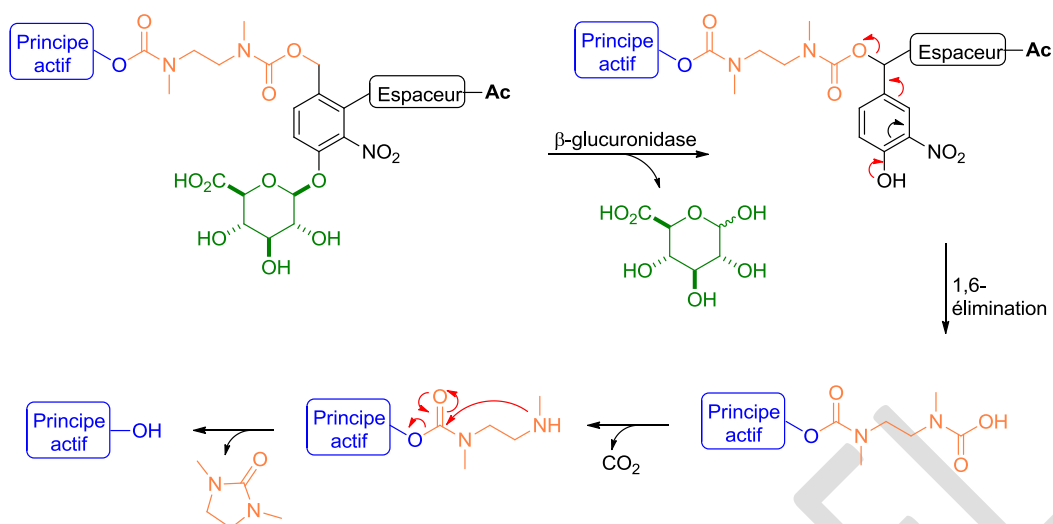
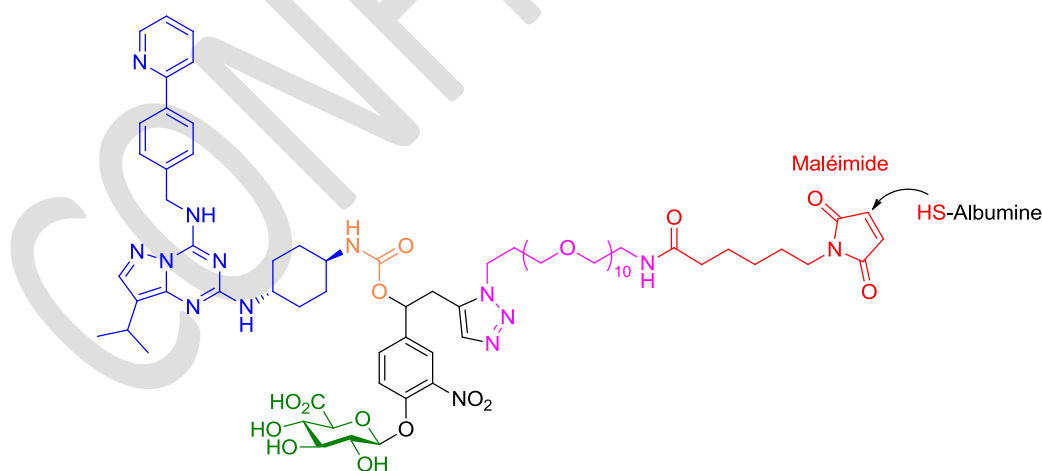


Schéma 47 - Mécanisme de dégradation avec une gâchette aromatique substitué par un  $\beta$ -glucuronide

. Sur ce principe de plateforme auto-immolable, l'équipe de Papot a notamment préparé des prodrogues de la doxorubicine<sup>64</sup> et d'un inhibiteur d'une protéine kinase<sup>65</sup> via une gâchette aromatique qui présente un espaceur de type PEG fonctionnalisé par motif maléimide pour réagir *in vivo* sur les fonctions thiols de l'albumine, qui a pour action de transporter la prodrogue dans l'organisme (Schéma 48). On retrouve toujours le même principe, à savoir l'utilisation d'un espaceur qui présente à ces extrémités, deux fonctions réactives différentes, qui dans le cas présent, est un maléimide d'un côté et un ester activé de l'autre.



Gâchette aromatique avec la prodrogue

Schéma 48 - Exemple d'une gâchette aromatique décrit par l'équipe de Papot<sup>65</sup>

<sup>64</sup> T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, J-M. Berjeaud, F. Guillhot, S. Papot, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4516-4520.

<sup>65</sup> G. Compain, N. Oumata, J. Clarhaut, E. Péraudeau, B. Renoux, H. Galons, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 158, 1-6.

### III - Présentation des travaux

Le premier objectif de la thèse envisage le greffage entre l'anticorps et le KRN7000 *via* un espaceur non clivable. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un espaceur de type PEG fonctionnalisé par une fonction ester activée et un motif maléimide. L'avantage de ce type d'espaceur commercial est la variabilité de la longueur de la chaîne PEG d'où la possibilité de moduler la distance entre le KRN7000 et l'anticorps pour juger l'impact sur l'activité de notre complexe. L'anticorps réagira *via* ses fonctions thiols sur le maléimide. Par conséquent, le KRN7000 devra réagir *via* une fonction amine, inexistante sur ce composé. L'introduction de la fonction amine se fera sur la position 6'' du galactose car elle accepte le plus de modifications. Des travaux initiaux de notre équipe ont montré que l'introduction de l'amine primaire sur cette position présentait une synthèse avec de faibles rendements et la réactivité de l'amine vis-à-vis du groupement ester activé de l'espaceur était mauvaise probablement due à l'encombrement stérique du KRN7000. L'idée est d'éloigner la fonction amine réactive du KRN7000 modifié, *via* un second espaceur avec une fonction amine terminale. Dans la littérature, le KRN7000 a été modifié en position 6'' du galactose par une chaîne carbonée<sup>66</sup> ou une chaîne de type PEG.<sup>67</sup> Dans le cas de notre étude, nous utiliserons un espaceur de type PEG car ce type de lien devrait apporter une meilleure solubilité en milieu aqueux du KRN7000, initialement hydrophobe, pour le greffage à l'anticorps. Cet espaceur sera couplé au KRN7000 grâce à une fonction carbamate stable en milieu physiologique, pour mener à notre premier synthon, le GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> (Schéma 49).

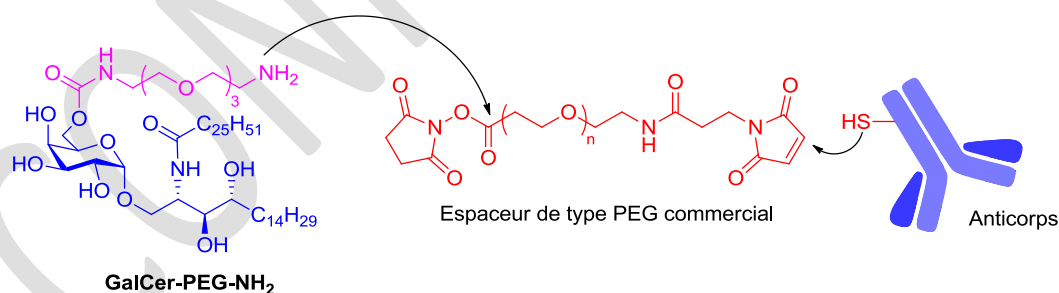


Schéma 49 – Greffage du GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> à l'anticorps *via* un espaceur de type PEG

La seconde approche consiste à associer les deux partenaires (anticorps et KRN7000) pour accéder à notre vecteur *via* une plateforme auto-immolable (Schéma 50) inspirée des travaux de l'équipe de Papot. Avant cela, une plateforme modèle ne présentant pas l'anticorps

<sup>66</sup> M. Cavallari, P. Stallforth, A. Kalinichenko, D. C. K. Rathwell, T. M. A. Gronewold, A. Adibekian, L. Mori, R. Landmann, P. H. Seeberger, G. De Libero, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 950-956.

<sup>67</sup> P-H. Liang, M. Imamura, X. Li, D. Wu, M. Fujio, R. T. Guy, B-J. Wu, M. Tsuji, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12348-12354.

sera préparée, dont l'objectif est de valider la dégradation enzymatique (Schéma 50). Le KRN7000 sera fonctionnalisé en position 6'' du galactose par un espaceur de type diamine avant d'être greffé au noyau aromatique pour éviter tout problème d'encombrement stérique.

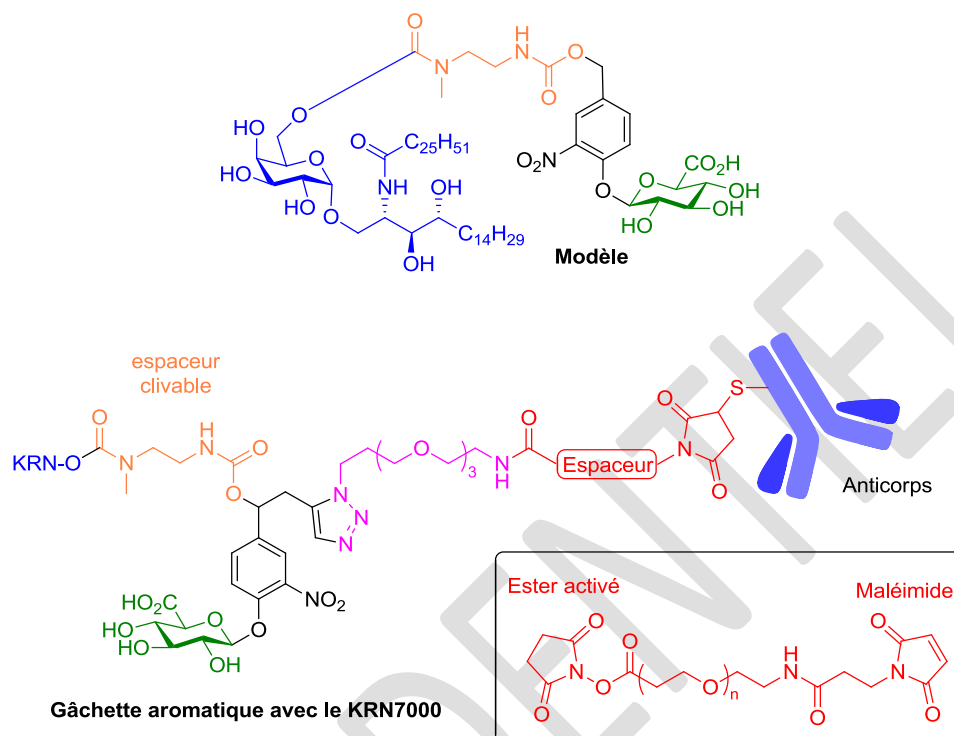


Schéma 50 - Plateforme auto-immolable avec et sans l'anticorps

# Chapitre II - Résultats et discussions

Notre objectif de synthèse de ce chapitre est la préparation de deux synthons, à savoir le GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> **63** et plateforme modèle **64** (Schéma 51). La particularité de ces synthons est la modification de la position 6'' du galactose qui est réalisée à partir d'un précurseur commun : le GalCer-6''-OH **65** (Schéma 51). La première partie de ce chapitre décrira, dans un premier temps, la synthèse du GalCer-6''-OH selon deux approches. La synthèse des deux synthons **63** et **64** sera ensuite exposée.

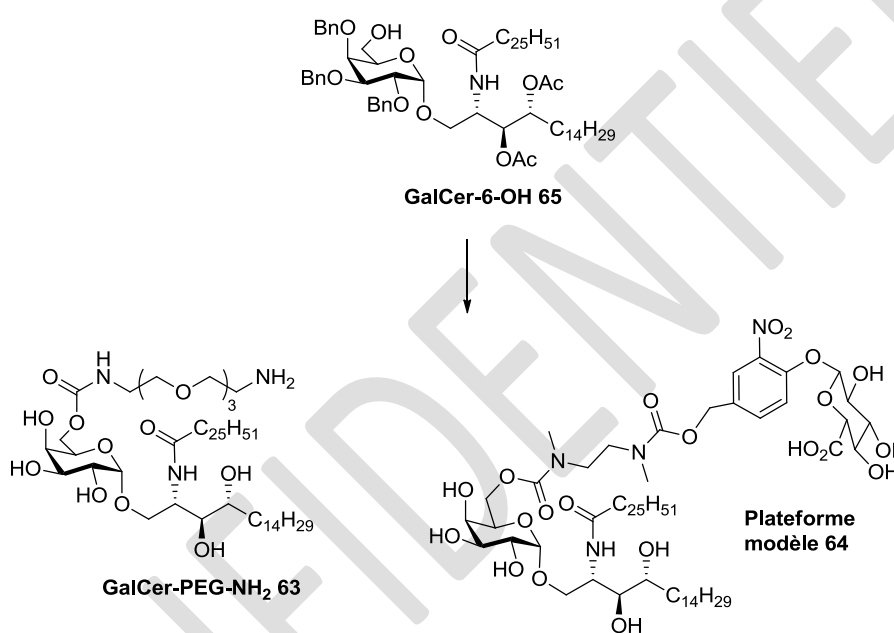


Schéma 51 - Cibles à synthétiser

## I - Synthèse du GalCer-6''-OH **65**

Le GalCer-6''-OH **65** peut être obtenu selon deux approches de synthèse (Schéma 52). Selon la voie 1, initialement mis au point au laboratoire, le GalCer-6''-OH **65** résulte d'une *N*-acylation entre l'acide cérotique **69** et la glycosphingosine **66**. Cette dernière est obtenue par couplage glycosidique entre le fluorogalactosyle **71** et la phytosphingosine **67a** (R = H), judicieusement fonctionnalisée suite à un jeu de protection à partir de la phytosphingosine commerciale **68**. Suivant la voie 2, le couplage glycosidique serait réalisé en fin de synthèse entre le fluorogalactosyle **71** et le céramide **70**, qui résulterait de la *N*-acylation de la phytosphingosine **67b** (R = TBDPS) par l'acide cérotique **69**. Le fluorogalactosyle **71** serait préparé à partir du D-galactose **72** commercial.



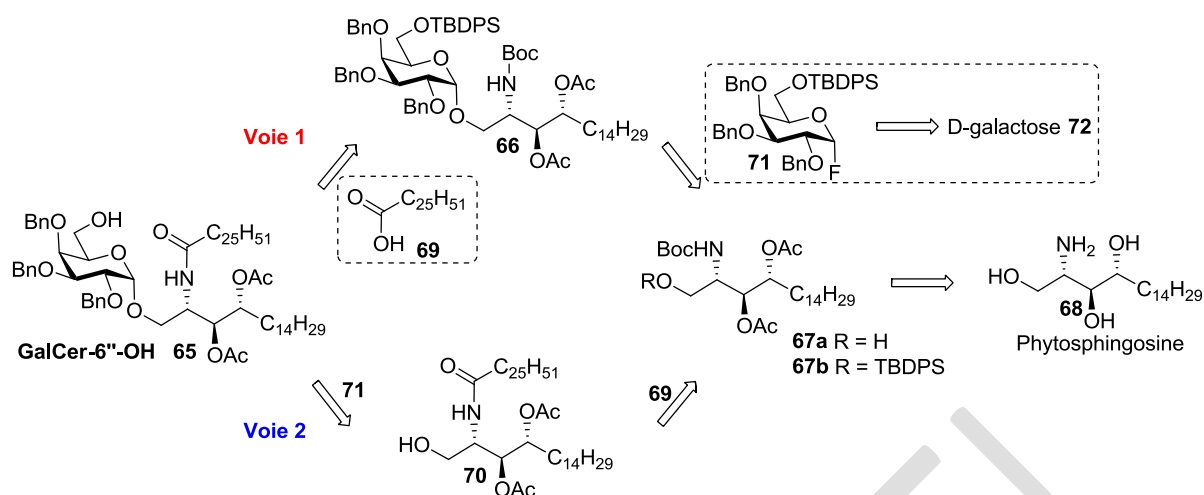


Schéma 52 - Rétrosynthèse du GalCer-6-OH

Suivant ces deux stratégies de synthèse, le fluorure de galactosyle **71** et la phytosphingosine **67b** sont deux fragments communs à la préparation du GalCer-6-OH **65** et leurs synthèses seront tout d'abord présentées.

## I-1. Synthèse des synthons communs aux deux stratégies

### a) Préparation du fluorogalactosyle **71**

La synthèse du fluorure de galactosyle **71** (Schéma 53) peut être réalisée en six étapes à partir du D-galactose **72** commercial.

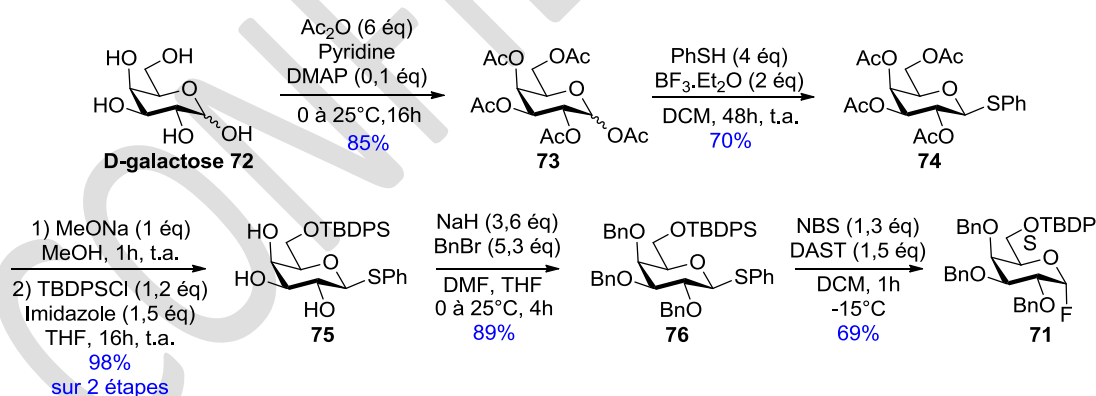


Schéma 53 - Synthèse du fluorogalactosyle 4

Le D-galactose **72** est acétylé par l'anhydride acétique dans la pyridine en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) en quantité catalytique pour accéder au galactose pentaacétate **73** avec un rendement de 85%. L'action du thiophénol en présence d'éthérate de trifluorure de bore en tant qu'acide de Lewis permet d'obtenir le  $\beta$ -thiogalactoside **74** avec un rendement de 70%. La sélectivité  $\beta$  de la thioglycosylation résulte de l'assistance du groupement acétate en position 2 du galactose ce qui permet la formation d'un acétoxonium

intermédiaire, qui bloque la face inférieure et impose uniquement une attaque du nucléophile par la face supérieure (Schéma 54).

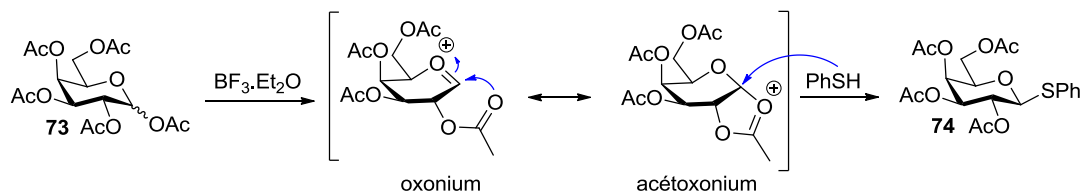


Schéma 54 - Mécanisme de la thioglycosylation

La méthanolyse des groupements acétates est réalisée suivant les conditions classiques de Zemplén<sup>68</sup> par action du méthylate de sodium dans le méthanol. La silylation sélective de l'alcool primaire est ensuite réalisée par le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle en présence d'imidazole dans le THF pour conduire au thiogalactoside silylé **75** avec un rendement de 98% sur deux étapes.<sup>69</sup>

Les groupements hydroxyles sont protégés en éthers de benzyle par action du bromure de benzyle en présence d'hydrure de sodium (NaH) dans un mélange DMF/THF. Le tribenzylthiogalactoside **76** est obtenu avec un rendement de 89% accompagné de 10% d'un sous-produit. Par analyse RMN du proton, le singulet du *tert*-butyl de l'éther silylé à 0.96 ppm a disparu et un nouveau système AB à 4.40 et à 4.33 ppm, caractéristique d'un éther de benzyle, est apparu. Le sous-produit correspond au galactose perbenzylé **77** qui résulte de la qualité médiocre des lots utilisés d'hydrure de sodium. Des traces d'eau hydrolysent partiellement l'hydrure de sodium ce qui forme de la soude, responsable du clivage de l'éther silylé instable en milieu basique.<sup>70</sup> Après clivage, le groupement hydroxyle est protégé en éther de benzyle pour donner le sous-produit **77** (Schéma 55). La formation de ce dernier est négligeable lorsque des lots récents d'hydrure de sodium sont utilisés.

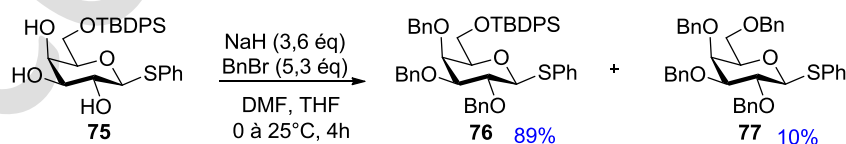


Schéma 55 - Clivage de l'éther silylé en milieu basique

<sup>68</sup> Z. Wang, *Comprehensive organic name reactions and reagents : Zemplén Deacetylation*, **2010**, 3123-3128.

<sup>69</sup> J. Lopez-Prados, F. Cuevas, N-C. Reichardt, J-L de Paz, E. Q. Morales, M. Martin-Lomas, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 764-786.

<sup>70</sup> S. Hatakeyama, H. Irie, T. Shintani, Y. Noguchi, H. Yamada, M. Nishizawa, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 13369-13376.

La dernière étape est la fluoration du tri-benzylthiogalactoside **76** par action du trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST) et de *N*-bromosuccinimide (NBS)<sup>71</sup> dans le dichlorométhane pour former le fluorogalactosyle **71** avec un rendement de 68% (Schéma 53). Le premier partenaire pour le couplage glycosidique est donc obtenu à partir du D-galactose avec un rendement global de 32% sur 6 étapes.

## b) Préparation de la phytosphingosine 5b

La phytosphingosine **67b** est commune aux deux voies de synthèse puisque par déprotection de l'éther silylé, elle fournit le second partenaire pour le couplage glycosidique suivant la voie 1. Sa synthèse résulte d'un jeu de protection à partir de la phytosphingosine commerciale **68** (Schéma 56).

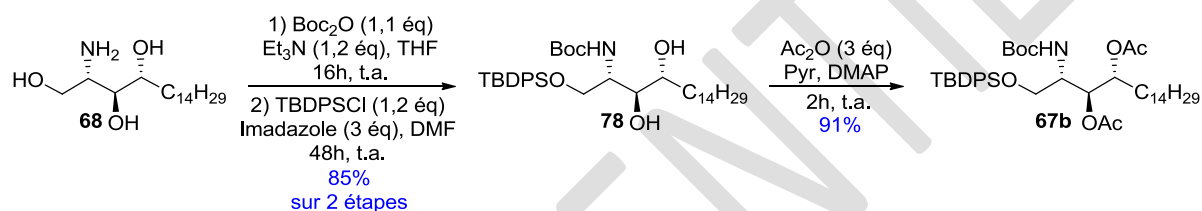


Schéma 56 - Synthèse de la phytosphingosine 5b

La phytosphingosine commerciale **68** est mise en réaction avec le dicarbonate de di-*tert*-butyle en présence de triéthylamine dans le THF pour protéger l'amine primaire sous forme de carbamate. L'alcool primaire est sélectivement protégé sous forme d'éther silylé par le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle en présence d'imidazole dans le DMF pour accéder à la phytosphingosine **78** avec un rendement de 85% sur deux étapes.

L'acétylation des groupements hydroxyles par l'anhydride acétique en présence de DMAP dans la pyridine permet d'accéder à la phytosphingosine **67b** avec un rendement de 91%.

## I-2. Vers la synthèse GalCer-6''-OH suivant la voie 1

Selon la voie 1, le GalCer-6''-OH **65** résulte d'une *N*-acylation entre l'acide cérotique **69** et la glycosphingosine **66**. Cette dernière est obtenue par couplage glycosidique entre le fluorogalactosyle **71** et la phytosphingosine **67a** (R = H), issu du composé **67b** (R = TBDPS) (Schéma 57).

<sup>71</sup> K. C. Nicolaou, R. E. Dolle, D. P. Papahatjis, J. L. Randall, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4189-4192.

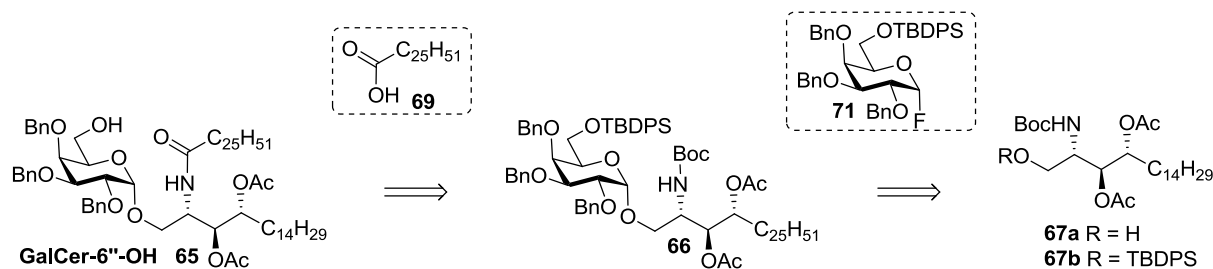


Schéma 57 - Rappel de la stratégie selon la voie 1

Tout d'abord, le groupement hydroxyle de l'intermédiaire **67b** doit être libéré pour accéder au nucléophile, indispensable à la réaction de couplage glycosidique. Une première tentative de déprotection avec le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) a été réalisée mais le produit attendu n'est pas isolé et un sous-produit est obtenu de même poids moléculaire que la phytosphingosine **67a**. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  a montré la migration d'un groupement acétate en position 3 vers le groupement hydroxyle primaire, favorisée par un intermédiaire cyclique à six chaînons (Schéma 58).

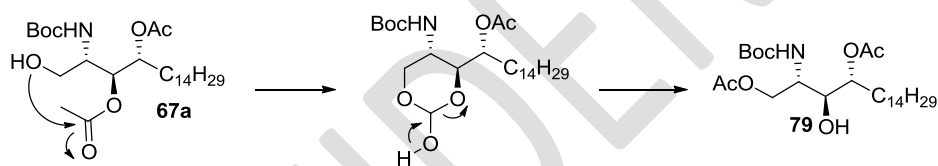


Schéma 58 - Migration du groupement acétate

Lorsque le clivage de l'éther silylé est réalisé en présence d'acide fluorhydrique en solution dans la pyridine dans le THF, la phytosphingosine **67a** est obtenue avec un rendement de 48% au côté du produit de migration **79** avec un rendement de 38% (Schéma 59). Il faut préciser que la concentration de HF.pyridine à 0,5 M est optimale car à des concentrations plus faibles ou plus élevées, le rendement du produit **67a** diminue et le produit de migration est favorisé.

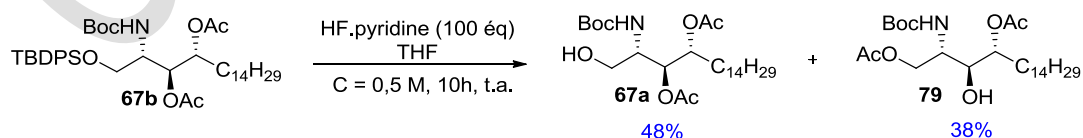


Schéma 59 - Synthèse de la phytosphingosine 5a

Avant de présenter la réaction du couplage glycosidique entre la phytosphingosine **67a** et le fluorogalactosyle **71**, les méthodes de glycosylation appliquées à la synthèse d' $\alpha$ -galactosylcéramides vont être présentées.

### a) La *O*-glycosylation appliquée aux analogues du KRN7000 dans la littérature

Différentes méthodes d'*O*-glycosylation existent dans la littérature. Les plus courantes mettent en jeu des thiogalactosides, des galactoses trichloroacétimides, des halogénogalactosides (bromé, iodé ou fluoré). Ces dérivés ont tous été utilisés dans la synthèse d' $\alpha$ -galactosylcéramides.

En 2010, Veerapen *et al.*<sup>72</sup> ont décrit la synthèse d'analogues du KRN7000 pour coupler un thiogalactoside **80** et un sphingolipide **81** en présence du chlorure de *p*-nitrobenzenesulfonyl (*p*-NO<sub>2</sub>PhSCL) avec du triflate d'argent (AgOTf) (Schéma 60). La nature du donneur de glycosyle permet d'avoir une sélectivité en faveur de l'anomère  $\alpha$  **82**. Le groupement 4,6-*O*-di-*tert*-butylsilylène (DTBS) permet de bloquer la conformation et la face supérieure du sucre ce qui favorise la formation de l'anomère  $\alpha$  avec un rendement de 75%.

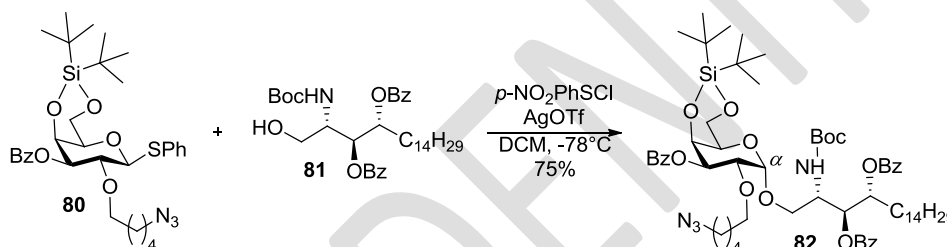


Schéma 60 - Couplage glycosidique *via* un thiogalactoside

En 2004, Kim *et al.*<sup>73</sup> ont décrit la synthèse du KRN7000 dont le couplage glycosidique est réalisé à partir d'un galactose trichloroacétimide **83** et un céramide **84** en présence d'éthérate de trifluorure de bore (Schéma 61). Leur stratégie permet d'obtenir le galactosylcéramide **85** avec un rendement de 63% de configuration  $\alpha$  seulement.

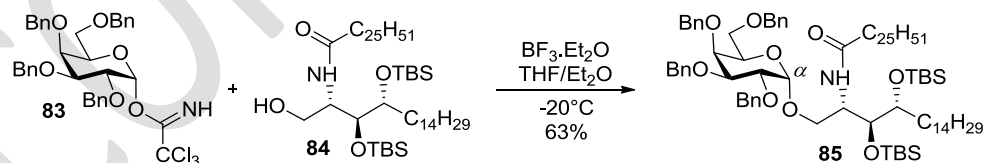


Schéma 61 - Couplage glycosidique *via* un trichloroacétimide

En 1975, Lemieux *et al.*<sup>74</sup> ont mis au point une méthode de couplage pour la préparation de disaccharide, qui permet d'obtenir l'anomère  $\alpha$  entre un dérivé bromé et un accepteur de glycosyle par action du bromure de tétra-butylammonium (TBAB) dans un solvant aprotique. Cette méthode consiste à isomériser l'anomère  $\alpha$  par une source externe

<sup>72</sup> N. Veerapen, E. A. Leadbetter, M. B. Brenner, L. R. Cox, G. S. Besra, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 741-747.

<sup>73</sup> S. Kim, S. Song, T. Lee, S. Jung, D. Kim, *Synthesis*, **2004**, *6*, 847-850.

<sup>74</sup> R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056-4062.

d'ions bromures. L'isomérisation du dérivé bromé sous sa forme  $\beta$ , plus réactive, permet d'avoir une attaque axiale de l'accepteur de glycosyle (Schéma 62).

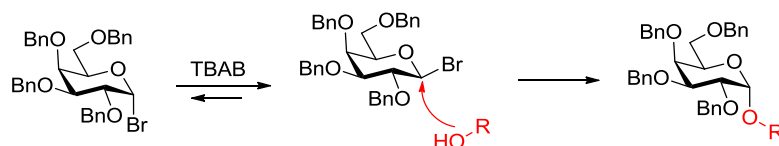


Schéma 62 - Isomérisation d'un bromolactoside en présence d'ions bromures

Toba *et al.*<sup>75</sup> ont décrit un couplage  $\alpha$  sélectif mais avec des rendements variables selon l'accepteur de glycosyle (Schéma 63).

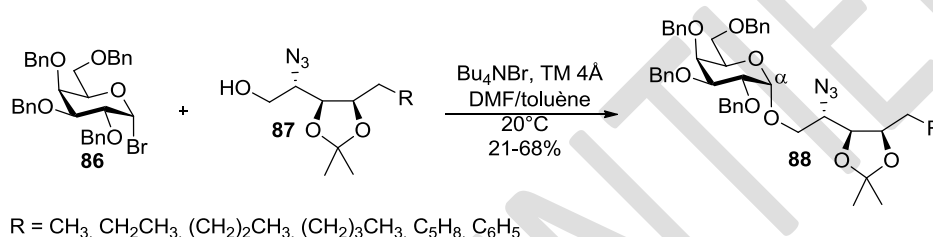


Schéma 63 - Couplage glycosidique *via* un dérivé bromé

Hadd et Gervay ont été les premiers à montrer que l'utilisation de dérivés iodés permettait d'obtenir un couplage  $\alpha$  stéréosélectif sans acide de Lewis en se basant sur les travaux de Lemieux avec les dérivés bromés.<sup>76</sup> Ils ont appliqué cette méthode d'activation pour la synthèse d'analogues du KRN7000 dont le 4-déoxy-KRN7000 avec un rendement de 94% pour le couplage glycosidique (Schéma 64).<sup>77</sup>

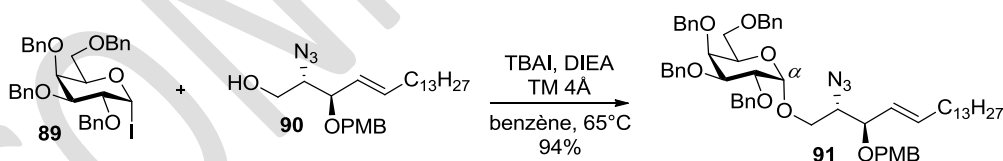


Schéma 64 - Couplage glycosidique *via* un dérivé iodé décrit par Gervay

En 2011, Veeparen *et al.*<sup>78</sup> ont reproduit les conditions décrites par l'équipe de Toba mais ils ont obtenu des rendements compris entre 26% et 46% pour leurs composés (Schéma 65). L'utilisation de dérivés iodés ou bromés montre la difficulté des couplages glycosidiques, souvent dépendant des substrats utilisés.

<sup>75</sup> T. Toba, K. Murata, K. Nakanishi, B. Takahashi, N. Takemoto, M. Akabane, T. Nakatsuka, S. Imajo, T. Yamamura, S. Miyake, H. Annoura, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 2781-2784.

<sup>76</sup> M. J. Hadd, J. Gervay, *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 61-69.

<sup>77</sup> W. Du, J. Gervay-Hague, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2063-2065.

<sup>78</sup> N. Veeparen, F. Reddington, M. Salio, V. Cerundolo, G. S. Besra, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 221-228.

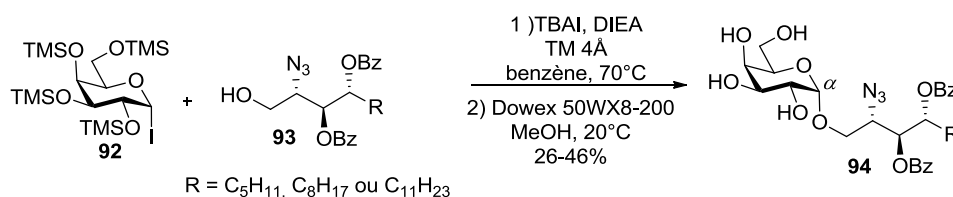


Schéma 65 - Couplage glycosidique *via* un dérivé iodé décrit par Veeparen

Les auteurs décrivent aussi dans cette publication la synthèse du KRN7000 en utilisant un dérivé fluoré comme donneur de glycosyle (Schéma 66) selon des conditions décrites par Mukaiyama<sup>79</sup> qui utilisent le chlorure d'étain II (SnCl<sub>2</sub>) et le perchlorate d'argent (AgClO<sub>4</sub>) pour avoir une sélectivité  $\alpha$ .

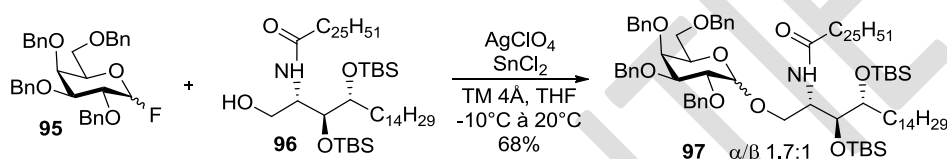


Schéma 66 - Couplage glycosidique *via* un dérivé fluoré

Les méthodes de couplage qui impliquent les dérivés halogénés semblent très dépendantes des substrats autant sur les rendements que sur la sélectivité. Des travaux préliminaires de notre équipe sur l'optimisation du couplage glycosidique ont montré que l'utilisation des dérivés fluorés menait à de meilleurs résultats en termes de rendements et de sélectivité. Cette méthode a en effet été utilisée pour la synthèse d'analogues 4-déoxy et d'autres analogues fluorés décrits dans le chapitre I. C'est pour cela que nous avons préparé un fluorure de galactosyle pour réaliser le couplage glycosidique.

### b) Synthèse de l' $\alpha$ -galactosylsphingosine

Notre stratégie de synthèse porte sur le couplage glycosidique entre le fluorogalactosyle **71** et l'accepteur de glycosyle **67a** (Schéma 67) dont les synthèses ont été décrites précédemment.

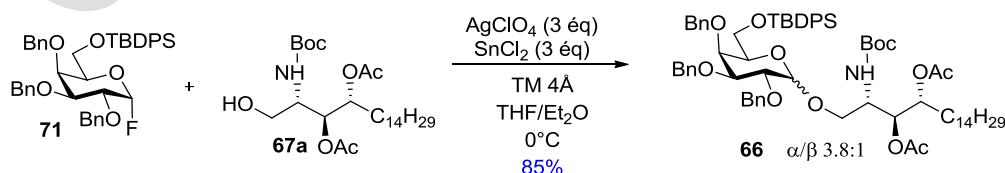


Schéma 67 - Couplage glycosidique entre le fluorogalactosyle **71** et l'accepteur de glycosyle **67a**

<sup>79</sup> T. Mukaiyama, Y. Murai, S-I. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, *10*, 431-432.

Le glycosphingolipide **66** est obtenu avec un rendement de 85% sous forme d'un mélange d'anomères  $\alpha/\beta$  (3,8:1) difficilement séparables à ce stade de la synthèse mais facilement identifiables en RMN  $^1\text{H}$ . Le signal du proton anomérique à 4.16 ppm pour le composé  $\beta$  est facilement reconnaissable sous la forme d'un doublet avec une constante de couplage de 7.7 Hz avec le proton en position 2 du galactose caractéristique d'une constante diaxiale (Schéma 68). Quant au proton anomérique du composé  $\alpha$ , son signal RMN  $^1\text{H}$  est sous le massif des protons benzyliques autour de 4.78 ppm mais la constante de couplage est inférieure à 3 Hz, caractéristique d'une constante axiale-équatoriale. De plus, les signaux RMN  $^1\text{H}$  des groupements acétates et le groupement Boc de la chaîne sphingosine n'ont pas le même déplacement chimique pour chaque anomère (Tableau 1).

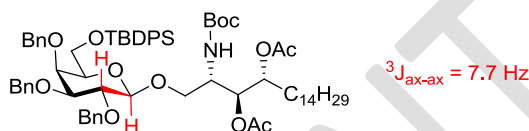


Schéma 68 - Constante de couplage du proton anomérique du composé  $\beta$

Tableau 1 - Déplacements chimiques de groupements caractéristiques de chaque anomère

	$\text{H}_{\text{anomérique}}$	OAc (1)	OAc (2)	Boc
$\alpha$	4.65 ppm ( $J < 3\text{Hz}$ )	1.91 ppm	1.90 ppm	1.37 ppm
$\beta$	4.16 ppm ( $J = 7.7\text{ Hz}$ )	1.88 ppm	1.84 ppm	1.32 ppm

La purification minutieuse du glycosphingolipide **66** permet d'isoler l'anomère  $\alpha$  avec un rendement de 60% et l'anomère  $\beta$  avec un rendement de 11% ainsi qu'un mélange d'anomères avec un rendement de 14%.

### I-3. Accès au GalCer-6''-OH **65**

A ce stade, l'anomère  $\alpha$  peut être engagé dans l'étape de *N*-acylation pour accéder au GalCer-6''-OH après avoir préalablement déprotégé le groupement *tert*-butyloxycarbamate. Avant de détailler ces deux étapes de synthèse, des méthodes générales de *N*-acylation seront décrites.

#### a) Généralités sur la *N*-acylation<sup>80</sup>

De nombreuses méthodes existent pour former une liaison amide. La formation directe d'un amide entre un acide carboxylique et une fonction amine est généralement limitée par la

<sup>80</sup> J. E. Taylor, S. D. Bull, **2014**, « *N*-Acylation Reactions of Amines » dans *Comprehensive Organic Synthesis II*. Vol. 6. 2 ed. Elsevier. 427-478.



formation du carboxylate d'ammonium par réaction acido-basique. De hautes températures (140-180°C)<sup>81</sup> limitent la formation de sels et permettent la formation de la liaison amide mais de telles conditions ne sont pas applicables à tous types de molécules, notamment aux principes actifs qui possèdent des fonctions thermosensibles.

Il existe différentes méthodes de couplage entre un acide carboxylique et une amine. L'acide carboxylique doit être préalablement activé pour permettre l'addition de l'amine (Schéma 69). La première est une méthode indirecte qui consiste à former et isoler, dans la mesure du possible, un intermédiaire plus réactif pour ensuite réaliser l'aminolyse. La seconde méthode consiste à former l'intermédiaire réactif *in situ* grâce à un agent de couplage.

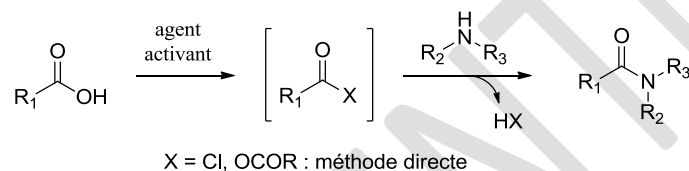


Schéma 69 - Formation de la liaison amide avec un agent acylant

- **Méthode indirecte**

Concernant la méthode indirecte, les chlorures d'acyles (X= Cl) et les anhydrides d'acides (X = OCOR) sont les composés les plus utilisés.<sup>82</sup> Les chlorures d'acyles sont largement utilisés car la méthode de préparation est simple et de nombreux réactifs de ce type sont commerciaux. Selon les substrats, les méthodes courantes de préparations des chlorures d'acyles font intervenir classiquement le chlorure de thionyle **98** (Schéma 70), le chlorure d'oxalyle **99** (Schéma 70), le chlorure cyanurique **100** (Schéma 71) ou le réactif de Ghosez **101** (Schéma 72). L'avantage des deux dernières méthodes est d'éviter la formation d'acide chlorhydrique qui peut cliver des fonctions sensibles en milieu acide.

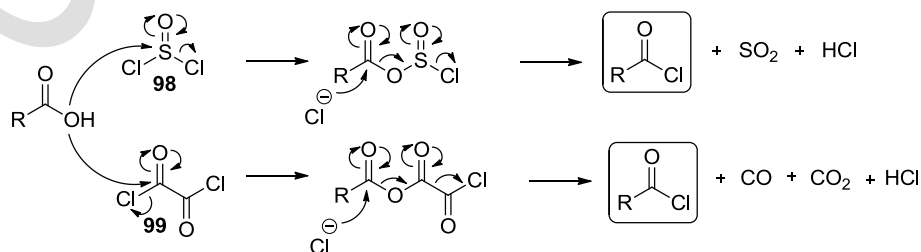


Schéma 70 - Formation d'un chlorure d'acyle avec dégagement d'acide chlorhydrique

<sup>81</sup> J. Cossy, C. Pale-Grosdemange, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2771-2774.

<sup>82</sup> C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827-10852.

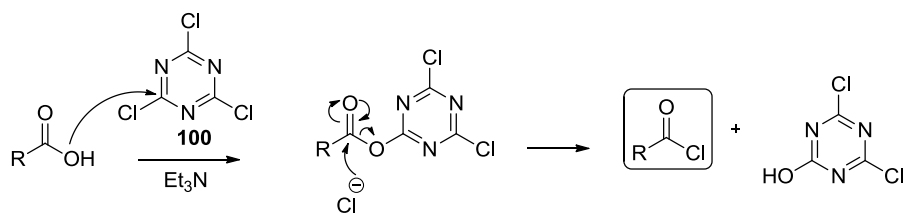


Schéma 71 - Formation d'un chlorure d'acyle en présence de chlorure cyanurique

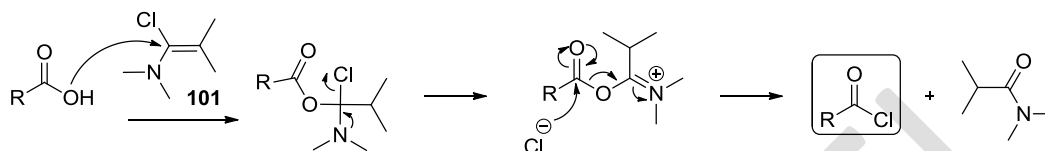


Schéma 72 - Formation d'un chlorure d'acyle en présence du réactif de Ghosez

La liaison amide est formée par un mécanisme d'addition-élimination de l'amine à partir d'un chlorure d'acyle. Une base est nécessaire pour piéger l'acide chlorhydrique formé pour éviter la formation du sel d'ammonium non réactif. L'utilisation des chlorures d'acyles pour la formation de liaisons amides est limitée par la possibilité d'isomérisation de composés optiquement purs. En effet, la déprotonation en  $\alpha$  du carbonyle peut mener à la formation d'un cétène en milieu basique.<sup>83</sup> L'amine peut ainsi réagir sur les deux faces du cétène pour conduire à l'amide avec la perte intégrale de la chiralité (Schéma 73).

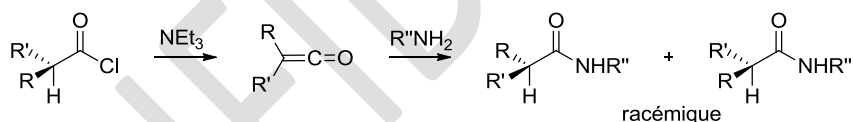


Schéma 73 - Racémisation *via* la formation d'un cétène

Une alternative au chlorure d'acide est possible par l'utilisation d'anhydrides d'acides mixtes<sup>80</sup> dont l'avantage est d'avoir un groupe partant spectateur idéalement bon marché et facile à éliminer du milieu réactionnel. Le problème de cette approche est le contrôle de la régiosélectivité de l'addition de l'amine sur l'anhydride mixte. Des anhydrides pivaliques mixtes sont souvent formés *in situ* pour avoir une *N*-acylation régiosélective (Schéma 74). L'encombrement stérique du groupement *tert*-butyle empêche l'attaque nucléophile de l'amine sur le centre électrophile (**b**).<sup>84</sup>

<sup>83</sup> F. I. Luknitskii, B. A. Vovsi, *Russ. Chem. Rev.* **1969**, *38*, 478-494.

<sup>84</sup> K. Yoshia, K. Yamaguchi, A. Mizuno, Y. Unno, A. Asai, T. Sone, H. Yokosawa, A. Matsuda, M. Arisawa, S. Shuto, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1868-1877.

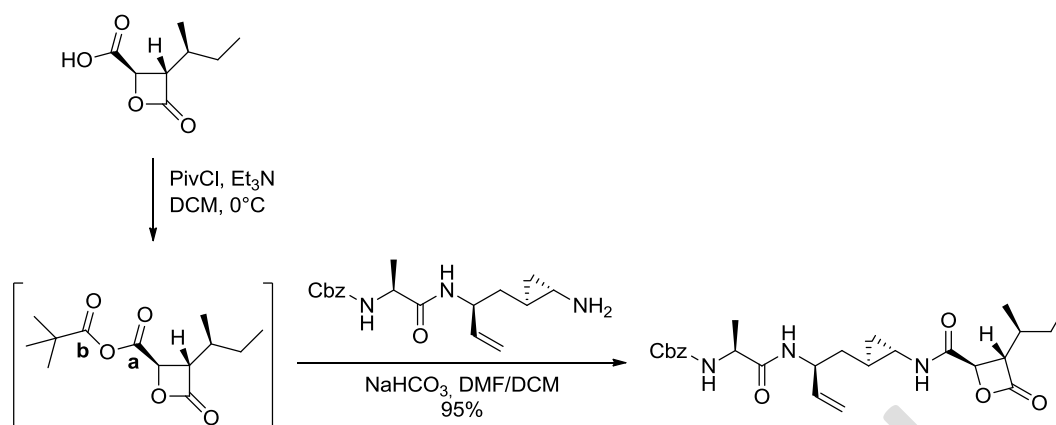


Schéma 74 - Exemple de *N*-acylation avec un anhydride mixte

Une stratégie est de différencier les deux centres électrophiles. Une excellente régiosélectivité est observée avec l'utilisation de carbonates d'acides. Le centre électrophile (**a**) est plus réactif que le site (**b**) car il est moins stabilisé par résonance (Schéma 75). A titre d'exemple, le chloroformiate d'éthyle est utilisé pour former un carbonate d'acide *in situ* qui va pouvoir subir l'addition du nucléophile sur le centre le plus électrophile (Schéma 75).<sup>85</sup>

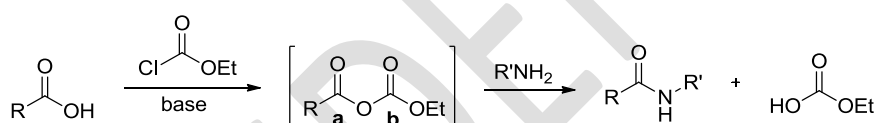


Schéma 75 - *N*-Acylation avec un carbonate d'acide

- **Méthode directe**

De nombreux agents de *N*-acylation (ou de couplage peptidique) ont été développés, notamment la famille des carbodiimides, des sels de phosphonium et des sels d'uronium qui sont pour la plupart commerciaux (Schéma 76).

<sup>85</sup> W. Chu, Z. Tu, E. McElveen, J. Xu, M. Taylor, R. R. Luedtke, R. H. Mach, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 77-87

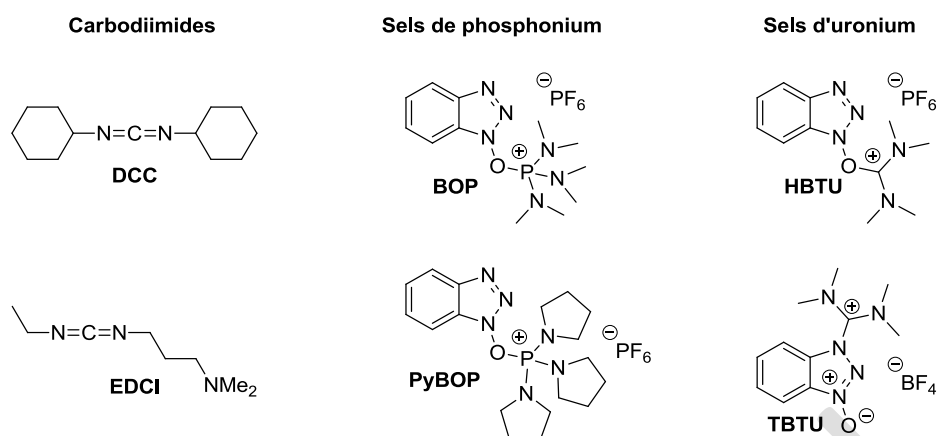


Schéma 76 - Exemples d'agents de couplage peptidique commerciaux

Concernant les réactifs de la famille des carbodiimides, il est nécessaire de réaliser le couplage à 0°C ou en ajoutant un nucléophile comme l'hydroxybenzotriazole (HOBT) pour générer un intermédiaire plus réactif vis-à-vis de l'amine.<sup>86</sup>

Selon le mécanisme (Schéma 77), une réaction acido-basique a lieu entre l'acide carboxylique **102** et le carbodiimide **103**. L'*O*-acylurée **106**, formée après addition du carboxylate **104** sur le carbodiimide protoné **105**, peut subir l'attaque directe de l'amine **107** (voie a) ce qui conduit à l'amide **108** avec la libération d'une urée **109**. L'*O*-acylurée **106** peut également se réarranger en une *N*-acylurée **110** non réactive (voie b) ce qui diminue le rendement de la *N*-acylation. L'ajout de l'HOBT **111**, dans le milieu, limite le réarrangement par la formation d'un ester activé **112** (voie c). L'addition de l'amine **107** sur ce dernier conduit ainsi à l'amide **108** avec de meilleurs rendements.

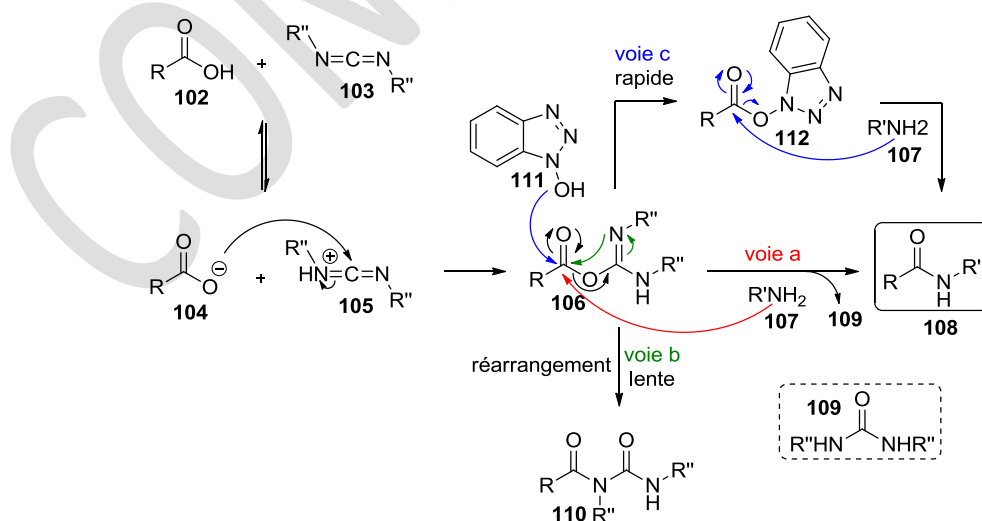


Schéma 77 - Mécanisme du couplage peptidique en présence d'un carbodiimide et d'HOBT

<sup>86</sup> G. Windridge, E. C. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 6318-6319

L'HOBt apparaît ici comme un bon activateur de l'acide carboxylique. Dans ce contexte, les sels de phosphonium et d'uronium, dont les structures sont basées sur celles d'HOBt, ont été développés. Parmi ces méthodes, il n'y a pas de règle générale permettant d'en choisir une car le plus souvent, cette réaction est substrat-dépendante.

Un travail d'optimisation de la réaction de *N*-acylation avait été effectué au sein de l'équipe. La méthode directe d'activation *via* le PyBOP (hexafluorophosphate de *O*-benzotriazolyl-tris(pyrrolidinophosphonium)) a déjà fait l'objet d'une étude au sein de l'équipe et a montré de bons résultats avec de bons rendements.

### b) Synthèse du GalCer-6''-OH 65

La *N*-acylation est réalisée entre le glycosphingolipide **66** et l'acide cérotique (Schéma 78) après avoir préalablement clivé le carbamate par action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane.

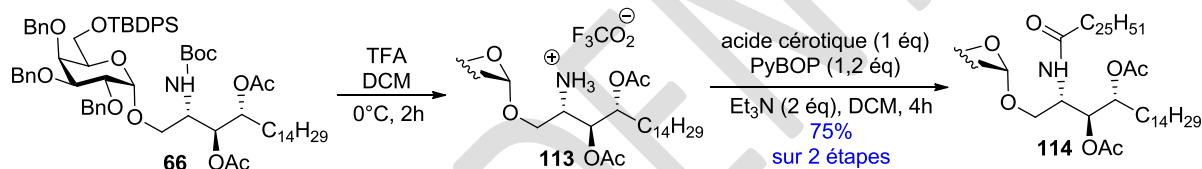


Schéma 78 - Préparation du galactosylcéramide 33

Le galactosylcéramide **114** est obtenu avec un rendement de 75% sur deux étapes. La triéthylamine permet, d'une part de neutraliser le sel d'ammonium **113** formé après clivage du carbamate et d'autre part, d'accéder au carboxylate **115** de l'acide cérotique **69**. Ce dernier réagit avec le PyBOP pour former l'espèce réactive **116**. L'amine peut directement réagir sur l'intermédiaire pour créer la liaison amide ou bien le sel de l'hydroxybenzotriazole peut réagir sur le composé **116** pour donner une nouvelle espèce réactive **117**. L'amine peut à nouveau d'ajouter sur l'ester activé **117** pour former l'amide **114** (Schéma 79).

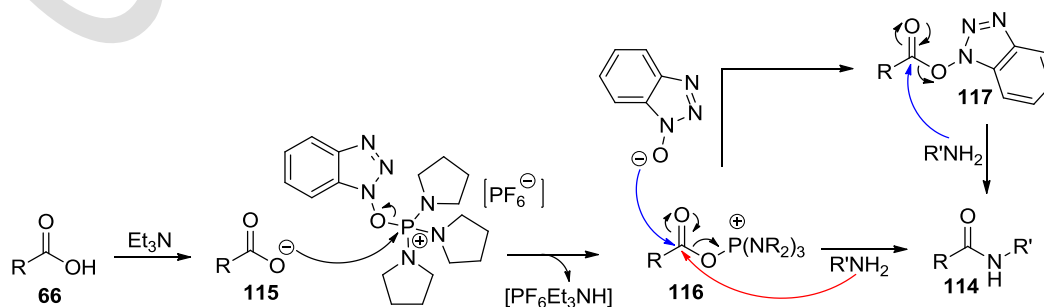


Schéma 79 - Mécanisme de *N*-acylation avec le PyBOP

La dernière étape pour accéder au GalCer-6''-OH **65** est le clivage de l'éther silylé **114** par action de HF.pyridine dans le THF (Schéma 80).

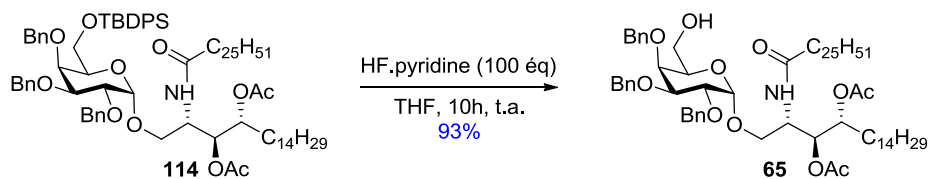


Schéma 80 - Synthèse du GalCer-6-OH

Le GalCer-6''-OH **65** est obtenu avec un rendement de 93%. Cette première voie de synthèse permet de former notre précurseur **65** avec un rendement global de 14% sur 8 étapes à partir de la phytosphingosine. La migration d'un groupement acétate étant limitante, nous avons envisagé une seconde approche pour la synthèse du GalCer-6''-OH.

#### I-4. Seconde approche de synthèse

Suivant la voie 2, le couplage glycosidique serait réalisé en fin de synthèse entre le fluorogalactosyle **71** et le céramide **70**, qui résulterait de la *N*-acylation de la phytosphingosine **67b** par l'acide cérotique **69** (Schéma 81).

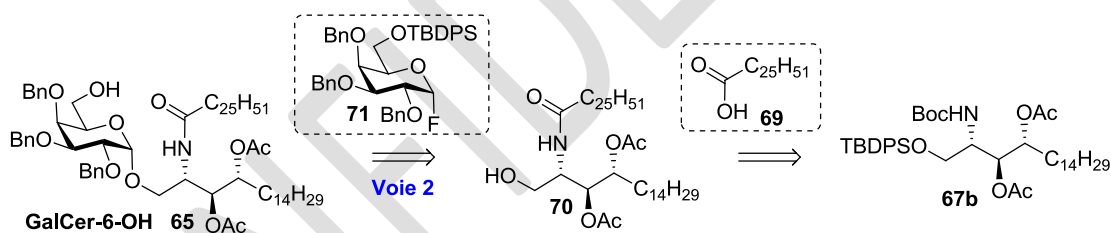


Schéma 81 - Rappel de la stratégie selon la voie 2

##### a) Préparation du céramide 70

L'accès au céramide **70** se fait en deux étapes à partir de la phytosphingosine **67b** dont la synthèse a été décrite précédemment. La phytosphingosine **67b** est traitée par l'acide trifluoroacétique à 0°C dans le dichlorométhane pour former le sel d'ammonium **115**. La *N*-acylation est réalisée avec l'acide cérotique en présence de PyBOP et de triéthylamine en excès pour d'une part, neutraliser le sel d'ammonium et d'autre part, former le carboxylate de l'acide cérotique. Le céramide protégé **116** est obtenu avec un rendement de 85% sur deux étapes (Schéma 82).

Enfin, l'éther silylé **116** est clivé en présence d'acide fluorhydrique en solution dans la pyridine, dans le THF, pour obtenir le céramide **70** avec un rendement de 88% (Schéma 82). A partir de ce substrat, la migration est très minoritaire voire négligeable. Si le suivi CCM

montre la présence du produit de migration, la réaction est stoppée et une nouvelle déprotection est relancée après purification sur gel de silice.

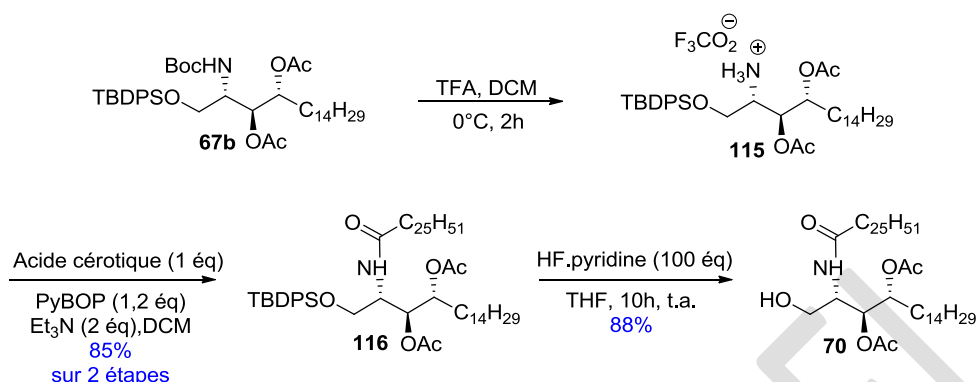


Schéma 82 - Synthèse du céramide 70

### b) Couplage glycosidique et accès au GalCer-6''-OH 65

Le couplage glycosidique est réalisé entre le fluorogalactosyle **71** et le céramide **70** en présence de chlorure d'étain et de perchlorate d'argent dans un mélange THF/Et<sub>2</sub>O. Dans ces conditions, le galactosylcéramide **114** est obtenu avec un rendement de 76% (Schéma 83) sous forme d'un mélange inséparable des deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  dont le ratio diastéréoisomérique n'a pas pu être déterminé.

Le clivage de l'éther silylé par action de HF.pyridine permet de déprotéger l'hydroxyle primaire. A ce stade les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent être séparés respectivement avec un rendement de 89% et de 4% (Schéma 83).

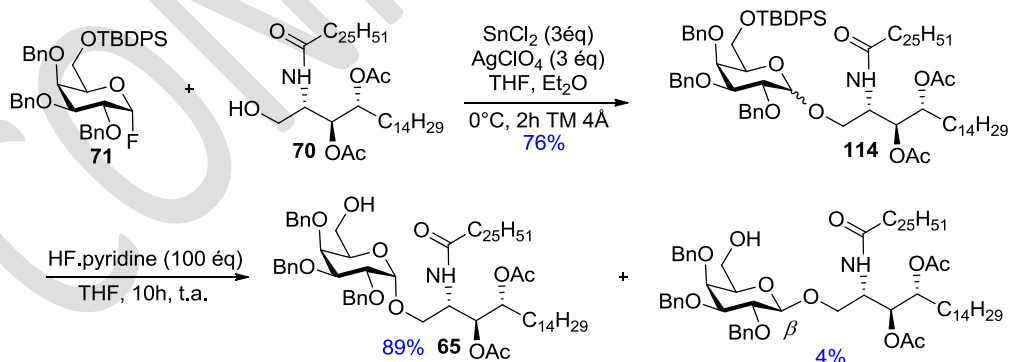


Schéma 83 - Synthèse du GalCer-6-OH

Finalement, le GalCer-6''-OH a pu être obtenu par deux voies de synthèses. Selon la voie 1, le couplage glycosidique est réalisé avant la *N*-acylation. Le premier inconvénient de cette approche réside dans la migration d'un groupement acétate lors du clivage de l'éther silylé. Le second inconvénient est le manque de sélectivité  $\alpha/\beta$  lors du couplage glycosidique.

Le rendement global de cette voie de synthèse est de 14% sur 8 étapes à partir de la phytosphingosine.

Selon la voie 2, la *N*-acylation est réalisée avant le couplage glycosidique. Cette approche limite la migration du groupement acétate vers la fonction hydroxyle primaire. De plus, le couplage glycosidique est sélectif en faveur de l'anomère  $\alpha$ . Le rendement global de cette voie de synthèse est 36 % sur 8 étapes à partir de la phytosphingosine. Cette seconde approche de synthèse est plus adaptée à la synthèse du GalCer-6''-OH.

## II - Fonctionnalisation du GalCer-6''-OH par un espaceur covalent

Cette partie sera consacrée à la préparation d'un analogue du KRN7000 modifié en position 6'' du galactose (Schéma 84). Un premier espaceur sera introduit par formation d'un carbamate, stable en milieu physiologique. L'extrémité de cet espaceur sera fonctionnalisée par une fonction amine de manière à pouvoir introduire l'espaceur de type PEG commercial afin de greffer le GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> à l'anticorps.

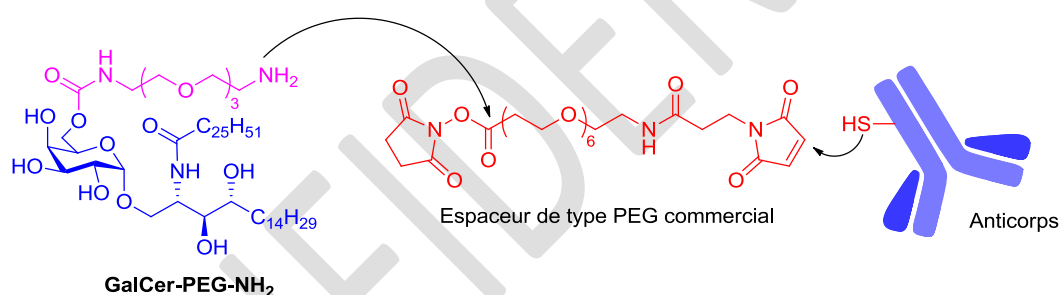


Schéma 84 - Préparation du GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> pour une approche covalente

Avant de présenter la synthèse du précurseur covalent, les méthodes générales de préparation des carbamates seront introduites. Les analogues du KRN7000 présentant une fonction carbamate décrits dans la littérature seront ensuite exposés.

### II-1. Création d'un lien carbamate

#### a) Méthodes principales de préparation des carbamates<sup>87</sup>

Les carbamates constituent des fonctions importantes dans des composés biologiquement actifs, notamment en offrant une plus grande stabilité à l'hydrolyse lors des mécanismes biologiques. En conséquence, des méthodes simples et efficaces ont été développées pour la synthèse de carbamates.

<sup>87</sup> A. K. Ghosh, M. Brindisi, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2895-2940.



Le réarrangement d'Hofmann est une méthode classique pour convertir les amides primaires en amines ou carbamates.<sup>87</sup> Cette approche implique l'utilisation de dibrome en présence de soude (Schéma 85, Méthode I). C'est une méthode peu utilisée pour la synthèse de carbamates même si beaucoup d'optimisations ont été apportées.

Le réarrangement de Curtius est une seconde méthode qui consiste à convertir un azoture d'acyle en carbamate (Schéma 85, Méthode II).<sup>87</sup> Les azotures d'acyle sont généralement préparés à partir de dérivés d'acide carboxylique tels que les chlorures d'acyle ou les anhydrides mixtes.

Le point commun de ces deux réarrangements est la formation *in situ* d'un isocyanate. La formation du carbamate résulte de l'addition d'un alcool sur l'isocyanate.

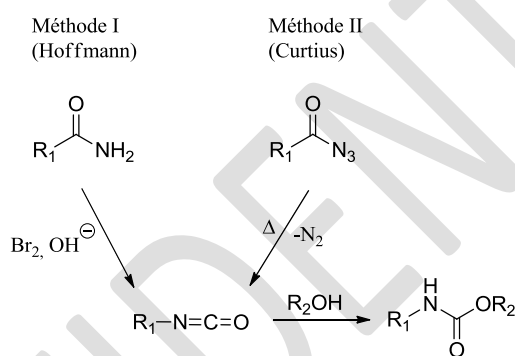


Schéma 85 - Formation du carbamate *via* un isocyanate

Les deux approches précédentes font intervenir soit un amide primaire, soit un azoture d'acyle, tous deux issus d'un acide carboxylique. Une autre approche fait directement intervenir une amine qui est activée sous forme d'un chlorure de carbamoyle ou bien un carbamate activé. Un alcool peut ensuite réagir sur le centre électrophile généré et former le carbamate stable correspondant (Schéma 86). A l'inverse, le groupement hydroxyle peut être activé sous forme d'un carbonate et l'amine peut ensuite réagir pour mener au carbamate stable souhaité (Schéma 86).

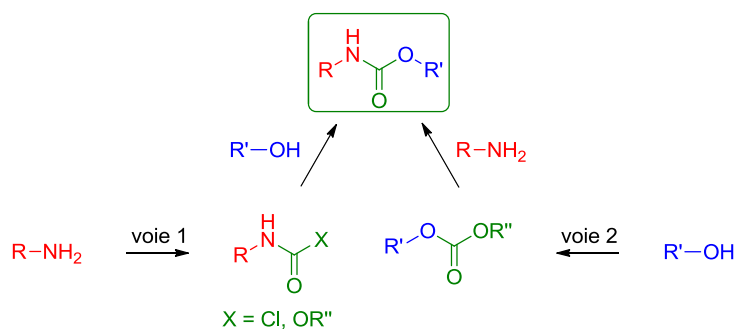


Schéma 86 - Formation du carbamate *via* une amine ou un alcool activée

A titre d'exemple, l'équipe de Tietze a préparé la première prodrogue de la Duocarmycine (Schéma 87) grâce à l'activation de l'amine **117** en présence de phosgène en solution dans le toluène pour conduire au chlorure de carbamoyle **118**. L'addition de la duocarmycine permet ensuite d'accéder à la prodrogue **119** attendue.<sup>88</sup>

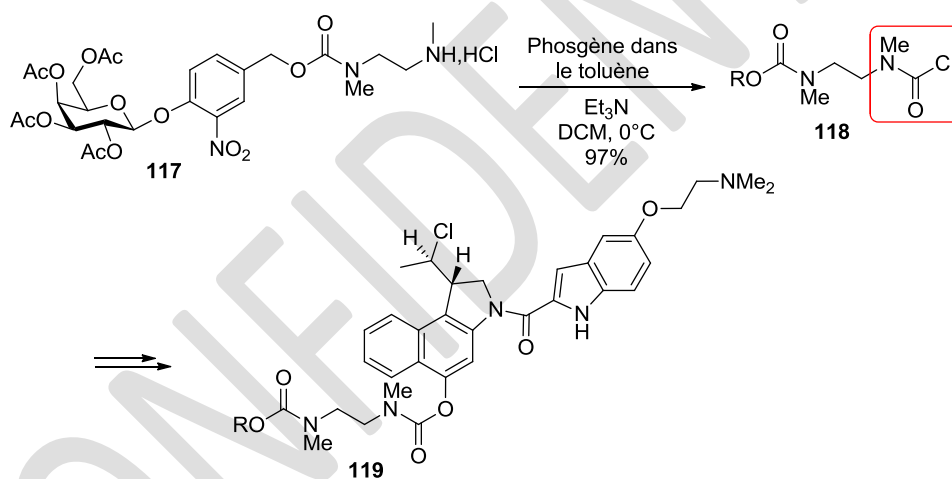


Schéma 87 - Synthèse d'une prodrogue *via* la formation d'un chlorure de carbamoyle

Malgré l'utilisation importante du phosgène dans la chimie, ce composé, de haute toxicité, tend à être remplacé au laboratoire par des réactifs moins dangereux. Ainsi, des réactifs commerciaux moins nocifs ont été développés comme le chloroformiate de *p*-nitrophénol (PNPCOCl) **120** ou le carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle (DSC) **121** (Schéma 88), pour la synthèse de carbamates.

<sup>88</sup> H. J. Schuster, B. Krewer, J. M. von Hof, K. Schmuck, I. Schuberth, F. Alves, L. F. Tietze, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1833-1842.

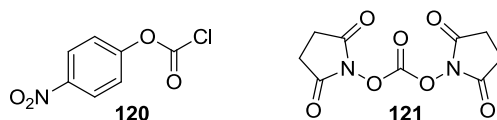


Schéma 88 - Exemples de réactifs utilisés pour la synthèse de carbamates

A titre d'exemple, le chlorure de *p*-nitroformiate (PNPCOCl) **120** a été utilisé pour former un carbamate activé **122** (Schéma 89) pour la synthèse de la prodrogue développée par Tietze.<sup>88</sup> Dans ce cas, l'amine est activée sous forme de carbamate mais c'est généralement l'alcool qui réagit pour former un carbonate activé.

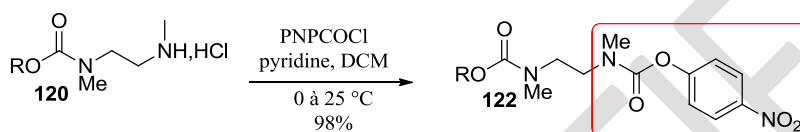


Schéma 89 - Préparation d'un carbamate activé

Le carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle (DSC) **121** est un agent d'alkoxycarbonylation très utilisé pour la synthèse de carbamates.<sup>89</sup> L'avantage des carbonates activés, outre la faible toxicité des réactifs engagés, est la stabilité de ces dérivés par rapport à un chlorure de carbamoyle.

### b) Analogues du KRN7000 via la formation d'un lien carbamate

En 2006, Liang *et al.*<sup>90</sup> ont mené une étude sur l'interaction de différents glycolipides avec la glycoprotéine CD1d. Dans cette étude, une variété de glycolipides a été greffée à une surface de verre fonctionnalisée par des groupements NHS (*N*-hydroxysuccinimide). La position 6'' du galactose a été modifiée par un espaceur de type PEG. L'extrémité de la chaîne PEG est fonctionnalisée par une fonction amine, qui pourra réagir avec la surface de verre fonctionnalisée. L'éloignement de l'amine du glycolipide permet de limiter l'encombrement stérique entre la glycoprotéine CD1d et la surface en verre.

La chaîne PEG est introduite par addition du galactosylcéramide **123** sur un isocyanate préparé *in situ* par action de l'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA) sur un acide carboxylique **124**. L'hydrogénolyse des éthers de benzyle et la réduction de l'azoture de l'intermédiaire **125** permet d'accéder au glycolipide **63** avec l'amine disponible pour le greffage (Schéma 90).

<sup>89</sup> A. K. Ghosh, T. T. Duong, S. P. McKee, W. J. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2781-2784.

<sup>90</sup> P-H. Liang, M. Imamura, X. Li, D. Wu, M. Fujio, R. T. Guy, B-J. Wu, M. Tsuji, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12348-12354.

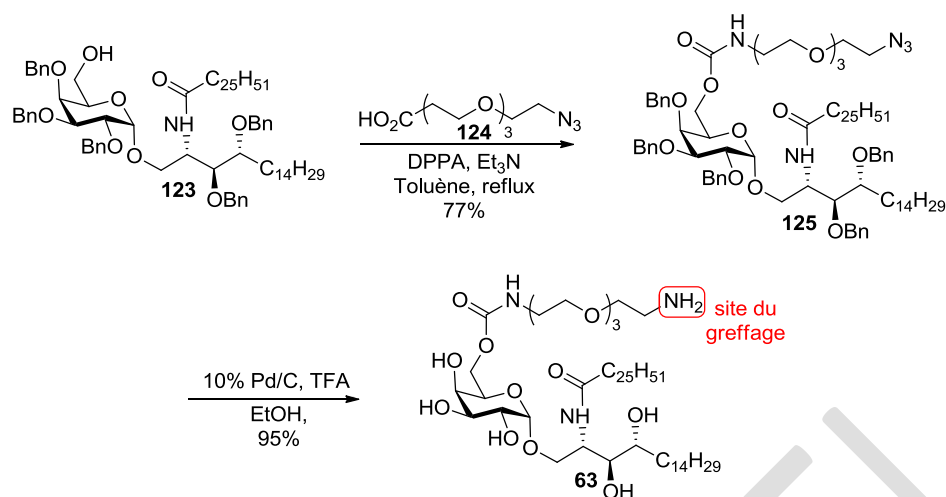


Schéma 90 - Modification de l' $\alpha$ -GalCer en position 6'' du galactose par un carbamate

En 2015, l'équipe de Van Calenbergh a décrit la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues du KRN7000 modifiés en position 6'' du galactose par un groupement carbamate.<sup>91</sup> Cette fonction résulte de l'addition du glycolipide **123** sur des isocyanates commerciaux. L'hydrogénolyse permet d'accéder aux analogues **126** et **127** (Schéma 91).

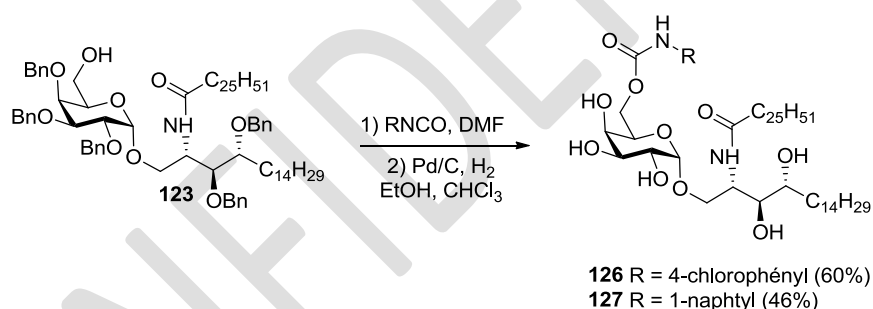


Schéma 91 - Analogues modifiés en position 6 du galactose par un carbamate

## II-2. Préparation du GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> 63

### a) Préparation de l'espaceur 124

Avant de fonctionnaliser le GalCer-6''-OH, il est nécessaire de préparer un espaceur de type PEG présentant une amine masquée sous forme d'un azoture qui sera réduit en fin de synthèse. L'espaceur **124** peut être préparé à partir du triéthylène glycol en 4 étapes<sup>92</sup> (Schéma 92).

<sup>91</sup> J. Guillaume, N. Pauwels, S. Aspeslagh, D. M. Zajonc, D. Elewaut, S. Van Calenbergh, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 3175-3182.

<sup>92</sup> L. S. Wong, S. J. Janusz, S. Sun, G. J. Leggett, J. Micklefield, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12234-12243.

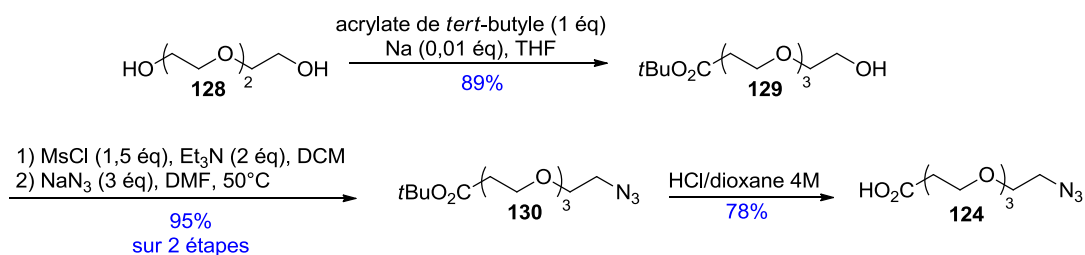


Schéma 92 - Préparation de l'espaceur 41

L'acrylate de *tert*-butyle est additionné au triéthylène glycol **128** en présence de sodium dans le THF pour conduire à l'ester **129** avec un rendement de 89%. L'azoture **130** est préparé par méthylation de l'alcool **129** en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane suivi de la substitution nucléophile par l'azoture de sodium dans le DMF à 50°C avec un rendement de 95% sur deux étapes. L'acide carboxylique **124** est obtenu par clivage de l'ester **130**, par action de l'acide chlorhydrique dans le dioxane, avec un rendement de 78%.

### b) Synthèse du GalCer-PEG-N<sub>3</sub> **131**

La première approche consiste à introduire la chaîne PEG par addition du GalCer-6-OH **65** sur un isocyanate préparé *in situ* par action de l'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA) sur l'acide carboxylique **124** pour former la GalCer-PEG-N<sub>3</sub> **131** comme décrit dans la littérature.<sup>90</sup> Malgré nos efforts, aucune conversion n'a été observée par CCM (Schéma 93). Etant donné qu'il s'agit d'une réaction « one-pot », la formation de l'azoture d'acyle intermédiaire ne peut être confirmée.

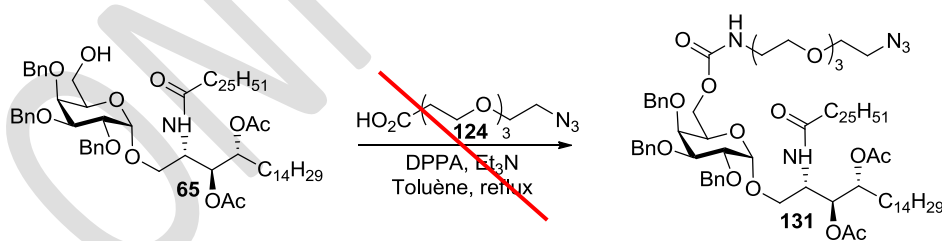


Schéma 93 - Essai de préparation du GalCer-PEG-N<sub>3</sub> via l'utilisation du DPPA

Pour pallier ce manque de réactivité, l'azoture d'acyle **133** a été préparé à partir de l'acide carboxylique **124**. Ce dernier est activé avec le chloroformiate d'éthyle en présence de triéthylamine dans le THF. Le carbonate d'acide **132** formé *in situ* réagit avec l'azoture de sodium en solution aqueuse pour accéder à l'azoture d'acyle **133** avec un rendement de 95% (Schéma 94).

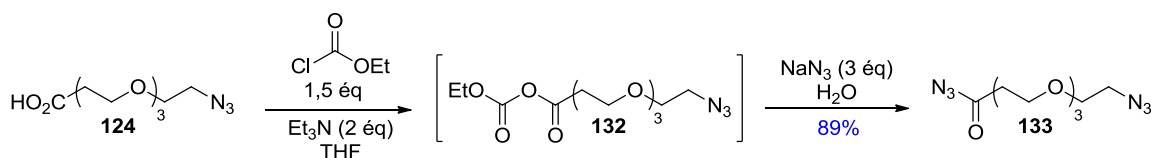


Schéma 94 - Préparation de l'azoture d'acyle 26

L'azoture d'acyle **133** est ensuite chauffé à 90°C dans le toluène pour initier le réarrangement de Curtius (Schéma 95). Une fois l'isocyanate formé grâce au réarrangement de Curtius, le GalCer-6''-OH **65** est additionné à température ambiante puis le mélange réactionnel est chauffé au reflux pour accéder au GalCer-PEG-N<sub>3</sub> **131**. Un temps de réaction de 48h est nécessaire pour avoir une conversion complète mais le rendement n'excède pas 40%. L'utilisation du DABCO<sup>93</sup> (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) permet de diminuer le temps de réaction à 4h et d'améliorer significativement les conditions opératoires pour atteindre un rendement de 86% (Schéma 95).

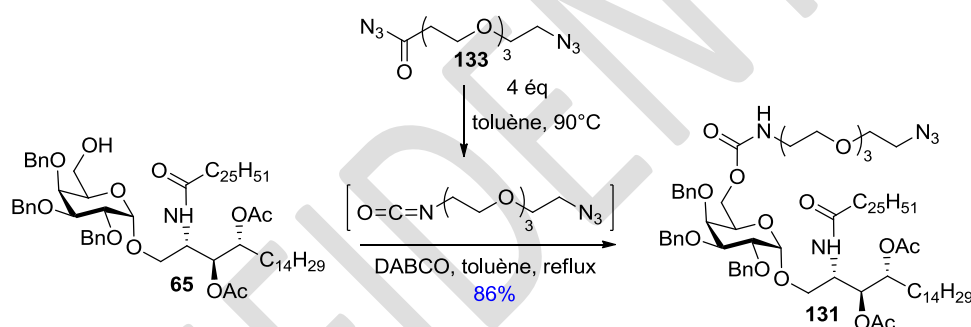


Schéma 95 - Préparation du GalCer-PEG-N<sub>3</sub> en présence de DABCO

L'assistance du DABCO permet d'une part, de transférer le proton de l'alcool vers l'isocyanate ce qui permet d'accéder au carbamate désiré *via* un état de transition proposé à 4 centres<sup>93</sup> (Schéma 96) et d'autre part, le caractère nucléophile du DABCO permet d'activer l'isocyanate.<sup>94</sup>

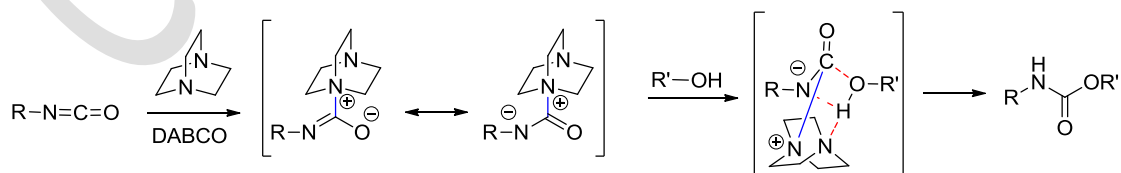


Schéma 96 - Etat de transition proposé pour la formation du carbamate assistée par le DABCO

<sup>93</sup> Z. Wen, W. Hu, X. Chi, X. Wang, D. Tian, M. Wang, J. Liu, X. Ma, A. Pang, *Commun. Comput. Chem.* **2014**, 2, 22-35.

<sup>94</sup> E. Sharmin, F. Zafar, *Polyurethane : an introduction*, **2012**, 3-16.

### c) Synthèse du GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> 63

Pour accéder au GalCer-PEG-NH<sub>2</sub>, l'azoture de la chaîne PEG doit être réduit en amine primaire et les groupements hydroxyles doivent être déprotégés. La première étape consiste à faire une hydrogénolyse à pression atmosphérique en présence de Pd/C. Cette réaction est effectuée en milieu acide pour d'une part, piéger l'amine formée sous forme d'ammonium lors de la réduction de l'azoture pour conserver l'activité du palladium et d'autre part, éviter une éventuelle réaction secondaire entre l'amine et l'un des groupements esters de la chaîne sphingosine. Plusieurs essais ont été réalisés en modifiant la quantité de palladium et la nature de l'acide. Le palladium est introduit soit en quantité catalytique, soit en charge équivalente à la masse du substrat de départ que ce soit en présence d'acide chlorhydrique ou d'acide trifluoroacétique. Pour les deux acides, les meilleurs rendements sont obtenus pour une charge catalytique de 10% en masse et l'acide chlorhydrique s'est révélé être le plus efficace. Ainsi, l'hydrogénolyse sous atmosphère d'hydrogène pendant 4h à température ambiante permet d'accéder au galactosylcéramide **134** avec un rendement de 95%. Les groupements hydroxyles sont ensuite libérés par méthanolyse pour conduire GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> **63** quantitativement (Schéma 97).

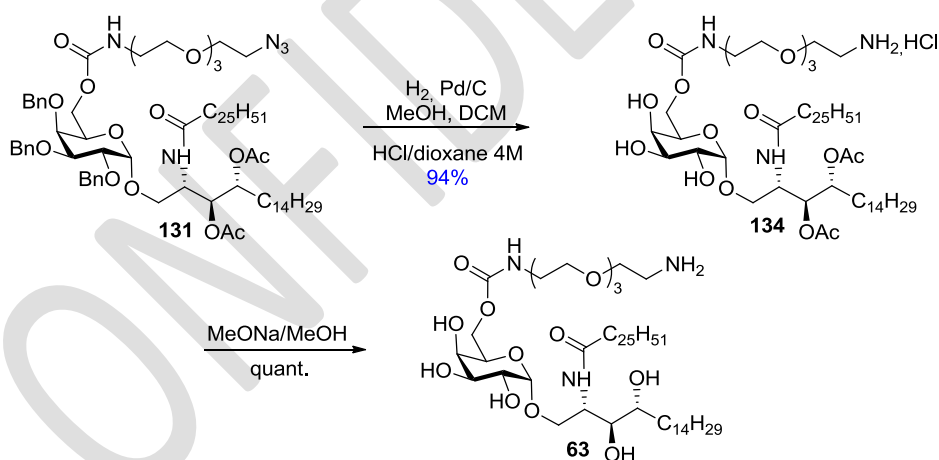


Schéma 97 - Préparation du GalCer-PEG-NH<sub>2</sub>

### d) Introduction de l'espaceur de type PEG

Après avoir introduit une fonction amine primaire sur la position 6'' du galactose *via* un premier espaceur pour limiter tout problème de gêne stérique avec le KRN7000, la prochaine étape est l'introduction de l'espaceur commercial de type PEG comportant une fonction maléimide dans le but de greffer notre immunostimulant à l'anticorps (Schéma 98).

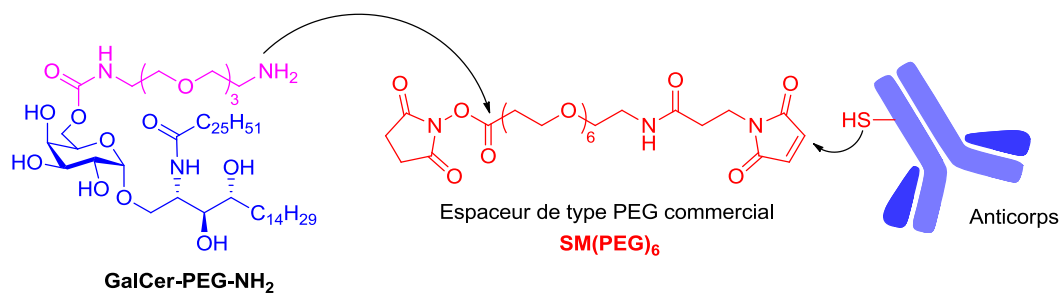


Schéma 98 - Rappel de la stratégie de greffage covalent

Une première approche consiste à réaliser l'addition de l'amine sur l'ester activé de l'espaceur en milieu aqueux pour pouvoir directement notre intermédiaire maléimide prêt pour le greffage l'anticorps, réalisable uniquement en milieu aqueux. Cependant, toutes nos tentatives d'addition de l'amine sur l'ester activé se sont montrées infructueuses ce qui peut être dues à la faible solubilité de l'amine **63** en milieu aqueux. Le couplage du GalCer-PEG-NH<sub>2</sub> **63** a donc été réalisé dans un mélange méthanol/dichlorométhane pour accéder au maléimide **135** avec un rendement de 57% (Schéma 99).

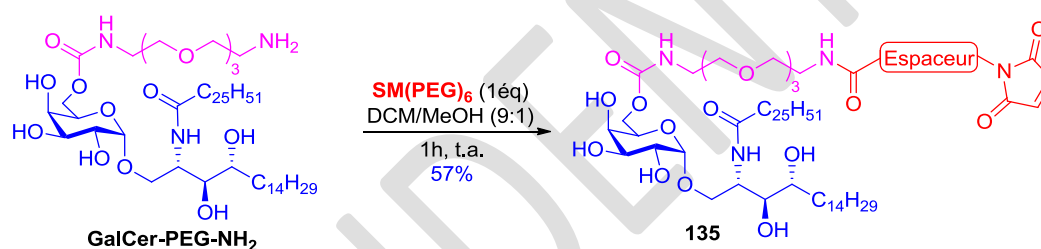


Schéma 99 - Préparation du maléimide **135**

A ce stade, il nous reste plus qu'à étudier le greffage du maléimide **135** à l'anticorps. Les premiers greffages sont en cours d'optimisations mais ne seront pas discutés dans ce mémoire. En parallèle, nous avons envisagé l'étude de l'approche auto-immolable.

### III - Fonctionnalisation du GalCer-6''-OH par un espaceur clivable

Les paragraphes suivants présenteront la fonctionnalisation du GalCer-6''-OH par un espaceur clivable. La synthèse de notre plateforme **64** associée seulement au KRN7000 sera détaillée pour étudier le relargage de l'immunostimulant (Schéma 100). La stratégie de synthèse pour l'élaboration de l'ADC sera ensuite présentée.



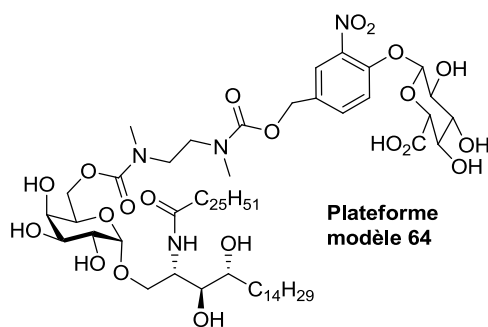


Schéma 100 - Plateforme modèle à synthétiser

### III-1. Synthèse d'une plateforme clivable modèle

De nombreuses structures ont été étudiées pour délivrer un principe actif vers les cellules cancéreuses (cf **Chapitre I**). Le lien glucuronide a été exploité pour libérer le principe actif d'un ADC après clivage par la  $\beta$ -glucuronidase.<sup>64,65</sup> Cette enzyme, présente dans les lysosomes dans toutes les cellules, est surexprimée dans certaines tumeurs dans le milieu extracellulaire des cellules cancéreuses.<sup>95</sup> C'est dans ce contexte que nous avons choisi de construire une structure clivable modèle pour mettre en évidence la libération du KRN7000 par clivage enzymatique (Schéma 101). La plateforme modèle est clivée par la  $\beta$ -glucuronidase pour former l'acide glucuronique **137** et un intermédiaire **136**. Ce dernier subit spontanément une cascade d'éliminations suivie d'une cyclisation pour libérer le KRN7000, une urée **138**, du dioxyde de carbone et le 4-(hydroxyméthyl)phénol **139**.

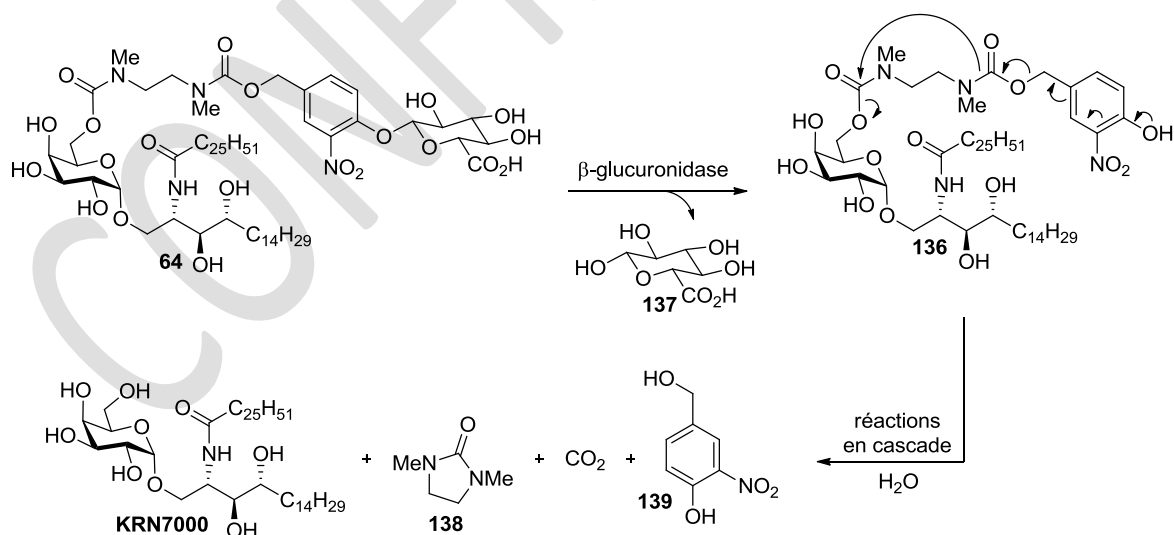


Schéma 101 - Mécanisme de dégradation enzymatique

Selon le schéma rétrosynthétique (Schéma 102), la plateforme **64** pourrait être obtenue à partir du GalCer-diamine-Boc **140** et de la gâchette **141**. Le GalCer-diamine-Boc **140** met

<sup>95</sup> M. de Graaf, E. Boven, H. W. Scheeren, H. J. Haisma, H. M. Pinedo, *Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8, 1391-1403

en jeu deux précurseurs, à savoir la *N,N'*-diméthyléthylènediamine commerciale **142** et le GalCer-6''-OH **65**, dont la synthèse a déjà été décrite (I-3. Accès au GalCer-6''-OH). La gâchette **141** est issue de deux composés commerciaux : le 4-hydroxy-3-nitro-benzaldéhyde **143** et de la glucuronolactone **144**.

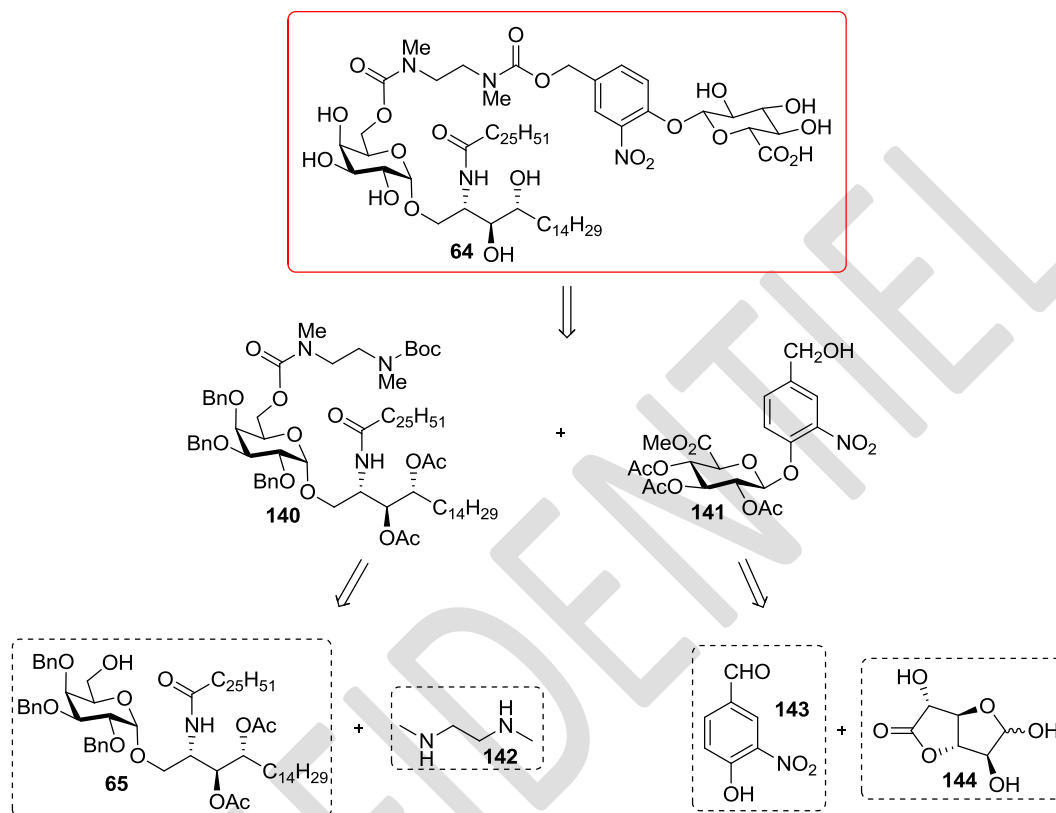


Schéma 102 - Rétrosynthèse de la plateforme modèle

### a) Synthèse de la gâchette **141**

La gâchette **141** est préparée en 4 étapes comme décrit dans la littérature<sup>96</sup> à partir de la glucuronolactone **144** commerciale (Schéma 103).

<sup>96</sup>a) J-C. Florent, X. Dong, G. Gaudel, S. Mitaku, C. Monneret, J-P. Gesson, J-C. Jacquesy, M. Mondon, B. Renoux, S. Andrianomenjanahary, S. Michel, M. Koch, F. Tillequin, M. Gerken, J. Czech, R. Straub, K. Bosslet, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3572-3581. b) S. A. K. Jongkees, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19334-19337.

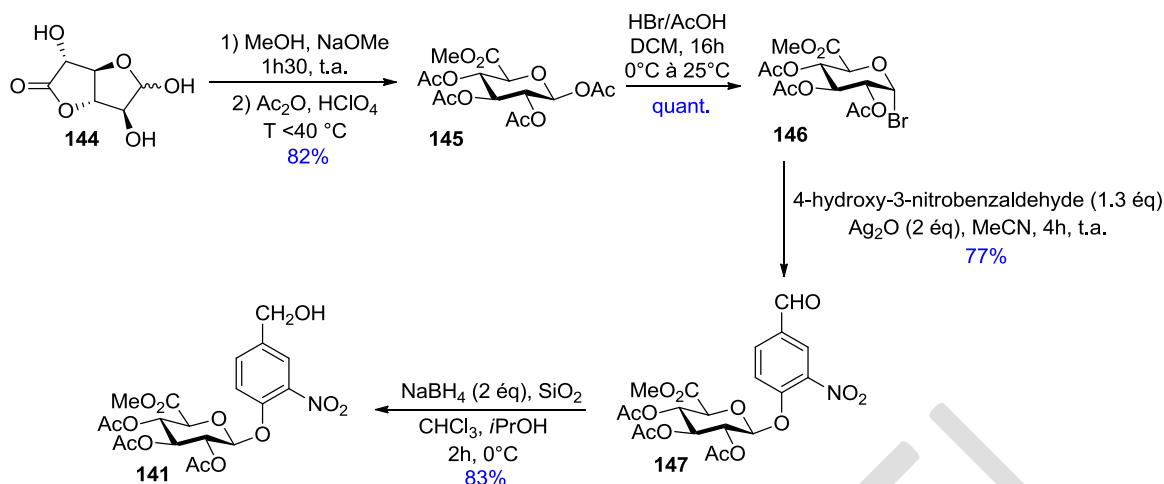


Schéma 103 - Synthèse la gâchette 76

La glucuronolactone **144** est transestérifiée en présence de méthanolate de sodium dans le méthanol puis la protection des fonctions hydroxyles par l'anhydride acétique est catalysée par l'acide perchlorique.<sup>97</sup> L'anomère  $\beta$  **145** est obtenu par précipitation avec un rendement de 82%. Il faut préciser que la température lors de la protection des groupements hydroxyles (réaction exothermique) doit rester inférieure à 40°C au risque de favoriser la dégradation du substrat et donc faire chuter le rendement. L'analyse RMN du proton du composé **145** obtenu après filtration montre un doublet à 5.77 ppm avec une constante de couplage de 8,0 Hz caractéristique d'un  $\beta$ -glucuronide.

Le groupement acétate en position anomérique de l'ester glucuronique **145** est substitué quantitativement par l'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique pour accéder au dérivé bromé **146** après filtration sur gel de silice. Le couplage glycosidique est ensuite réalisé entre le donneur de glycosyle **146** et le 4-hydroxy-3-nitrobenzaldéhyde commercial par action de l'oxyde d'argent dans l'acétonitrile. Dans le brut réactionnel, le composé **147** de configuration  $\beta$  est obtenu grâce à l'assistance antimérique du groupement acétate en position 2. Ce dernier permet la formation d'un acétoxonium intermédiaire ce qui implique une attaque du nucléophile par la face supérieure uniquement (Schéma 104). Le produit de couplage **147** est obtenu avec un rendement 77%.

<sup>97</sup> G. N. Bolennback, John W. Long, D. G. Benjamin, J. A. Lindquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 3310-3315.

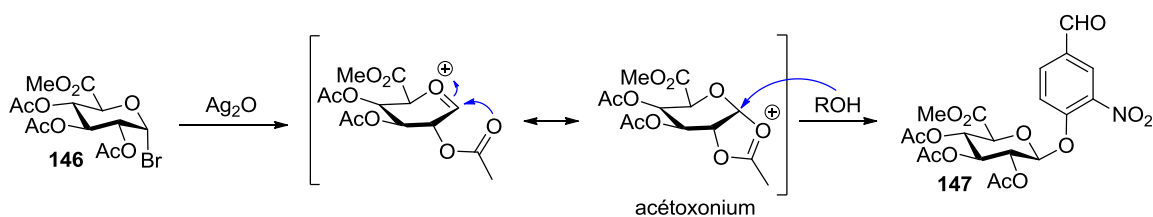


Schéma 104 - Mécanisme du couplage glycosidique

Enfin, l'aldéhyde **147** est réduit par action du borohydrure de sodium en présence de silice dans le chloroforme et l'isopropanol pour donner l'alcool **141** avec un rendement de 83%. La silice est utilisée en tant que phase protique insoluble dans le mélange de solvant pour reprotoner l'anion issu de la réduction avec NaBH<sub>4</sub><sup>98</sup> pour éviter une addition sur un groupement ester de la gâchette.

### b) Synthèse du GalCer-diamine-Boc 140

Le GalCer-6''-OH est fonctionnalisé avec une chaîne diamine **148** via la formation d'une fonction carbamate. La diamine **148** est préparée à partir de la *N,N'*-diméthyléthylènediamine **142** commerciale en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle dans le dichlorométhane avec un rendement de 72% (Schéma 105).

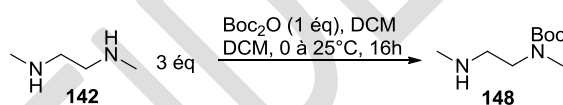


Schéma 105 - Synthèse de la diamine 148

Le GalCer-6''-OH **65** est traité par le chloroformiate de *p*-nitrophénol (PNPCOCl) au reflux du toluène en présence de triéthylamine et de diméthylaminopyridine (DMAP) pour former un carbonate activé non isolé pour éviter la dégradation de cet intermédiaire. Une fois le milieu réactionnel à température ambiante, la diamine est ajoutée en solution dans le toluène pour accéder au GalCer-diamine-Boc **140** avec un rendement de 94% (Schéma 106).

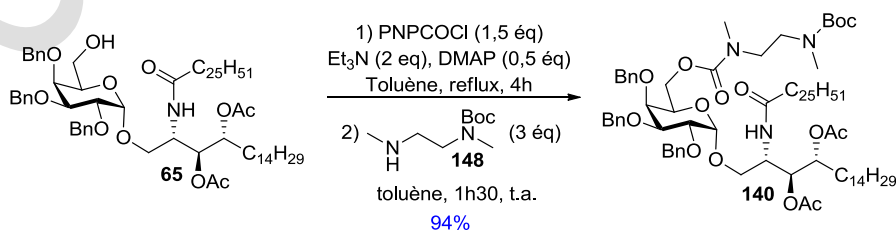


Schéma 106 - Synthèse du GalCer-diamine-Boc

<sup>98</sup> A. K. Sinhababu, R. T. Borchardt, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 227-230.

### c) Couplage du GalCer-diamine-Boc 140 et de la gâchette 141

La synthèse de la plateforme avancée **149** a été préparée à partir des deux synthons **140** et **141** décrits précédemment (Schéma 107).

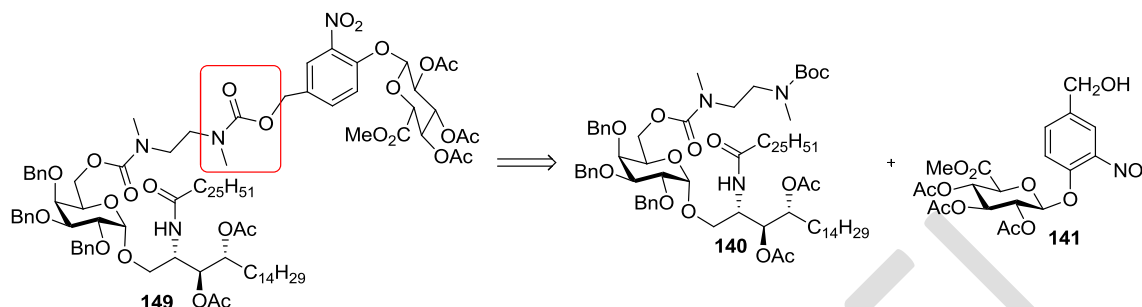


Schéma 107 - Rétrosynthèse envisagée

Pour satisfaire la synthèse qui consiste à former une liaison carbamate, il est nécessaire dans un premier d'activer la fonction hydroxyle de la gâchette **141** sous forme d'un carbonate et dans un second temps, de libérer l'amine du composé **140** pour effectuer l'addition nucléophile sur le carbonate de la gâchette pour accéder à la plateforme avancée **149**.

La première étape consiste donc à préparer un carbonate à partir de l'alcool **141**. Nous avons étudié la réactivité de deux carbonates **150** et **151**, dont l'un est formé à partir du chloroformiate de *para*-nitrophénol tandis que l'autre provient du carbonate de disuccinimidyle (DSC). La purification sur gel de silice permet d'accéder au carbonate **150** avec un rendement moyen de 44% (Schéma 108). La grande instabilité du carbonate **151** empêche le traitement aqueux du milieu réactionnel. Le couplage du GalCer-diamine-Boc **140** et de la gâchette **141** pourra éventuellement être réalisé en « one-pot ».

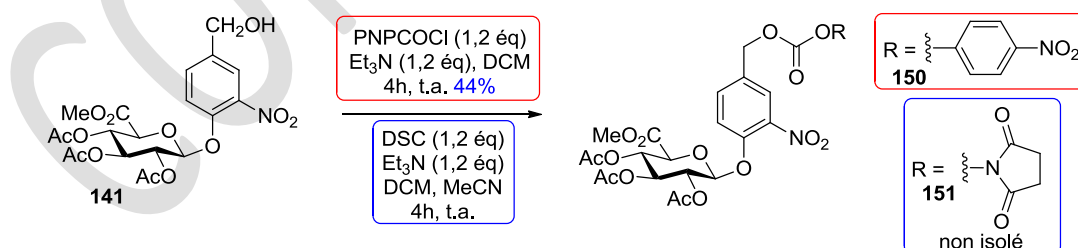


Schéma 108 - Conditions de préparation de deux carbonates

Nous avons donc décidé d'engager directement le milieu réactionnel, contenant le carbonate activé (**150** ou **151**), dans la prochaine étape qui consiste à additionner le GalCer-diamine **152** sous forme d'ammonium pour éviter la cyclisation intramoléculaire. Pour cela, le GalCer-diamine-Boc **140** est traité par l'acide trifluoroacétique (TFA) pendant 2h à 0°C pour

accéder au sel d'ammonium **152**, après co-évaporation au toluène pour éliminer l'excès de TFA. Le GalCer-diamine **152** est repris dans le dichlorométhane et est ensuite additionné au mélange réactionnel contenant le carbonate activé (**150** ou **151**) en présence d'un excès de triéthylamine pour libérer l'amine sous forme neutre. Ces conditions permettent d'avoir seulement une addition de l'amine sur le carbonate activé (**150** ou **151**). En effet, la cyclisation intramoléculaire n'est pas observée. La synthèse « one-pot » avec le carbonate **150** a mené à une dégradation des substrats. L'addition de l'ammonium **152** sur le carbonate **151** a conduit, après 2h à température ambiante, au produit attendu **149** avec un rendement de 76% après purification sur gel de silice (Schéma 109).

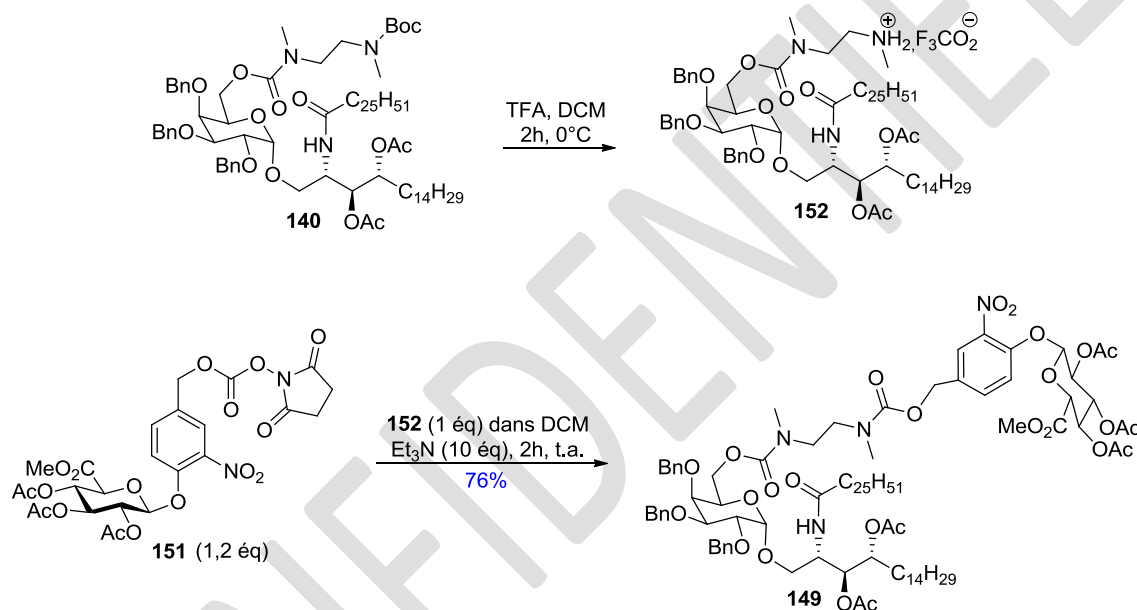


Schéma 109 - Synthèse de la plateforme avancée **149**

Après avoir formé la plateforme **149**, il reste à déprotéger toutes les fonctions hydroxyles. Dans un premier temps, l'hydrogénolyse doit être effectuée pour libérer les groupements hydroxyles de l'unité galactose et la saponification des fonctions esters sera ensuite réalisée.

Tout d'abord, l'hydrogénolyse de l'intermédiaire **149** (Schéma 110) a mené à un mélange complexe qui peut être dû à la réduction de la fonction nitro en amine. En effet, la fonction amine empoisonne le catalyseur au palladium ce qui empêche la débenzylation totale de l'intermédiaire **149**. Pour pallier ce problème, l'hydrogénolyse peut être envisagée avant le couplage sur le carbonate activé de la plateforme **151**.

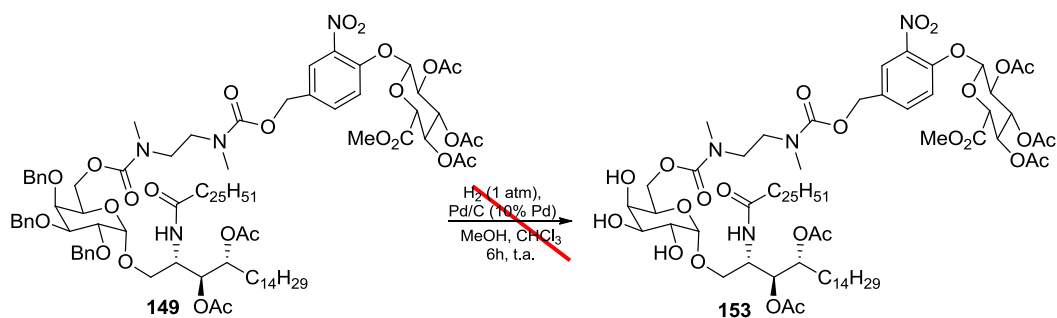


Schéma 110 - Tentative d'hydrogénolyse de la plateforme 149

#### d) Hydrogénolyse du GalCer-diamine 149 et couplage sur la plateforme 151

L'hydrogénation du GalCer-diamine-Boc **140** catalysée par le palladium sur charbon (10% en masse) permet d'accéder au composé **154** avec un rendement de 94% (Schéma 111). Le groupement Boc du composé **154** est clivé sous l'action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane le résidu obtenu est additionnée sur le carbonate activé de la plateforme **151** pour accéder à la plateforme **155** avec un rendement de 77% (Schéma 111).

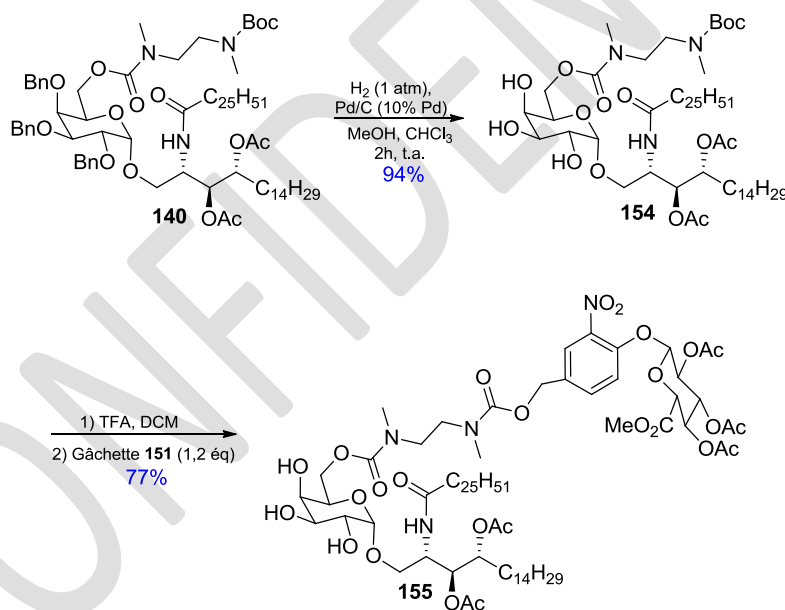


Schéma 111 - Hydrogénolyse du GalCer-diamine-Boc 140

La dernière étape réside dans la déprotection des fonctions hydroxyles et de l'acide carboxylique. Pour cela, la saponification a été réalisée pour libérer les alcools et l'acide carboxylique en une seule étape en présence de lithine dans un mélange THF/eau (1:1) (Schéma 112). Cependant, un mélange complexe a été obtenu mais la présence du composé **64** attendu a été confirmée par analyse HRMS et également un sous-produit **156** résulte d'une élimination du groupement acétate en position 4 de l'ester glucuronique (Schéma 112). La

présence d'un proton acide en  $\alpha$  de l'ester méthylique favorise l'élimination du groupement acétate.<sup>99</sup>

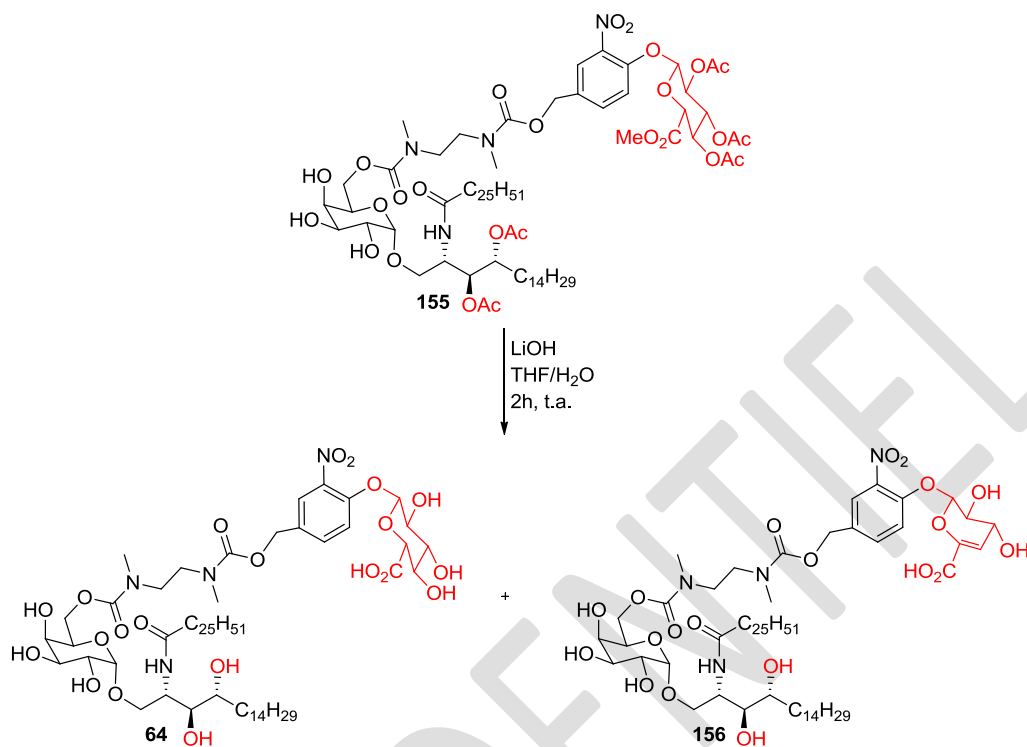


Schéma 112 - Hydrolyse basique du composé 155

Une seconde approche consiste à réaliser la déprotection en deux étapes, d'abord la méthanolyse des groupements acétates puis la saponification de l'ester méthylique. Dans ces conditions, la plateforme modèle **64** est obtenue avec un rendement de 61% sur deux étapes (Schéma 113). Notre plateforme modèle peut être préparée à une échelle d'une centaine de milligrammes.

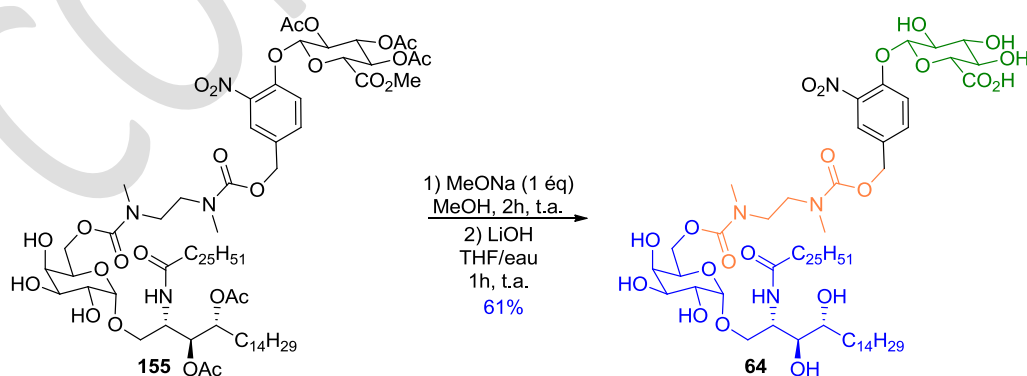


Schéma 113 - Méthanolyse suivie de la saponification du composé 155

<sup>99</sup> A. El Alaoui, F. Schmidt, C. Monneret, J-C. Florent, *J. Org. Chem.* **2009**, *71*, 9628-9636.



La suite des travaux consiste à réaliser la dégradation enzymatique de la plateforme **64** par la  $\beta$ -glucuronidase en milieu aqueux pour valider le relargage du KRN7000. A ce jour, une seule tentative d'hydrolyse enzymatique a été réalisée mais les conditions opératoires n'ont pas permis de détecter le KRN7000. Dans le paragraphe suivant, la stratégie de synthèse de la plateforme auto-immolable associée à l'anticorps sera évoquée.

### III-2. Stratégie de synthèse de la plateforme clivable associée à l'anticorps

La préparation de notre plateforme auto-immolable associée à l'anticorps est basée sur les travaux de Papot *et al.*<sup>100</sup> La stratégie de synthèse retenue pour la préparation du vecteur **157** repose sur l'utilisation de l'unité centrale **158** (Schéma 114). Ce composé comporte trois fonctions chimiques distinctes permettant d'assembler de manière successive les différentes unités composant l'assemblage moléculaire (gâchette/KRN7000/anticorps). Ainsi, la gâchette glycosidique pourra être introduite de manière chimiosélective sur le phénol par une réaction de couplage glycosidique, déjà mentionné lors de la synthèse de la plateforme modèle. Le KRN7000 sera ensuite installé par l'intermédiaire d'un espaceur de type diamine clivable, sur l'alcool benzylique préalablement activé sous la forme d'un carbonate de succinimidyle, dont les étapes de synthèse ont été également décrites lors de la synthèse de la plateforme modèle. Enfin, un premier espaceur de type PEG comportant un azoture pourra être couplé avec l'alcyne vrai par une réaction de cycloaddition [3+2] ("click chemistry"). L'autre extrémité de la chaîne PEG sera fonctionnalisée par une fonction amine pour permettre le greffage au second espaceur commercial de type PEG (SM(PEG)) *via* un ester activé. Ce type d'espaceur, que nous avons utilisé pour l'étude du greffage covalent à l'anticorps, est fonctionnalisé par un groupement maléimide pour effectuer le greffage à l'anticorps (Schéma 114).

---

<sup>100</sup> T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, C. Jayle, J. Alsaraff, M. Thomas, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 67, 75-80.

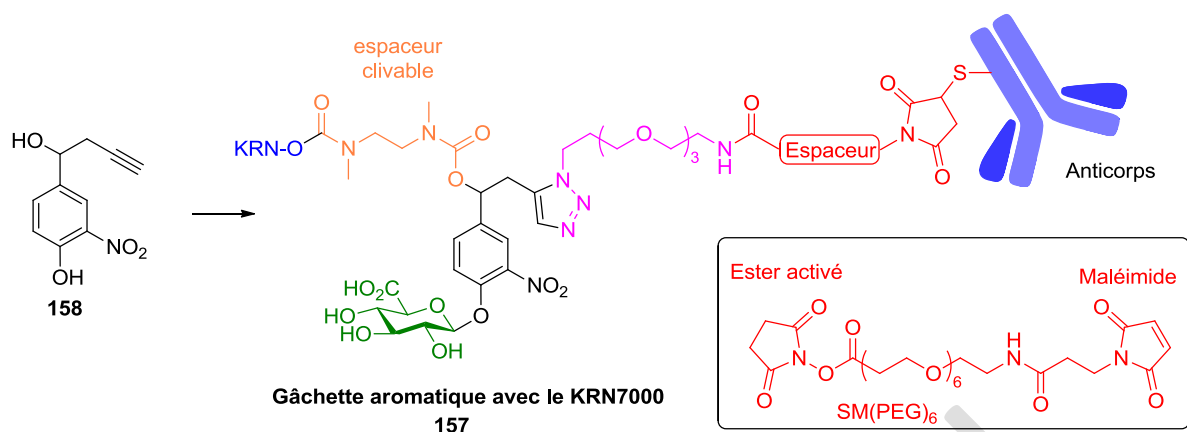


Schéma 114 – Stratégie de synthèse du vecteur 157

Tout d'abord, la stratégie consiste à réaliser le couplage glycosidique entre le donneur de glycosyle **146** et le phénol **158** pour accéder au composé **159**. La seconde étape est l'introduction d'un espaceur non clivable de type PEG *via* une réaction de « Click-Chemistry » entre l'alcyne de la plateforme et l'azoture de l'espaceur pour mener à l'intermédiaire **160**. Le second groupement hydroxyle de la plateforme est ensuite activé sous forme d'un carbonate **161** pour installer le KRN7000 fonctionnalisé par un espaceur avec une fonction amine, libérée *in situ* à partir du sel d'ammonium **152**. A ce stade, la synthèse de la plateforme **162** a été entreprise par un ingénieur d'étude. La suite de la stratégie, en cours de réalisation, repose dans un premier temps, à installer l'espaceur de type PEG fonctionnalisé par un groupement maléimide pour pouvoir ensuite greffer l'anticorps *via* les fonctions thiols (Schéma 115).

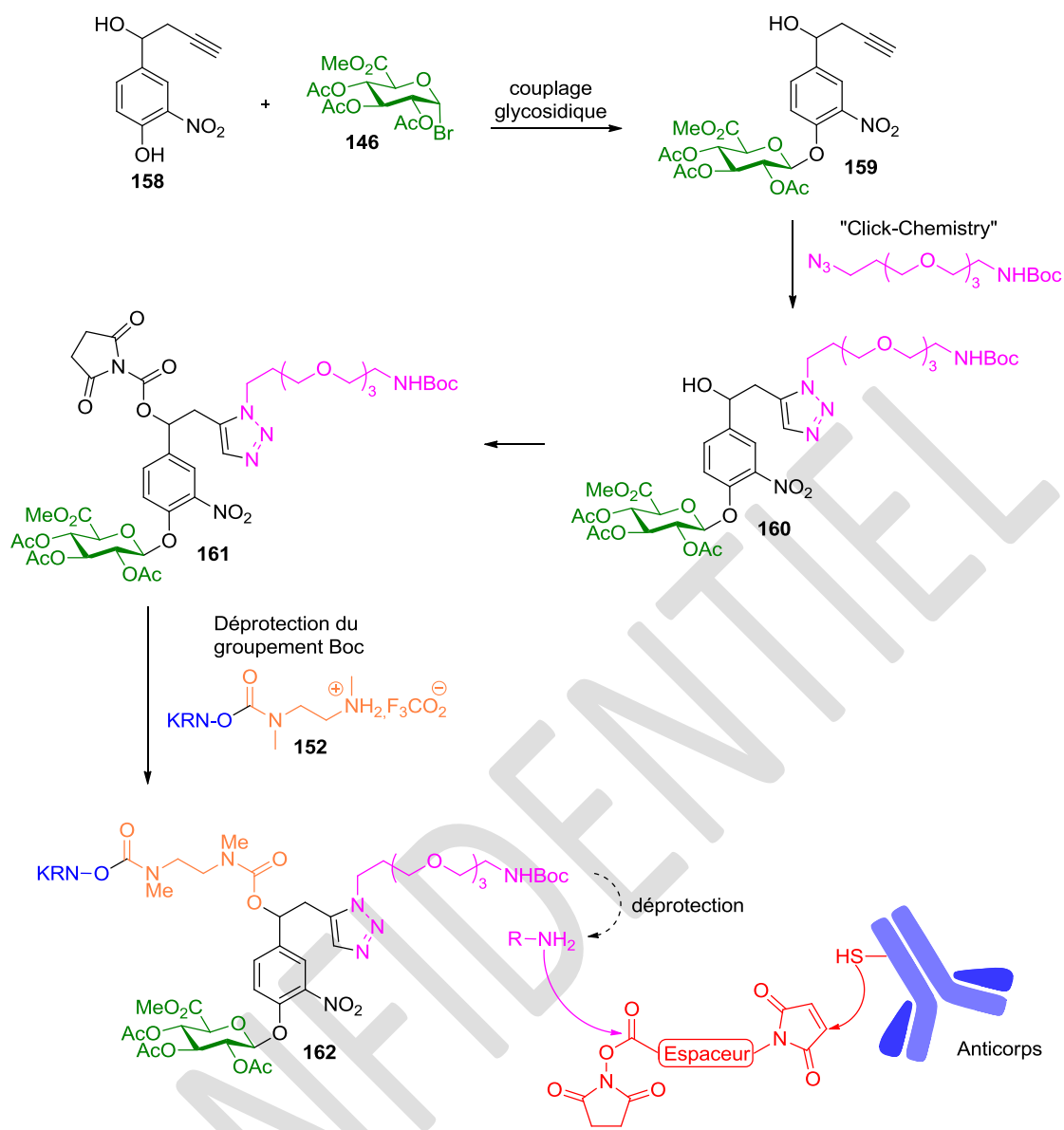
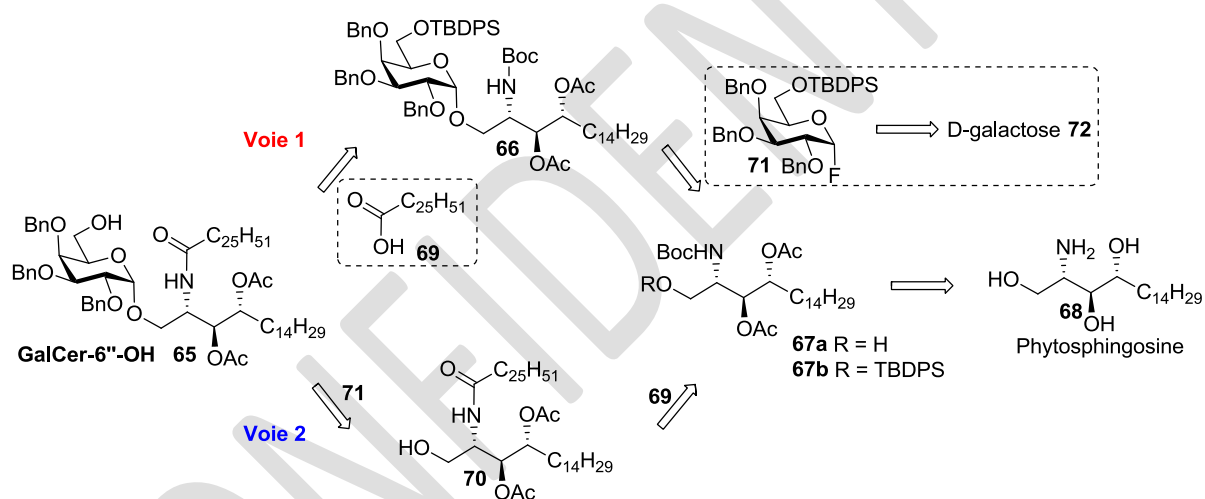


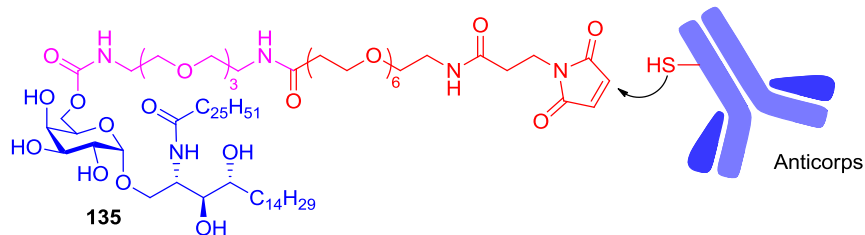
Schéma 115 - Synthèse de l'intermédiaire 159 et stratégie envisagée

# Conclusion et perspectives

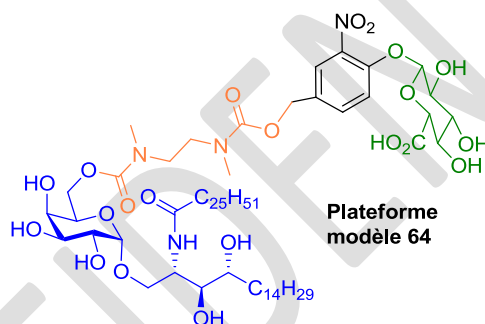
Dans cette partie, le premier objectif était d'effectuer la synthèse d'un ADC, composée du KRN7000 et d'un anticorps, tous deux liés de manière non clivable pour étudier l'impact du greffage sur l'activité de l'anticorps. Le second objectif était la préparation d'une plateforme auto-immolable sans l'anticorps pour réaliser une étude de dégradation enzymatique. Dans les deux cas, le complexe KRN7000/Anticorps passe par la fonctionnalisation du KRN7000 en position 6'' du galactose à partir d'un synthon commun, à savoir le GalCer-6''-OH **65**. Le GalCer-6''-OH **65** est obtenu selon une synthèse efficace et convergente à partir du galactose et de la phytosphingosine. Deux approches de synthèse du GalCer-6''-OH **65** ont été étudiées, à savoir effectuer le couplage glycosidique suivi de la *N*-acylation (voie 1) ou réaliser d'abord la *N*-acylation, puis le couplage glycosidique (voie 2).



La première approche (voie 1) a montré différentes limites, à savoir une migration d'un groupement acétate sur la fonction hydroxyle primaire lors de la préparation du composé **67a**, et une mauvaise sélectivité lors du couplage glycosidique. Le GalCer-6''-OH **65** est ainsi obtenu par la seconde approche à l'échelle du gramme avec un rendement global de 36 % (14 % pour la voie 1) sur 8 étapes. Une fois ce composé à disposition et en quantité suffisante, la préparation de l'ADC et la synthèse plateforme modèle ont été entreprises. A ce jour, la synthèse de la plateforme **135** comprenant l'espaceur de type PEG avec une extrémité maléimide a été effectuée avec succès et le greffage à l'anticorps est actuellement en cour d'optimisation.



Notre objectif de synthèse de la plateforme modèle **64** a été mené à son terme avec un total de 23 étapes et un rendement global inférieur à 1%. Une étude approfondie de la dégradation enzymatique n'a cependant pas encore été réalisée mais la synthèse de cette plateforme modèle est la première prodrogue du KRN7000. En effet, cette prodrogue ne cible pas les cellules tumorales mais nous pouvons penser que la dégradation enzymatique est effectuée uniquement dans l'environnement tumoral ce qui pourrait mener à une libération contrôlée du KRN7000 au niveau des cellules tumorales.



## Experimental section

---

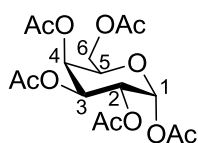
All air and moisture sensitive reactions were performed under argon atmosphere with anhydrous solvents. Commercial reagents were used without further purification.

Column chromatography was performed using The Reveleris® flash chromatography systems. Thin-layer chromatography was performed with SIL G/UV254 plates and products were detected by UV radiation ( $\lambda = 254$  nm) or phosphomolybdic acid (PMA).

$^1\text{H}$  NMR (300 or 400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (75 or 100 MHz) spectra were recorded on a Bruker Avance 300 or 400. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in part per million (ppm). Coupling constants are given in Hertz (Hz) and the multiplicity of signal is indicated as following : s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br. s (broad singlet).

High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on ESI within a tolerance of 5 ppm of the theoretically calculated value.

### Penta-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranose 73

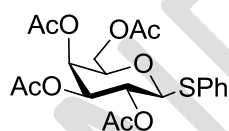


$C_{17}H_{24}O_{10}$   
 $M = 390.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid  
 $R_f = 0.44$  (PE/EtOAc, 6:4)

D-galactose (10 g, 55.0 mmol, 1 eq) was dissolved in dry pyridine (100 mL) and acetic anhydride (50 mL). The mixture was cooled at 0°C and stirred for 20 minutes. A catalytic amount of DMAP (0.61 g, 5.5 mmol, 0.1 eq) was added and the mixture was stirred overnight at 25°C. Then, the solution was quenched by saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (200 mL) and AcOEt (100 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (100 mL). Organic layers were washed with a aqueous CuSO<sub>4</sub> solution (4×100 mL), water (100 mL), brine (100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to give the crude product which was recrystallized in methanol to afford a white powder (18.5 g, 85%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.37-6.35 (m, 1H, H-1), 5.47-5.45 (m, 1H, H-4), 5.30-5.28 (m, 2H, H-2, H-3), 4.31 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-5), 4.07-4.04 (m, 2H, H-6), 2.12 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### Phenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside<sup>101</sup> 74



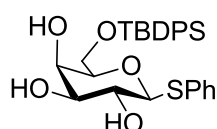
$C_{20}H_{24}O_9S$   
 $M = 440.46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
Colorless oil  
 $R_f = 0.31$  (PE/EtOAc, 7:3)

The compound **73** (19.5 g, 50 mmol, 1 eq) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL). Thiophenol (20.4 mL, 200 mmol, 4 eq) was added. The mixture was cooled at 0°C and stirred for 20 minutes. BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (12.3 mL, 100 mmol, 2 eq) was added dropwise. The mixture was stirred two days at 25°C (monitored by TLC). Cold water (200 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL). Organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (200 mL) and aqueous NaOH 1M solution (2×100 mL) to remove thiophenol. The organic layer was washed with brine (100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with PE/AcOEt (8:2) gave **74** (15.4 g, 70%) as a colorless oil.

<sup>101</sup> S. Deng, U. Gangadharmath, C-W. T. Chang, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5179-5185.

**RMN <sup>1</sup>H** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.54-7.50 (m, 2H, ArH), 7.34-7.30 (m, 3H, ArH), 5.42 (dd, *J* = 3.4, 1.0Hz, 1H, H-4), 5.24 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-2), 5.05 (dd, *J* = 10.0, 3.4Hz, 1H, H-3), 4.72 (d, *J* = 10.0Hz, 1H, H-1), 4.22-4.08 (m, 2H, H-6), 3.96-3.90 (m, 1H, H-5), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**Phenyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-1-thio-β-D-galactopyranoside<sup>102</sup> 75**

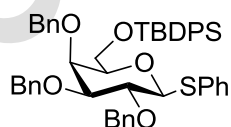


C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>SSi  
*M* = 510.72 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
*R<sub>f</sub>* = 0.35 (PE/EtOAc, 4:6)

To a solution of **74** (8.81 g, 20 mmol) in MeOH (80 mL) was added MeONa 1M (20 mL, 20 mmol, 1 eq). The mixture was stirred at 25°C for 1h. Amberlyte IR120 (H<sup>+</sup>) was added to neutralize the solution for 10 min. After filtration and concentration, the white solid was dissolved in dry THF (50 mL). Imidazole (6.8 g, 100 mmol, 5 eq) and TBDPSCl (6.24 mL, 24 mmol, 1.2 eq) were added and the mixture was stirred overnight at 25°C. Water (150 mL) and AcOEt (150 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (2×50 mL). Organics layers were washed with water (100 mL) and brine (100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with PE/AcOEt (5:5) gave **75** (9.99 g, 98%) as a white solid.

**RMN <sup>1</sup>H** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.74-7.67 (m, 4H, ArH), 7.57-7.54 (m, 2H, ArH), 7.47-7.35 (m, 6H, ArH), 7.28-7.25 (m, 3H, ArH), 4.51 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-1), 4.16-4.09 (m, 1H, H-4), 4.01-3.92 (m, 2H, H-6), 3.68 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-2), 3.62-3.56 (m, 2H, H-3, H-5), 3.05 (s, 2H, OH), 2.85 (s, 1H, OH), 1.07 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS).

**Phenyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thio-β-D-galactopyranoside<sup>103</sup> 76**



C<sub>49</sub>H<sub>52</sub>O<sub>5</sub>SSi  
*M* = 781.08 g.mol<sup>-1</sup>  
 Pale yellow oil  
*R<sub>f</sub>* = 0.24 (PE/EtOAc, 96:4)

Compound **75** (2.55 g, 5 mmol) was dissolved in dry DMF (10 mL). At 0°C, NaH (5.85 g, 14.65 mmol, 3.6 eq) was added and stirred for 30 min. Then, THF (20 mL) and BnBr

<sup>102</sup> K. C. Nicolaou, J. Li, G. Zenke, *Helv. Chim. Acta.* **2000**, 83, 1977-2006

<sup>103</sup> J. Lopez-Prados, F. Cuevas, N-C. Reichardt, J-L. de Paz, E. Q. Morales, M. Martin-Lomas, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 764-786



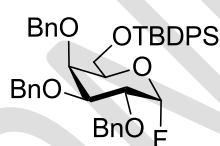
(2.6 mL, 21.57 mmol, 4.5 eq) were added and the mixture was allowed to 25°C and stirred for 4h. Water (30 mL) and Et<sub>2</sub>O (30 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (2×30 mL). Organic layers were washed with water (30 mL) and brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with PE/AcOEt (100:0 to 95:5) gave **76** (3.47 g, 89%).

$[\alpha]_D^{25} +18.3$  (*c* 1.2, CHCl<sub>3</sub>).

**RMN <sup>1</sup>H** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.62-7.57 (m, 4H, ArH), 7.53-7.49 (m, 2H, ArH), 7.42-7.24 (m, 21H, ArH), 7.16-7.10 (m, 3H, ArH), 4.99 and 4.62 (AB Syst. *J* = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.79-4.68 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.56 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-1) ; 3.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-4), 3.91 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-2), 3.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-6), 3.56 (dd, *J* = 9.3, 2.5 Hz, 1H, H-3), 3.43 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-5), 1.03 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS).

**RMN <sup>13</sup>C** (75MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 138.9 (Cq), 138.5 (Cq), 138.4 (Cq), 135.7 (Caro), 135.6 (Caro), 134.3 (Cq), 133.3 (Cq), 131.3 (Caro), 129.9 (Caro), 129.8 (Caro), 128.8 (Caro), 128.5 (Caro), 128.4 (Caro), 128.2 (Caro), 127.8 (Caro), 127.8 (Caro), 127.6 (Caro), 127.4 (Caro), 127.0 (Caro), 87.7 (C1), 84.3 (C3), 78.6 (C5), 77.2 (C2), 75.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 74.5 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.7 (C4), 73.0 (CH<sub>2</sub>Ph), 62.5 (C6), 27.0 (CH<sub>3</sub>, TBDPS), 19.3 (Cq, TBDPS).

**6-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl fluoride **71****



C<sub>49</sub>H<sub>52</sub>FO<sub>5</sub>Si  
*M* = 690.91 g.mol<sup>-1</sup>  
 Pale yellow oil  
*R<sub>f</sub>* = 0.24 (PE/EtOAc, 96:4)

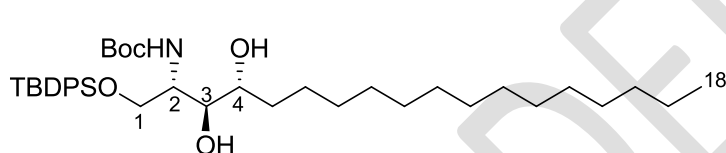
Compound **76** (2.75 g, 3.53 mmol) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL). At -15°C, DAST (0.65 mL, 5.30 mmol, 1.5 eq) was added, followed by NBS (817 mg, 4.59 mmol, 1.3 eq). After stirring at -15°C for 1h, the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and quenched by saturated aqueous cold NaHCO<sub>3</sub> solution (80 mL). The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×30 mL). Organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with PE/AcOEt (98:2 to 95:5) gave **71** (1.69 g, 69%).

$[\alpha]_D^{25} +20,7$  (*c* 1.1, CHCl<sub>3</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.66-7.61 (m, 5H, ArH), 7.48-7.26 (m, 20H, ArH), 5.56 (dd, <sup>2</sup>J = 54.3 Hz <sup>3</sup>J = 2.7 Hz, 1H, H-1), 5.00 and 4.59 (AB syst. J = 11.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.89 and 4.78 (AB syst. J = 12.0, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.85 and 4.72 (AB syst. J = 11.8, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.13-4.05 (m, 2H, H-2, H-4), 4.05-3.97 (m, 2H, H-3, H-5), 3.94-3.72 (m, 2H, H-6), 1.08 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS).

**RMN <sup>13</sup>C** (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 138.6 (Cq), 138.6 (Cq), 138.1 (Cq), 135.6 (Caro), 133.2 (Cq), 133.1 (Cq), 129.9 (Caro), 129.9 (Caro), 128.5 (Caro), 128.5 (Caro), 128.4 (Caro), 128.3 (Caro), 128.2 (Caro), 128.1 (Caro), 127.9 (Caro), 127.9 (Caro), 127.7 (Caro), 127.7 (Caro), 127.6 (Caro), 106.5 (d, J = 225.8 Hz, C1), 78.6 (C3), 75.9 (d, J = 23.8 Hz, C2), 75.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 74.6 (C4), 73.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.3 (CH<sub>2</sub>Ph + C5), 61.8 (C6), 27.0 (CH<sub>3</sub>, TBDPS), 19.3 (Cq, TBDPS).

**tert-butyl ((2S, 3S, 4R)-1-((tert-butylidiphenylsilyloxy)-3,4-dihydroxyoctadecan-2-yl)carbamate 78**



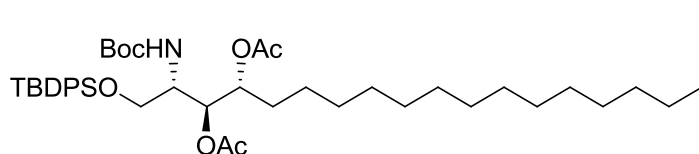
C<sub>39</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>5</sub>Si  
M = 656.02 g.mol<sup>-1</sup>  
Pale yellow oil  
R<sub>f</sub> = 0.30 (PE/EtOAc, 9:1)

To a solution of commercial phytosphingosine (2.5 g, 7.87 mmol, 1 eq) in dry THF (80 mL) was added Et<sub>3</sub>N (1.3 mL, 9.44 mmol, 1.2 eq) and Boc<sub>2</sub>O (1.80 g, 8.26 mmol, 1.05 eq). The mixture was stirred overnight at 25°C. After the removal of solvent, the white solid was dissolved in dry DMF (30 mL). Imidazole (3.11 g, 39.35 mmol, 5 eq) and TBDPSCI (2.45 mL, 9.44 mmol, 1.2 eq) were added. The mixture was stirred for 48h at 25°, diluted with AcOEt (60 mL) and water (60 mL). The organic layer was separated, washed with water (70 mL), brine (70 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt (9:1 to 8:2) gave **78** (4.85 g, 85%) as a colorless oil.

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.69-7.64 (m, 4H, ArH), 7.45-7.37 (m, 6H, ArH), 5.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.03-3.97 (m, 1H, H-1), 3.91-3.82 (m, 2H, H-1, H-2), 3.68-3.61 (m, 2H, H-3, H-4), 1.76-1.67 (m, 1H, H-5), 1.59-1.51 (m, 1H, H-6), 1.44 (s, 10H, <sup>t</sup>Bu Boc, H-5), 1.33-1.26 (m, 23H, H-6 to H-17), 1.04 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS) 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 155.8 (C=O), 135.6-128.1 (Caro), 79.7 (Cq), 75.8 (C3 or C4), 73.4 (C3 or C4), 64.1 (C1), 52.3 (C2), 33.1 (C5), 32.0-29.4 (C7-C17), 28.5 (CH<sub>3</sub>Boc), 27.0 (CH<sub>3</sub> TBDPS), 26.0 (C6), 21.1 (Cq TBDPS), 14.2 (C18).

**(2S,3S,4R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)octadecane-3,4-diyl diacetate 67b**



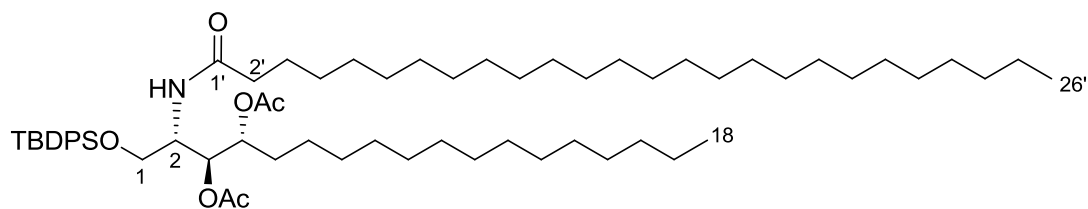
C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>7</sub>Si  
M = 740.10 g.mol<sup>-1</sup>  
Colorless oil  
R<sub>f</sub> = 0.65 (PE/EtOAc, 9:1)

Compound **78** (2.87 g, 4.4 mmol) was dissolved in dry pyridine (40 mL). Acetic anhydride (1.2 mL, 13.2 mmol, 3 eq) and DMAP (54 mg, 0.44 mmol, 0.1 eq) were added. The mixture was stirred at 25°C for 2h. After dilution with Et<sub>2</sub>O (40 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (20 mL), the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (20 mL). Organic layers were washed with brine (2×30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt (95:5) gave **67b** (2.96 g, 91%) as a colorless oil.

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.63-7.59 (m, 4H, ArH), 7.43-7.34 (m, 6H, ArH), 5.29 (dd, J = 2.5 Hz J = 9.2 Hz, 1H, H-3), 5.06-5.02 (m, 1H, H-4), 4.95 (d, J = 10 Hz, 1H, NH), 3.94-3.86 (m, 1H, H-2), 3.68-3.55 (m, 2H, H-1), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.62-1.60 (m, 2H, H-5), 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu Boc, H-5), 1.25-1.24 (m, 22H, H-6 to H-17), 1.04 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS) 0.89 (t, J = 6.5 Hz, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 171.0 (C=O), 169.9 (C=O), 155.3 (C=O), 135.8-127.9 (Caro), 79.8 (Cq), 73.4 (C4), 71.7 (C3), 62.7 (C1), 51.3 (C2), 33.1 (C5), 32.0- 29.4 (C5-C16), 28.5 (CH<sub>3</sub> Boc), 26.9 (CH<sub>3</sub> TBDPS), 22.8 (C17), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 20.9 (CH<sub>3</sub>), 19.3 (Cq), 14.2 (C18).

**(2S,3S,4R)-1-((tert-butylidiphenylsilyl)oxy)-2-hexacosanamidoctadecane-3,4-diyl diacetate 116**



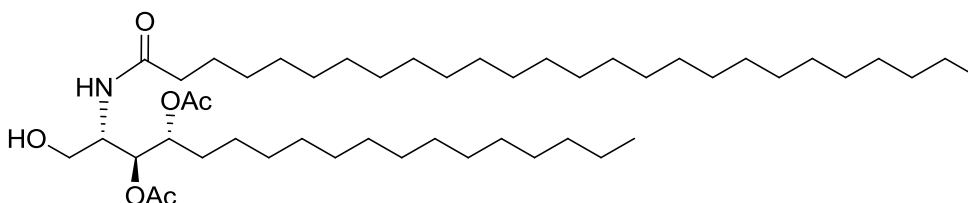
$C_{64}H_{111}NO_6Si$   
 $M = 1018.65 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
Colorless oil  
 $R_f = 0.75$  (PE/EtOAc, 9:1)

To a solution of **67b** (1.88 g, 2.55 mmol) in dry DCM (45 mL) was added trifluoroacetic acid (10 mL) at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for 2h. After coevaporation with toluene, the crude product was dissolved in dry DCM (90 mL). Cerotic acid (1.01 g, 2.55 mmol, 1 eq), PyBOP (1.59 g, 3.06 mmol, 1.2 eq) and Et<sub>3</sub>N (2.2 mL, 16.3 mmol, 6 eq) were added and the mixture was stirred at 25°C for 4h. After dilution with water (50 mL), the organic layer was separated, washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/DCM (5:5) gave **116** as a colorless oil (2.21 g, 85%).

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.60-7.57 (m, 4H, ArH), 7.46-7.35 (m, 6H, ArH), 5.93 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, NH), 5.35 (dd,  $J = 9.8, 2.6$  Hz, 1H, H-3), 4.90 (dt,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-4), 4.27-4.19 (m, 1H, H-2), 3.69-3.60 (m, 2H, H-1), 2.13 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H, H-2'), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60-1.56 (m, 4H, H-5 + H-3'), 1.27-1.23 (m, 68H, H-6 to H-17, H-4' to H-25'), 0.88 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H, H-18, H-26').

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 172.8 (C=O), 171.4 (C=O), 169.9 (C=O), 135.7-127.7 (Caro), 73.7 (Caro), 73.7 (C4), 71.7 (C3), 62.4 (C1), 49.3 (C2), 37.0 (C2'), 31.6-23.1 (C6-C17, C3'-C25'), 27.7 (Cq), 26.8 (tBu TBDPS), 25.6 (C5 + C2'), 21.2 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (C18, C26').

**(2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-hydroxyoctadecane-3,4-diyl diacetate 70**



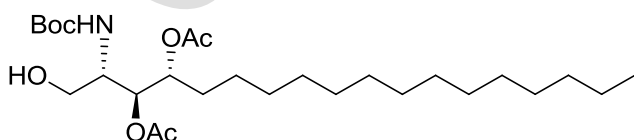
$C_{48}H_{93}NO_6$   
 $M = 1018.65 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid  
 $R_f = 0.3$  (PE/EtOAc, 6:4)

Compound **116** (2 g, 1.96 mmol) was dissolved in dry THF (35 mL). HF.pyridine (3.5 mL, 196 mmol, 100 eq) was added and the mixture was stirred at 25°C for 10h. After dilution with AcOEt (50 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL). The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (50 mL). Organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with PE/AcOEt (7:3) + 5% DCM gave **70** as a white solid (1.35 g, 88%).

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 6.22 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, NH), 5.05-5.01 (m, 1H, H-3), 4.99-4.94 (m, 1H, H-4), 4.20-4.13 (m, 1H, H-2), 3.60-3.55 (m, 2H, H-1), 2.52 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H, OH), 2.22 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2'), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.79-1.59 (m, 4H, H-5 and H-3'), 1.33-1.23 (m, 68H, H-6 to H-17, H-4' to H-25'), 0.88 (t,  $J = 6.84$  Hz, 6H, H-18, H-26').

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 173.3 (C=O), 171.8 (C=O), 171.06 (C=O), 73.3 (C3) 73.3 (C4), 61.8 (C1), 49.8 (C2), 37.0 (C2'), 32.1-22.8 (C6-C17, C4'-C25'), 28.12 (C5), 25.8 (C3'), 21.2 (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (C18, C26').

**(2S,3S,4R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1-hydroxyoctadecane-3,4-diyl diacetate 67a**



$C_{27}H_{51}NO_7$   
 $M = 501.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid  
 $R_f = 0.4$  (PE/EtOAc, 7:3)

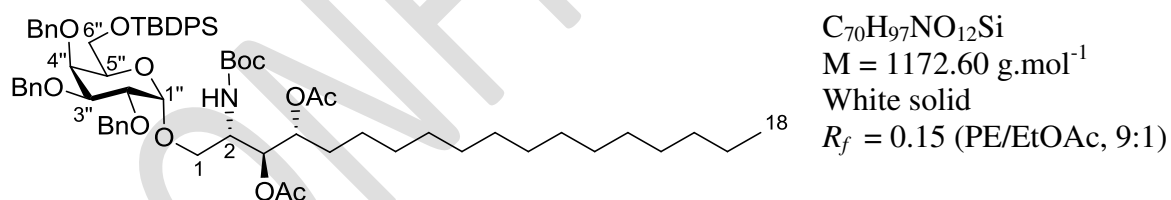
Compound **67b** (2.20 g, 3.35 mmol) was dissolved in dry pyridine (30 mL). Acetic anhydride (0.94 mL, 10 mmol, 3 eq) and DMAP (41 mg, 0.34 mmol, 0.1 eq) were added. The mixture was stirred overnight at 25°C. After dilution with AcOEt (40 mL) and saturated

aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (20 mL), the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (20 mL). Organic layers were washed with brine (2x30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. The oil was dissolved in dry THF (20 mL). HF.pyridine (6.1 mL, 335 mmol, 100 eq) was added and the mixture was stirred at overnight at 25°C. After dilution with AcOEt (100 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (200 mL). The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (50 mL). Organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with PE/AcOEt (7:3) gave **67a** (0.80 g, 48%).

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 5.23-5.13 (m, 1H, NH), 5.13-4.99 (m, 2H, H-3, H-4), 3.86-3.75 (m, 1H, H-2), 3.65-3.51 (m, 2H, H-1), 2.40-2.29 (m, 1H, OH), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.64-1.59 (m, 2H, H-5), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.32-1.20 (m, 22H, H-6 to H-17), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ :171.6 (C=O), 170.9 (C=O), 155.6 (C=O), 73.3 (C3), 73.0 (C4), 61.9 (C1), 51.9 (C2), 32.2 (CH<sub>2</sub>), 28.12 (C5), 25.8 (C3'), 21.4 (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (C18).

**(2S,3S,4R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1-O-(6-O-TBDPS-2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-heptadecan-3,4-di-O-acetyl 66**

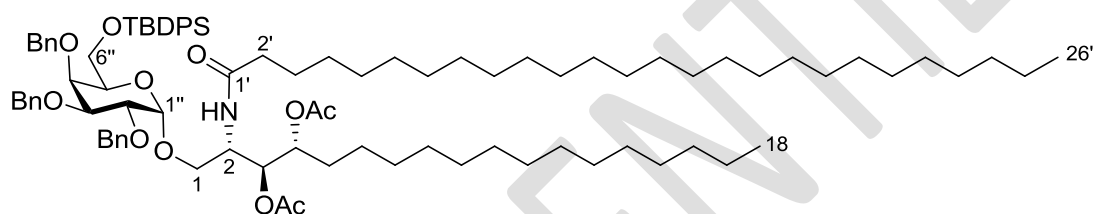


Compound **71** (565 mg, 0.82 mmol, 1.15 eq) and **67a** (355mg, 0.71 mmol, 1eq) were dried vacuum for 2h, then Et<sub>2</sub>O (20 mL) was added just before the coupling (Solution A). SnCl<sub>2</sub> (404 mg, 2.13 mmol, 3 eq) and AgClO<sub>4</sub> (441.5 mg, 2.13 mmol, 3 eq) were added in two-neck round bottom flask covered with aluminium. Molecular sieves 4Å (~2 g), THF (10 mL) were added and the mixture was stirred at 25°C for 90 minutes then at 0°C for 30 minutes (Solution B). Solution A was added to the solution B through cannula and the mixture was stirred at 0°C for 30 min. After filtration on celite, the filtrate was diluted with AcOEt (150 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (100 mL). The organic layer was separated and washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (2x100 mL), dried over

MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt (98:2 to 90:10) gave **66** (500mg, 60%),  $\alpha/\beta$  anomers (119mg, 14%) and  $\beta$  anomer (90 mg, 11%).

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.69-7.59 (m, 4H, ArH), 7.47-7.19 (m, 21H, ArH), 5.30-5.20 (m, 2H, H-1, H-3), 5.13-5.04 (m, 1H, H-4), 4.99-4.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.81-4.65 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61-4.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.06-3.87 (m, 3H), 3.82-3.64 (m, 3H), 3.59-3.39 (m, 2H), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.64-1.59 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 1.46 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu Boc), 1.35-1.19 (m, 22H, H-6 to H-17), 1.06 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS), 0.94-0.86 (m, 3H, H18).

**(2S,3S,4R)-1-O-(6-O-TBDPS-2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2-hexacosanoylaminoheptadecan-3,4-di-O-acetyl 114**



C<sub>91</sub>H<sub>139</sub>NO<sub>11</sub>Si  
M = 1451.16 g.mol<sup>-1</sup>  
Colorless oil  
R<sub>f</sub> = 0.18 (PE/EtOAc, 9:1)

**Protocol 1 :**

To a solution of compound **66** (435 mg, 0.37mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) was added trifluoroacetic acid (5 mL) at 0°C. The mixture was added at 0°C for 2h. After coevaporation with toluene, the crude product was dissolved in dry DCM (20 mL). Cerotic acid (147mg, 0.37 mmol, 1 eq), PyBOP (231 mg, 0.44 mmol, 1.2 eq) and Et<sub>3</sub>N (0.4 mL, 3 mmol, 8 eq) were added and the mixture was stirred at RT for 4h. After dilution with water (30 mL) and DCM (20mL), the organic layer was separated, washed with brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt/DCM (9/0.5/0.5) gave **114** (403.5 mg, 76%).

**Protocol 2 :**

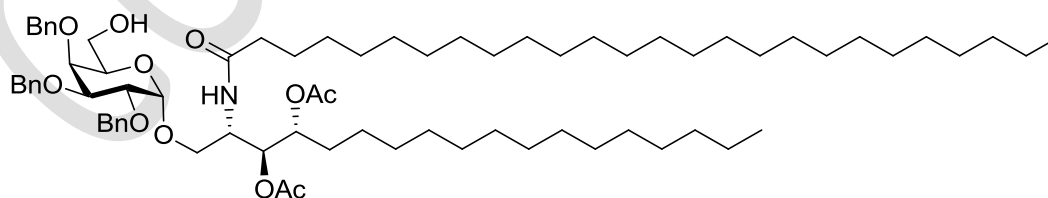
Compound **71** (1.2 g , 1.7 mmol, 1.2 eq) and **70** (1.1g, 1.41 mmol, 1eq) were dried vacuum for 2h, then Et<sub>2</sub>O (35 mL) and THF (15 mL) were added just before the coupling (Solution A). SnCl<sub>2</sub> (899 mg, 4.74 mmol, 3 eq) and AgClO<sub>4</sub> (983 mg, 4.74 mmol, 3 eq) were

added in two-neck round bottom flask covered with aluminium. Molecular sieves 4Å (~4 g), THF (40 mL) were added and the mixture was stirred at RT for 90 minutes then at 0°C for 30 minutes (Solution B). Solution A was added to the solution B through cannula and the mixture was stirred at 0°C for 30 min. After filtration on celite, the filtrate was diluted with AcOEt (200 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (150 mL). The organic layer was separated and washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (2×100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt/DCM (9/0.5/0.5) gave **114** (1.71 g, 84%).

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.67-7.63 (m, 5H, ArH), 7.49-7.27 (m, 20H, ArH), 6.77 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.34 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-3), 5.00 and 4.61 (Syst. AB, *J* = 11.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.00 and 4.99 (m, 1H, H-4), 4.91 and 4.74 (Syst. AB, *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.86-4.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.84 (m, 1H, H-1''), 4.43-4.32 (m, 1H, H-2), 4.08 (dd, *J* = 3.5 Hz, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-2''), 4.04 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-4''), 3.93 (dd, *J* = 2.7 Hz, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-3''), 3.80-3.68 (m, 3H, H-5'', H-6''), 3.59-3.43 (m, 2H, H-1), 2.16 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75-1.61 (m, 2H, H-5), 1.31 (m, 68H, H-6 to H-17, H-3' to H-25'), 1.09 (m, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS), 0.96-0.90 (m, 6H, H-26', H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 172.9 (C=O), 171.1 (C=O), 170.3 (C=O), 139.0-127.4 (Caro), 98.2 (C1''), 78.7 (C3''), 76.8 (C2''), 75.1 (C4''), 75.0 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.6 (C4), 73.3 (2CH<sub>2</sub>Ph), 71.5 (C3), 71.4 (C5''), 66.2 (C1), 62.4 (C6''), 48.0 (C2), 36.8 (C2'), 32.2-22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.7-25.7 (C5), 27.0 (Cq TBDPS) 21.1 (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>).

**(2S,3S,4R)-1-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-α-D-galactopyranosyl)-2-hexacosanoylaminoheptadecan-3,4-di-O-acetyl 65**



C<sub>75</sub>H<sub>121</sub>NO<sub>11</sub>  
M = 1212.76 g.mol<sup>-1</sup>  
White solid  
*R<sub>f</sub>* = 0.18 (PE/EtOAc, 9:1)

To a solution of compound **114** (1.03 g, 0.71mmol, 1eq) in dry THF (15mL) was added HF.pyridine (1.3 mL, 71 mmol, 100 eq). The mixture was stirred at RT for 10h. After

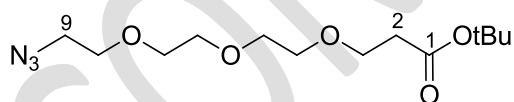


dilution with AcOEt (50 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL). The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (50 mL). Organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt (7:3) + 5% DCM gave **75** (804 mg, 93%) as a white solid.

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.65 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, NH), 7.42-7.27 (m, 15H, ArH), 5.36 (dd, *J* = 10.9 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-3), 4.92 and 4.72 (Syst. AB, *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.84 (d, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.80 (d, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.65 (d, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61 (d, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.73-4.71 (m, 1H, H-4), 4.68-4.66 (m, 1H, H-1''), 4.28-4.18 (m, 2H, H-1, H-2), 4.05 (dd, *J* = 10.2 Hz, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-2''), 3.96-3.89 (m, 1H, H-4''), 3.84 (dd, *J* = 10.2 Hz, *J* = 2.67 Hz, 1H, H-3''), 3.80-3.72 (m, 2H, H-5'', H-6''), 3.62-3.54 (m, 1H, H-6''), 3.42-3.34 (m, 1H, OH), 2.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-2'), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.71- 1.52 (m, 2H, H-5), 1.36-1.17 (m, 68H, H-6 to H-17, H-3'-H-25'), 0.92-0.85 (m, 6H, H-26', H-15).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 173.5 (C=O), 172.6 (C=O), 170.2 (C=O), 138.9-138.1 (Caro), 128.9-127.5 (Caro), 102.2 (C1''), 79.2 (C3''), 74.6 (C4''), 74.5 (CH<sub>2</sub>Ph), 74.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.9 (C1), 73.6 (CH<sub>2</sub>Ph, C4), 73.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 69.5 (C3), 62.9 (C6''), 48.4 (C2), 36.6 (C2'), 32.2-29.3 (C6-C17 + C3'-C25'), 25.8 (C5), 22.8 (C6-C17, C3'-C25'), 21.4 (CH<sub>3</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (C15, C26').

**tert-butyl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate 130**



C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
 M = 303.35 g.mol<sup>-1</sup>  
 Colorless liquid

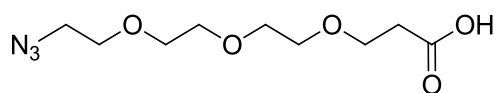
To a solution of *tert*-butyl 3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate **129** (2.0 g, 7.2 mmol, 1 eq) in DCM (12mL) was added Et<sub>3</sub>N (1.9 mL 14.4 mmol, 2 eq). The mixture was cooled at 0°C and MeSO<sub>2</sub>Cl (0.83 mL, 10.8 mmol, 1.5 eq) was added dropwise then the mixture was allowed to RT and stirred overnight. The mixture was concentrated, diluted with water (70 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3x50 mL). Organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford a crude product as a yellow oil. The oil was dissolved in DMF (20mL), NaN<sub>3</sub> (0.702 g, 10.8 mmol, 1.5 eq) was added. The mixture was heated at 55°C for 3 hours and concentrated. Water was added (50 mL), the

aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (3x30 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt (1:3) gave **130** (1.78 g, 81%) as a yellow oil.

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.71 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-3), 3.68-3.59 (m, 10H, H-4 to H-8), 3.39 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-9), 2.50 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-2), 1.44 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 171.1 (C=O), (C<sub>q</sub>), 70.9-70.1 (C4 to C8), 67.0 (C3), 50.8 (C9), 36.4 (C2).

**3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoic acid 124**



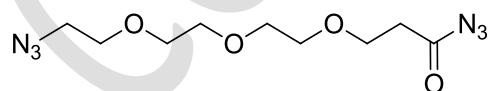
C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>  
M = 247.25 g.mol<sup>-1</sup>  
Colorless liquid

A solution of **130** (1.78 g, 5.865 mmol) in HCl 4M in dioxane (10 mL) was stirred at RT overnight. The mixture was concentrated to afford the crude product **124** (1.06 g, 4.3 mmol, 73%) as a yellow oil.

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.77 (t, *J* = 6.23 Hz, 2H, H-3), 3.71-3.65 (m, 10H, H-4 to H-8), 3.19 (t, *J* = 5.06 Hz, 2H, H-9), 2.65 (t, *J* = 6.24 Hz, 2H, H-2).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 175.5 (C=O), 70.9-70.1 (C4 to C8), 66.4 (C3), 50.8 (C9), 34.9 (C2).

**3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoyl azide 133**



C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>  
M = 272.26 g.mol<sup>-1</sup>  
Colorless liquid

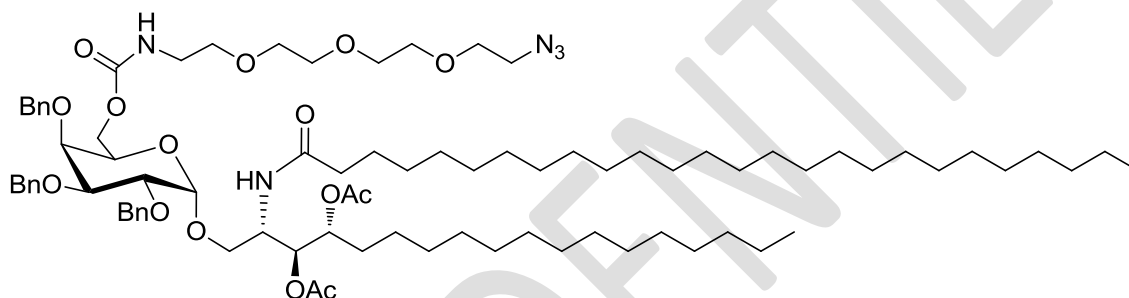
Compound **124** (1.0 g, 4 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (25 mL) and Et<sub>3</sub>N (1.08 mL, 8 mmol, 2 eq) was added. The mixture is cooled to 0°C and ethyl chloroformate (0.58 mL, 10 mmol, 2.5 eq) was added. The mixture was stirred and allowed to RT for 30 minutes. The mixture was cooled to 0°C and NaN<sub>3</sub> (0.65 g, 6 mmol, 1.5 eq) was added. The mixture was then allowed to RT and stirred for 1 hour. The mixture was then diluted with AcOEt (25

mL) and brine (25 mL). The organic layer was washed with brine (25 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the compound **133** (0.97 g, 89%) as a yellow oil.

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.76 (t, *J* = 6.27 Hz, 2H, H-3), 3.71-3.59 (m, 10H, H-4 to H-8), 3.43-3.37 (m, 2H, H-9), 2.62 (t, *J* = 4.14 Hz, 2H, H-2).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 171.7 (C=O), 70.9-70.1 (C4 to C8), 66.3 (C3), 50,8 (C9), 37.6 (C2).

**(2S,3S,4R)-1-O-(6-(((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate)-2,3,4-tri-O-benzyl-α-D-galactopyranosyl)-2-hexacosanoylaminoheptadecan-3,4-di-O-acetyl 131**



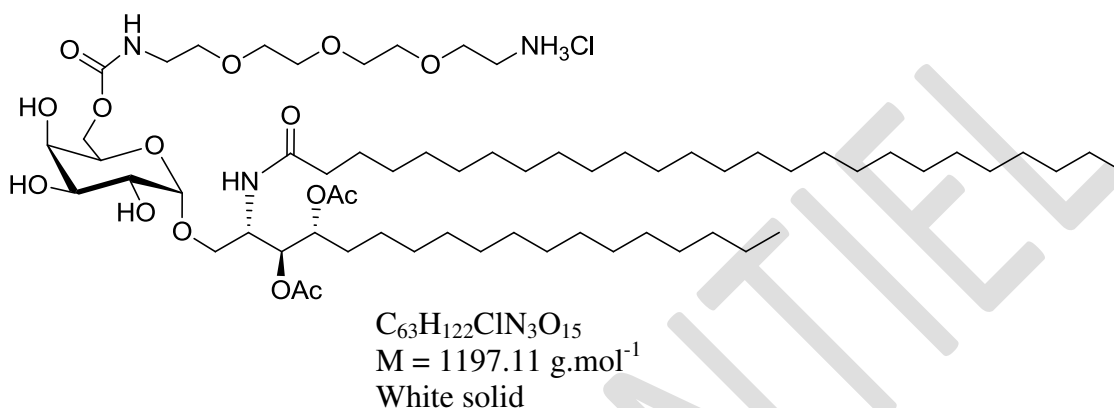
C<sub>84</sub>H<sub>137</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub>  
M = 1457.01 g·mol<sup>-1</sup>  
White solid

Compound **133** (530 mg, 1.84 mmol, 4 eq) was dissolved in toluene (4 mL). The mixture is warmed to 100°C for 20 minutes (N<sub>2</sub> gassing). At 20°C, compound **65** (562 mg, 0.46 mmol, 1 eq) was dissolved in toluene (4 mL) and added to the solution. DABCO (224 mg, 1.84 mmol, 4 eq) was added and the mixture was stirred to 130°C for 30 minutes. The mixture was cooled to 20°C and concentrated to afford the crude product. Purification on silica gel with petroleum ether/AcOEt (7/3) + 10% DCM gave **131** (607 mg, 86%).

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.41 - 7.24 (m, 15 H, ArH), 6.66 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H), 5.75 - 5.66 (m, 1 H), 5.18 (dd, *J* = 2.1, 9.3 Hz, 1 H), 4.96 - 4.89 (m, 2 H), 4.82 (d, *J* = 11.7 Hz, 1 H), 4.78 - 4.66 (m, 4 H), 4.61 (d, *J* = 11.4 Hz, 1 H), 4.33 - 4.24 (m, 2 H), 4.04 (dd, *J* = 3.6, 9.7 Hz, 1 H), 3.99 - 3.93 (m, 1 H), 3.90 (dd, *J* = 3.6, 11.1 Hz, 1 H), 3.87 - 3.79 (m, 3 H), 3.68 - 3.59 (m, 10 H), 3.57 - 3.51 (m, 3 H), 3.40 - 3.29 (m, 4 H), 2.12 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 2.04 (s, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.72 - 1.52 (m, 4 H), 1.33 - 1.17 (m, 68 H), 0.91 - 0.85 (m, 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 173.2, 171.2, 170.2, 156.5, 138.8, 138.5, 138.3, 128.5, 128.5, 100.2, 78.7, 76.7, 75.1, 74.7, 73.6, 73.4, 71.9, 70.9, 70.8, 70.8, 70.4, 70.2, 70.1, 69.9, 64.9, 50.8, 48.4, 41.0, 36.7, 32.1, 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.5, 27.9, 25.8, 25.8, 22.8, 21.1, 21.1, 14.2.

**(2S,3S,4R)-1-O-(6-(((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethylcarbamate)-α-D-galactopyranosyl)-2-hexacosanoylaminoheptadecan-3,4-di-O-acetyl 134**



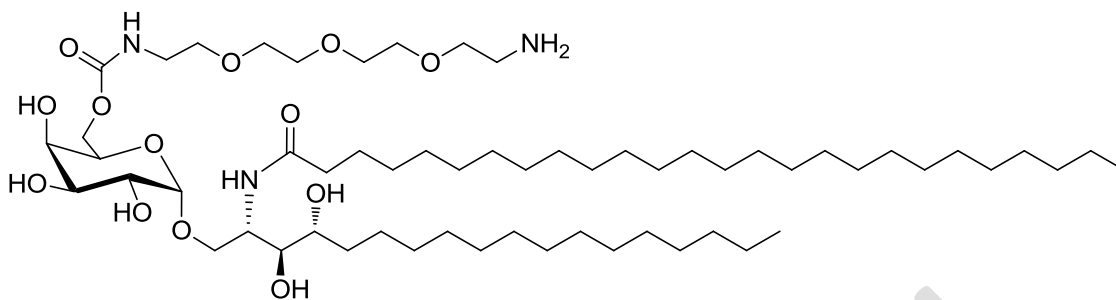
Compound **131** (540 mg, 0.37 mmol, 1 eq) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) and MeOH (2 mL). Pd/C (40 mg) and HCl/dioxane (4M) (0.37 mL) were added and the mixture was stirred to RT for 4h under H<sub>2</sub> (1 atm) and then filtered through Celite. The cake was washed with a warm solution of MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) (20 mL) and the filtrate was concentrated. Purification on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1 to 8:2) gave **134** (415 mg, 94%).

**HRMS (ESI+)**: m/z calcd. for C<sub>63</sub>H<sub>122</sub>O<sub>15</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1160.8876, found 1160.8881.

**RMN <sup>1</sup>H** : (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 6.75-6.67 (m, 1H, NH), 6.06-5.97 (m, 1H, NH), 5.30-5.22 (m, 1H, H-3), 4.96-4.89 (m, 1H, H-4), 4.77-4.71 (m, 1H, H-1''), 4.39-4.30 (m, 1H, H-3), 4.29-4.12 (m, 2H), 3.98-3.90 (m, 2H), 3.83-3.69 (m, 3H), 3.68-3.47 (m, 14H), 3.40-3.25 (m, 7H), 2.94-2.86 (m, 2H), 2.26-2.19 (m, 2H, H-2'), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68-1.54 (m, 4H, H-5, H-3'), 1.34-1.16 (m, 68H), 0.89-0.84 (m, 6H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** : (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 173.3 (C=O), 173.3 (C=O), 170.9 (C=O), 156.6 (C=O), 99.9 (C-1''), 73.4 (C-4), 72.2, 71.7 (C-3), 70.5, 70.2, 70.1, 70.0, 69.5, 68.7, 68.4, 68.0, 62.9, 48.0 (C-2), 41.3, 40.9, 36.6, 32.0, 29.8, 29.6, 29.4, 27.8, 25.8, 25.7, 22.8, 21.1, 21.0, 14.2

**(2S,3S,4R)-1-O-(6-(((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethylcarbamate)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2-hexacosanoylaminoheptadecan-3,4-diol **63****



$C_{59}H_{117}N_3O_{13}$   
 $M = 1075.86 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid

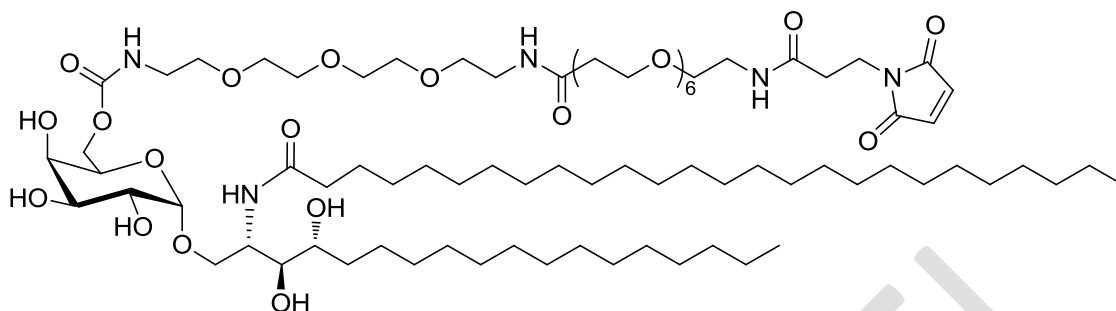
To a solution of compound **134** (315 mg, 0.27 mmol, 1 eq) in MeOH (13mL) was added MeONa 1M (0.27 mL, 1 eq). After stirring for 3h, the reaction mixture was neutralized with Amberlyte IR120 hydrogen form, then filtered and concentrated with Et<sub>3</sub>N (1 mL). Purification on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1 to 8:2) gave **63** (280 mg, 99%).

**HRMS (ESI+):** m/z calcd. for C<sub>59</sub>H<sub>118</sub>O<sub>13</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1076.8659, found 1076.8678.

**RMN <sup>1</sup>H :** (400MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta$  : 8.82 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, NH), 8.11-8.02 (m, 1H, NH), 5.50-5.42 (m, 1H, H-1''), 5.25-5.16 (m, 1H, H-2), 4.86-4.75 (m, 1H), 4.73-4.42 (m, 4H, H-2, H-2''), 4.38-4.18 (m, 4H), 3.93-3.86 (m, 1H), 3.65-3.38 (m, 28H), 2.52-2.40 (m, 2H, H-2'), 2.27-2.13 (m, 1H), 1.90-1.52 (m, 4H), 1.36-1.09 (m, 62H), 0.90-0.88 (m, 6H).

**RMN <sup>13</sup>C :** (100MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta$  : 173.1 (C=O), 157.3 (C=O), 100.6 (C-1''), 76.1, 72.1, 70.9, 70.2, 70.1, 70.1, 70.0, 69.7, 67.8, 67.3, 64.9, 51.1, 49.2, 40.9, 39.4, 36.4, 33.9, 31.7, 30.0, 29.8, 29.6, 29.4, 29.2, 26.2, 26.0, 22.5, 13.9

**(2S,3S,4R)-1-O-(6-(37-maleimido-13,34-dioxo-3,6,9,16,19,22,25,28,31-nonaoxa-12,33-diazapentatriacontanosyl)carbamate)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2-hexacosanoylaminoheptadecan-3,4-diol 135**



$C_{81}H_{151}N_5O_{23}$   
 $M = 1563.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid

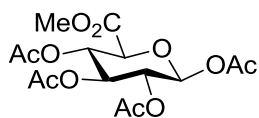
To a solution of compound **263** (34 mg, 0.031 mmol, 1 eq) in MeOH (2 mL) was added SM(PEG)<sub>6</sub> (49 mg, 0.031 mmol, 1 eq). After stirring for 2h, the reaction mixture was concentrated. Purification on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) gave **135** (28 mg, 57%).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$  calcd. for  $C_{81}H_{153}N_5O_{23} [M + 2H]^{2+}$  1564.0956, found 1564.0948.

**RMN <sup>1</sup>H :** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 7.05 - 6.96 (m, 1 H), 6.89 - 6.80 (m, 1 H), 6.70 (s, 1 H), 6.10 - 6.02 (m, 1 H), 4.92 (d,  $J = 2.8 \text{ Hz}$ , 1 H), 4.29 - 4.15 (m, 3 H), 3.98 (t,  $J = 6.4 \text{ Hz}$ , 1 H), 3.96 - 3.89 (m, 2 H), 3.88 - 3.76 (m, 5 H), 3.74 (t,  $J = 6.1 \text{ Hz}$ , 2 H), 3.69 - 3.59 (m, 30 H), 3.58 - 3.50 (m, 6 H), 3.42 (qd,  $J = 5.4, 11.2 \text{ Hz}$ , 4 H), 3.37 - 3.30 (m, 2 H), 2.55 - 2.45 (m, 4 H), 2.23 - 2.17 (m, 2 H), 1.65 - 1.56 (m, 3 H), 1.55 - 1.48 (m, 1 H), 1.47 - 1.43 (m, 2 H), 1.33 - 1.20 (m, 66 H), 0.90 - 0.85 (m, 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C :** (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 173.7, 171.9, 170.7, 170.3, 156.9, 134.4, 99.8, 75.2, 72.8, 70.6, 70.6, 70.5, 70.4, 70.3, 70.2, 70.1, 69.9, 69.3, 69.2, 69.2, 69.0, 69.0, 67.4, 63.8, 50.4, 41.0, 39.4, 39.4, 36.9, 36.9, 34.7, 34.6, 32.5, 32.1, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 28.6, 26.2, 26.0, 22.8, 14.2.

### Methyl 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronate 145

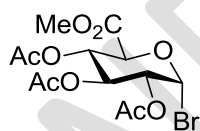


$C_{15}H_{20}O_{11}$   
 $M = 376.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid  
 $R_f = 0.70$  (PE/EtOAc, 7:3)

Glucuronolactone (8.8 g, 0.05 mol) was added to 50 mL of methanol which contained 75 mg of sodium methoxide. The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes until dissolution of starting material. After another 30 minutes, the methanol was removed under reduced pressure. The crude was dissolved in 50 mL of acetic anhydride and 0.15 mL of perchloric acid was added slowly at 0°C. After the reaction mixture had stood overnight at room temperature and 0.1 mL of perchloric acid was added and the solution stored in the refrigerator. The solid was filtered followed by recrystallisation in ethanol to afford the white solid **145** (15.4 g, 40.9 mmol, 82%).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 5.77 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1 H, H-1), 5.36-5.07 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.19 (dd,  $J = 9.3$ , 1H, H-5), 3.76 (s, 3 H), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### Methyl 1-bromo-2,3,4-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucuronate 146

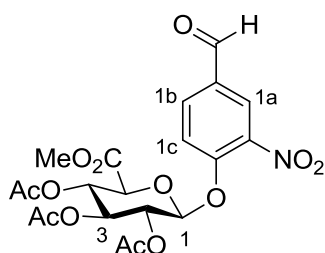


$C_{13}H_{17}BrO_9$   
 $M = 397.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
Pale yellow solid  
 $R_f = 0.70$  (PE/EtOAc, 7:3)

Compound **145** (5.07 g, 13.47 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (4.5 mL) and  $\text{Ac}_2\text{O}$  (1.53 mL, 16.2 mmol, 1.2 eq.) was added at r.t. then, at 0°C, HBr 33% (27 mL, 155 mmol, 11.5 eq.) was added and the mixture was stirred at 0°C for 10 min then at r.t. for 15 h. The mixture was then poured in iced water (300 mL) and extracted three times with chloroform. The combined organic layers were washed with cold satd.  $\text{NaHCO}_3$  solution, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated to afford the crude product. Filtration through silica plug (eluent: EP/EtOAc 1:1) afforded compound **146** as a pale yellow solid with quantitative yield (5.35 g).

$^1\text{H NMR}$  : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 6.63 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, H-1), 5.60 (t,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H-3), 5.23 (dd,  $J = 9.8, 10.3$  Hz, 1H, H-4), 4.84 (dd,  $J = 9.8, 4.1$  Hz, 1H, H-2), 4.57 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H, H-5), 3.75 (s, 3 H), 2.09 (s, 3 H), 2.05 (s, 3 H), 2.04 (s, 3 H).

#### 4-formyl-2-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosiduronic acid methyl ester 2,3,4-triacetate **147**

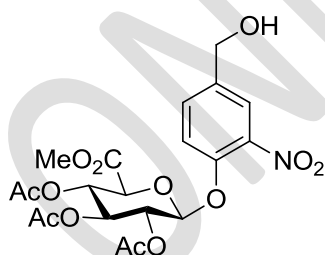


$C_{20}H_{21}NO_{13}$   
 $M = 483.38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid  
 $R_f = 0.30$  (PE/EtOAc, 5:5)

To a solution of compound **146** (4.70 g, 11.8 mmol) in anhydrous acetonitrile (100 mL), were added silver oxide (8.2 g, 35.4 mmol) and 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde **143** (2.57 g, 15.4 mmol) successively. After stirring for 4 h at room temperature and filtration through a pad of celite, the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the crude product. Purification on silica gel with with PE/EtOAc (6:4 to 5:5) gave **147** (4.22 g, 8.7 mmol, 74%).

$^1\text{H NMR}$  : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 10.05 (s, 1H, CHO), 8.30 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-1a), 8.10 (dd,  $J = 9.0, 2.0$  Hz, 1H, H-1b), 7.50 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-1c), 5.40-5.36 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-4), 4.37 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 3.72 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

#### 4-hydroxymethyl-2-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosiduronic acid methyl ester 2,3,4-triacetate **141**



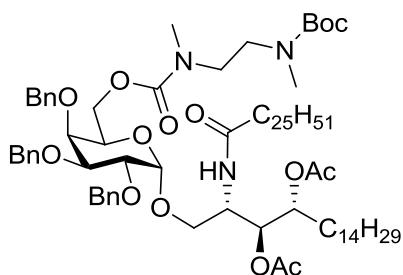
$C_{20}H_{23}NO_{13}$   
 $M = 485.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid  
 $R_f = 0.20$  (PE/EtOAc, 5:5)

Compound **147** (1.65 g, 3.4 mmol) was dissolved in a mixture of chloroform (14 mL) and isopropanol (10 mL). After addition of 2 g of silica gel and cooling to  $0^\circ\text{C}$ , sodium borohydride (435 mg, 6.8 mmol) was added and the resulting suspension was stirred at  $0^\circ\text{C}$  for 2 h. The mixture reaction was diluted with an aqueous HCl 1N solution (20 mL) and extracted with dichloromethane (3 $\times$ 20 mL). Organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduced pressure to afford the crude product. Purification on silica gel with with PE/EtOAc (35:65) gave **141** (1.37 g, 2.8 mmol, 83%).



**<sup>1</sup>H NMR** : (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 8.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-1a), 7.81 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H, H-1b), 7.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-1c), 5.38-5.25 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-4), 4.71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-5), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.95 (br s, 1H, OH), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### **GalCer-diamine-Boc 140**



C<sub>85</sub>H<sub>139</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>

*M* = 1427.02 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

*R<sub>f</sub>* = 0.18 (PE/EtOAc, 9:1)

GalCer-6''-OH **65** (200 mg, 0.17 mmol) was dissolved in dry toluene (4 mL). 4-nitrophenyl chloroformate (67 mg, 0.33 mmol), dimethylaminopyridine (10 mg, 0.08 mmol) and triethylamine (40 μL, 0.33 mmol) were successively added. The reaction mixture was warmed under reflux for 5 h, then cooled at room temperature. Diamine 148 (111 mg, 0.495 mmol) was dissolved in toluene (2 mL) and added to a cooled mixture reaction. The resulting solution was stirred at room temperature for 90 minutes, then diluted with a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (10 mL). Aqueous layer was extracted with EtOAc (10 mL) and organic layer was washed with water (10 mL), brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to afford the crude product. Purification on silica gel with with PE/EtOAc (7:3) + 5% DCM gave **140** (228 mg, 0.15 mmol, 94%).

**<sup>1</sup>H NMR** : (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.42-7.23 (m, 15H, ArH), 6.67-6.57 (m, 1H, NH), 5.28-5.21 (m, 1H, H-3), 5.01-4.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph, H-4), 4.88-4.68 (m, 6H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.65-4.56 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.37-4.27 (m, 1H, H-2), 4.20-3.98 (m, 3H), 3.98-3.80 (m, 3H), 3.67-3.54 (m, 2H, H-1), 3.40-3.21 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 2.94-2.78 (m, 6H, NCH<sub>3</sub>), 2.17-2.10 (m, 2H, H-2'), 2.05-2.01 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.70-1.56 (m, 4H, H-5, H-3'), 1.44 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu, Boc), 1.32-1.18 (m, 68H), 0.91-0.84 (m, 6H, H-18, H-26').

**<sup>13</sup>C NMR** : (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 173.1, 170.9, 170.2, 138.8, 138.4, 128.5, 128.4, 128.2, 127.8, 127.8, 127.7, 98.8, 78.7, 74.7, 73.4, 73.3, 71.7, 69.4, 53.5, 48.2, 36.7, 32.0, 29.8, 29.6, 29.5, 28.5, 27.9, 25.8, 25.7, 22.8, 21.1, 21.0, 14.2

# PARTIE B

Cette partie, réalisée à l'IMMM au Mans, sera consacrée à la préparation de nouveaux analogues plus stables et plus sélectifs de la voie Th1, à savoir des analogues *C*-glycosidiques du 4-désoxy-KRN7000.<sup>48</sup> Ces composés seront préparés selon une nouvelle voie de synthèse mettant en œuvre une cycloaddition [3+2] entre une nitroène et un *C*-vinyl-galactoside comme étape clé (Schéma 116).

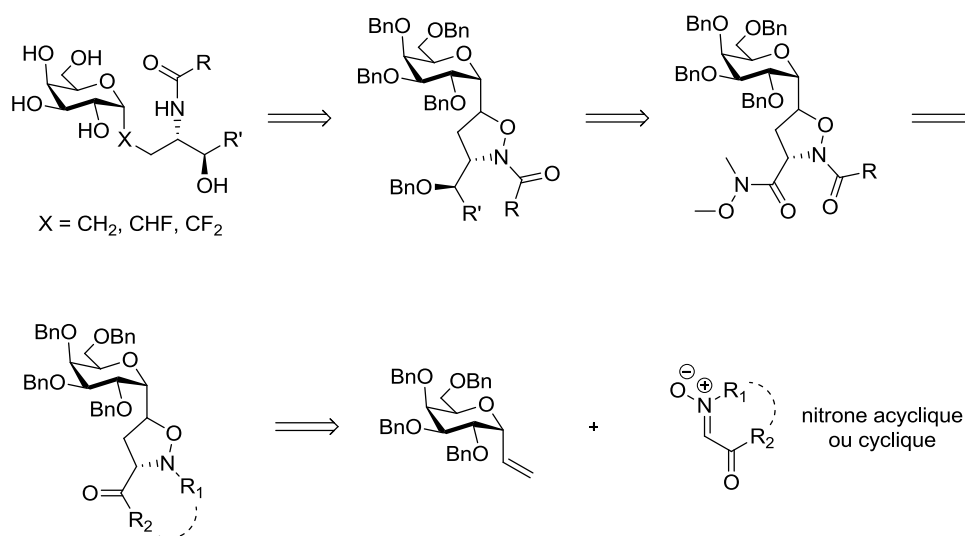


Schéma 116 - Stratégie de synthèse envisagée pour la synthèse d' $\alpha$ -*C*-galactosylcéramides

La partie B sera divisée en trois chapitres. Le premier chapitre sera consacré à la synthèse des  $\alpha$ -*C*-galactosylcéramides décrite dans la littérature. Le second chapitre abordera dans un premier temps, la synthèse de *C*-vinyl-glycosides décrite dans la littérature puis notre optimisation de synthèse de ces composés. La suite de ce chapitre décrira les généralités de la cycloaddition 1,3-dipolaire entre une nitroène et une oléfine, les exemples de cycloaddition [3+2] avec des dérivés de sucres déjà rapportés et enfin, nous présenterons l'étude méthodologique effectuée sur cette réaction clé de notre stratégie. Le troisième chapitre discutera de la fonctionnalisation du cycle isoxazolidine, formé au cours de la cycloaddition [3+2], pour introduire les différentes chaînes lipidiques, ainsi que de l'étude de son ouverture permettant d'accéder aux analogues d' $\alpha$ -*C*-galactosylcéramides.

Les parties A et B étant indépendantes, une nouvelle numérotation est mise en place pour faciliter l'écriture de ce mémoire.

# Chapitre I

Comme évoqué précédemment, ce chapitre décrira les synthèses d' $\alpha$ -C-galactosylcéramides décrites dans la littérature. Ces composés ont suscité un grand intérêt car ils induisent une forte sélectivité Th1, responsable de l'activité antitumorale.

## I - Synthèses décrites dans la littérature

### I-1. Première voie de synthèse

La synthèse de l' $\alpha$ -C-GalCer **1** a été rapportée pour la première fois dans un brevet par l'entreprise Kotobuki Pharmaceutical en 2002.<sup>104</sup> L'étape clé de cette synthèse est une réaction de Wittig entre l'ylure de phosphonium **2** et l'aldéhyde **3**, dérivé de la phytosphingosine, (Schéma 117) pour former l'alcène **4**, avec un rendement global inférieur à 1% après 18 étapes. En 2005, l'équipe d'Annoura<sup>105</sup> a tenté de reproduire la méthode décrite dans le brevet mais les auteurs ne sont pas parvenus à isoler le produit attendu dû à un mélange de sous-produits non séparable en fin de synthèse. Les conditions de Wittig provoquent notamment l'épimérisation du carbone en  $\alpha$  de l'aldéhyde **3** (Schéma 117).

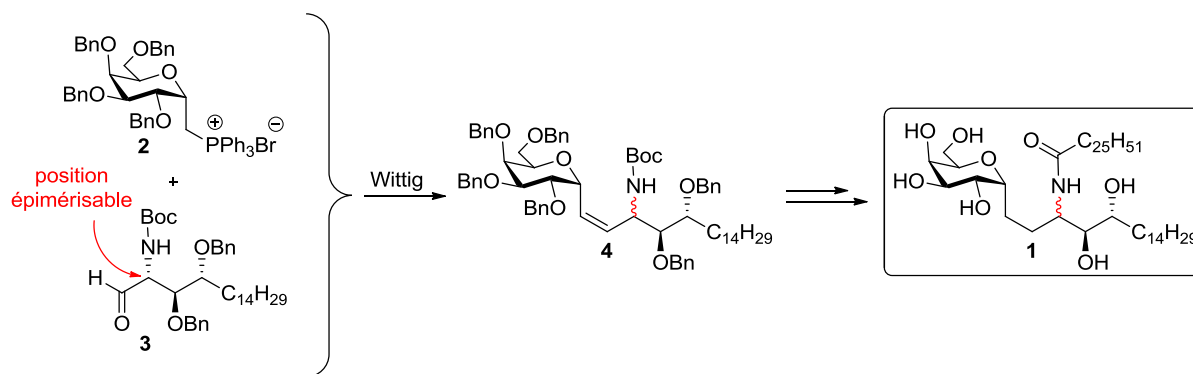


Schéma 117 - Première approche de synthèse de l' $\alpha$ -C-Galcer

### I-2. Synthèse décrite par Franck

En 2004, l'équipe de Franck a décrit une synthèse de l'analogue C-glycosidique du KRN7000.<sup>106</sup> Leur approche synthétique est basée sur deux étapes clés (Schéma 118). La première fait intervenir une réaction de Ramberg-Bäcklund<sup>107</sup> qui permet d'obtenir la liaison

<sup>104</sup> H. Tomiyama, T. Yanagisawa, M. Nimura, A. Noda, T. Tomiyama, U.S. Patent 6635622, **2003**.

<sup>105</sup> T. Toba, K. Murata, T. Yamamura, S. Miyake, H. Annoura, T, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 5043-5047.

<sup>106</sup> a) G. Yang, J. Schmieg, M. Tsuji, R. W. Franck, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3906-3910. b) G. Yang, J. Schmieg, M. Tsuji, R. W. Franck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3818-3822.

<sup>107</sup> R. J. K. Taylor, G. Casy, *Org. React.* **2003**, 62, 357-475.

C-glycosidique. La seconde étape clé met en jeu un transfert d'hydrure intramoléculaire ce qui contrôle la configuration de la position pseudo-anomérique. La sulfone **7** est préparée à partir du thiogalactoside **5** et de la L-homosérine **6** en 14 étapes avec un rendement global de 14% (Schéma 118). Une fois la réaction de Ramberg-Bäcklund réalisée menant à l'exoglycal **8**, ce dernier est fonctionnalisé en 5 étapes avec un rendement global de 37% pour accéder à l'acétal **9**, intermédiaire clé pour le transfert d'hydrure intramoléculaire. L' $\alpha$ -C-GalCer **1** est ensuite obtenu en 6 étapes avec un rendement global de 30%.

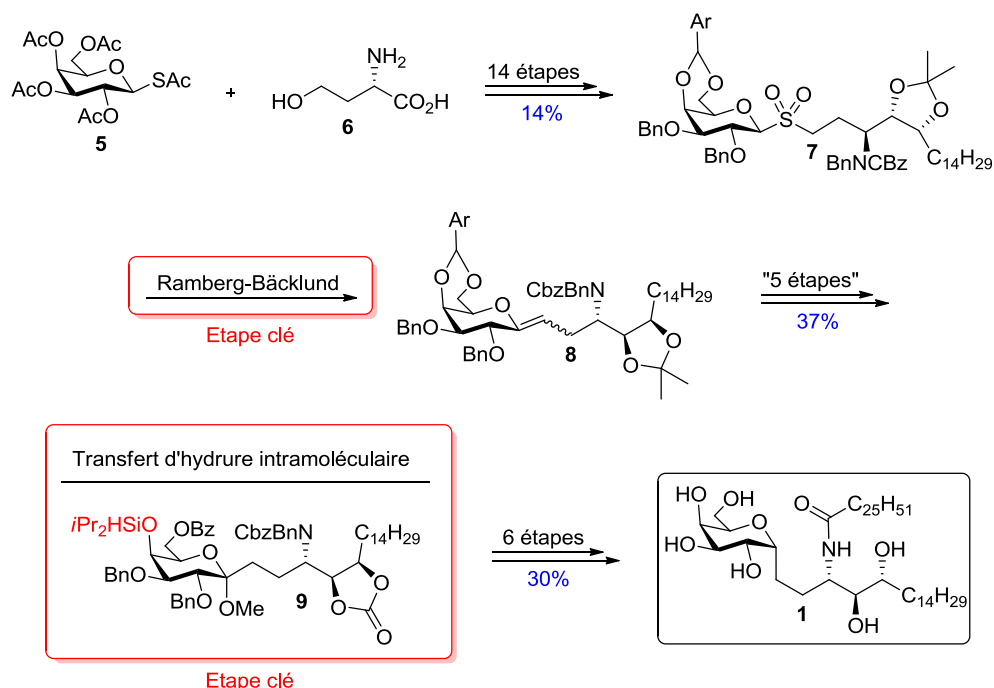


Schéma 118 – Approche de synthèse de l' $\alpha$ -C-GalCer développée par Franck

La première étape clé de cette synthèse est la réaction de Ramberg-Bäcklund qui permet la formation d'un alcène à partir d'une sulfone. Le mécanisme fait intervenir une  $\alpha$ -halogénosulfone **10** qui, en milieu basique, mène à la formation du dioxyde de thiirane **11**. Ce dernier se décompose en alcène **12** avec libération de dioxyde de soufre (Schéma 119).

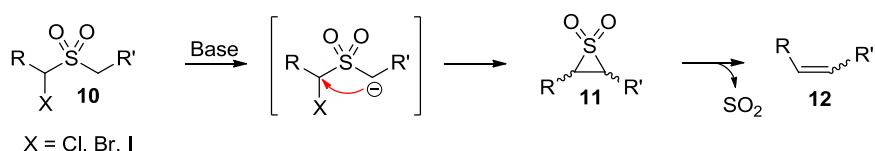


Schéma 119 - Mécanisme générale de la réaction de Ramberg-Bäcklund

Les auteurs ont appliqué cette réaction à la sulfone **7** en présence du réactif de bromation  $\text{C}_2\text{F}_4\text{Br}_2$  pour former la bromosulfone **13** *in situ*, en milieu basique (Schéma 120).

Ce dernier se réarrange pour former l'alcène **8** avec libération de dioxyde de soufre. A ce stade, le ratio *Z/E* de l'alcène **8** ne peut être déterminé par analyse RMN du proton mais la stéréochimie n'est pas importante pour la suite de la synthèse.

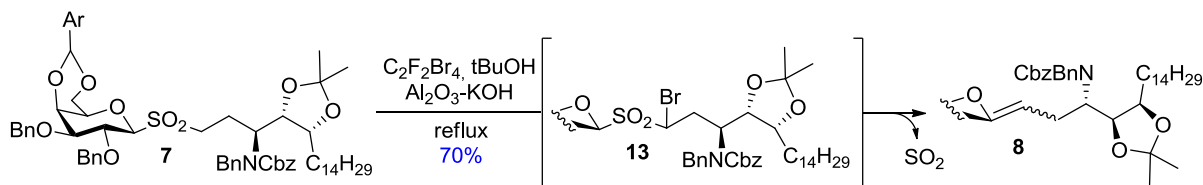


Schéma 120 - Synthèse de l'alcène **8**

Plusieurs aménagements fonctionnels sont nécessaires pour permettre la seconde étape clé. Le groupement acétonide est d'abord transformé en un carbonate cyclique, plus robuste vis-à-vis des conditions acides lors du transfert d'hydrure. Un groupement hydrosilane est ensuite installé sur la position 4'' du galactose afin de délivrer sélectivement l'hydrure sur la face  $\beta$  du sucre. Le transfert d'hydrure intramoléculaire est réalisé en présence de l'éthérate de trifluorure de bore pour générer le carbocation **14** et conduire au composé **15**. Après clivage de l'éther silylé **15**, l' $\alpha$ -C-glycoside **16** est obtenu avec un rendement de 76%, ainsi que le composé 1,4-anhydro **17** (Schéma 121) avec un rendement de 15%.

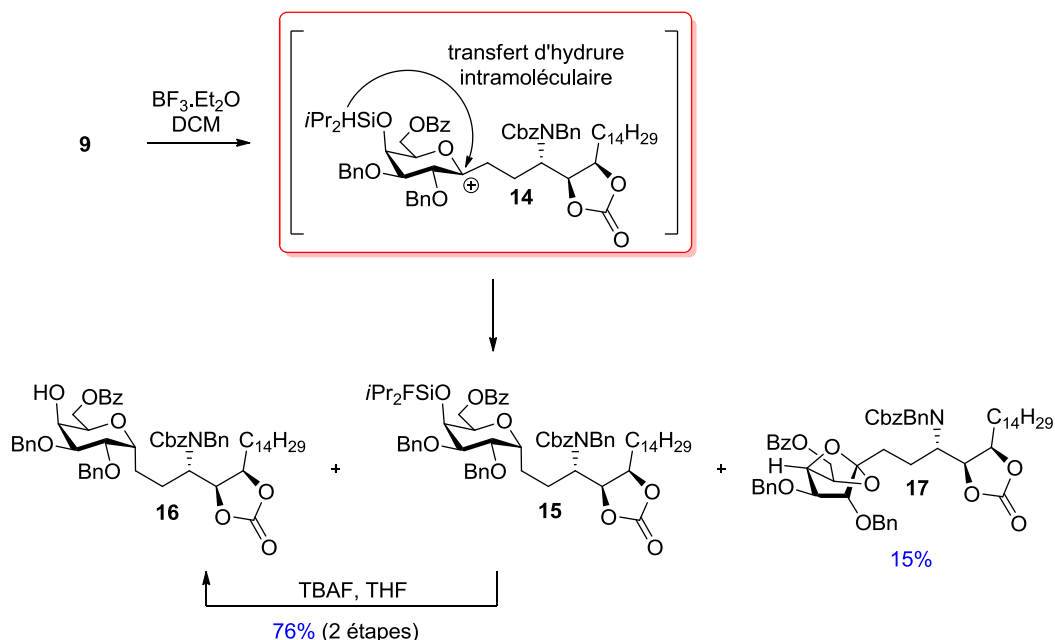


Schéma 121 - Formation de l' $\alpha$ -glycoside **16**

Enfin, la déprotection complète de l' $\alpha$ -C-glycoside **16** suivie de l'introduction de la chaîne acyle conduit à l' $\alpha$ -C-GalCer **1** en 6 étapes avec un rendement global de 30% (Schéma 118).

Le rendement global de cette voie de synthèse, qui comprend 26 étapes, est de 2% à partir de la L-homosérine ce qui limite le développement de nouveaux analogues pour étudier leurs activités biologiques. De plus, l'utilisation de C<sub>2</sub>F<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>, pour la réaction de Ramberg-Bäcklund, n'est plus disponible dans le commerce car cette molécule fait partie des substances appauvrissant la couche d'ozone (SAO) défini par le protocole de Montréal. Ces inconvénients ont amené à établir de nouvelles méthodologies pour la synthèse des  $\alpha$ -C-galactosylcéramides.

### I-3. Seconde approche décrite par Franck

Dans l'objectif de développer des méthodes de synthèse plus efficaces pour produire des analogues C-glycosidiques du KRN7000 à plus grande échelle, l'équipe de Franck a décrit une voie de synthèse innovante basée sur une réaction de métathèse.<sup>108</sup> Leur approche synthétique permet d'obtenir des analogues insaturés **20** et saturés **1** ( $\alpha$ -C-GalCer), à partir du C-(prop-1-ényl)-galactoside **18 $\alpha$**  et du dérivé de la phytosphingosine **19**. Le composé **18 $\alpha$**  est issu du 1,2,3,4,6-penta-O-acétyl-D-galactopyranoside en 2 étapes avec un rendement global de 87% tandis que le dérivé de la phytosphingosine **19** est préparé à partir de la phytosphingosine commerciale avec un rendement global de 60% (Schéma 122).

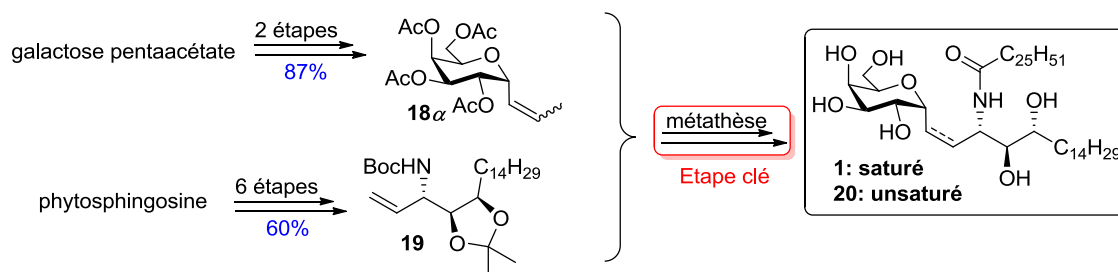


Schéma 122 - Synthèse envisagée par Franck

Le produit de métathèse **21** est ensuite obtenu avec un rendement 72% de configuration *E* seulement, en présence d'éthylène et du catalyseur de Grubbs II (Schéma 123). Selon les auteurs, l'utilisation d'éthylène facilite la formation du ruthénocyclobutane de l'oléfine sphingolipidique.

<sup>108</sup> G. Chen, J. Schmieg, M. Tsuji, R. W. Franck, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4077-4080.

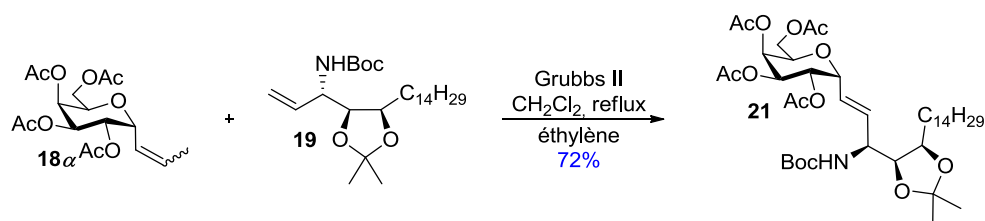


Schéma 123 - Méta-thèse entre les deux partenaires oléfiniques

L' $\alpha$ -C-GalCer **1** et son analogue insaturé **20** sont finalement obtenus respectivement en 4 et 3 étapes avec un rendement global de 70% et 76% (Schéma 124).

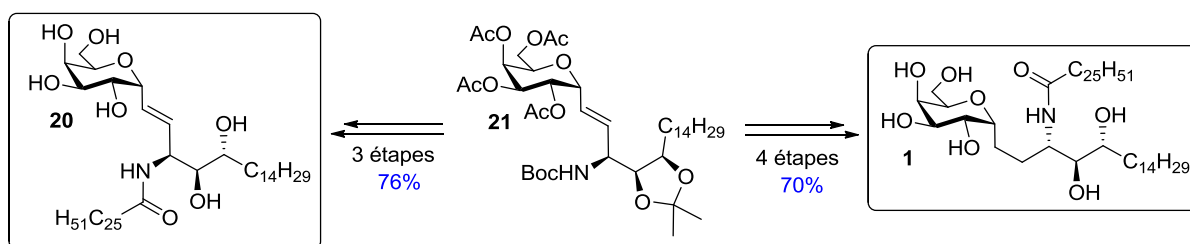


Schéma 124 - Synthèse de l' $\alpha$ -C-GalCer et de son analogue insaturé

Cette voie de synthèse convergente permet d'accéder à l' $\alpha$ -C-Galcer en 11 étapes avec un rendement global de 30% à partir de la phytoshingosine commerciale. De plus, cette méthode, basée sur une réaction de méta-thèse, donne accès à des analogues insaturés de l' $\alpha$ -C-GalCer.

#### I-4. Synthèse décrite par Annoura

En 2005, l'équipe d'Annoura<sup>105</sup> a décrit une nouvelle méthodologie pour la synthèse d'analogues d' $\alpha$ -C-galactosylcéramides dont l'analogue C-glycosidique de l'OCH **25**, caractérisé par une chaîne sphingosine de 10 carbones. Leur approche synthétique est basée sur l'addition nucléophile d'un alcynure, issu de l'alcyne **22 $\alpha$**  correspondant, sur un aldéhyde de type sphingolipidique **23** (Schéma 125).

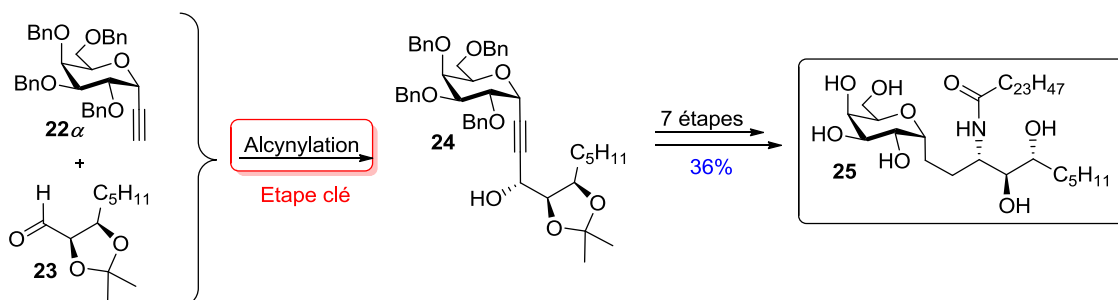


Schéma 125 - Synthèse proposée par Annoura

Plus précisément, l'alcyne **22 $\alpha$**  est obtenu à partir du 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl-D-galactose commercial en 3 étapes avec un rendement global de 60%. Le second précurseur **23** pour l'alcynylation est préparé à partir du L-arabinose en 6 étapes avec un rendement global de 43%. L'alcynylation a été ensuite examinée sous diverses conditions notamment sur la nature du contre ion métallique de l'acétylure. Les auteurs ont utilisé des organozinciques et des organomagnésiens pour contrôler la sélectivité par chélation de l'aldéhyde mais ces espèces n'offrent aucune diastéréosélectivité et les rendements observés sont très faibles. L'utilisation de l'organolithien **26 $\alpha$**  permet, quant à lui, d'obtenir un mélange de deux diastéroisomères facilement séparables par chromatographie sur gel de silice avec des rendements de 47% (**24**) et 30% (**27**) (Schéma 126).

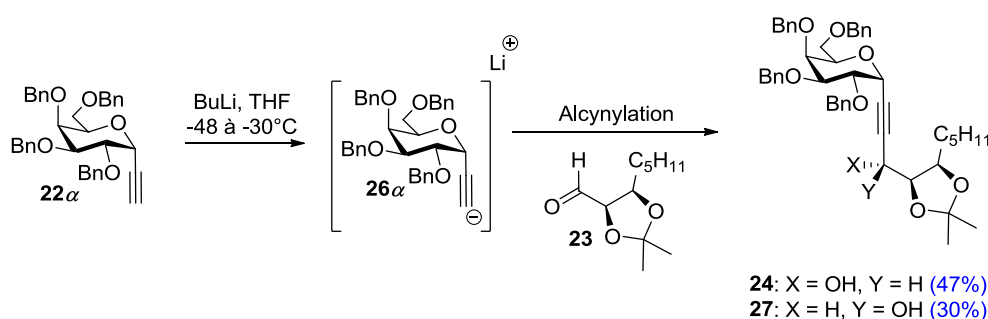


Schéma 126 - Mécanisme de l'alcynylation

Le produit d'alcynylation **24** est finalement fonctionnalisé pour introduire la chaîne acyle et la triple liaison est ensuite réduite. La déprotection de l'acétonide et des éthers de benzyle en fin de synthèse permet d'accéder à l'analogue **25** qui comporte une courte chaîne sphingosine. Ce dernier est donc obtenu en 14 étapes avec un rendement global satisfaisant de 7,3%. L'étape clé d'alcynylation reste toutefois limitante car la réaction n'est pas diastéréosélective. Seulement 47% de l'alcool ayant la configuration voulue est obtenu.

## I-5. Synthèse décrite par Wipf et Pierce

En 2006, Wipf et Pierce<sup>109</sup> ont développé la première synthèse linéaire de l' $\alpha$ -C-GalCer **1**. Leur approche synthétique est basée sur l'addition d'un alcène d'aluminium sur la *N*-*tert*-butylsulfinylimine **29** pour conduire à l'amine allylique **30**. La sulfinylimine **29** est préparée en 2 étapes avec un rendement global de 62%, à partir du dérivé du galactose **28** (Schéma 127).

<sup>109</sup> P. Wipf, J. G. Pierce, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3375-3378.



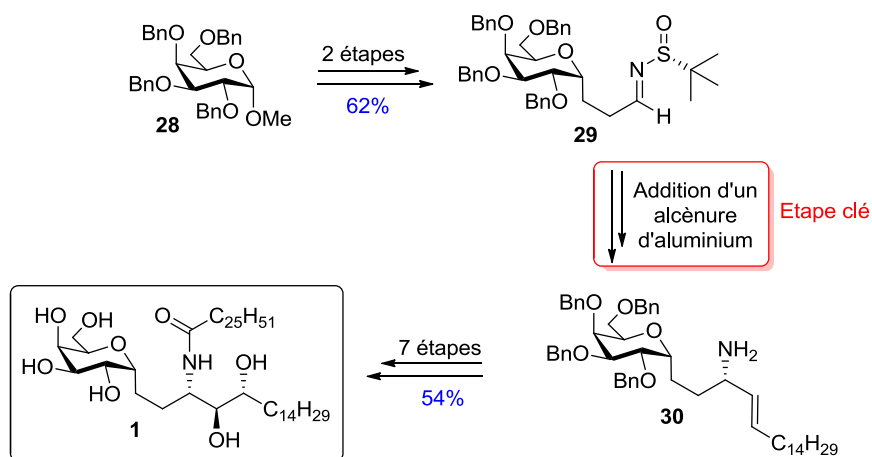


Schéma 127 - Synthèse proposée par Wipf et Pierce

Les auteurs se sont concentrés sur l'étape clé qui concerne l'addition d'un alcène d'aluminium *via* une transméallation d'un alcène de zirconium. La première étape consiste à réaliser une hydrozirconation de l'alcyne **31** par le réactif de Schwartz **32** suivi de la transméallation en présence de triméthylaluminium dans le dichlorométhane. Les auteurs proposent l'état de transition à 4 chaînons **34**, entre l'alcène d'aluminium **33** et la sulfonylimine **29**, à l'origine de la stéréosélectivité. Le groupement *tert*-butyle encombre une des faces de la sulfonylimine ce qui permet une approche contrôlée de l'alcène. L'hydrolyse acide conduit finalement à l'amine allylique **30** désirée avec un rendement de 72% (Schéma 128).

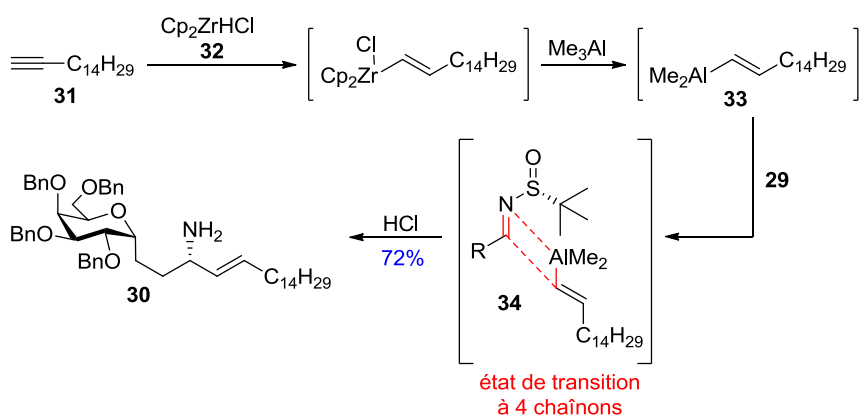


Schéma 128 - Mécanisme d'addition d'un alcène d'aluminium sur une sulfonylimine

Les auteurs ont ensuite optimisé les conditions d'époxydation à partir de l'intermédiaire **35**, isolé à partir de l'amine allylique **30**. L'action de l'acide trifluoroperacétique permet d'avoir un bon stéréocontrôle (r.d. = 9:1) dû à l'effet du carbamate voisin. L'ouverture intramoléculaire de l'époxyde **36** permet ensuite d'accéder au carbamate cyclique **37** (Schéma 129), facilement séparable du diastéréoisomère minoritaire

par chromatographie sur gel de silice. L' $\alpha$ -C-GalCer **1** est finalement obtenu après aménagement de la chaîne acyle et déprotection des éthers de benzyle.

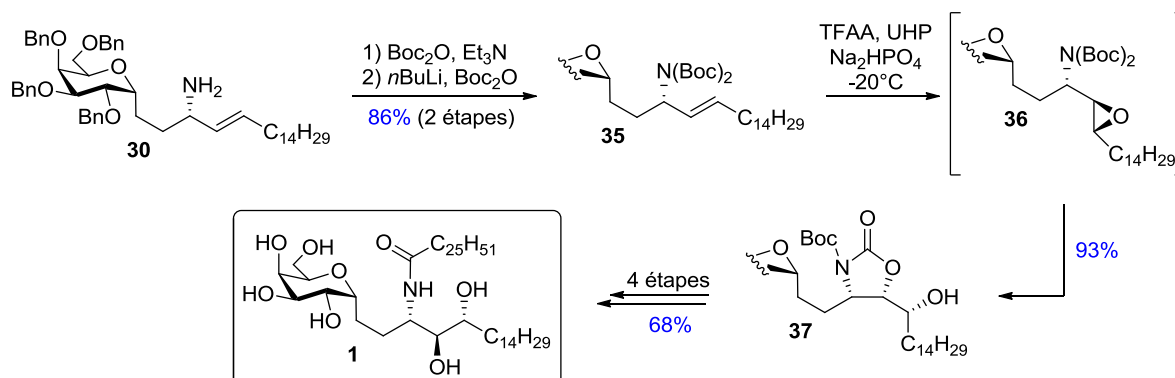


Schéma 129 - Accès à l' $\alpha$ -C-GalCer via une époxidation diastéréosélective

Cette synthèse, bien que linéaire, est efficace car elle permet d'accéder à l' $\alpha$ -C-GalCer en 10 étapes avec un rendement global de 25%.

## I-6. Troisième synthèse décrite par Franck

En 2006, l'équipe de Franck<sup>110</sup> a développé une nouvelle voie d'accès pour accéder aux analogues insaturés *E* **20** ou *Z* **41** de l' $\alpha$ -C-Galcer via l'oléfination de Julia-Kocienski<sup>111</sup> comme étape clé. Il s'agit d'une approche convergente qui fait intervenir l'aldéhyde **38** et les sulfones **39** et **40**, préparés respectivement à partir du galactose pentaacétate en 7 étapes avec un rendement global de 45%, et de la phytosphingosine en 7 ou 8 étapes selon la sulfone préparée (Schéma 130).

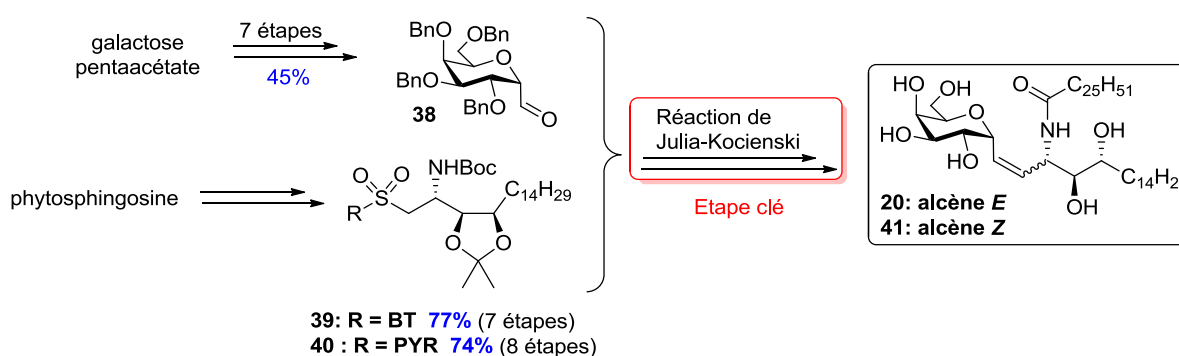


Schéma 130 - Synthèse proposée par Franck

Les auteurs ont décrit la synthèse de deux sulfones, issues de la phytosphingosine, permettant d'accéder soit à l'alcène *E*, soit à l'alcène *Z*. Ainsi, lors de la réaction de Julia-

<sup>110</sup> G. Chen, M. Chien, M. Tsuji, R. W. Franck, *ChemBioChem*, **2006**, 7, 1017-1022.

<sup>111</sup> J. B. Baudin, G. Hareau, S. A. Julia, O. Ruel, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1175-1178.

Kocienski, l'utilisation de la benzothiazol-2-yl (BT) sulfone **39** donne exclusivement l'oléfine *E* **42** tandis que celle de la 2-pyridyl (PYR) sulfone **40** permet de former majoritairement l'oléfine *Z* **43** (Tableau 2).

Tableau 2 - Réaction de Julia-Kocienski

	R	Base	T(°C)	Solvant	Rendement	Ratio E/Z
<b>1</b>	BT ( <b>39</b> )	LiHMDS	-78 à -10	THF	71%	100 : 0
<b>2</b>	PYR ( <b>40</b> )	LiHMDS	-20 à 25	DME	40%	39 : 61

Le contrôle de la stéréochimie est très dépendant du substrat, de la base, du solvant et de la température mais le mécanisme général est composé de trois étapes : l'addition nucléophile, le réarrangement de Smiles et l'élimination désulfurante.<sup>111</sup> L'anion lithié est obtenu par l'action d'une base forte sur la sulfone **39**. Le nucléophile **44** ainsi formé s'additionne sur l'aldéhyde **38**. L'alcoolate **45** subit ensuite un réarrangement de Smiles. Le benzothiazole de l'intermédiaire **46** est transféré de l'atome de soufre vers l'oxygène du dérivé carbonylé. Ce réarrangement conduit à la formation d'un sulfinate de lithium **47**. Ce dernier se décompose menant aux oléfines **42** et **43** par élimination d'une molécule de dioxyde de soufre et de l'anion lithié de la benzothiazol-2-one (BTOLi) (Schéma 131). La présence de la benzothiazol-2-one dans le mélange final est une preuve de ce mécanisme.

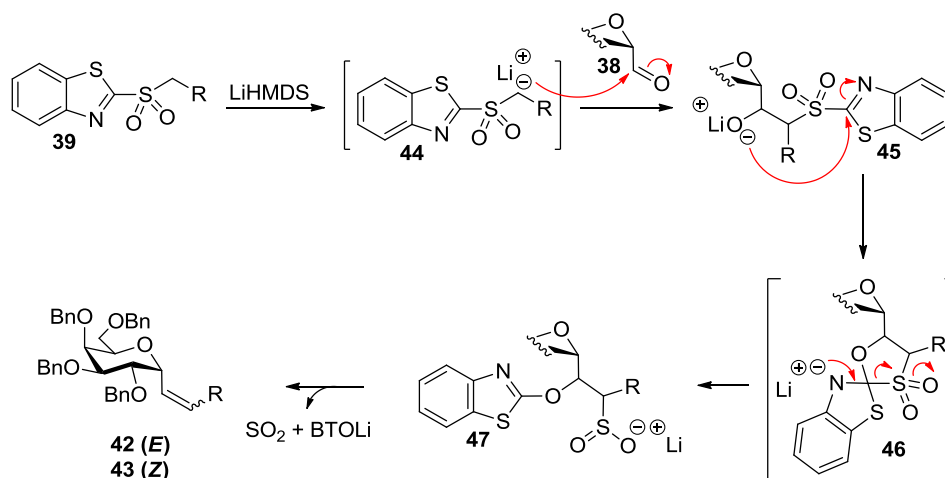


Schéma 131 - Mécanisme de réaction de Julia-Kocienski

Les analogues insaturés **20** et **41** sont finalement obtenus par aménagement de la chaîne acyle suivi du clivage des groupements protecteurs des fonctions hydroxyles. Cette voie de synthèse permet d'accéder à des  $\alpha$ -C-galactosylcéramides insaturés en 11 ou 12 étapes avec un rendement global de 20 à 39 %, à partir de la phytosphingosine. La formation du lien glycosidique par la réaction de Julia-Kocienski reste limitante pour la synthèse de glycoside insaturé de configuration Z. Une seconde limite de cette méthode est l'utilisation d'une base forte comme LiHMDS qui peut conduire à un mélange  $\alpha/\beta$  ou au produit de  $\beta$ -élimination du benzyloxy en position 2 de l'aldéhyde **38**.<sup>110</sup>

### I-7. Synthèse décrite par Bittman

En 2010, l'équipe de Bittman<sup>112</sup> a décrit une méthodologie de synthèse d' $\alpha$ -C-galactosylcéramides basée sur un couplage de Sonogashira, une époxydation de Sharpless et une ouverture d'époxyde intramoléculaire (Schéma 132).

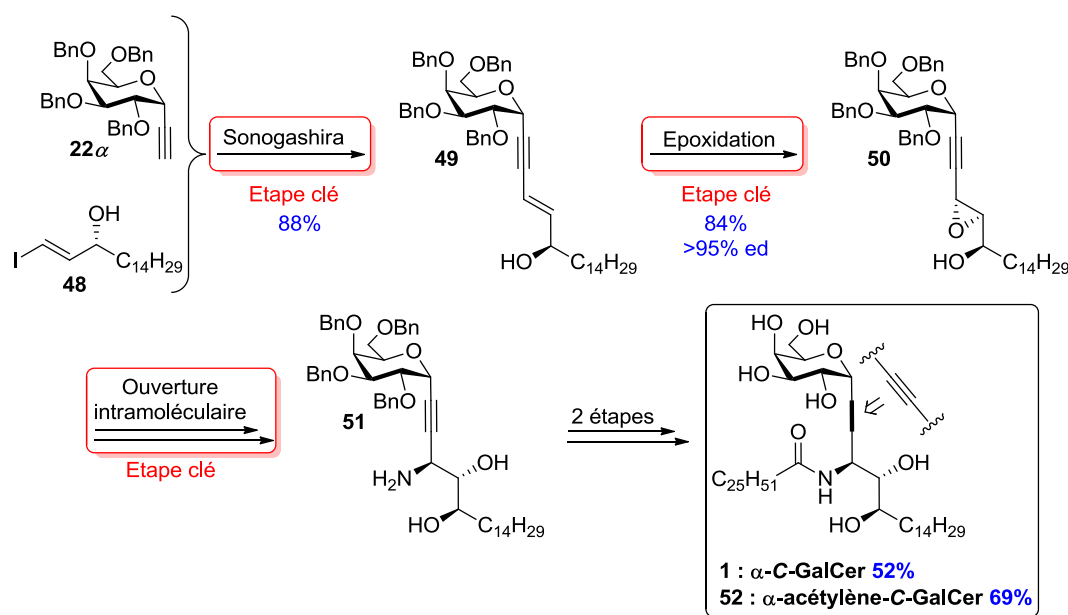


Schéma 132 - Synthèse proposée par Bittman

L'alcyne **22 $\alpha$**  est préparé à partir du galactose en 4 étapes avec un rendement global de 10%. Le second accepteur pour la réaction de Sonogashira est l'iodure de vinyle **48**, formé en 6 étapes avec un rendement global de 26%. Le couplage de ces deux synthons permet d'accéder à l'ényne **49** avec un rendement 88%.

La seconde étape clé est l'époxydation de Sharpless<sup>113</sup> de l'alcool allylique **49**. La stéréochimie de l'époxyde formé, est déterminée par la chiralité du tartrate de diéthyle (DET)

<sup>112</sup> Z. Liu, H-S. Byun, R. Bittman, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2974-2977.

(ou d'isopropyle (DIPT)). Cette réaction est catalysée par le tétraisopropoxyde de titane et nécessite un oxydant comme l'hydroperoxyde de *tert*-butyle. Un modèle permet de décrire la stéréochimie de l'époxyde en fonction de la chiralité du tartrate. L'alcène est placé dans un plan et l'alcool allylique est placé dans le coin inférieur droit, dans le même plan. Dans cette orientation, le tartrate de diester (-) réagit sur la face supérieure tandis que le tartrate de diester (+) réagit sur la face inférieure (Schéma 133).

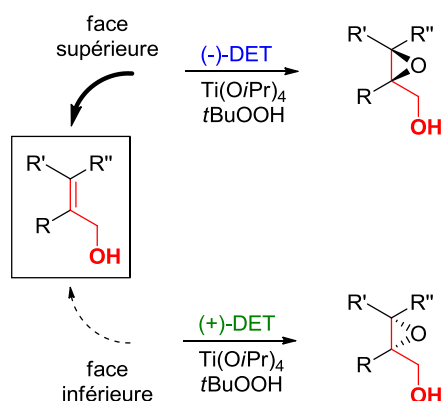


Schéma 133 - Modèle décrivant la stéréochimie lors de l'époxydation de Sharpless

Les auteurs ont ainsi utilisé cette méthode d'époxydation en utilisant le (-)-DIPT et l'hydroperoxyde de cumène en tant qu'oxydant, pour obtenir l'époxyde **50** avec un rendement de 84% et un excès diastéréoisomérique supérieur à 95%.

La troisième étape clé de cette synthèse est l'ouverture intramoléculaire de l'époxyde **50** assistée par un groupement trichloroacétimide **53**, positionné sur l'hydroxyle en position 5, en présence d'un acide de Lewis pour accéder à la dihydrooxazine **54** avec un rendement de 67%. L'ouverture du cycle mène à l'amine **51** avec un rendement global de 68% sur deux étapes (Schéma 134). L'aménagement fonctionnel de cette dernière permet de donner selon les conditions de réactions, l' $\alpha$ -C-GalCer ou l' $\alpha$ -acétylène-C-GalCer **52**.

<sup>113</sup> T. Katsuki, V. S. Martin, *Org. React.* **1996**, *48*, 1–300.

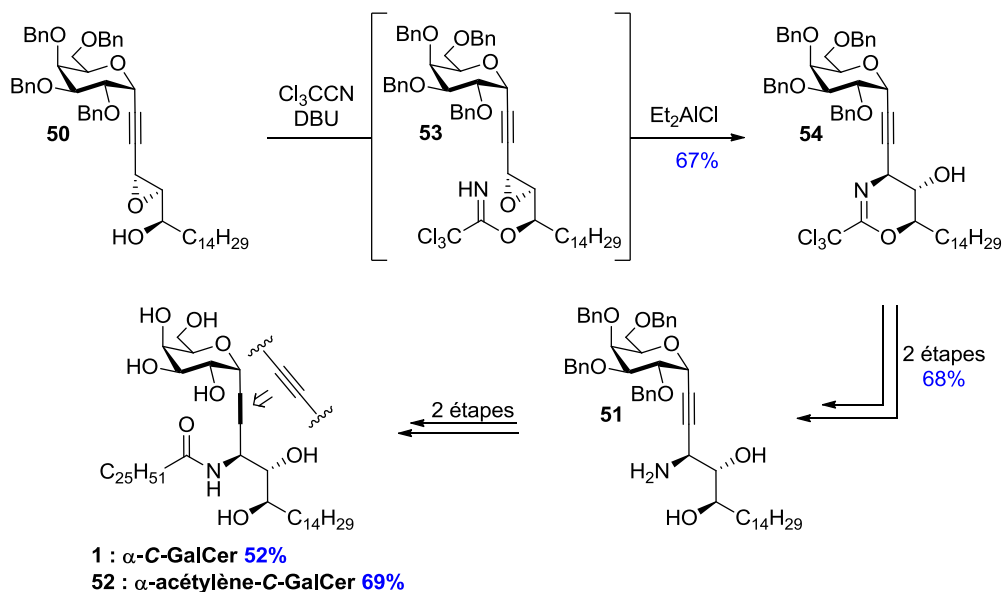


Schéma 134 - Ouverture de l'époxyde et obtention des  $\alpha$ -galactosylcéramides

Cette séquence permet d'accéder aux  $\alpha$ -C-galactosylcéramides en 11 étapes avec un rendement global inférieur à 1%. Bien que cette méthode comporte beaucoup d'étapes, elle permet d'accéder à des composés alcyniques avec une très bonne stéréosélectivité.

### I-8. Synthèse décrite par Haudrechy

En 2011, l'équipe d'Haudrechy<sup>15a,114</sup> a développé une stratégie basée sur une addition nucléophile suivie d'une ouverture d'époxyde, nommée stratégie NEO. Cette méthode permet d'une part, de préparer des analogues avec un groupement ester au lieu de la fonction amide, et d'autre part, de pouvoir fonctionnaliser sélectivement la position 6 du galactose (Schéma 135).

<sup>114</sup> S. Guillaume, K. Plé, A. Haudrechy, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1015-1017.

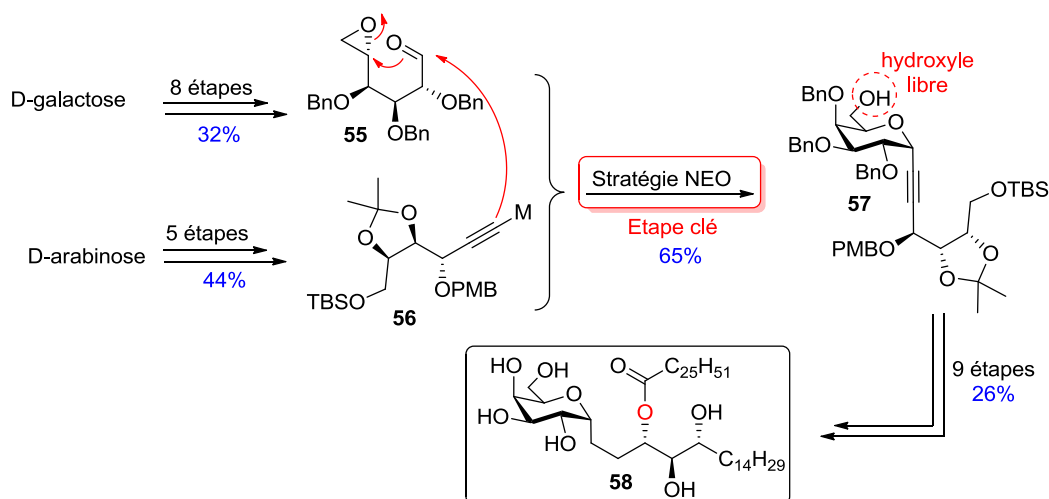


Schéma 135 - Stratégie proposée par Haudrechy

L'étape clé est une réaction en cascade guidée par le chlorure de zinc qui permet d'avoir une bonne stéréosélectivité lors de l'addition de l'alcynure **56** sur l'aldéhyde **55** et d'activer l'ouverture de l'époxyde *in situ*. La cyclisation est complète en présence de bromure de lithium conduisant ainsi au *C*-galactoside **57** avec un rendement de 65%. L'aménagement fonctionnel permet ensuite d'accéder à l'analogue ester **58** de l' $\alpha$ -*C*-GalCer en 9 étapes avec un rendement global de 26%. Les auteurs ont cependant noté que la déprotection du groupement acétonide en milieu acide mène à une migration de la chaîne acyle en position 3 vers le groupement hydroxyle en position 5 (Schéma 136).

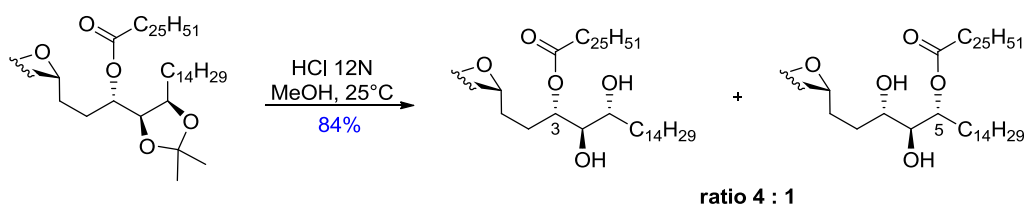


Schéma 136 - Migration du groupement ester

## II - Bilan sur les synthèses existantes

Toutes les méthodes décrites précédemment montrent la faisabilité à créer le squelette *C*-galactoside. Chacune de ces synthèses présentent des avantages et des inconvénients dans la préparation d'analogues de *C*-galactosylcéramides (Tableau 3).

Tableau 3 - Inconvénients et avantages des synthèses existantes

Synthèse	Avantages	Inconvénients
Brevet	- Synthèse convergente	- Synthèse longue et non reproductible - Epimérisation : formation de diastéréoisomères non séparables
Franck (I)	- Synthèse convergente	- Synthèse longue (26 étapes) - Etape clé limitante avec formation d'un sous-produit inutilisable - Fonctionnalisation en début de synthèse
Franck (II)	- Synthèse courte et convergente (10 étapes) - Bon rendement global (10%) - Accès à des analogues insaturés	- Utilisation de phytosphingosines commerciales peu diversifiées - Modifications structurales sur les chaînes limitées et peu accessibles
Annoura	- Synthèse courte et convergente (14 étapes) - Bon rendement global (7%). - Analogue C-OCH	- Etape clé non stéréosélective
Wipf et Pierce	- Synthèse courte (10 étapes) - Bon rendement global (25%)	- Synthèse linéaire
Franck (III)	- Synthèse courte et convergente (11-12 étapes) - Bon rendement global (20-39%) - Accès à des analogues insaturés	- Modifications structurales sur les chaînes limitées et peu accessibles - Etape clé peu stéréosélective
Bittman	- Etape clé stéréosélective - Accès à des analogues alcyniques	- Rendement global faible (1%)
Haudrechy	- Etape clé stéréosélective - Accès à des analogues alcyniques - Modulation possible de la position 6 du galactose - Synthèse convergente	- Synthèse longue (18 étapes) - Migration d'une chaîne lipidique



Toutes ces méthodes sont basées sur l'introduction précoce de la chaîne phytosphingosine ou de l'utilisation de la phytosphingosine commerciale ce qui limite les modifications structurales de cette chaîne.

Dans le cadre de notre projet, nous avons également envisagé de préparer des analogues C-glycosidiques qui comportent sur la position pseudo-anomérique un groupe monofluoro- et *gem*-difluorométhylène. A notre connaissance, bien que les équipes de Leclerc et Mootoo aient isolé des analogues ou intermédiaires hautement fonctionnalisés, les composés CF<sub>2</sub>-GalCer ou CHF-GalCer n'ont pas été isolés.

Depuis de nombreuses années, les équipes de Quirion et Pannecoucke s'intéressent à des méthodologies d'introduction de groupe monofluoro- et *gem*-difluorométhylène en position pseudo-anomérique de sucres.<sup>115</sup> En 2011, Leclerc et Pannecoucke ont décrit une méthodologie de synthèse efficace de composés C-glycosidiques difluorés<sup>116</sup> qu'ils ont appliquée à la préparation d'analogues difluorés de l' $\alpha$ -GalCer (Schéma 137).<sup>117</sup> L'approche synthétique est basée sur la préparation stéréosélective de l' $\alpha$ -CF<sub>2</sub>-galactoside **61**, issu du glycal **59** en 2 étapes avec un rendement global de 53%. L'estérification de l'hydroxyle en position 2 avec des acides carboxyliques **62** et **63**, issus de l'aldéhyde de Garner **60** en 6 étapes, conduit aux esters **64** et **65**. Le lithien, formé par traitement au méthyllithium, réagit sur la fonction ester pour fournir l'hémiacétal correspondant qui est ensuite réduit ce qui donne accès aux précurseurs (**70-73**). A ce stade, toutes les tentatives de désoxygénation du groupement hydroxyle en  $\alpha$  du groupement CF<sub>2</sub> se sont montrées infructueuses. Les auteurs ont tout de même obtenu des analogues difluorés avec différentes longueurs de chaînes lipidiques (Schéma 137). Les réponses immunitaires de ces différents analogues ont été évaluées mais aucune activité n'a été observée.

---

<sup>115</sup> a) S. Marcotte, F. D'Hooge, S. Ramadas, C. Feasson, X. Pannecoucke, J-C. Quirion, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5879-5882. b) A. B. Cuenca, F. D'Hooge, V. Gouge, G. Castelot-Deliencourt, H. Oulyadi, E. Leclerc, P. Jubault, X. Pannecoucke, J-C. Quirion, *Synlett*, **2005**, *17*, 2627-2630. c) N. P. Karce, C. Pierry, F. Poulain, H. Oulyadi, E. Leclerc, X. Pannecoucke, J-C. Quirion, *Synlett*, **2007**, *1*, 123-126. d) B. Moreno, C. Quehen, M. Rose-Hélène, E. Leclerc, J-C. Quirion, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2477-2480. e) F. Poulain, A-L. Serre, J. Lalot, E. Leclerc, J-C. Quirion, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2435-2438. f) F. Poulain, E. Leclerc, J-C. Quirion, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1803-1805. g) V. Gouge-Ibert, C. Pierry, F. Poulain, A-L. Serre, C. Largeau, V. Escriou, D. Scherman, P. Jubault, J-C. Quirion, E. Leclerc, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1957-1960.

<sup>116</sup> S. Colombel, M. Sanselme, E. Leclerc, J-C. Quirion, X. Pannecoucke, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5238-5241.

<sup>117</sup> S. Colombel, N. Van Hijfte, T. Poisson, X. Pannecoucke, F. Monneaux, *J. Fluorine Chem.* **2015**, *173*, 84-91.

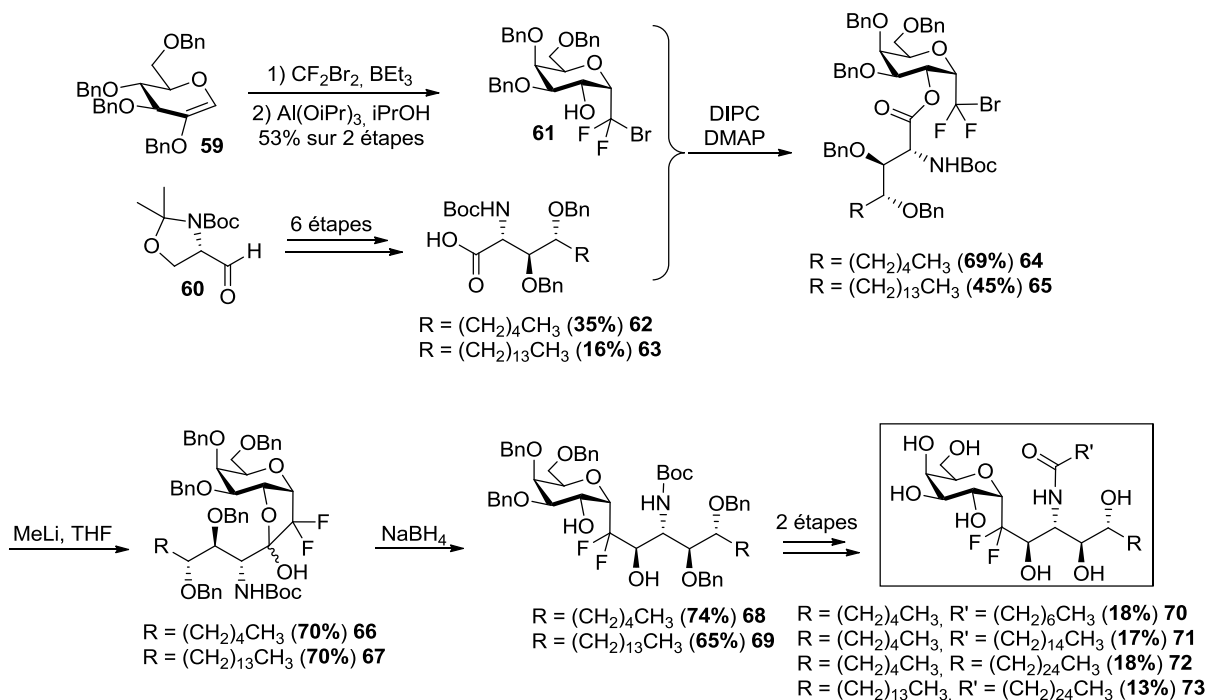


Schéma 137 - Synthèse d'analogues d' $\alpha$ - $\text{CF}_2$ -GalCer

Concernant les analogues C-glycosidiques monofluorés, l'équipe de Mootoo<sup>118</sup> a décrit une stratégie basée sur une étape de crotylation d'aldéhyde chiral comportant la chaîne sphingosine (Schéma 138). L'atome de fluor a été introduit en début de synthèse à partir de l'aldéhyde **74**, par fluoration organocatalysée, puis une réaction de Wittig permet d'accéder au précurseur fluoré **75** avec un rendement de 73% sur deux étapes. Le composé stannylé **76**, obtenu en 6 étapes avec un rendement de 29% à partir de l'intermédiaire **75**, est engagé dans une réaction de crotylation avec l'aldéhyde **77** pour accéder à l'oléfine **78**, qui est ensuite fonctionnalisée en 4 étapes avec un rendement global de 37% menant à un intermédiaire avancé **79** de l' $\alpha$ -CHF-GalCer.

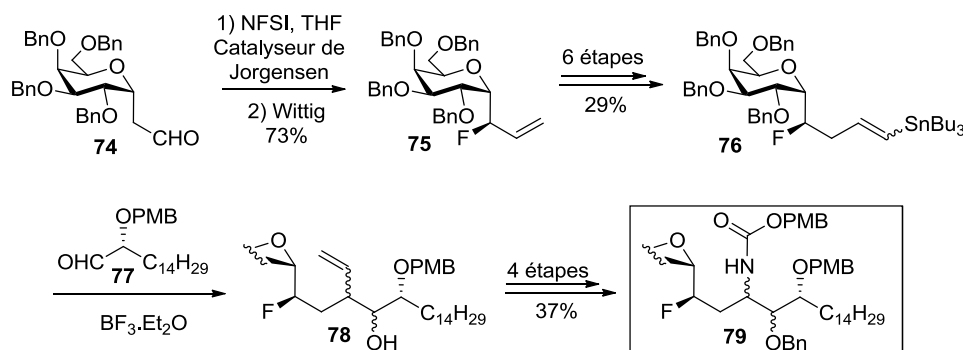


Schéma 138 - Synthèse d'un intermédiaire de l'analogue monofluoré de l' $\alpha$ -C-GalCer

<sup>118</sup> A. S. Altiti, S. Bachan, D. R. Mootoo, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4654-4657.

Toutefois, à notre connaissance, Mootoo n'a pas décrit la synthèse totale de l' $\alpha$ -CHF-GalCer, le principal obstacle étant la détermination de la stéréochimie de deux centres asymétriques de la chaîne sphingosine.

Notre stratégie de synthèse innovante pour la synthèse d' $\alpha$ -C-galactosylcéramides est basée sur une réaction de cycloaddition (3+2), entre un C-vinyl-galactoside et une nitroène. Après un aménagement fonctionnel adéquat au niveau du cycle isoxazolidine, la stratégie envisagée devrait permettre une modularité importante notamment au niveau de la chaîne acyle. Outre la perspective d'accéder à des analogues contraints C-glycosylés du 4-désoxy-KRN7000, l'ouverture tardive du cycle isoxazolidine offre la possibilité de préparer des analogues comportant des groupements variés en position pseudo-anomérique. (Schéma 139).

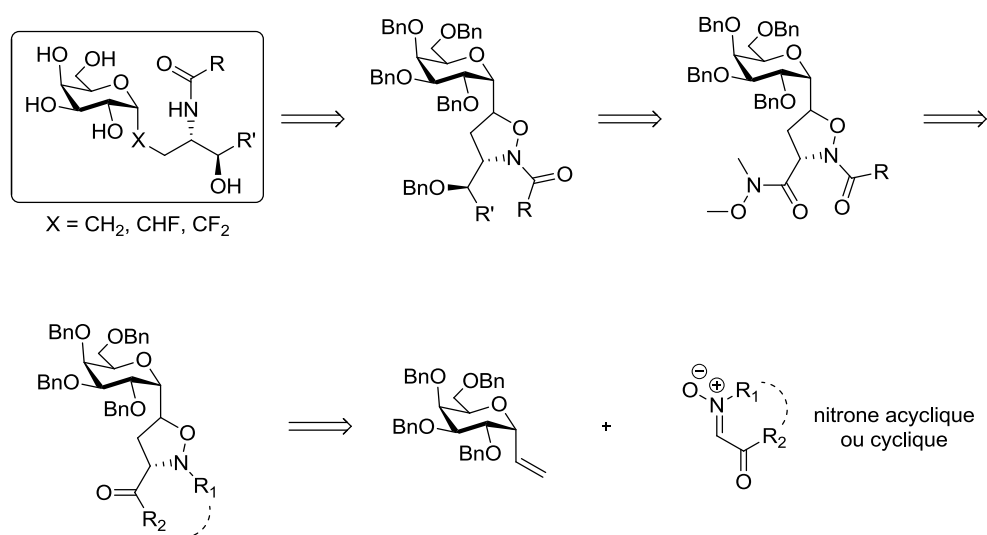


Schéma 139 - Stratégie de synthèse envisagée pour la synthèse d' $\alpha$ -C-galactosylcéramides

# Chapitre II

Notre stratégie de synthèse repose sur une cycloaddition (3+2) entre un *C*-vinyl-glycoside et une nitroène. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes pour former des *C*-glycosides,<sup>119</sup> l'utilisation de *C*-glycosyl éthène pour la synthèse de *C*-glycoconjugués a été peu décrite. Pour leur préparation, les précurseurs les plus courants sont les halogénures de glycosyle, les lactones de glycosyles, les composés 1,2-anhydro-glycosylés, les *C*-glycosides et des structures acycliques. Pour ce projet, il était nécessaire de préparer les deux anomères du *C*-vinyl-galactoside sur une échelle de quelques grammes. Il était également important de disposer d'une méthode de synthèse générale de *C*-vinyl-glycosides pour nous permettre une étude approfondie de la cycloaddition (3+2). Nous présenterons d'abord les principales méthodes d'obtention des *C*-vinyl-glycosides de la littérature avant de décrire nos résultats.

## I - Synthèses de *C*-vinyl-glycosides décrites dans la littérature

### I-1. A partir d'halogénures de glycosyle

#### a) Avec un dérivé bromé

Une des premières approches consiste à utiliser le bromure de vinylmagnésium sur le bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- $\alpha$ -*D*-glucoside **80** (Schéma 140).<sup>120,121</sup> Cette méthode nécessite non seulement l'utilisation d'un large excès d'organomagnésien mais également une re-protection des hydroxyles par acylation en présence d'anhydride acétique pour pouvoir accéder à un mélange d'anomères de *C*-vinyl-glucoside **81 $\alpha$**  et **81 $\beta$**  (ratio  $\alpha/\beta$  1:5,5) (Schéma 140). L'anomère  $\beta$  peut être isolé par recristallisation mais le rendement global de la réaction n'est que de 34%.

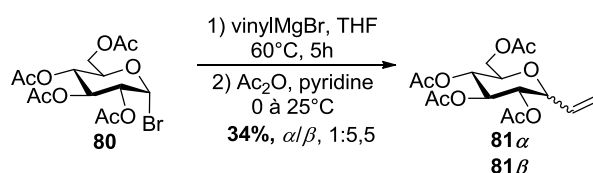


Schéma 140 - Synthèse de *C*-vinyl-glycoside via un dérivé bromé

<sup>119</sup> Y. Yang, B. Yu, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12281-12356.

<sup>120</sup> M. L. Shulman, S. D. Shiyan, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1974**, *33*, 229-235.

<sup>121</sup> Y. A. Lin, J. M. Chalker, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811.

## b) Avec un dérivé iodé

En 2006, l'équipe de Gervay-Hague a préparé des analogues C-glycosidiques d'un glycolipide bactérien immunogène appelé BbGL2.<sup>122</sup> Leur stratégie de synthèse repose sur une réaction de métathèse croisée entre deux partenaires vinyliques dont l'un est l' $\alpha$ -C-vinyl-galactoside **84 $\alpha$**  préparé à partir de l'acétate de galactosyle **82** (Schéma 141). Cette méthode consiste à générer *in situ* l'iodure de galactosyle **83 $\alpha$**  de configuration  $\alpha$  qui s'isomérise par une source d'ions iodures externe comme le TBAI, sous effet thermique. En effet, l'anomère **83 $\beta$**  est plus réactif vis-à-vis de l'organomagnésien favorisant la formation du C-vinyl-galactoside **84 $\alpha$** . Un mélange des deux anomères séparable par chromatographie sur gel de silice est obtenu avec un rendement de 79% dans un ratio ( $\alpha/\beta$ ) de 12:1.

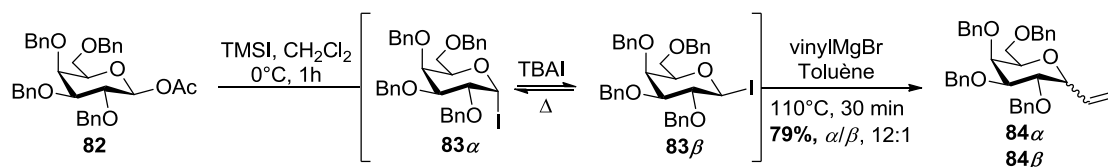


Schéma 141 - Préparation du C-vinyl-galactoside via un dérivé iodé généré *in situ*

## I-2. A partir de lactones

En 1988, Kraus et Molina<sup>123</sup> ont rapporté la première addition de bromure de vinylmagnésium sur la gluconolactone **85** à  $-78^\circ\text{C}$  suivie de la réduction de l'hémiacétal intermédiaire par le triéthylsilane en présence d'éthérate de trifluorure de bore avec un rendement de 60% (Schéma 142). Dans ces conditions, seul l'anomère **86 $\beta$**  est formé.

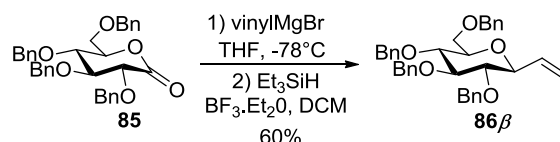


Schéma 142 - Addition du bromure de vinylmagnésium sur la gluconolactone **85**

Néanmoins, Xie *et al.*<sup>124</sup> ont montré en 2003, que cette réaction n'était pas reproductible. En effet, lorsqu'ils ont additionné 1,2 équivalent d'organomagnésien, un mélange de C-vinyl-glucoside **86 $\beta$**  avec un rendement de 49% et un sous-produit **92** correspondant à une double addition d'organomagnésien avec un rendement de 14% a été obtenu. L'addition d'un premier équivalent d'organomagnésien sur la gluconolactone protégée **85** conduit à l'hémiacétal **87**, qui est en équilibre avec l'énone **88**. Le second

<sup>122</sup> S. S. Kulkarni, J. Gervay-Hague, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5765-5768.

<sup>123</sup> G. A Kraus, M. T. Molina, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 752-753.

<sup>124</sup> J. Xie, F. Durrat, J-M. Valéry, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7896-7898.

équivalent peut s'additionner sur ces deux intermédiaires. Après hydrolyse, l'hydroxy ènone **90** cyclise pour conduire à l'hémiacétal **91**. Enfin la réduction permet d'accéder au sous-produit **92** (Schéma 143).

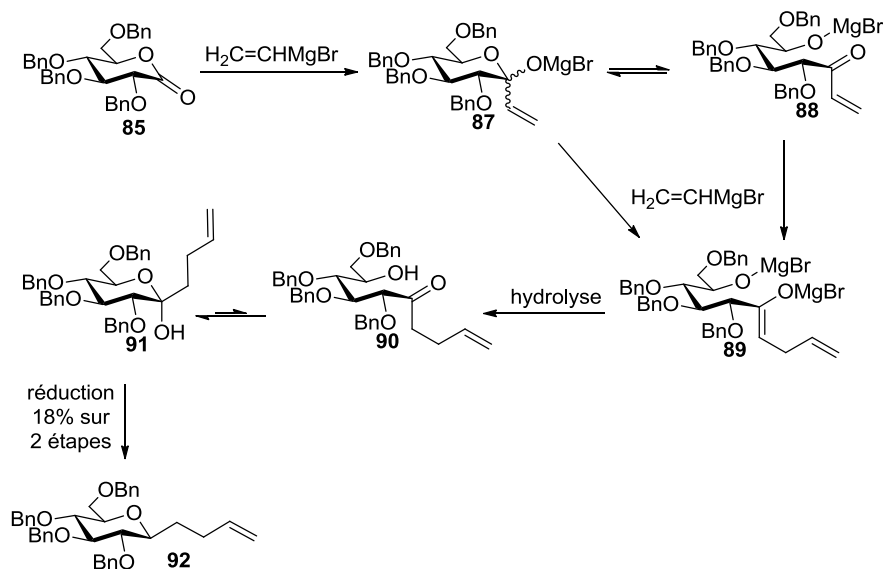


Schéma 143 - Mécanisme de double-addition du bromure de vinylmagnésium sur la lactone

En série galactose, l'utilisation de 1.2 équivalent conduit uniquement au composé vinylique **84 $\beta$**  sans la moindre trace de produit de double addition avec un rendement de 50% tandis qu'avec 1.5 équivalent, le C-vinyl-galactoside **84 $\beta$**  est obtenu avec un rendement de 25% et le produit de double addition **94** est isolé avec un rendement de 28% (Schéma 144).

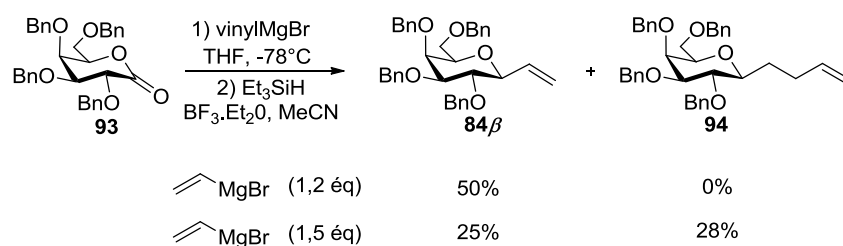


Schéma 144 - Addition du bromure de vinylmagnésium sur la galactonolactone **93**

### I-3. A partir d'époxydes

En 2000, Rainier *et al.*<sup>125</sup> ont préparé le C-vinyl-glucoside **96 $\alpha$**  par addition de six équivalent de trivinylalane sur l'époxyde **95** (obtenu par époxydation du glucal correspondant) dans du dichlorométhane entre -65°C et 20°C. Dans ces conditions, l'anomère  $\alpha$  est obtenu avec un rendement de 76%. Lorsque l'addition est réalisée avec le bromure de

<sup>125</sup> J. Rainier, J. Cox, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2707-2709.

vinylmagnésium (2M dans le THF) dans le dichlorométhane et à  $-40^{\circ}\text{C}$ ,<sup>126</sup> seul l'anomère  $\beta$  **96 $\beta$**  est isolé avec un rendement de 57% (Schéma 145).

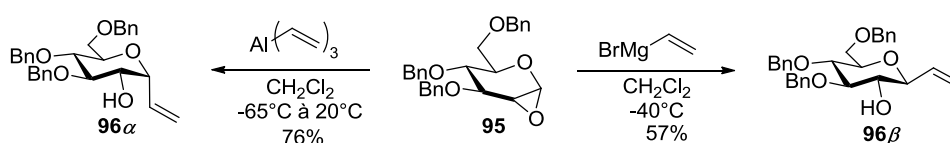


Schéma 145 - Addition d'organométalliques sur un époxyde

La formation de l'anomère  $\alpha$  **96 $\alpha$**  peut être expliquée par la complexation de l'aluminium sur l'oxygène de l'époxyde **95** conduisant à la formation de l'oxonium **97** ce qui permet le transfert de ligand par attaque axiale. L'hydrolyse de l'intermédiaire **98** en fin de réaction permet d'accéder au C-vinyl-glucoside **96 $\alpha$**  (Schéma 146).

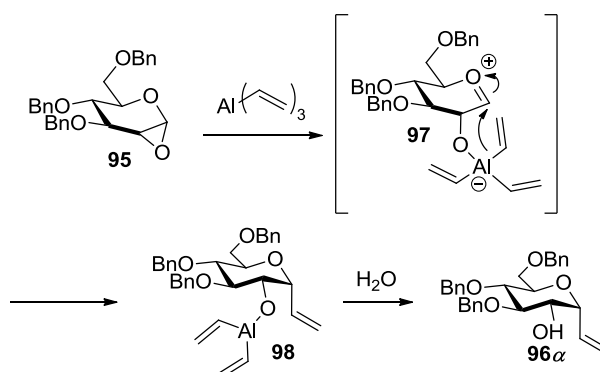


Schéma 146 - Mécanisme d'addition du trivinylalane sur un époxyde

Concernant l'addition d'organomagnésiens sur ce type de substrat, le contrôle de la température semble être un facteur important pour la sélectivité  $\alpha/\beta$ . En effet, lorsque la réaction est réalisée à  $0^{\circ}\text{C}$ , aucune sélectivité n'est observée dû à la formation de l'oxonium à cette température. En baissant la température à  $-40^{\circ}\text{C}$ , seul l'anomère  $\beta$  est isolé.

L'avantage de cette approche est l'accès aux deux anomères à partir du même substrat en changeant uniquement l'espèce organométallique. De plus, cette méthode permet d'avoir l'hydroxyle libre en position 2 ce qui offre la possibilité de moduler cette fonction selon la synthèse envisagée.

<sup>126</sup> S. Allwein, J. Cox, B. Howard, H. Johnson, J. Rainier, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 1997-2009.

## I-4. A partir de C-glycosides

### a) Par réduction contrôlée d'un alcyne

En 2004, dans le cadre de la synthèse d'analogues C-glycosidiques d' $\alpha$ -galactosylcéramides, l'équipe de Franck<sup>108</sup> a préparé l'alcène **84 $\alpha$**  par réduction contrôlée de l'alcyne **22 $\alpha$**  en présence du catalyseur de Lindlar (66% m/m) avec un rendement de 94% (Schéma 147). Cependant, l'anomère  $\alpha$  **22 $\alpha$**  est préparé en 4 étapes avec un rendement global de 32% à partir du galactoside de méthyle **99**, ce qui a été jugé comme non satisfaisant par l'équipe de Franck, les incitant à étudier une autre stratégie.

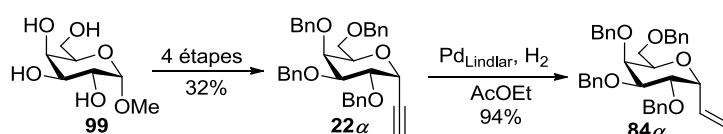


Schéma 147 - Préparation du C-vinyl-galactoside **84 $\alpha$**  par réduction contrôlée d'un alcyne

### b) Par une séquence isomérisation/métathèse

Afin d'obtenir un rendement global plus satisfaisant, la même équipe<sup>118</sup> a proposé de synthétiser les C-vinyl-galactosides (**84 $\alpha$**  et **103 $\alpha$** ) *via* une séquence isomérisation/métathèse (Schéma 148) à partir des dérivés allyliques correspondants (**100 $\alpha$**  et **101 $\alpha$** ). Dans un premier temps, les composés (**18 $\alpha$**  et **102 $\alpha$** ) sont obtenus par isomérisation des composés (**100 $\alpha$**  et **101 $\alpha$** ) en présence de chlorure de palladium. Une réaction de métathèse croisée est ensuite réalisée avec de l'éthylène en présence du catalyseur de Grubbs. Les C-vinyl-galactosides (**84 $\alpha$**  et **103 $\alpha$** ) peuvent être ainsi préparés respectivement en 5 étapes et 3 étapes avec un rendement global de 50% et de 53% à partir du galactose pentaacétate.

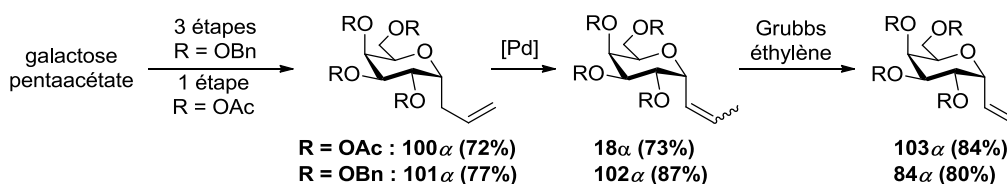


Schéma 148 - Préparation d' $\alpha$ -C-vinyl-galactosides par une séquence isomérisation/métathèse

L'avantage d'utiliser la séquence isomérisation/métathèse est la versatilité des groupements protecteurs ce qui permet d'utiliser aussi bien des groupements acétates (**103 $\alpha$** ) que des groupements benzyles (**84 $\alpha$** ).



## I-5. A partir de structures acycliques

En 2014, Nolen *et al.*<sup>127</sup> ont rapporté une méthode de synthèse hautement stéréosélective de C-vinyl-glycosides. La stratégie repose sur une cycloéthérification à partir de 1-acétoxy-2,3-didéoxy-oct-2-énitols (**104-106**) catalysée au palladium. Selon le substrat de départ, la cyclisation catalysée par Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> induit une diastéréosélectivité au niveau de la position anomérique. En série glucose et galactose, les anomères de configuration  $\alpha$  (**96 $\alpha$**  et **107 $\alpha$** ) sont formés sélectivement alors qu'en série mannose, l'anomère  $\beta$  **108 $\beta$**  est majoritairement obtenu (Schéma 149). Selon les auteurs, la différence de la configuration de la position 2 entre le glucose/galactose et le mannose joue un rôle dans l'approche du catalyseur sur la double liaison ce qui détermine la stéréochimie obtenue.

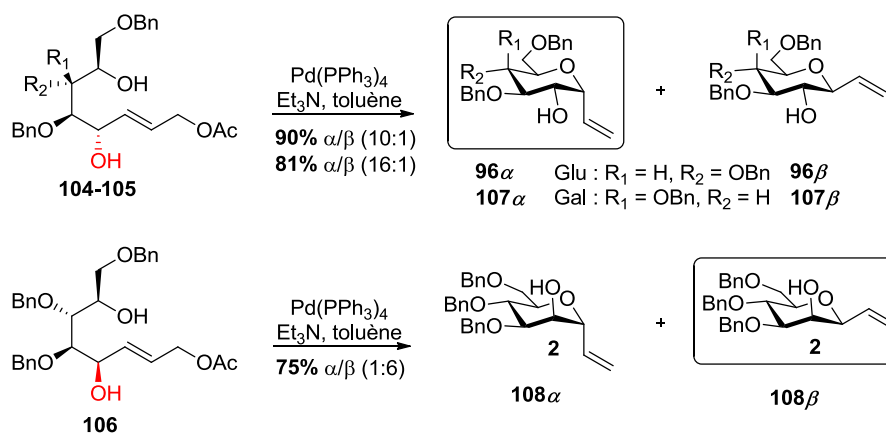


Schéma 149 - Synthèse des C-vinyl-glycosides via une cycloéthérification

Les auteurs ont également démontré que l'utilisation d'un ligand chiral comme le ligand de Trost (DACH) permet d'avoir un effet match/mismatch. En série glucose et galactose, le (*S,S*)-DACH a un effet match ce qui conduit à l'anomère  $\alpha$  seulement tandis que le même ligand inverse la sélectivité en série mannose ( $\alpha/\beta$  4,7:1) avec un effet mismatch. Au contraire, le (*R,R*)-DACH a un effet mismatch ce qui induit une inversion de sélectivité en série glucose ( $\alpha/\beta$  1:3,5). Aucune cyclisation n'est observée en série galactose alors qu'en série mannose, seul l'anomère  $\beta$  est obtenu (Tableau 4).

<sup>127</sup> E. G. Nolen, V. C. Ezech, M. J. Feeney, *Carbohydr. Res.* **2014**, 396, 43-47.

Tableau 4 - Utilisation de ligands chiraux

Série	Rendement (%), [ $\alpha/\beta$ ]		
	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> + ( <i>R,R</i> )-DACH	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> + ( <i>S,S</i> )-DACH
Glucose	90 [10:1]	99 [1:3,5]	90 [31:1]
Galactose	81 [16:1]	-	81 [ $\alpha$ seul]
Mannose	75 [1:6]	55 [ $\beta$ seul]	77 [4,7:1]

## I-6. Bilan

D'une manière générale, les *C*-vinyl-glycosides de configuration  $\alpha$  peuvent être obtenus à partir d'halogénures de glycosyle. Pour pouvoir accéder au *C*-vinyl-glycosides de configuration  $\beta$ , les précurseurs les plus utilisés sont les lactones. Les méthodes issues d'ouvertures d'époxyde ou de structures acycliques permettent, selon les réactifs utilisés, de former soit l'anomère  $\alpha$ , soit l'anomère  $\beta$  (Tableau 5).

Tableau 5 - Sélectivité obtenue en fonction du précurseur

Précurseur	Sélectivité
Halogénures	$\alpha$ majoritaire
Lactones	$\beta$ majoritaire
Epoxydes	anomères $\alpha$ ou $\beta$ accessibles
<i>C</i> -glycoside	configurations déjà établies
Cyclisation	anomères $\alpha$ ou $\beta$ accessibles

## II - Nos travaux

Afin d'étudier la réaction clé de notre stratégie, à savoir la cycloaddition dipolaire 1,3, il était nécessaire de disposer des deux anomères des *C*-vinyl-glycosides dans différentes séries et si possible sur une échelle d'un gramme. Différentes voies d'accès ont été étudiées et l'optimisation a systématiquement été effectuée en série galactose, qui est la série d'intérêt.

### II-1. Par addition nucléophile sur une lactone

Nous avons envisagé de préparer les anomères  $\beta$  par addition du bromure de vinylmagnésium sur des glyconolactones, facilement préparées en 3 étapes à partir des glycosides de méthyles commerciaux.

Les fonctions hydroxyles du galactoside de méthyle **99** sont d'abord protégées sous forme d'éthers de benzyle, en présence d'hydruure de sodium et du bromure de benzyle dans le DMF, pour accéder à l'acétal **28** avec un rendement de 95%. L'hydrolyse acide de l'acétal **28** à 90°C mène au lactol **109** avec un rendement de 63%. La lactone **93** est obtenue par oxydation de l'hémiacétal **109** en présence d'anhydride acétique et de diméthylsulfoxyde à température ambiante avec un rendement de 83% (Schéma 150).

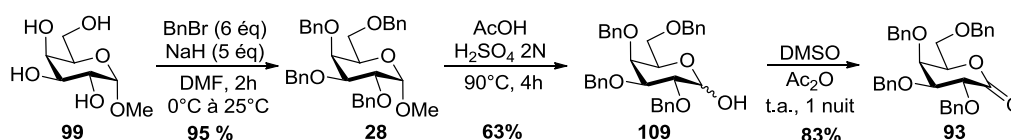


Schéma 150 - Préparation de la lactone 93

Il s'agit de l'oxydation d'Albright-Goldman<sup>128</sup> décrite en 1967, permettant d'accéder à des composés carbonylés à partir d'alcools, sans l'utilisation de base et à température ambiante. Le mécanisme est décrit sur le Schéma 151.

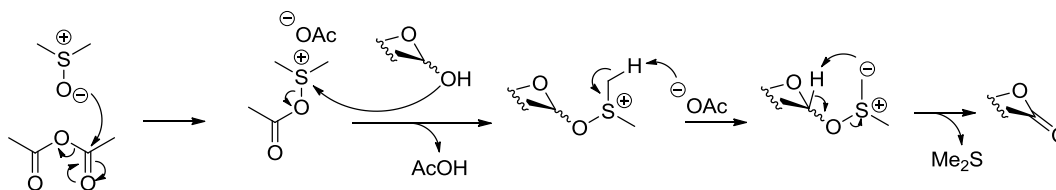


Schéma 151 - Mécanisme de l'oxydation d'Albright-Goldman

Nous avons ensuite reproduit les conditions décrites par Molina.<sup>123</sup> Afin d'éviter la double addition d'organomagnésien, 1,2 équivalent d'organomagnésiens sont utilisés. Lorsque la réaction a été réalisée à -78°C, la lactone **93** est totalement consommée après 2,5 h de réaction. L'étape de réduction en présence d'éthérate de trifluorure de bore et de triéthylsilane dans l'acétonitrile permet d'accéder au C-vinyl-galactoside **84β** avec un rendement faible de 25% (Schéma 152).

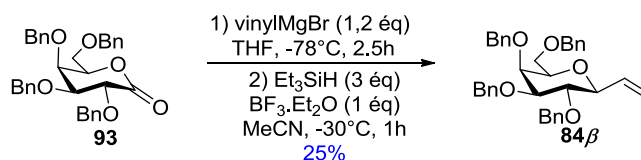


Schéma 152 - Préparation du β-C-vinyl-galactoside

Ce résultat décevant nous a incités à tester d'autres méthodes de synthèse.

<sup>128</sup> J. D. Albright, L. Goldman, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2416-2423.

## II-2. Par ouverture d'époxydes

Etant donné qu'il est possible d'obtenir sélectivement l'anomère  $\alpha$  ou  $\beta$  à partir du même substrat en changeant uniquement l'espèce organométallique, la stratégie basée sur l'ouverture d'époxydes nous a paru très intéressante.

En série galactose, la synthèse de l'époxyde **111** a été réalisée à partir du 3,4,6-tri-*O*-benzyl-*D*-galactal **110** (Schéma 153). Dondoni<sup>129</sup> a montré qu'il était possible de préparer l'époxyde **111** en formant *in situ* du diméthylldioxirane (DMDO) avec un très bon rendement et la réaction est généralement propre. Le galactal **110** a donc été mis en solution dans le dichlorométhane, l'acétone et une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> à température ambiante. D'après leurs travaux,<sup>129</sup> seulement deux équivalents d'Oxone sont suffisants pour que l'époxyde se forme après deux heures de réaction. Cependant, après plusieurs tentatives dans ces conditions, l'époxyde n'a pas été obtenu. Etant en milieu biphasique, nous avons rajouté un agent de transfert de phase (Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub>) dans le milieu réactionnel, comme l'avait décrit l'équipe de Goekjian.<sup>130</sup> Au bout de 2 heures de réaction, l'analyse RMN du proton a révélé alors la présence du galactal de départ et de l'époxyde avec un ratio 1:1. Lorsque 4 équivalents d'Oxone sont utilisés, l'époxyde est exclusivement formé mais la purification sur gel de silice n'a pas permis d'isoler cet époxyde et seul le diol correspondant a été obtenu montrant ainsi la fragilité de ce composé sur silice. Ce dernier a finalement été isolé avec un rendement de 83% après dissolution du produit brut dans le toluène et filtration afin de s'affranchir de l'agent de transfert de phase.

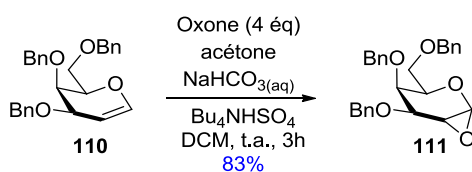


Schéma 153 - Préparation de l'époxyde à partir du galactal

Nous avons ensuite appliqué les conditions décrites par l'équipe de Rainier<sup>125</sup> pour former l'anomère  $\alpha$  en utilisant le trivinylalane, formé à partir du chlorure d'aluminium et de trois équivalents de bromure de vinylmagnésium. Le composé vinylique **107 $\alpha$**  a été isolé avec un rendement de 40% (Schéma 154) et la configuration de la position anomérique a été déterminée par RMN <sup>1</sup>H après benzylation de la position 2, et est en accord avec les données de la littérature.<sup>108</sup>

<sup>129</sup> P. Cheschev, A. Marra, A. Dondoni, *Carbohydrate Res.* **2006**, *341*, 2714-2716.

<sup>130</sup> D. Lafont, J. D'attoma, R. Gomez, P. G. Goekjian, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, *22*, 1197-1204.

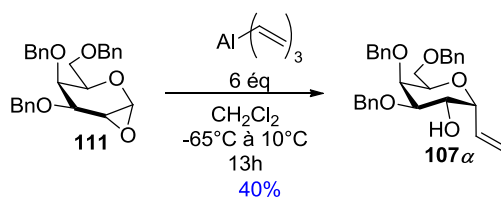


Schéma 154 - Ouverture de l'époxyde par le trivinylalane

L'ouverture de l'époxyde **111** en présence de 4 équivalents de bromure de vinylmagnésium dans le dichlorométhane à  $-60^{\circ}\text{C}$  a aussi été effectuée. A notre grande surprise, seul l'anomère  $\alpha$  **107 $\alpha$**  a été isolé avec un rendement de 23% (Schéma 155). Le spectre RMN  $^1\text{H}$  est identique à celui obtenu avec la réaction avec le trivinylalane.

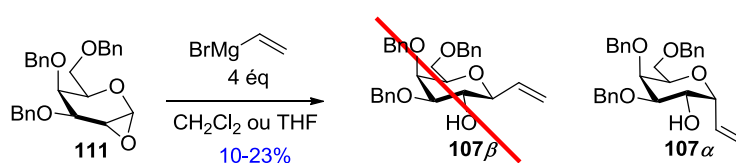


Schéma 155 - Ouverture d'époxyde par un organomagnésien

Nous avons pensé que l'organomagnésien devait se complexer à l'époxyde, ce qui semble être la condition pour former l'anomère  $\alpha$  (Schéma 156) comme pour les dérivés aluminiques. L'utilisation du THF, un solvant plus complexant, pourrait favoriser la formation de l'anomère  $\beta$ , mais encore une fois, l'anomère  $\alpha$  a été obtenu avec un rendement de 10% (Schéma 155). Il faut préciser que cette réaction a également été effectuée en série glucose et l'anomère  $\alpha$  a été obtenu majoritairement ( $\alpha/\beta$  10:1) avec un rendement de 21%.

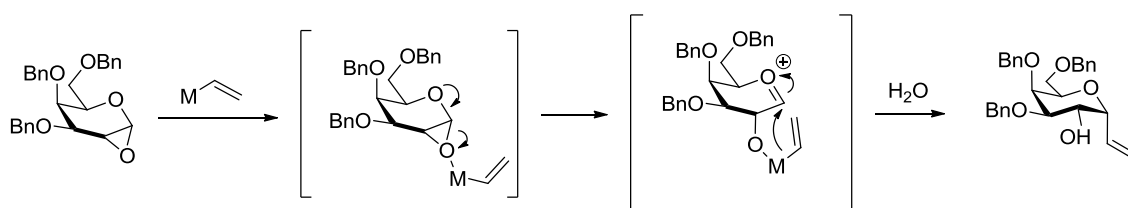


Schéma 156 - Transfert intramoléculaire favorisant l'anomère  $\alpha$

Bien que l'époxyde soit facile à préparer à partir du glycol correspondant, l'addition d'un organomagnésien n'a pas conduit à l'anomère  $\beta$  comme décrit dans la littérature et surtout les rendements faibles n'ont pas permis d'accéder aux C-vinyl-glycosides en quantité suffisante. Cette voie de synthèse a donc été abandonnée.

### II-3. Séquence isomérisation/métathèse

La stratégie mettant en œuvre une séquence isomérisation/métathèse à partir de C-allyl-glycosides a été envisagée car ces substrats peuvent être obtenus en peu d'étapes et cette méthode permet d'utiliser des sucres comportant des groupements protecteurs variés.

- Allylation

Le 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-1-allyl-1-désoxy- $\alpha$ -D-galactopyranose **100 $\alpha$**  a été préparé à partir du galactose pentaacétate commercial, en présence d'allyltriméthylsilane et d'éthérate de trifluorure de bore dans l'acétonitrile (Schéma 157), avec un rendement insatisfaisant de 21%.

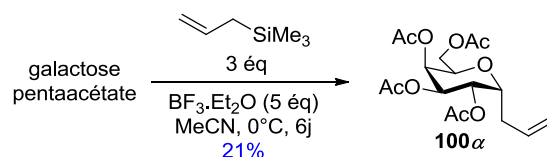


Schéma 157 - Allylation du galactose pentaacétate

L'*α*-C-allyl-galactoside **101 $\alpha$**  est obtenu après allylation de l'intermédiaire **28** en présence d'allyltriméthylsilane et du triflate de triméthylsilyle dans l'acétonitrile a conduit exclusivement à l'anomère **101 $\alpha$**  avec un rendement de 40%. La sonification<sup>131</sup> a permis de diminuer le temps de réaction et d'augmenter le rendement à 56% (Schéma 158).

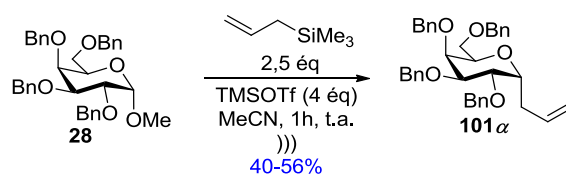


Schéma 158 - Allylation du 1-*O*-méthyl-galactoside perbenzylé

- Isomérisation/métathèse

Les composés allyliques ont ensuite été isomérisés en présence d'un catalyseur au palladium au reflux du toluène pendant 5 jours. L'utilisation de chlorure de palladium n'a pas permis d'avoir une conversion. En revanche, le chlorure de bis(benzonitrile)palladium a donné lieu à une isomérisation incomplète (ratio 70:30) quels que soient les groupements protecteurs présents sur le substrat de départ (Schéma 159). Dans les deux cas, les deux isomères n'ont pas pu être séparés par chromatographie sur gel de silice. Face à cette difficulté, cette voie de synthèse a été abandonnée.

<sup>131</sup> D. V. Jarikote, C. O'Reilly, P. V. Murphy, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6776-6778.

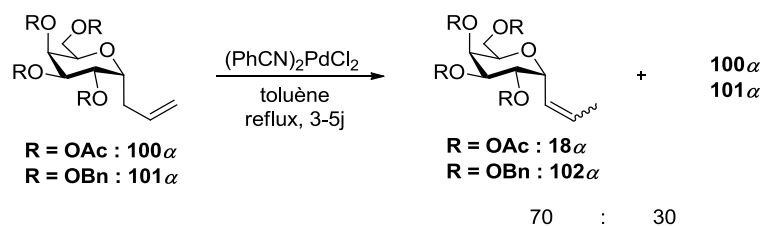


Schéma 159 - Séquence isomérisation/métathèse

## II-4. Réduction contrôlée d'un alcyne

La synthèse de l'anomère  $\alpha$  du C-vinyl-galactoside par réduction contrôlée de l'alcyne correspondant décrit par l'équipe de Franck<sup>110</sup> a attiré notre attention. Etant donné que Dondoni *et al.*<sup>132</sup> ont rapporté la synthèse sélective des anomères  $\alpha$  ou  $\beta$  de C-éthynyl-glycosides, cette stratégie nous est apparue particulièrement intéressante. Leurs conditions opératoires ont donc été appliquées en série galactose, glucose et mannose. Les alcynes des différentes séries ont donc été obtenus à partir d'un même synthon, à savoir les lactols dont la préparation en série galactose a déjà été présentée (Schéma 160). Les lactols en série glucose et mannose sont préparés en deux étapes à partir des glycosides de méthyle **112** et **113** correspondants dont la première étape a été la benzylation des groupements hydroxyles. La fonction acétal des composés **114** et **115** a ensuite été hydrolysée en milieu acide pour accéder aux lactols **116** et **117** (Schéma 160) avec des rendements moyens de 68% à 53% respectivement.

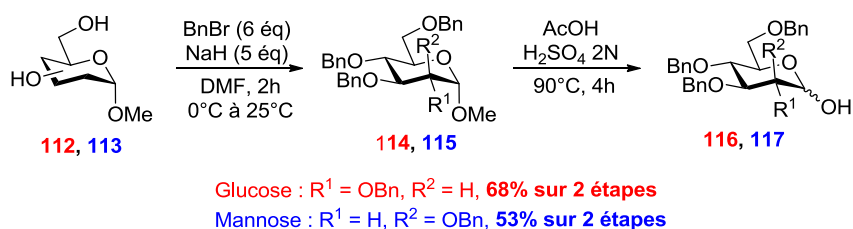
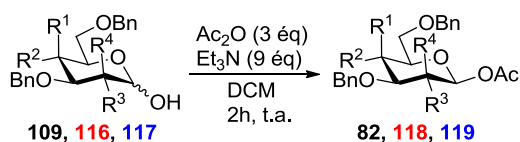


Schéma 160 - Synthèse du synthon commun dans en série glucose et mannose

### a) Synthèse des alcynes de configuration $\alpha$

Les lactols (**109**, **116** et **117**) ont été traités par de l'anhydride acétique en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane pour conduire aux acétates (**82**, **118** et **119**) avec de bons rendements pour les 3 séries (Schéma 161). Il faut noter qu'en série mannose, un mélange d'anomères a été obtenu (ratio  $\alpha/\beta$  1:1) mais cela n'a aucune conséquence pour la prochaine étape de C-glycosylation.

<sup>132</sup> A. Dondoni, G. Mariotti, A. Marra, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4475-4486.



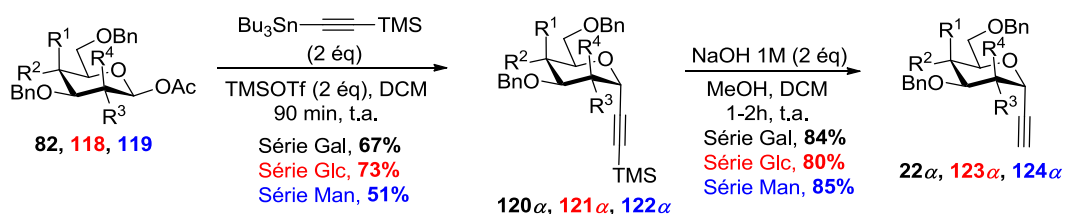
S\u00e9rie Gal, R<sup>1</sup> = OBn, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = OBn, R<sup>4</sup> = H, **60%**

S\u00e9rie Glc, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OBn, R<sup>3</sup> = OBn, R<sup>4</sup> = H, **67%**

S\u00e9rie Man, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OBn, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = OBn, **74%**

Sch\u00e9ma 161 - Synth\u00e8se des ac\u00e9tates \u00e0 partir des lactols

L'utilisation d'un d\u00e9riv\u00e9 stannyl\u00e9 en pr\u00e9sence d'un acide de Lewis permet d'acc\u00e9der exclusivement \u00e0 l'anom\u00e8re  $\alpha$ . L'\u00e9quipe d'Isobe a pr\u00e9sum\u00e9 que la s\u00e9lectivit\u00e9 est guid\u00e9e par des effets st\u00e9reo\u00e9lectroniques favoris\u00e9s dans une approche axiale, entre l'ion oxonium g\u00e9n\u00e9r\u00e9 *in situ* et l'alcyne.<sup>133</sup> La C-glycosylation des ac\u00e9tates par un d\u00e9riv\u00e9 stannyl\u00e9 en pr\u00e9sence de TMSOTf dans le dichlorom\u00e9thane a ainsi permis d'acc\u00e9der aux alcynes (**120 $\alpha$ -122 $\alpha$** ), de configuration  $\alpha$  seulement, pour les 3 s\u00e9ries avec des rendements mod\u00e9r\u00e9s (Sch\u00e9ma 162). L'analyse RMN <sup>1</sup>H a montr\u00e9 en effet que l'hydrog\u00e8ne en position anom\u00e9rique avait un d\u00e9placement chimique autour de 4.8 ppm pour les 3 s\u00e9ries,<sup>132</sup> caract\u00e9ristique d'une configuration \u00e9quatoriale, les protons \u00e9tant plus d\u00e9blind\u00e9s. Le traitement basique a fourni finalement les alcynes (**22 $\alpha$ , 123 $\alpha$  et 124 $\alpha$** ) avec d'excellents rendements (Sch\u00e9ma 162).



Sch\u00e9ma 162 - Pr\u00e9paration des alcynes de configuration  $\alpha$

## b) Synth\u00e8se des alcynes de configuration $\beta$

Les alcynes de configuration  $\beta$  peuvent \u00eatre obtenus \u00e0 partir des glyconolactones. L'oxydation des lactols (**116-117**) a \u00e9t\u00e9 men\u00e9e dans les m\u00eames conditions que pr\u00e9c\u00e9demment pour conduire aux lactones (**125 et 126**) correspondantes avec de bons rendements (Sch\u00e9ma 163).

<sup>133</sup> T. Nishikawa, Y. Koide, S. Kajii, K. Wada, M. Ishikawa, M. Isobe, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 687-700.



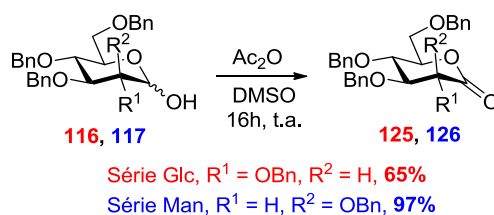


Schéma 163 - Synthèse des lactones 125 et 126

L'addition sur les lactones s'effectue en utilisant un organocérium. Ce type de réactif est plus nucléophile et moins basique que les organolithiens<sup>134</sup> ce qui limite des réactions secondaires lors de l'addition sur la lactone. Le triméthylsilylacétylène a donc été traité par du *n*-butyllithium pour former l'organolithien correspondant qui a subi ensuite une transmétallation en présence de chlorure de cérium pour accéder à l'organocérium.

Après l'addition nucléophile sur chacune des lactones, le brut réactionnel a été mis en réaction, sans purification, en présence de triéthylsilane et d'éthérate de trifluorure de bore pour accéder exclusivement à l'anomère  $\beta$  en série galactose (**120 $\beta$** ) et glucose (**121 $\beta$** ) (Schéma 164). L'analyse RMN <sup>1</sup>H a montré en effet que l'hydrogène en position anomérique avait un déplacement chimique autour de 4.1 ppm pour les 2 séries,<sup>132</sup> caractéristique d'une configuration axiale, les protons étant moins déblindés. En revanche, un mélange d'anomères a été obtenu en série mannose (**122 $\alpha$**  et **122 $\beta$** ) ( $\alpha/\beta$  1:2). Le traitement basique donne finalement les alcynes (**22 $\beta$** , **123 $\beta$**  et **124 $\beta$** ) avec d'excellents rendements (Schéma 164). En série mannose, les deux anomères sont facilement séparable après clivage du groupement silylé.

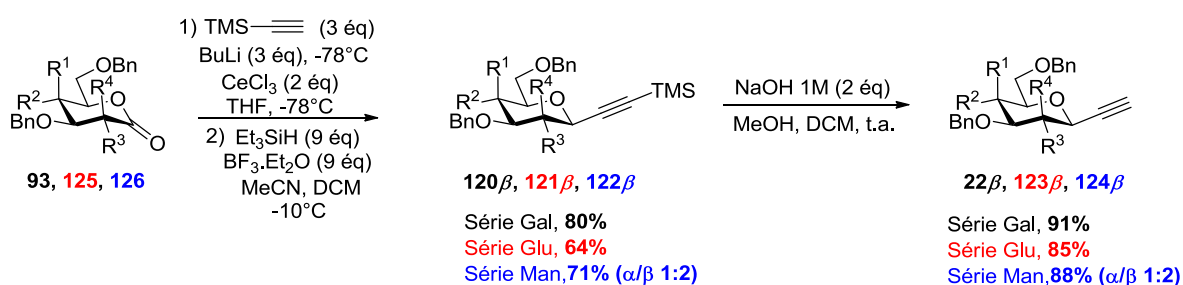


Schéma 164 - Préparation des alcynes de configuration  $\beta$

La formation exclusive de l'anomère  $\beta$  résulte de la stabilisation de l'état de transition dans la conformation <sup>4</sup>C<sub>1</sub> lors de la réduction de l'hémiacétal par effet anomère (Schéma 165), défini par l'hyperconjugaison entre le doublet non liant de l'oxygène et l'orbitale anti-liante

<sup>134</sup> G. Bartoli, E. Marcantoni, M. Marcolini, L. Sambri, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6104-6143.

de la nouvelle liaison C-H formée dans l'état de transition.<sup>135</sup> La présence d'un groupement axial en position 2 (cas du mannose) déstabilise cet état de transition ce qui mène à un mélange d'anomères.

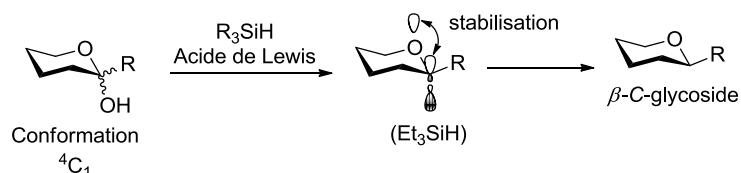


Schéma 165 - Mécanisme supposé pour la réduction

### c) Synthèse des alcynes dérivés de *N*-acétylgalactosamines

Pour la préparation des alcynes comportant un groupe acétamido en position 2, deux voies étaient envisageables, la première à partir du 2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-désoxyglycopyranose et la deuxième à partir du 3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-nitroglycal. Ces deux composés peuvent être isolés à partir du glycal correspondant. Pour ce projet, la série galactose a uniquement été étudiée.

Lorsque nous avons traité le 3,4,6-tri-*O*-benzyl-*D*-galactal **110** par l'azoture de sodium en présence de CAN dans l'acétonitrile,<sup>136</sup> un mélange complexe de nombreux produits difficilement séparables a été obtenu et cela n'a pas permis d'isoler les deux anomères attendus (Schéma 166). Dans un deuxième temps, le 3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-nitro-*D*-galactal **125** a été préparé selon les conditions décrites par Schmidt *et al.*<sup>137</sup> avec un rendement de 82% sur deux étapes (Schéma 166).

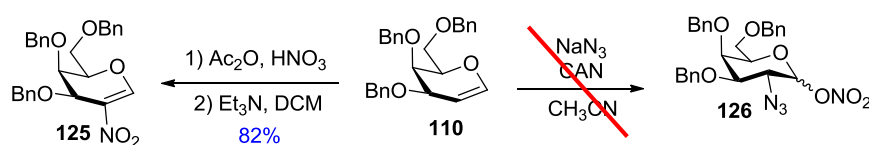


Schéma 166 – Préparation des dérivés azotés

Afin d'accéder rapidement aux dérivés vinyliques, l'addition conjuguée de bromure de vinylmagnésium sur le nitrogalactal **125** a d'abord été réalisée selon un protocole décrit par Vankar *et al.*<sup>138</sup> mais dans notre cas, un mélange de trois produits peu séparables a été obtenu. L'analyse RMN du proton, d'une fraction purifiée, a semblé être en accord avec les résultats de Vankar *et al.* Ces deux composés sont les deux anomères **127 $\alpha$**  et **127 $\beta$**  de la série

<sup>135</sup> M. Terauchi, H. Abe, A. Matsuda, S. Shuto, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3751-3754.

<sup>136</sup> A. Marra, L. K. S. Shun, F. Gauffeny, P. Sinay, *Synlett*, **1990**, *8*, 445-448.

<sup>137</sup> J. Das, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1609-1613.

<sup>138</sup> G.Reddy, Y. D. Vankar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2001-2004.

galactose. Le troisième composé pourrait être un dérivé du talose comme l'ont mentionné les auteurs (Schéma 167).

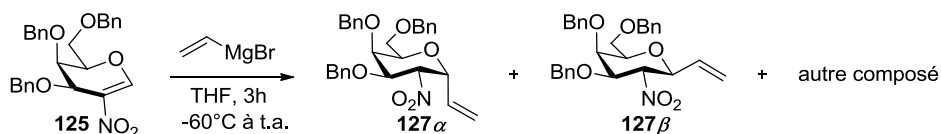


Schéma 167 - Addition du bromure de vinylmagnésium sur le nitrogalactal

Face à ce résultat peu concluant, nous avons alors opté pour la stratégie décrite précédemment, à savoir la réduction contrôlée d'alcyne. L'introduction de la fonction alcyne a été effectuée selon une méthode décrite par l'équipe de Pannecoucke<sup>139</sup> en série glucose. L'addition de l'alcynure du triméthylsilylacétylène, formé *in situ*, sur le nitrogalactal **125** conduit aux deux anomères **128α** et **128β** du composé attendu, séparables par chromatographie sur gel de silice. Les anomères β et α ont été isolés respectivement avec des rendements de 40% et de 30% (Schéma 168) et ont été clairement identifiés. Sur le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé le moins polaire, un doublet à 5,22 ppm correspondant au signal du proton anomérique avec une constante de couplage de 5,8 Hz a été observé, ce qui est en accord avec la présence de l'anomère α. Pour le deuxième composé isolé, le spectre RMN <sup>1</sup>H a présenté pour le proton anomérique, un doublet à 4,45 ppm avec une grande constante de couplage de 10,0 Hz, caractéristique d'une relation *trans* entre les deux hydrogènes H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub> ce qui est le cas de l'anomère β.

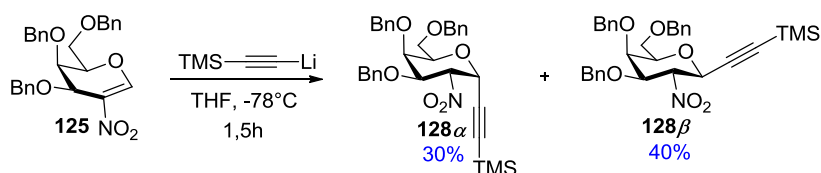


Schéma 168 - Addition de l'alcynure sur le nitrogalactal

La réduction a ensuite été effectuée en présence de zinc en milieu acide puis l'amine brute obtenue a été traitée par l'anhydride acétique en présence de triéthylamine pour conduire aux deux dérivés (**129α** et **129β**) comportant un groupe acétamido en position 2 avec des rendements de 74 et 82%. Le clivage du TMS en milieu basique a permis d'accéder aux deux alcynes (**130α** et **130β**) avec des rendements excellents de 97 et 94% (Schéma 169).

<sup>139</sup> T. Delaunay, T. Poisson, P. Jubault, X. Pannecoucke, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3341-3345.

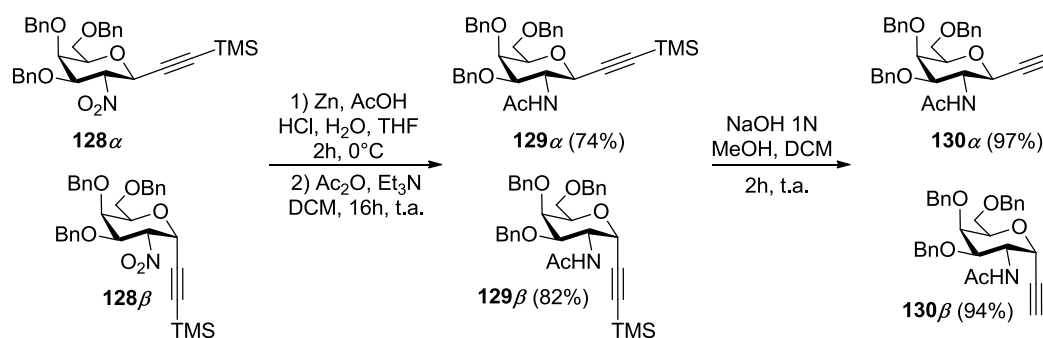


Schéma 169 - Synthèse des alcynes dérivés de galactosamine

#### d) Accès aux C-vinyl-glycosides

Disposant des différents alcynes, nous avons procédé à la réduction contrôlée selon la procédure décrite par Franck *et al.*<sup>110</sup> L'utilisation d'une charge de catalyseur à 66% en masse leur a permis d'isoler le composé vinylique avec un rendement de 94% après 1 heure de réaction. Ce protocole a été reproduit avec l'alcyne **22β** en série galactose. Après 30 minutes de réaction, le suivi de réaction par CCM a montré la conversion totale du composé de départ et la formation de deux composés légèrement moins polaires. Après purification, un mélange du composé vinylique attendu et de l'alcane correspondant, issu de la sur-réduction, a été obtenu avec un ratio 1:1. La réduction de la charge catalytique à 20% a permis d'avoir une réduction contrôlée après 1 heure sous atmosphère d'hydrogène avec un rendement de 80% à une échelle de 0.35g sans la moindre trace du produit issu de la sur-réduction. Le même rendement a été obtenu lorsque la réduction est effectuée sur une échelle de 0,8 g.

Ces conditions sont reproductibles pour les anomères  $\beta$  en série glucose et mannose avec de bons rendements de 81 et 84% (Schéma 170). Pour la réduction contrôlée des anomères  $\alpha$ , le suivi CCM n'a pas été possible car l'alcyne et l'alcène avaient le même  $R_f$ . La réaction a été systématiquement stoppée après 1 h de réaction. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  a montré que la réaction était complète. Dans ces conditions, les  $\alpha$ -C-vinyl-glycosides ont été isolés avec des rendements compris entre 84 et 87% (Schéma 170). Quant aux deux anomères des C-vinyl-galactosamines, la conversion n'a pas été totale après 6h de réaction. L'analyse RMN  $^1\text{H}$  a montré un ratio alcyne/vinyl de 3:7 pour l'anomère **130β**. Le manque de solubilité dans l'acétate d'éthyle peut être la cause de ce manque de réactivité. Un mélange méthanol/THF (1:1) a permis de pallier le manque de solubilité et les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  ont été obtenus respectivement avec un rendement de 88% et 62%. Il est important de signaler que cette réduction contrôlée a pu être effectuée sur une échelle de 4 g pour l' $\alpha$ -C-vinyl-galactoside.

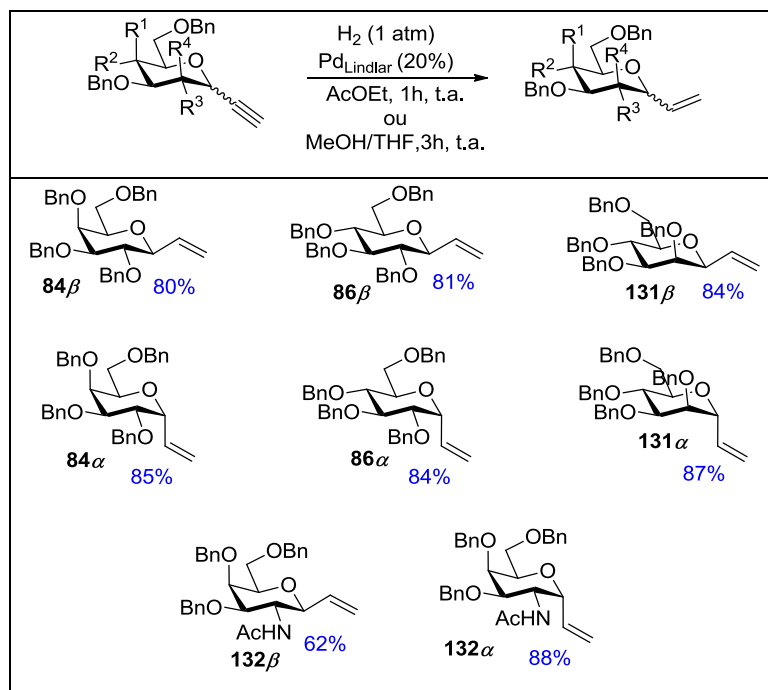


Schéma 170 - Réduction contrôlée d'alcynes

### III - Cycloaddition 1,3-dipolaire des nitrones

#### III - 1. Généralités<sup>140</sup>

Les réactions de cycloaddition (3+2) permettent de former facilement des cycles à 5 chaînons à partir d'un dipôle 1,3 et d'un dipolarophile (alcène, alcyne...). Les dipôles 1,3 peuvent être classés en deux catégories : les dipôles 1,3 de type anion propargylique (diazalkanes, azotures, oxyde de nitrile...) et de type anion allylique (ozone, nitrones, ylures d'azométhine...) (Schéma 171).

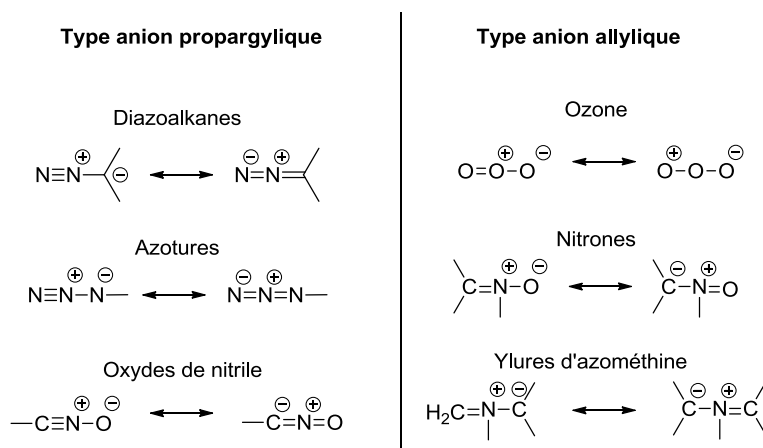


Schéma 171 - Exemples de dipôles 1,3

<sup>140</sup> S. Kobayashi, K. A. Jorgensen (Ed), *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, **2002**, pp. 211-247.

La cycloaddition 1,3-dipolaire des nitrones est certainement celle où il y a le plus de travaux décrits car ce dipôle est facilement accessible.<sup>141</sup> De plus, la plupart des nitrones sont stables même à température ambiante. Lorsque le dipolarophile utilisé est un alcène, un cycle isoxazolidine est formé. Ce motif est retrouvé dans un certain nombre de composés naturels<sup>141</sup> notamment dans des familles d'alcaloïdes. D'un point de vue synthétique, le cycle isoxazolidine peut être issu d'une cycloaddition (3+2) entre une nitronne et une oléfine où sont créées à la fois une liaison carbone-carbone et carbone-oxygène. C'est une réaction concertée qui correspond à un processus en une seule étape où la molécule passe par un état de transition sans intermédiaire réactionnel.

### a) Interactions des Orbitales Moléculaires frontières

L'état de transition d'une cycloaddition concertée sous l'effet d'une activation thermique est contrôlé principalement par les orbitales moléculaires frontières (OMF) des substrats. L'orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée par au moins un électron (HO) interagit avec l'orbitale non occupée la plus basse en énergie (BV). Ainsi, il existe 3 types d'interactions basés sur les énergies relatives des OMF entre le dipôle 1,3 et le dipolarophile<sup>142</sup> (Schéma 172). Ainsi, dans les réactions de types I ou à demande électronique normale, l'interaction OMF prédominante est celle entre la  $HO_{\text{dipôle}}$  et la  $BV_{\text{dipolarophile}}$ . Pour les réactions de type II, la similarité entre l'écart d'énergie  $HO_{\text{dipôle}}-BV_{\text{dipolarophile}}$  et  $HO_{\text{dipolarophile}}-BV_{\text{dipôle}}$  traduit que ces deux interactions HO-BV sont importantes. Les réactions de type III ou à demande électronique inverse sont déterminées par l'interaction entre  $HO_{\text{dipolarophile}}$  et  $BV_{\text{dipôle}}$ . La présence de groupements électro-donneurs ou électro-attracteurs sur le dipôle ou le dipolarophile peut modifier les énergies des OMF relatives.

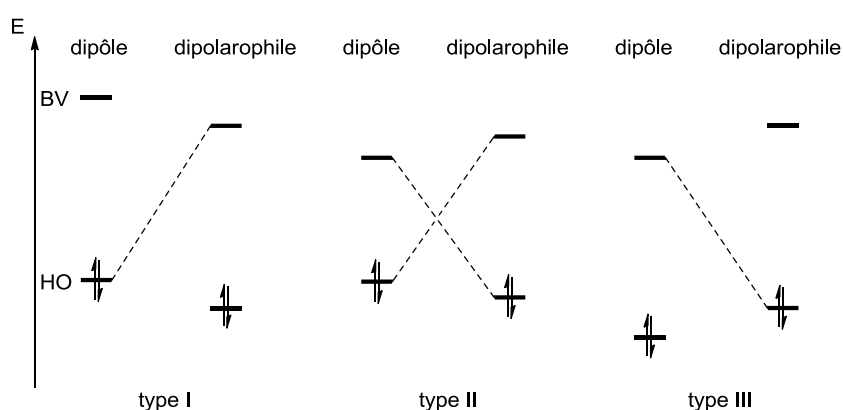


Schéma 172 - Types d'interactions dans les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire

<sup>141</sup> a) G. Soldaini, F. Cardona, A. Goti, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 473-476. b) Henry Feuer (Ed), *Nitrile oxides, nitrones and nitronates in organic synthesis : Novel strategies in Synthesis*, Wiley, **2008**, pp. 129.

<sup>142</sup> R. Sustmann, *Pure Appl. Chem.* **1974**, *40*, 569-593.

## b) Cas des réactions catalysées

Lorsque la réaction est sous contrôle orbitalaire, plus la différence énergétique entre les OMF est faible, plus la cycloaddition est favorisée. Les niveaux énergétiques des OMF dépendent non seulement des effets électroniques des substituants des substrats mais également de la présence éventuelle d'un acide de Lewis souvent en quantité catalytique pour permettre de réaliser la réaction de cycloaddition à plus basse température (Schéma 173). Ainsi, dans des cycloadditions (3+2) à demande électronique normale et dans le cas de l'utilisation de nitrones, l'acide de Lewis va se complexer au dipolarophile (type acrylate) qui va induire une diminution de sa BV et favoriser la réactivité du système. Dans les réactions à demande électronique inverse, l'acide de Lewis va complexer l'oxygène de la nitronne ce qui mène à une diminution de sa BV et favorise la réactivité du système.

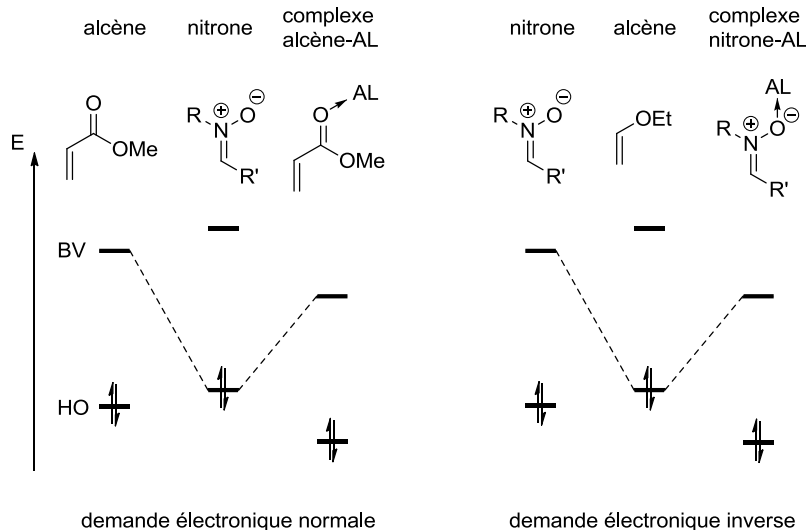


Schéma 173 - Effet d'un acide de Lewis sur la cycloaddition 1,3-dipolaire

## c) Régiosélectivité

La cycloaddition (3+2) des nitrones avec des alcènes monosubstitués (cas de notre étude) peut mener au cycle isoxazolidine avec deux régioisomères possibles (Schéma 174). L'encombrement stérique et les effets électroniques jouent un rôle important au niveau de la régiosélectivité. Un dipolarophile riche en électrons et monosubstitué (éthers vinyliques) ou neutre (oléfines simples) favorisera la formation du régioisomère-3,5 en raison d'effets électroniques et stériques (Schéma 174). Au contraire, lorsqu'un dipolarophile monosubstitué et pauvre en électron (acrylates) est utilisé, un mélange de deux régioisomères peut être obtenu car les effets électroniques favorisent la formation du régioisomère-3,4 (contrôlée par la taille des coefficients des OMF) alors que les effets stériques favorisent l'obtention du régioisomère-3,5.

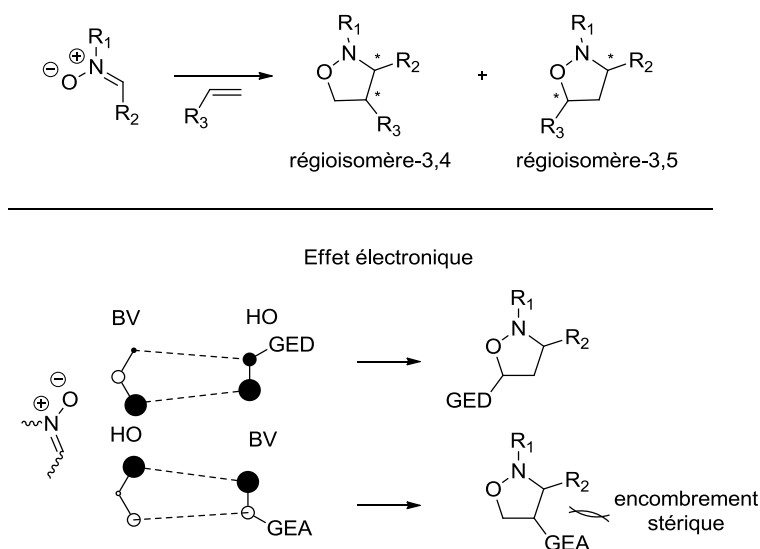


Schéma 174 - Régiosélectivité de la cycloaddition 1,3-dipolaire des nitrones

#### d) Stéréosélectivité

La formation de chaque régioisomère peut conduire à 4 stéréoisomères (4 diastéréoisomères si un des substrats de départ est chiral, ou deux couples d'énantiomères) car deux centres stéréogènes sont créés. La stéréosélectivité dépend de la discrimination des approches *endo/exo* et de la discrimination faciale (face *Re* ou *Si* de la nitrone) (Schéma 175).<sup>143</sup> Dans les réactions de cycloaddition, le produit majoritaire est généralement le produit *endo* (produit cinétique). Ce dernier est thermodynamiquement le moins stable puisqu'il résulte de l'approche la plus encombrée. L'approche *endo* est favorisée par des interactions orbitales secondaires en phase qui peuvent donc suppléer la gêne stérique. Cependant, pour les cycloadditions 1,3-dipolaires, ces interactions secondaires sont moins importantes que pour une réaction de Diels-Alder. Quant à l'approche *exo*, celle-ci est privilégiée dans des conditions thermodynamiques qui requièrent généralement une simple augmentation de la température de la réaction.

<sup>143</sup> M. Berthet, T. Cheviet, G. Dujardin, I. Parrot, J. Martinez, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 15235-15283.



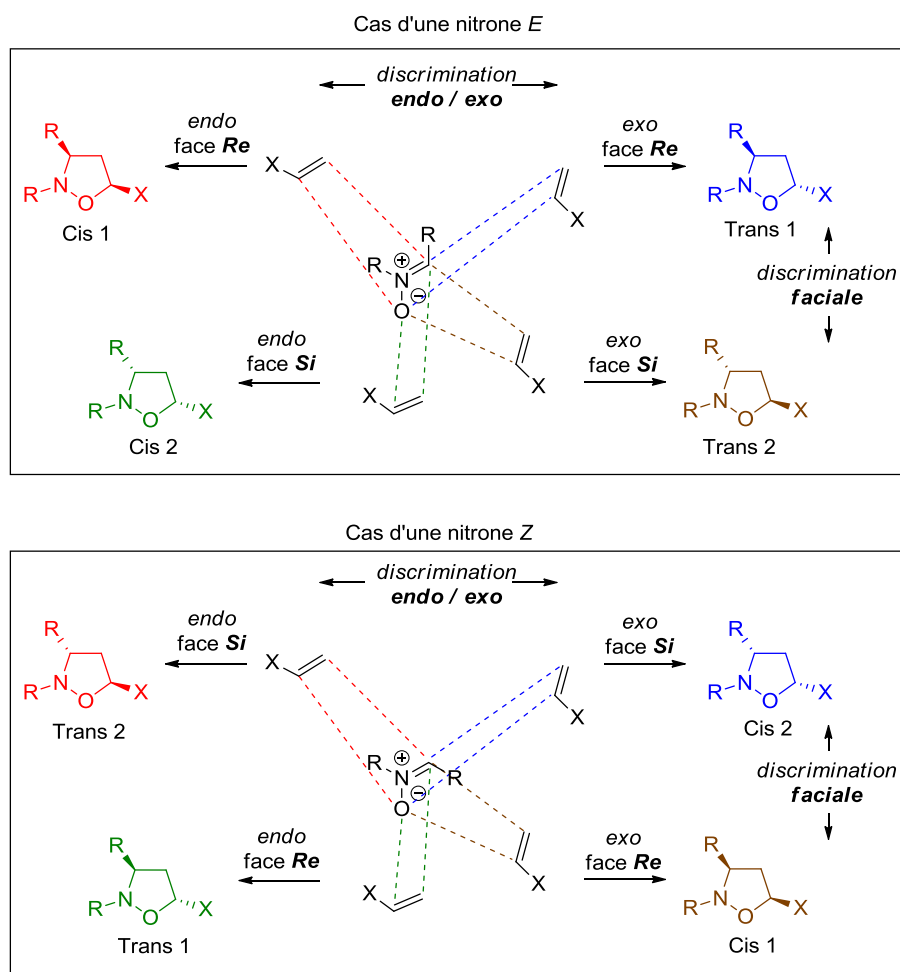


Schéma 175 - Stéréosélectivité de la cycloaddition [3+2]

Certaines nitrones peuvent exister dans un équilibre configurationnel entre deux isomères *Z* et *E* ce qui rend difficile l'obtention d'un bon stéréocontrôle. En effet, dans le cas d'une nitrone *E*, l'approche *endo* mène aux isomères *cis* tandis que pour une nitrone *Z*, l'approche *endo* conduit aux isomères *trans*. A titre d'exemple, l'adduit *cis*-1 peut être obtenu soit par une approche *endo* via la face *Re* de la nitrone *E* et la face *Si* du dipolarophile, soit par une approche *exo* via la face *Re* de la nitrone *Z* et la face *Si* du dipolarophile (Schéma 175).

### III - 2. Cycloaddition (3+2) de nitrones avec des oléfines dérivées de sucres

Notre étude concerne la cycloaddition 1,3-dipolaire de nitrones avec des oléfines dérivées de sucres. Dans les paragraphes suivants, nous présenterons des exemples de cycloaddition (3+2) avec ces types de dipolarophile et plus particulièrement avec des glycofuranosides ou pyranosides comportant une double liaison C=C.

### a) Avec des C-allyl-glycosides

Les travaux de Westermann<sup>144</sup> décrivent une réaction de cycloaddition (3+2) diastéréosélective et régiosélective réalisée entre la nitrone chirale **133**, issue de la L-menthone et le C-allyl-galactoside **101 $\alpha$**  au reflux du toluène pendant 36h pour accéder au seul cycloadduit **134** avec un rendement de 82% (Schéma 176).

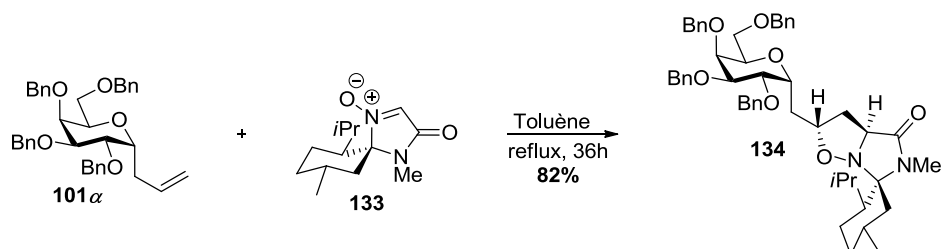


Schéma 176 - Cycloaddition [3+2] entre un C-allyl-galactoside et une nitrone chirale

Le régioisomère-3,5 est exclusivement formé pour minimiser l'encombrement stérique et les effets électroniques favorisent cette régiosélectivité. Concernant la stéréosélectivité, la nitrone chirale cyclique permet d'une part de bloquer la conformation *E* du dipôle-1,3, et d'autre part, d'avoir une discrimination faciale dû au groupement isopropyle de la nitrone. L'approche *exo* et la face *Si* de la nitrone sont aussi favorisées pour minimiser les effets d'encombrement stérique (Schéma 177). Les auteurs mentionnent également une cycloaddition avec l'anomère  $\beta$  du C-vinyl-glucoside mais aucun rendement et caractérisation ne sont décrits.

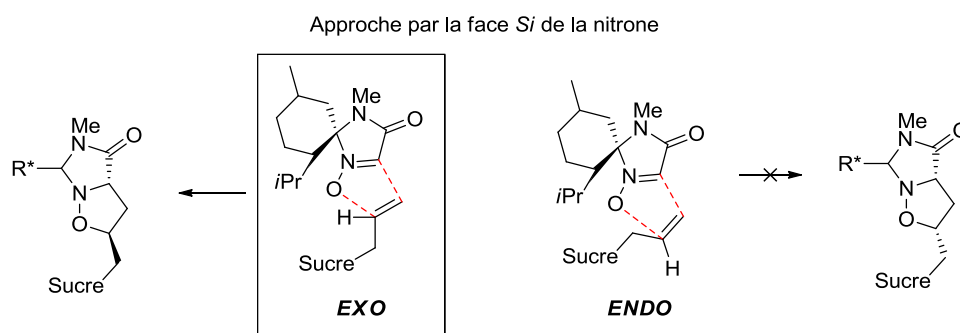


Schéma 177 - Différentes approches de la cycloaddition

### b) Avec des O-, NH- et S-allyl-glycosides

En 2012, l'équipe de Praly<sup>145</sup> a décrit la cycloaddition (3+2), basée sur les travaux de Westermann, entre différents motifs allyliques (**135-140**) et la nitrone chirale **133**. La

<sup>144</sup> B. Westermann, A. Walter, U. Flörke, H-J. Altenbach, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1375-1378.

<sup>145</sup> K. Aouadi, M. Msaddek, J-P. Praly, *Tetrahedron*, **2012**, 68, 1762-1768.

cycloaddition, réalisée au reflux du toluène pendant 3 à 5 jours, a mené aux différents cycloadduits (**141-145**) avec de très bons rendements compris entre 71% et 86% (Schéma 178). Cependant, la cycloaddition entre la nitroène **133** et la *N*-allyl-glucoside **140** conduit à la formation du cycloadduit attendu **146** avec un rendement de seulement 7% car une rupture de la liaison *N*-osidique s'est produite aboutissant au composé **147** avec un rendement de 60%.

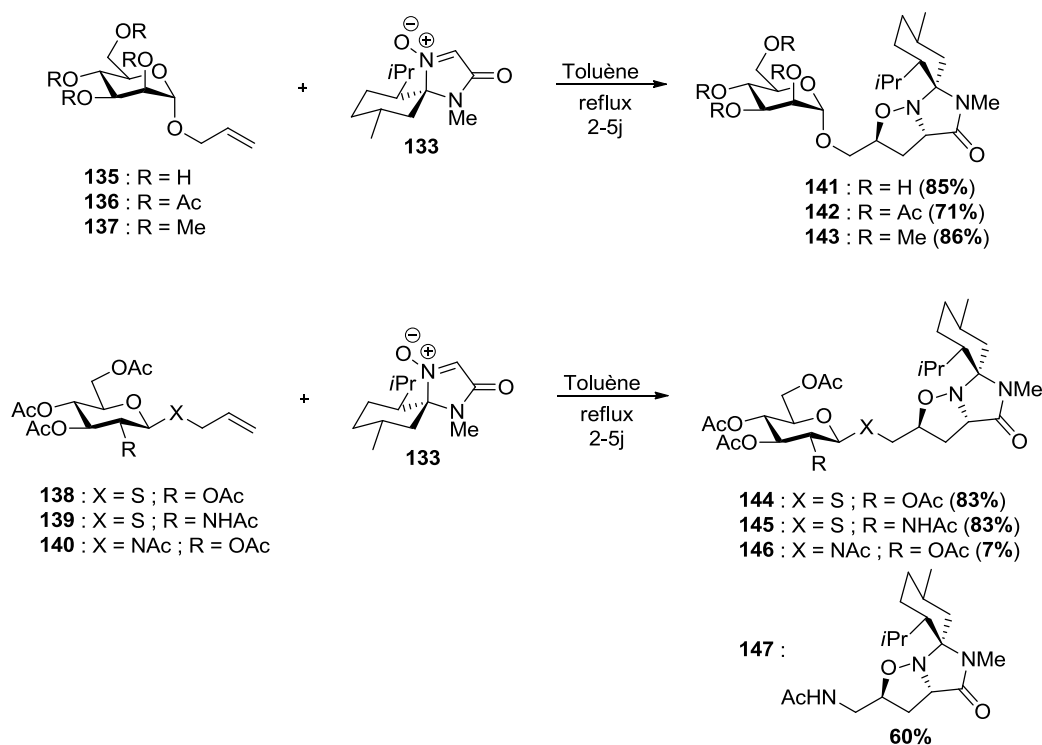


Schéma 178 - Cycloaddition [3+2] avec des *O*, *NH* et *S*-allylglycosides

### c) Avec des *exo*-glycols

L'équipe d'Ikegami<sup>146</sup> s'est intéressée à la synthèse de structures spiroisoxazolidines *via* une cycloaddition entre l'*exo*-glucal **148** et la nitroène **149** en présence de différents acides de Lewis. La cycloaddition réalisée au reflux du toluène permet d'accéder seulement à deux diastéréoisomères **150** et **151** avec un rendement de 43% et 52%, où le carbone C3 est de configuration *R*, les diastéréoisomères de configuration *S* n'étant pas observés. Les auteurs ont également montré que la meilleure sélectivité avait été obtenue lorsque de l'éthérate de trifluorure de bore dans le dichlorométhane à une température comprise de -78°C à 0°C avait été utilisé. L'isomère  $\alpha$  **150** est ainsi obtenu majoritairement avec un rendement de 72% et l'isomère  $\beta$  **151** avec un rendement de 6% (Schéma 179).

<sup>146</sup> X. Li, H. Takahashi, H. Ohtake, S. Ikegami, *Heterocycles* **2003**, 59, 547-571.

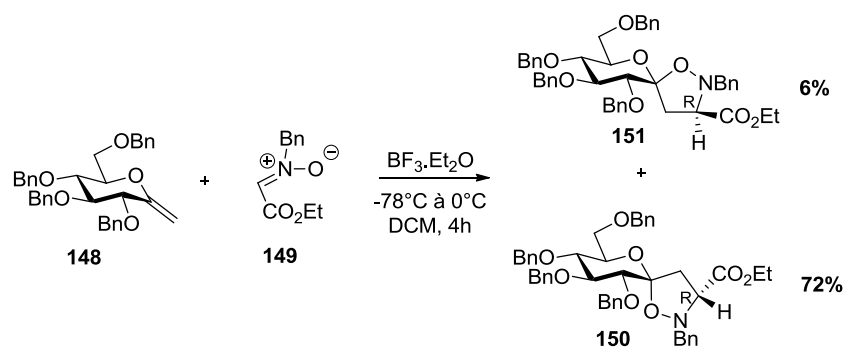


Schéma 179 - Cycloaddition entre une nitronne et des exo-glycals

La même équipe<sup>147</sup> s'est aussi intéressée à la synthèse de disaccharides *via* une cycloaddition stéréosélective entre les *exo*-glycals (**148**, **152**, **153**) et la nitronne **154**, dérivée du D-glucose (Schéma 180). En série glucose, la cycloaddition est diastéréosélective (carbone C3 de configuration *R* seulement), et a mené aux deux isomères  $\alpha$  (**156**) et  $\beta$  (**155**), avec des rendements respectifs de 17% et 52% (Tableau 10). En série galactose et mannose, la cycloaddition a conduit à un seul isomère  $\alpha$  avec des rendements respectifs de 53% et 51% (Tableau 6). Les auteurs n'ont pas mentionné les causes de la différence de réactivité mais il semble que le groupement benzyloxy en position axiale (C-4 en série galactose et C-2 en série mannose) puisse induire un encombrement stérique menant à la formation d'un seul produit.

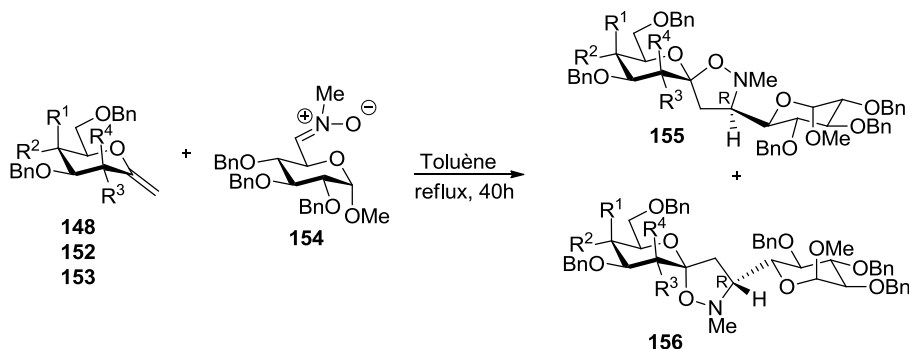


Schéma 180 - Cycloaddition stéréosélective entre une nitronne dérivée du D-glucose et des exo-glycals

Tableau 6

	R1	R2	R3	R4	Rdt 155	Rdt 156
<b>148 (Glc)</b>	H	OBn	OBn	H	17%	52%
<b>152 (Gal)</b>	OBn	H	OBn	H	-	53%
<b>153 (Man)</b>	H	OBn	H	OBn	-	51%

<sup>147</sup> X. Li, H. Takahashi, H. Ohtake, S. Ikegami, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 4123-4126.

En 2013, l'équipe de Chapleur<sup>148</sup> a décrit la cycloaddition 1,3-dipolaire sous activation micro-ondes entre les exo-glycals furanosides (**157** et **158**), dérivés du mannose, et la nitrone chirale **159** (Schéma 181). Pour chaque dipolarophile, un seul cycloadduit a été obtenu avec des rendements de 83% (**160**) et 60% (**161**). La discrimination faciale a été induite par le groupement acétonide de l'exo-glycal qui encombre une face. Ainsi, la nitrone chirale a pu approcher par la face opposée à celle de l'acétonide. De plus, c'est la face *Re* de la nitrone qui a réagi ce qui définit un effet match.

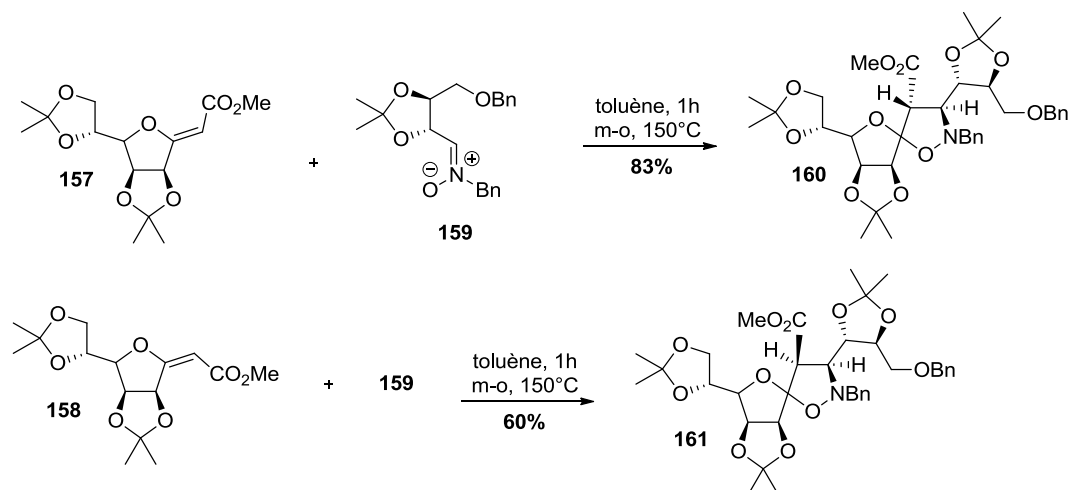


Schéma 181 - Cycloaddition avec des oléfines dérivées de furanosides

### c) Avec des 5-C-vinyl-glycosides

Un exemple de cycloaddition avec des *C*-vinyl-glycosides a été décrit par Wightman<sup>149</sup> avec une fonction alcène située sur la position 5 du galactose. La réaction entre le dipolarophile dérivé du D-galactopyranoside **162** et la nitrone **163** au reflux du toluène a ainsi conduit majoritairement au cycloadduit **164** (isomère *exo-anti*) et par une approche sur la face *Re* de la nitrone **163**, avec un rendement de 88% (Schéma 182). L'isomère *exo-syn* est également formé à l'état de traces (1%).

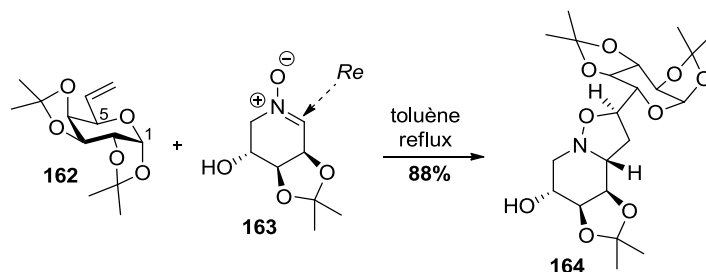


Schéma 182 - Cycloaddition entre une nitrone cyclique et un 5-C-vinyl-galactoside

<sup>148</sup> H. Oukani, N. Pellegrini-Moïse, O. Jackowski, F. Chrétien, Y. Chapleur, *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 205-214.

<sup>149</sup> F. Duff, V. Vivien. R. Wightman, *Chem. Commun.* **2000**, 2127-2128.

Un autre exemple de cycloaddition, où la fonction alcène se trouve sur la position 5 du galactose, a été décrit par Sarli.<sup>150</sup> La réaction entre le *Z*-acrylate dérivé du *D*-galactopyranosyle **165** et la nitroène **166** au reflux du toluène a permis l'obtention du cycloadduit **167** attendu contaminé par deux autres diastéréoisomères non identifiés. Les auteurs ont montré que l'addition de triéthylamine en quantité catalytique menait à une stéréosélectivité totale en faveur du cycloadduit **167** avec un rendement de 75% (Schéma 183). Cette stéréosélectivité pourrait être justifiée par le blocage de la conformation de la nitroène sous sa forme *E* par la triéthylamine.

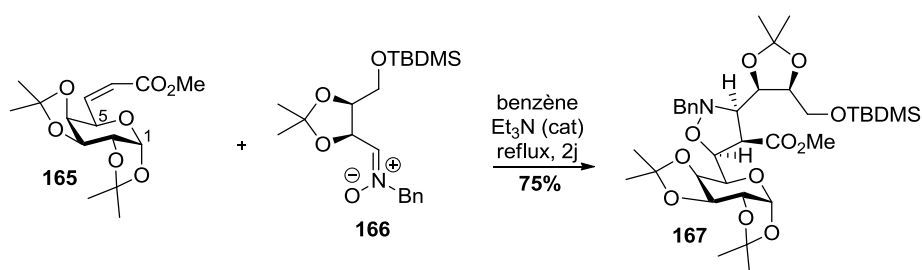


Schéma 183 - Cycloaddition entre une nitroène acyclique et un 5-C-vinyl-galactoside

#### d) Avec des glycols

L'équipe de Brandi<sup>151</sup> a rapporté la cycloaddition (3+2) entre des glycols et des nitroènes cycliques énantiopures. La faible réactivité des glycols a nécessité un excès de nitroène et un temps de réaction de plusieurs jours pour conduire aux cycloadduits avec des rendements compris entre 12% et 68%. Le groupement benzyloxy en position 4 du galactal protégé a permis de contrôler l'approche faciale de la cycloaddition en guidant ainsi la nitroène (Schéma 184). De plus, l'approche *exo* a été favorisée pour minimiser les effets d'encombrement stérique.

L'utilisation d'une nitroène chirale **168**, dérivée de l'acide *D*-tartrique, a permis d'avoir un effet match avec les glycols, le groupement *tert*-butyle en position 3 de la nitroène étant opposé au glycol (Schéma 184). Au contraire, la nitroène chirale **169** dérivée de l'acide *L*-tartrique a favorisé un effet mismatch dû à l'encombrement du groupement *tert*-butyle ce qui pourrait expliquer la diminution de la réactivité mentionnée par les auteurs (Schéma 184).

<sup>150</sup> N. G. Argyropoulos, V. C. Sarli, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 4237-4240.

<sup>151</sup> F. Cardona, S. Valenza, S. Picasso, A. Goti, A. Brandi, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7311-7318.

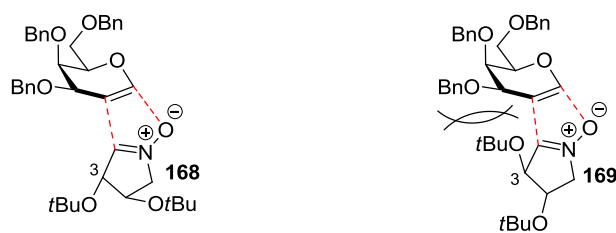


Schéma 184 - Cycloaddition entre une nitrone et un glycal

### III - 3. Nos résultats

A notre connaissance, aucun exemple de cycloaddition 1,3-dipolaire sur des *C*-vinylglycosides (vinyl en position 1 du galactose) n'a été décrit dans la littérature scientifique. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons l'étude de cette réaction en présence de différentes nitrones.

#### a) Utilisation d'une nitrone acyclique

Pour préparer nos analogues *C*-glycosidiques du 4-déoxy-KRN7000, notre stratégie de synthèse prévoit, pour l'introduction de la chaîne sphingosine, d'ajouter un dérivé organométallique sur un amide de Weinreb qui pourrait être obtenu soit à partir de l'acide carboxylique, soit de l'ester correspondant (Schéma 185). C'est pour cette raison que nous avons souhaité utiliser une nitrone issue du glyoxylate d'éthyle car cela permet l'obtention d'une isoxazolidine directement fonctionnalisée en position 3 par un groupement ester. Disposant de la nitrone dérivée de la *N*-benzylhydroxylamine en quantité suffisante au laboratoire,<sup>152</sup> nous avons souhaité étudier la réactivité de cette nitrone vis-à-vis des deux anomères du *C*-vinyl-galactoside.

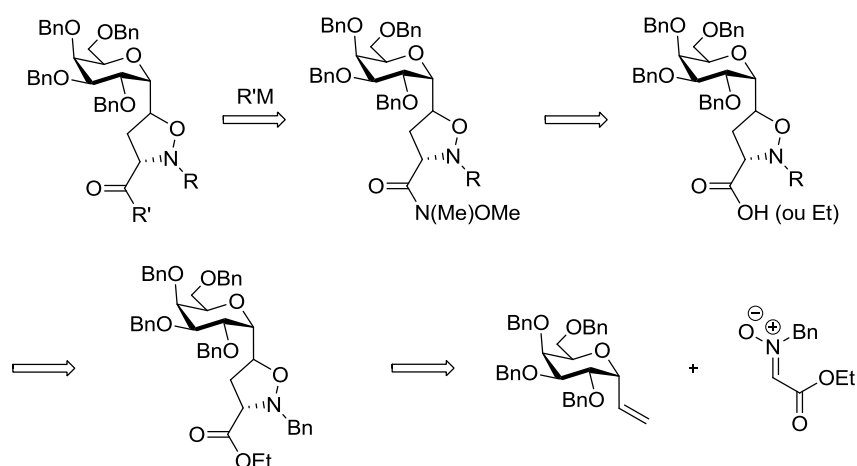


Schéma 185 - Rappel de la stratégie envisagée

<sup>152</sup> T. B. Nguyen, A. Martel, R. Dhal, G. Dujardin, *Synthesis*, **2009**, *18*, 3174-3176.

La réaction entre l'anomère  $\alpha$  **84** $\alpha$  et la nitrone **149** dans le toluène à 100°C pendant 31h a conduit à la formation de deux diastéréoisomères **170** $\alpha$  et **171** $\alpha$  détectables sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit brut avec un ratio de 3:1. Les deux diastéréoisomères sont difficilement séparables par chromatographie sur gel de silice et un rendement de 76% a été obtenu (Schéma 186).

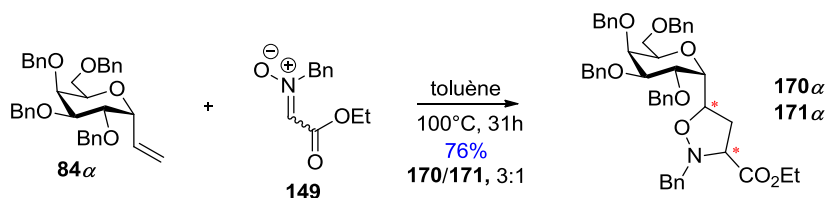


Schéma 186 - Réactivité du C-vinyl-galactoside  $\alpha$  avec une nitrone acylique

L'étude du spectre NOESY du diastéréoisomère majoritaire **170** $\alpha$  a montré que le proton H-1' est corrélé avec l'un des protons du CH<sub>2</sub> du cycle isoxazolidine tandis que le proton H-3' est corrélé avec le second proton du CH<sub>2</sub> ce qui justifie la relation *trans* des protons H-1' et H-3' (Schéma 187). Il faut préciser que le proton du CH<sub>2</sub>, corrélé au proton H-3', est également corrélé au proton anomérique H-1.

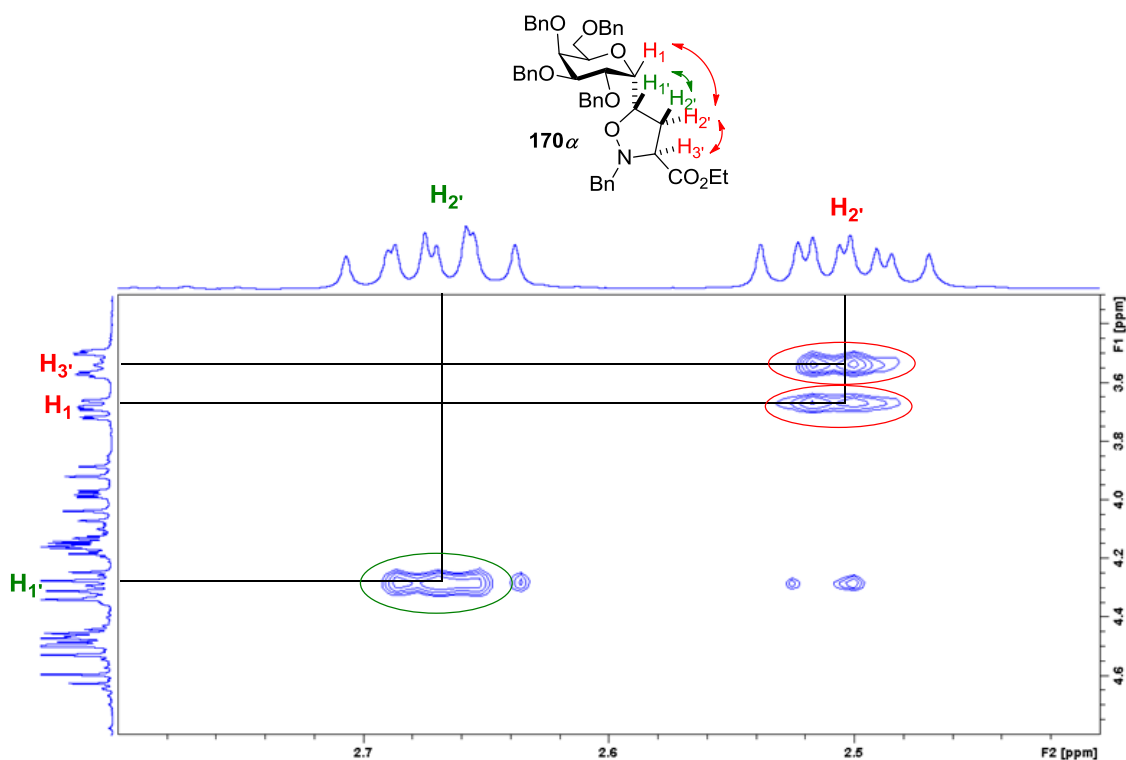


Schéma 187 - NOESY du composé *trans* majoritaire



L'étude du spectre NOESY du composé **171 $\alpha$**  a montré qu'un seul des protons du CH<sub>2</sub> est corrélé avec les protons H-1' et H-3' ce qui justifie la relation *cis* des protons H-1' et H-3' (Schéma 188). Il faut préciser que le second proton du CH<sub>2</sub> est corrélé seulement au proton anomérique H-1.

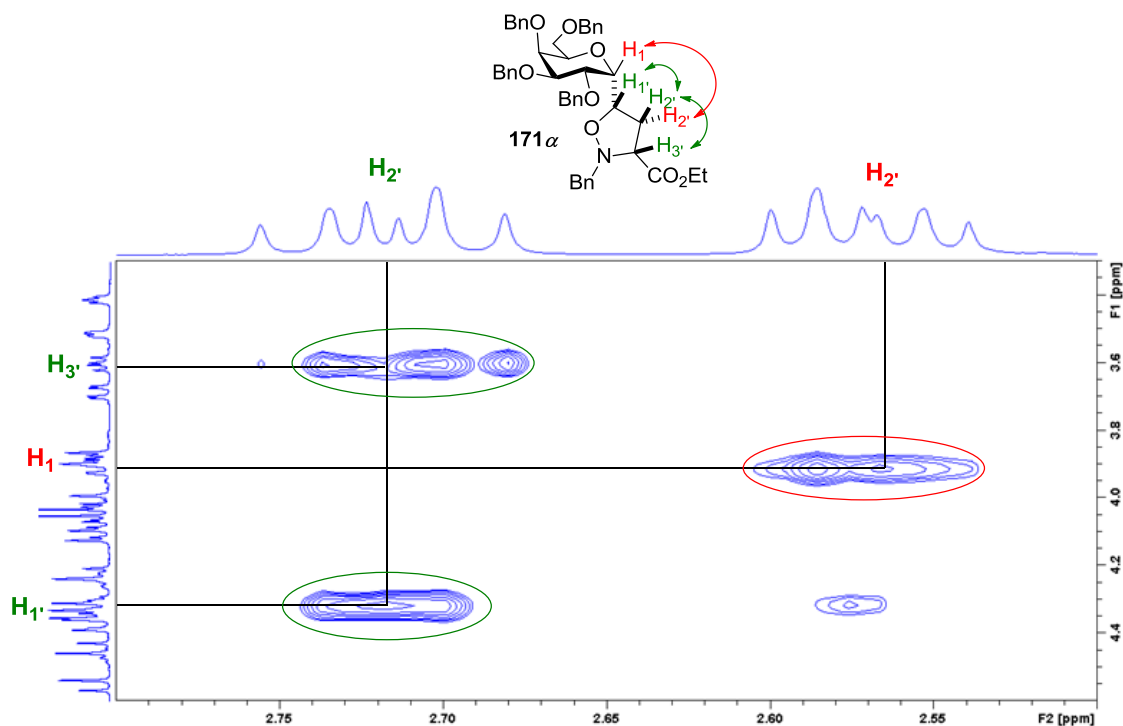


Schéma 188 - NOESY du composé *cis* minoritaire

Avec l'anomère **84 $\beta$** , en utilisant les mêmes conditions opératoires que précédemment, deux diastéréoisomères **170 $\beta$**  et **171 $\beta$**  ont également été détectés sur le spectre RMN <sup>1</sup>H du produit brut dans un ratio de 2:1. La séparation des deux diastéréoisomères a également été difficile et un rendement de 64 % a été obtenu pour cette réaction (Schéma 189). Les analyses des spectres NOESY montrent que le diastéréoisomère majoritaire est le composé *trans* et le composé minoritaire est le *cis*.

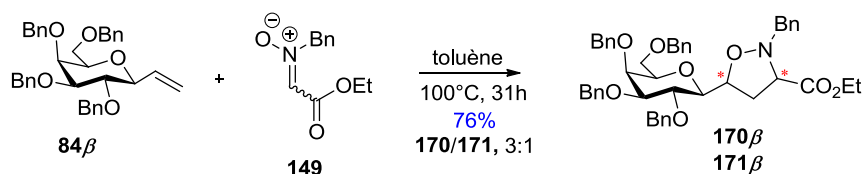


Schéma 189 - Réactivité du C-vinyl-galactoside  $\beta$  avec une nitronne acyclique

Que ce soit avec l'anomère  $\alpha$  ou  $\beta$ , le diastéréoisomère majoritaire est le composé *trans* qui résulte d'une approche *exo* de l'isomère *E* de la nitronne qui est la forme la plus

réactive malgré une répulsion stérique entre les groupements benzyle et ester. Pour la nitrone de configuration *E*, il n'y a pas d'interactions électrostatiques entre les deux atomes d'oxygène comme c'est le cas pour celle de configuration *Z*.<sup>136</sup> Cette interconversion *Z/E* rapide en solution conduit à un mélange de diastéréoisomères difficilement séparables. Afin de contrôler cette sélectivité *cis/trans*, deux options sont possibles. La première consiste à fixer la conformation en utilisant un acide de Lewis chélatant et la deuxième est d'utiliser une nitrone cyclique afin d'imposer la géométrie *E*. Nous avons choisi la deuxième option, à savoir l'utilisation d'une nitrone cyclique.

### b) Utilisation d'une nitrone cyclique achirale

Le choix de la nitrone cyclique achirale permet d'étudier l'effet du dipolarophile chiral sur la discrimination de l'approche faciale.

- Préparation de la nitrone

La nitrone cyclique **174** a donc été préparée en trois étapes à partir du chlorhydrate de méthyle **172**. Ce sel a d'abord été mis en réaction avec la méthylamine à température ambiante pendant 24h pour conduire à l'amide intermédiaire (non isolé) qui a été chauffé au reflux pendant 24h en présence de cyclohexanone, de triéthylamine et de tamis moléculaire 3Å menant à l'aminal de type spiro **173** avec un rendement de 77% sur deux étapes. Une oxydation de ce dernier avec du *m*-CPBA à 0°C pendant deux heures a permis d'accéder à la nitrone **174** avec un rendement de 95% (Schéma 190).

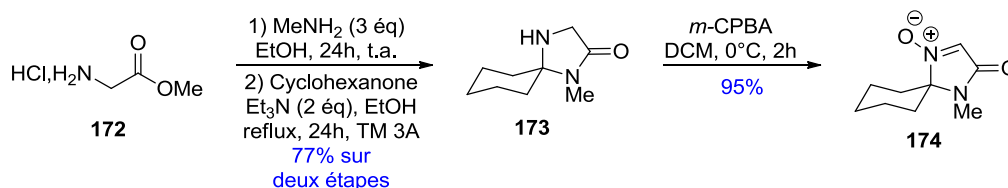


Schéma 190 - Préparation de la nitrone cyclique

- Cycloaddition 1,3-dipolaire

La nitrone cyclique **174** a été engagée avec l'anomère  $\beta$  du *C*-vinylgalactoside dans une réaction de cycloaddition (3+2) (Schéma 191). Une activation thermique a été utilisée et après 70h au reflux du toluène, un mélange de deux isomères **175 $\beta$**  et **176 $\beta$**  a été observé sur le spectre RMN <sup>1</sup>H du produit brut dont le rapport diastéréoisomérique est de 66:34.

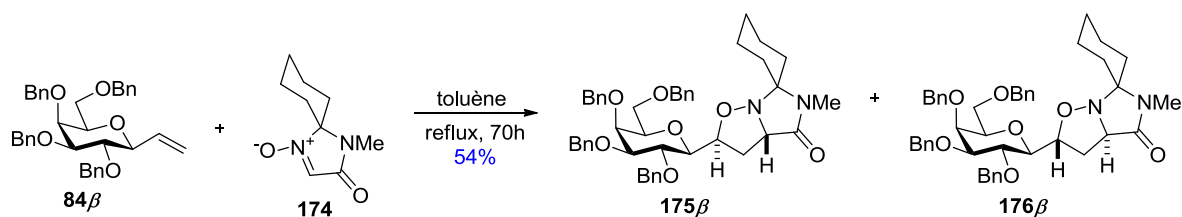


Schéma 191 - Réactivité du C-vinyl-galactoside  $\beta$  avec une nitronne cyclique

Sur le spectre NOESY du composé majoritaire (Schéma 192), une tache de corrélation apparaît clairement entre un des protons H-2' et le proton H-1'. L'autre corrélation est observée entre l'autre proton H-2' et le proton H-3'. Les mêmes corrélations ont été observées sur le spectre NOESY du second diastéréoisomère. Les deux diastéréoisomères obtenus sont donc de configuration *trans*, ce qui signifie qu'il y a eu uniquement une approche *exo* lors de la cycloaddition (3+2). A ce stade, il n'est pour l'instant pas possible de déterminer les configurations absolues de ces deux diastéréoisomères.

La formation des deux diastéréoisomères *trans* signifie qu'il n'y a pas de discrimination faciale au niveau de la nitronne. Chaque face est attaquée sans aucune contrainte stérique. Le « blocage » de l'une des faces de la nitronne est donc nécessaire pour l'obtention d'un seul diastéréoisomère.

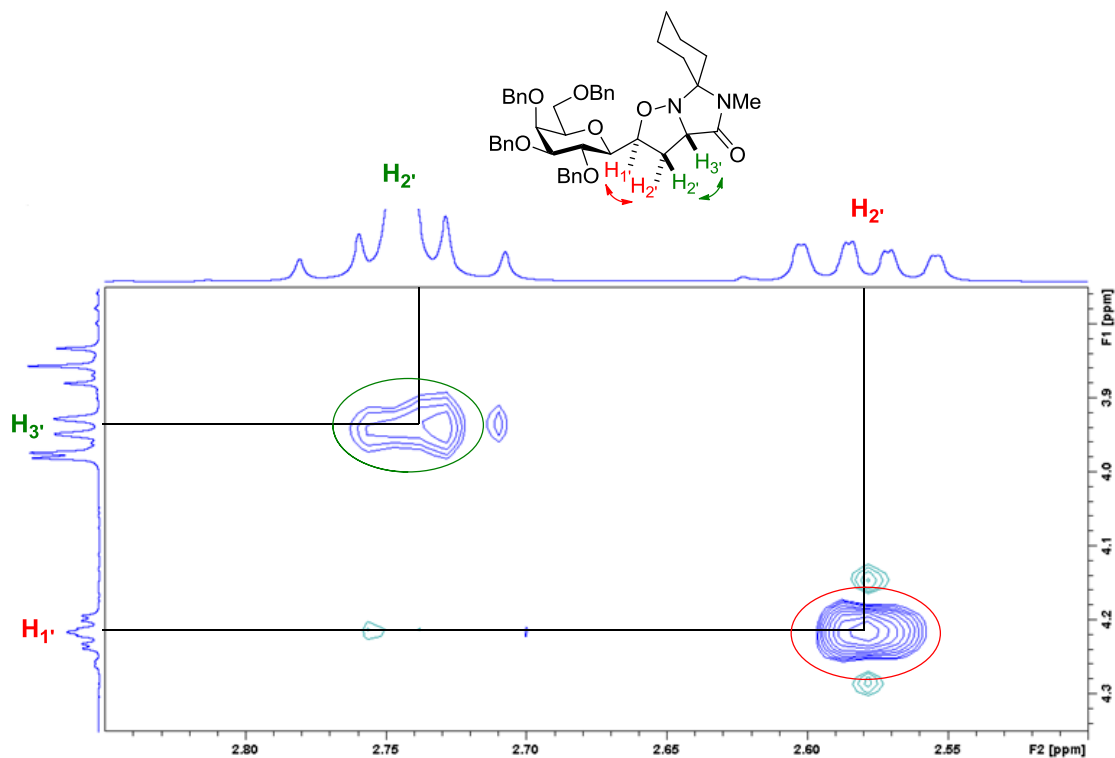


Schéma 192 - NOESY du composé *trans* majoritaire

### c) Avec une nitrone cyclique chirale

Afin d'améliorer la sélectivité faciale, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'une nitrone cyclique chirale qui comporte des groupements induisant une gêne stérique pour favoriser une diastéréosélectivité faciale. Afin d'accéder facilement à un acide ou un ester comme décrit dans notre stratégie (Schéma 185), nous avons d'abord étudié la réactivité de la nitrone de Katagiri **177**. Dans la littérature, la cycloaddition (3+2) entre cette nitrone et le triméthylsilylcyclopentène racémique en présence d'un équivalent de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  conduit à l'isoxazolidine **178** avec un rendement de 69%<sup>153</sup> (Schéma 193). Il faut préciser que la même réaction sans catalyseur nécessite une pression de 800 MPa.<sup>154</sup>

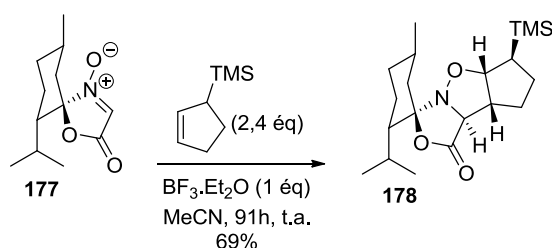


Schéma 193 - Cycloaddition avec la nitrone de Katagiri

Tout d'abord, la nitrone **177** a été synthétisée à partir de la L-menthone et de l'intermédiaire nitroso **180**. Ce dernier est issu de l'acide de Meldrum **179** en 2 étapes avec un rendement de 50% (Schéma 194). Lorsque le composé nitroso **180** est mis en solution en présence de la L-menthone au reflux du toluène, un mélange de deux diastéréoisomères est obtenu avec un rendement de 51% et avec un ratio (1:1). Ces diastéréoisomères sont difficilement séparables par chromatographie sur gel de silice.

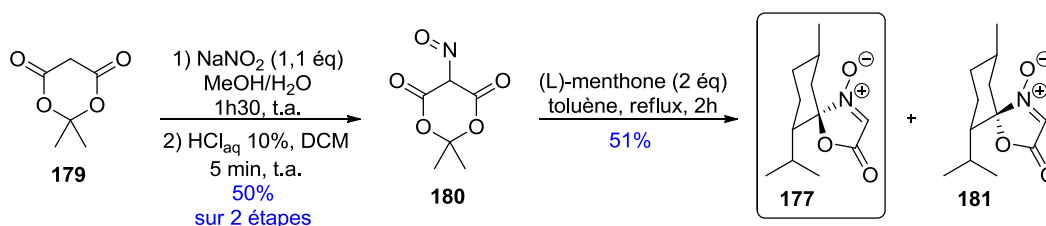


Schéma 194 - Synthèse de la nitrone de Katagiri

Nous avons reproduit les conditions décrites dans la littérature<sup>153</sup> avec la nitrone **177** et le C-vinyl-galactoside **84α**. Nous avons réalisé la cycloaddition sous activation micro-onde à 140°C pendant 6h mais aucune conversion n'a été observée. L'utilisation d'un acide de Lewis

<sup>153</sup> N. Katagiri, M. Okada, Y. Morishita, C. Kaneko, *Chem. Commun.* **1996**, 2137-2138.

<sup>154</sup> N. Katagiri, M. Okada, C. Kaneko, T. Furuya, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 11, 1801-1804.

à température ambiante pendant 72h n'a pas permis non plus d'accéder au cycloadduit **182** attendu (Schéma 195).

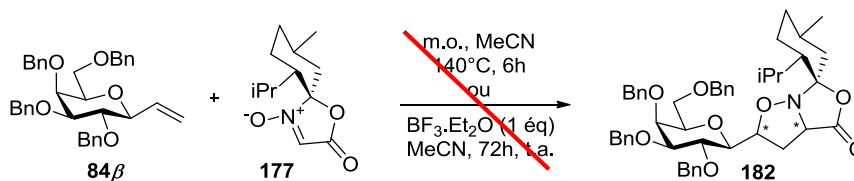


Schéma 195 - Essai de cycloaddition avec la nitrone de Katagiri

La faible réactivité de cette nitrone nous a orienté vers la préparation d'une seconde nitrone décrite par Altenbach.<sup>144</sup> La synthèse de cette nitrone nécessite 3 étapes dont la première est la condensation du dérivé de la glycine **183** (issu du glycinate de méthyle **172**) sur la L-menthone **184** avec un rendement de 38% sur deux étapes (Schéma 196). L'oxydation de l'aminal **185** en présence du *m*-CPBA à 0°C dans le dichlorométhane permet d'accéder à la nitrone **186** attendue sous la forme d'un seul diastéréoisomère avec un rendement de 89%.

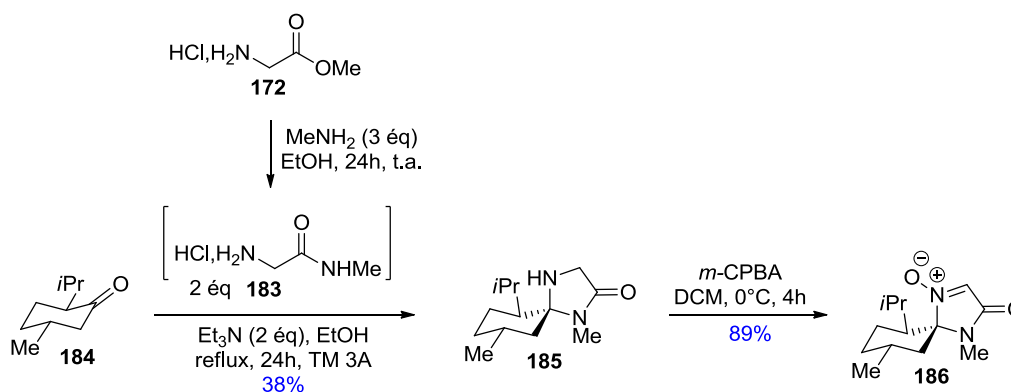


Schéma 196 - Préparation de la nitrone

Après la préparation de la nitrone **186**, nous avons étudié la réaction de cycloaddition (3+2) avec le  $\beta$ -C-vinyl-galactoside **84 $\beta$** . La cycloaddition avec un équivalent de chaque partenaire, réalisée au reflux du toluène pendant 72h, a permis d'accéder au cycloadduit **187 $\beta$**  sous la forme d'un seul diastéréoisomère avec un rendement de 36% en mélange avec des traces de la nitrone de départ (inférieur à 5%) car les composés ont des  $R_f$  très proches et ils sont très difficilement séparables par chromatographie sur gel de silice (Tableau 7, entrée 1). La conversion incomplète observée peut être due à l'encombrement du C-vinyl-glycoside car Westermann a montré que la conversion était complète en utilisant des C-allyl-glycosides **101 $\alpha$** . La cycloaddition au reflux du *p*-xylène pendant 30h a mené au même cycloadduit attendu avec un rendement de 27% (entrée 2). L'augmentation de la température dans de

simples conditions thermiques favorise la dégradation du cycloadduit, les substrats de départ étant stables à cette température.

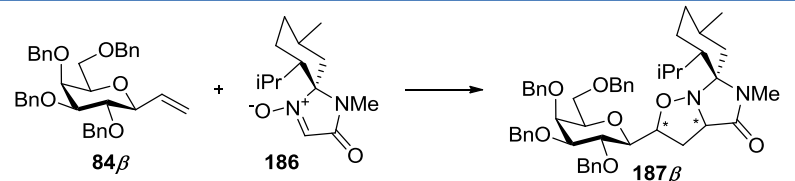
Nous avons ensuite effectué cette réaction en tube scellé à différentes températures. A 140°C (entrée 3) et 160°C (entrée 4), le cycloadduit est obtenu respectivement avec un rendement de 61% et 66% en mélange avec des traces de nitroène (inférieur à 5%). L'augmentation de la température à 180°C (entrée 5) a conduit au cycloadduit avec un rendement de 38% dû à une dégradation du produit de réaction à cette température malgré la diminution du temps de réaction.

L'activation par voie micro-ondes a permis de diminuer le temps de réaction à 7h par rapport au tube scellé (20h) avec des rendements similaires (entrées 3 et 6). L'augmentation de la température a conduit principalement à la dégradation du cycloadduit puisque ce dernier a été obtenu avec un rendement de 35% (entrée 7).

L'augmentation de la concentration a permis aussi de diminuer le temps de réaction sous activation micro-ondes (entrée 8). Le cycloadduit attendu a été obtenu au bout de 2h à 140°C avec un rendement de 75% toujours contaminé par la nitroène de départ (inférieur à 5%). Pour pallier cet inconvénient, le C-vinyl-galactoside a été mis en excès, dans les mêmes conditions que précédemment (entrée 9). Le cycloadduit a ainsi été obtenu avec un rendement de 72% sans trace de nitroène.

L'utilisation de cette nitroène chirale permet d'accéder à un seul diastéréoisomère de configuration *trans*, caractérisé par NOESY (Schéma 197). Le proton H<sub>1</sub>' est corrélé avec l'un des protons du CH<sub>2</sub> du cycle isoxazolidine tandis que le proton H<sub>3</sub>' est corrélé avec le second proton du CH<sub>2</sub> ce qui justifie la relation *trans* des protons H<sub>1</sub>' et H<sub>3</sub>' résultant d'une approche *exo*. Cependant, pour le moment, nous n'avons pas pu déterminer la configuration absolue de ces deux nouveaux centres asymétriques.

Tableau 7 - Optimisation de la cycloaddition [3+2]

		
Entrée	Conditions	Rendement
1	toluène, 110°C, 0.1M, 72h	36%
2	<i>p</i> -xylène, 140°C, 0.1M, 30h	27%
3	toluène, 140°C, 0.1M, 20h, tube scellé	61%
4	toluène, 160°C, 0.1M, 16h, tube scellé	66%
5	toluène, 180°C, 0.1M, 3h, tube scellé	38%
6	toluène, 140°C, 0.1M, 7h, micro-ondes	69%
7	toluène, 160°C, 0.1M, 4h, micro-ondes	35%
8	toluène, 140°C, 0.5M, 2h, micro-ondes	<u>75%</u>
9	toluène, nitronne (0.9 éq), 140°C, 0.5 M, 2h, micro-ondes	<u>72%</u>

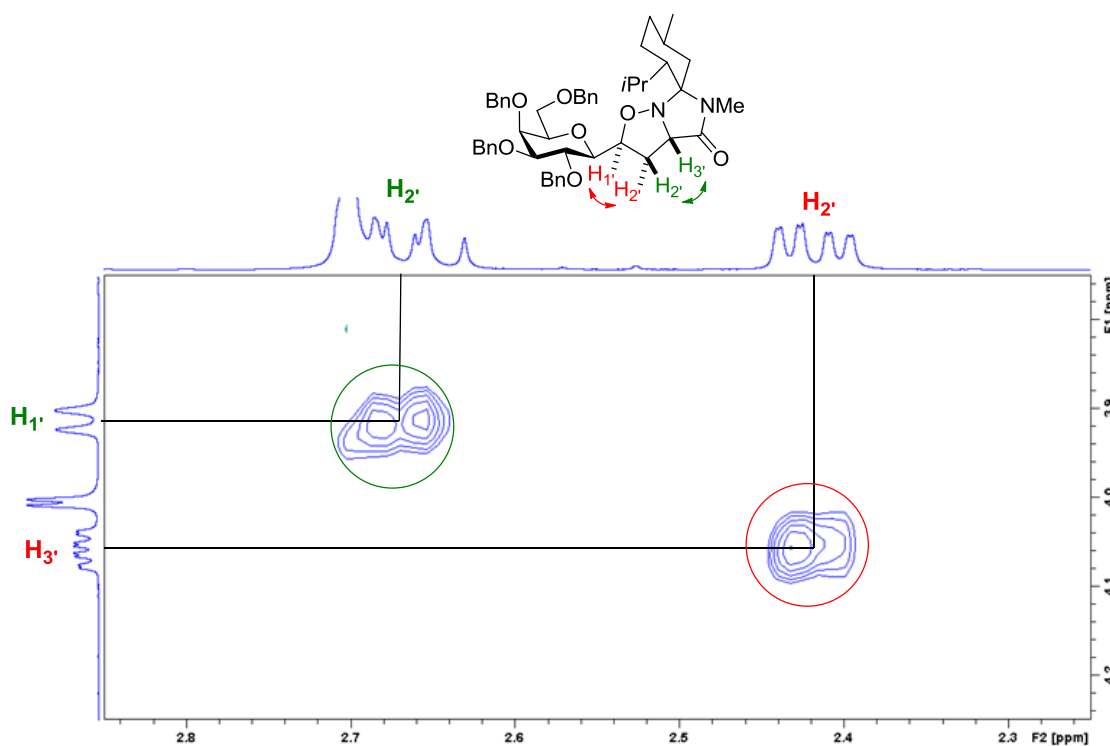


Schéma 197 - NOESY du cycloadduit 187β

Nous avons ensuite appliqué les conditions d'optimisation qui ont consisté à réaliser la cycloaddition (3+2) avec un défaut de nitronne dans le toluène (0,5 M) sous micro-ondes pendant 2h à 140°C pour les anomères  $\beta$  en série glucose et mannose avec des rendements compris entre 72% et 91%. Toutefois, un temps de réaction de 6h a été nécessaire pour les  $\alpha$ -C-vinyl-glycosides, obtenus avec des rendements compris entre 61% et 73%. La cycloaddition (3+2) avec les C-vinyl-galactosamines nécessite un temps de réaction de 8h et les cycloadduits **190 $\alpha$**  et **190 $\beta$**  sont obtenus respectivement avec des rendements de 77% et 65% (Schéma 198).

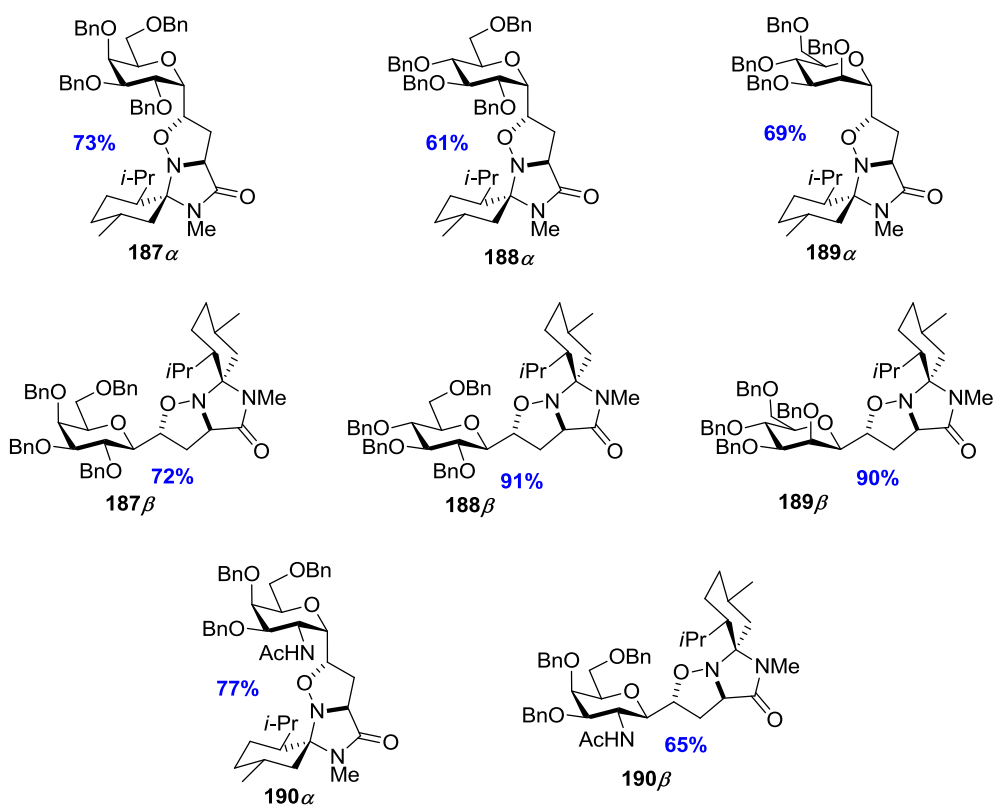


Schéma 198 - Produits issus de la cycloaddition [3+2]



# Chapitre III

Ce chapitre sera consacré à la fonctionnalisation du cycle isoxazolidine, pour accéder aux analogues ciblés. Après clivage de la copule chirale du cycloadduit **187 $\alpha$**  puis acylation avec l'anhydride penténoïque, le composé **A** pourra alors être obtenu. L'introduction de la chaîne sphingosine peut être envisagée selon deux approches possibles :

- soit par addition nucléophile sur l'amide de Weinreb **C** issu de l'ester ou l'acide carboxylique **B** correspondant (approche 1, Schéma 199).
- soit par addition nucléophile d'un organomagnésien sur l'amide secondaire **A** qui serait activé *in situ* (approche 2, Schéma 199).

Après la réduction de la cétone et la déprotection des éthers de benzyles de l'intermédiaire **D**, des analogues contraints **E** de l' $\alpha$ -C-GalCer pourraient être préparés (Schéma 199). La protection du groupement hydroxyle issu de la réduction mentionnée ci-dessus, sous forme d'éther de benzyle mènera au composé **F** (Schéma 200). L'ouverture du cycle isoxazolidine permettra d'accéder aux intermédiaires **G** où la fonction alcool générée pourra être transformée en un groupement méthylène, monofluoro ou difluoro méthylène (Schéma 200), conduisant ainsi à de nouveaux analogues **H** de l' $\alpha$ -C-GalCer.

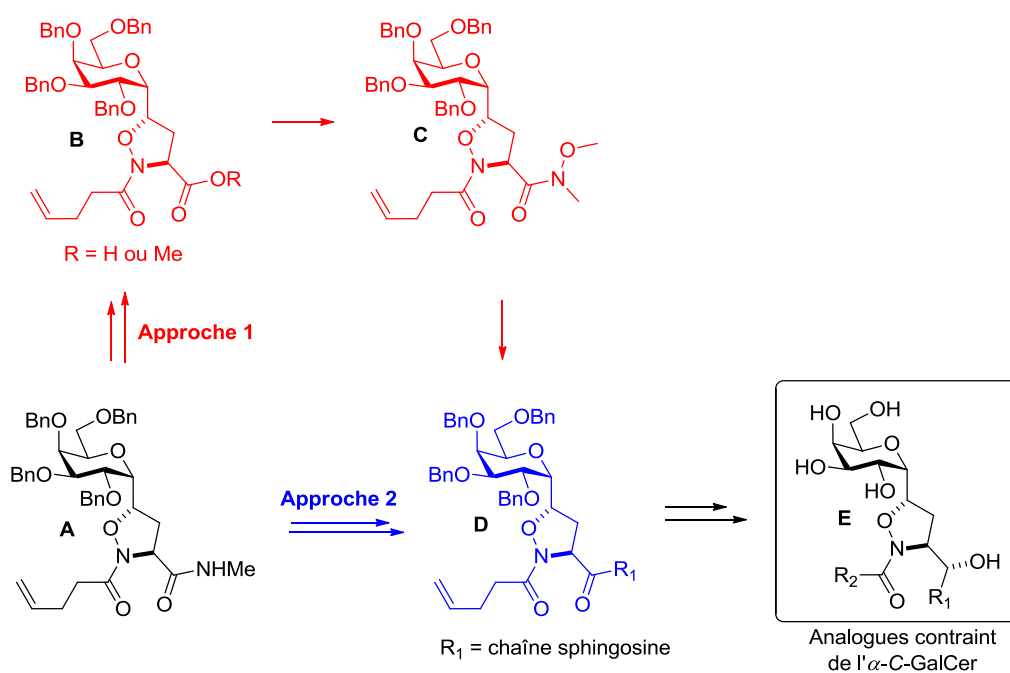


Schéma 199 - Stratégie de synthèse d'analogues contraints de l' $\alpha$ -C-GalCer

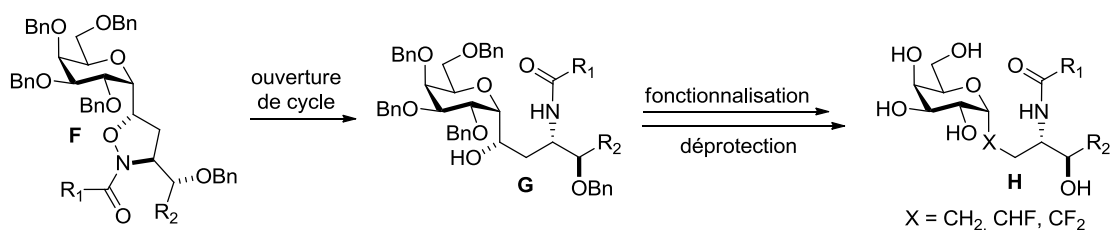


Schéma 200 - Stratégie de synthèse de nouveaux analogues de l' $\alpha$ -C-GalCer

A ce stade, il était nécessaire d'étudier plus particulièrement l'étape d'addition nucléophile et l'ouverture du cycle isoxazolidine. Du fait que notre cycloadduit soit obtenu après un certain nombre d'étapes, nous avons préféré étudier ces deux types de réaction sur un composé modèle. Une fois les stratégies validées, ces réactions seront effectuées sur le composé d'intérêt.

## I - Etude avec un substrat modèle

### I-1. Préparation du modèle

Le cycloadduit modèle a été préparé par réaction entre la nitronne chirale **186** et l'allyl benzyl éther commercial **191**. La réaction s'effectue sans solvant à 100°C pendant 4h en tube scellé. Le cycloadduit **192** est isolé avec un rendement de 95%, sous la forme d'un seul diastéréoisomère (Schéma 201), avec un rendement de 91%. L'analyse NOESY de ce diastéréoisomère **192** a montré la formation de l'isomère *trans*. La copule chirale est ensuite clivée en milieu acide à 80°C pendant 2h puis l'amine brute est ensuite acylée en présence d'anhydride acétique et de DMAP dans la pyridine à température ambiante pendant 20h pour conduire au substrat modèle **193** avec un rendement de 56% sur deux étapes (Schéma 201).

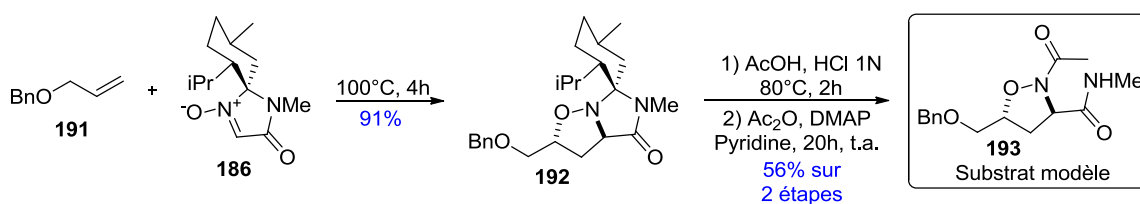


Schéma 201 - Synthèse du modèle

## I-2. Etude de la modification de l'amide du substrat modèle

### a) Par addition directe d'un organomagnésien

Plusieurs méthodes permettent la conversion d'amide secondaire en cétone par addition d'organométalliques sont décrites dans la littérature.<sup>155</sup> Nous nous sommes donc concentrés, dans un premier temps, sur ce type de modification pour introduire notre chaîne sphingosine en une seule étape. Cette stratégie consiste à générer *in situ* une espèce hautement électrophile en présence d'un agent activant comme la pyridine, à partir d'un amide secondaire. L'addition d'un organométallique permet ensuite de former l'imine dont l'hydrolyse acide mène à la cétone désirée (Schéma 202).

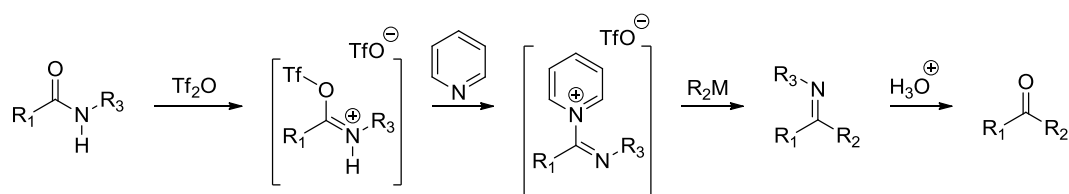


Schéma 202 - Mécanisme proposée pour la formation de cétone à partir d'amide secondaire<sup>156</sup>

L'amide **193** a été mis en réaction en présence d'anhydride triflique et de 2-chloro (ou 2-fluoro)-pyridine dans le dichlorométhane à -78°C. Les halogéno-pyridines étant moins nucléophiles et basiques que la pyridine, elles permettent de stabiliser le triflate de pyridinium. L'ajout de bromure de méthylmagnésium dans l'éther diéthylique suivi de l'hydrolyse acide ont ensuite été réalisées (Schéma 203). Cependant, aucune addition n'est observée et le composé de départ est totalement récupéré.

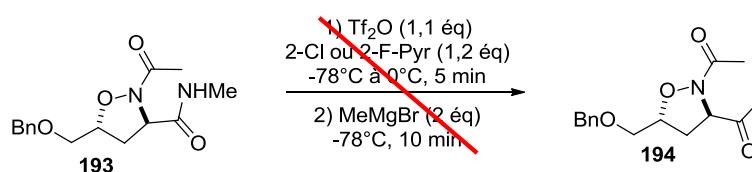


Schéma 203 - Activation puis addition d'un organomagnésien

### b) Hydrolyse basique de l'amide

L'hydrolyse basique d'un amide en un acide carboxylique est une méthode classique et simple. L'utilisation de lithine<sup>144</sup> dans un mélange THF/eau à température ambiante (Schéma 202) s'est montrée infructueuse car le substrat de départ est dégradé.

<sup>155</sup> a) A. B. Charrette, M. Grenon, *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1694-1703. b) W. S. Bechara, G. Pelletier, A. B. Charrette, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 228-234. c) K-J. Xiao, A-E. Wang, Y-H. Huang, P-Q. Huang, *Asian J. Org. Chem.* **2012**, *1*, 130-132.

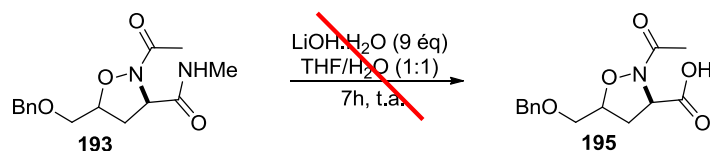


Schéma 204 - Tentative d'hydrolyse du modèle

### c) Par formation d'un nitrosamide

Evans *et al.*<sup>156</sup> ont étudié la nitrosation d'amides secondaires suivie de l'hydrolyse basique dans le cadre de deux synthèses totales ce qui nous a amené à appliquer cette méthode. L'amide **193** est traité par le nitrite de sodium en présence d'anhydride acétique et d'acide acétique. Le produit brut **196** qui est suffisamment pur, est mis en réaction avec la lithine dans un mélange THF/eau pour conduire à l'acide **195** correspondant, après neutralisation sur résine acide. Un faible rendement de 37% est obtenu sur les deux étapes qui peut s'expliquer par une perte de produit lors de la purification sur gel de silice (Schéma 205).

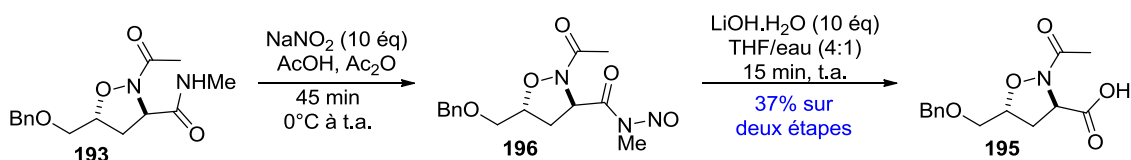


Schéma 205 - Séquence nitrosation/hydrolyse de l'amide secondaire

La décomposition du nitrosamide en milieu basique peut éventuellement mener à la formation de diazométhane,<sup>157</sup> composé toxique et explosif, mais ce dernier semble se dégrader par libération de méthanol et de diazote<sup>158</sup> en milieu aqueux (Schéma 206).

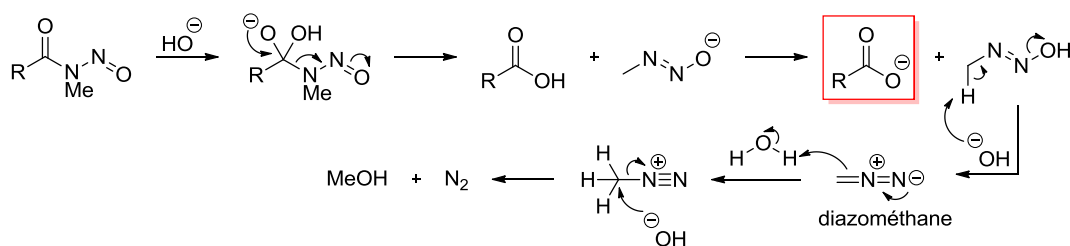


Schéma 206 - Décomposition du nitrosamide sous conditions basiques

<sup>156</sup> D. A. Evans, P. H. Carter, C. J. Dinsmore, J. C. Barrow, J. L. Katz, D. W. Kung, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4535-4538.

<sup>157</sup> R. W. Darbeau, E. V. Perez, J. I. Sobieski, W. A. Rose, M. C. Yates, B. J. Boese, N. R. Darbeau, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5679-5686.

<sup>158</sup> M. Pearce, *Helv. Chim. Acta*, **1980**, *63*, 887-891.

Pour pallier cet éventuel inconvénient, une seconde approche a été testée, qui consiste à convertir un nitrosamide en ester méthylique correspondant par un réarrangement sous activation thermique au reflux du dioxane (Schéma 207).<sup>159</sup>

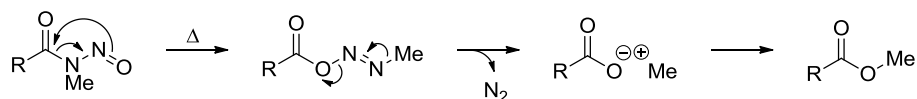


Schéma 207 - Réarrangement d'un nitrosamide pour conduire à un ester

Un exemple de cette méthode appliquée à un dérivé de la proline (Schéma 208)<sup>160b</sup> a été décrit en deux étapes. La première a consisté en la formation du nitrosamide en présence du nitrite de sodium dans l'anhydride acétique et l'acide acétique. La seconde étape est le réarrangement sous activation thermique afin d'accéder au dérivé de la proline attendu avec un rendement de 86% sur les deux étapes.

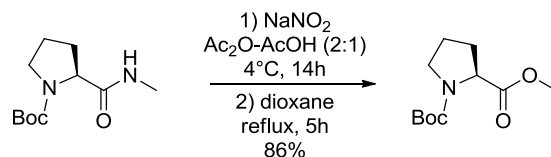


Schéma 208 - Déamidation de la proline

Lorsque notre nitrosamide **196** est mis au reflux du dioxane pendant 5h, l'ester **197** est isolé avec un rendement de 25% (Schéma 209). Cette méthode étant peu satisfaisante, l'hydrolyse basique du nitrosamide sera la méthode de choix pour accéder à l'acide carboxylique correspondant.

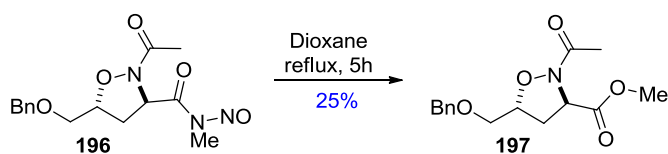


Schéma 209 - Préparation de l'ester méthylique 197

### I-3. Etude de l'ouverture du cycle isoxazolidine

Etant donné que l'étape d'ouverture du cycle isoxazolidine intervient tardivement au niveau de notre stratégie de synthèse, il nous a semblé important de déterminer au préalable les meilleures conditions opératoires sur le composé modèle.

<sup>159</sup> a) D. T. Glatzhofer, R. R. Roy, K. N. Cossey, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2349-2352. b) D. M. Shendage, R. Fröhlich, G. Haufe, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3675-3678.

### a) Par le zinc activé

La première méthode d'ouverture du cycle isoxazolidine étudiée est celle décrite par Aschweten *et al.*<sup>160</sup> et qui repose sur l'utilisation de zinc activé dans l'acide acétique. Classiquement, la poudre de zinc est activée par agitation dans une solution d'acide chlorhydrique diluée puis par lavages successifs avec de l'eau, de l'éthanol et de l'éther diéthylique, avant d'être rigoureusement séchée. Cette procédure permet d'éliminer les traces d'oxydes de zinc.<sup>161</sup>

Lorsque le modèle **193** est mis en solution dans l'acide acétique avec 10 équivalents de zinc activé à température ambiante pendant 24h, aucune conversion n'est observée (Schéma 210) et une autre méthode a été envisagée.



Schéma 210 - Essai d'ouverture en présence de zinc activé

### b) Par l'iodure de triméthylsilane TMSI

Une équipe indienne a développé une méthode de coupure de la liaison N-O du cycle isoxazolidine en présence d'iodure de triméthylsilane et d'eau dans l'acétonitrile. Le TMSI est généré *in situ* à partir du TMSCl et du KI dans l'acétonitrile pendant 90 minutes. Le cycloadduit et 0,5 équivalent d'eau sont ensuite ajoutés mais aucune conversion n'est observée après 24h (Schéma 211). Ceci est surprenant compte tenu de l'article qui mentionne que cette réaction dure moins d'une heure et que le rendement atteint 95%.<sup>162</sup>

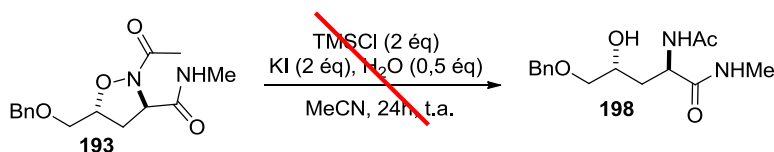


Schéma 211 - Essai d'ouverture en présence de TMSI

### c) Par le SmI<sub>2</sub>

L'utilisation du diiodure de samarium SmI<sub>2</sub> est une méthode efficace pour effectuer le clivage de la liaison N-O. Cette méthode a été utilisée par l'équipe de Westermann<sup>144</sup> sur le cycle isoxazolidine, issu de la cycloaddition 1,3-dipolaire entre le C-allyl-galactoside et une

<sup>160</sup> P. Aschweten, L. Kvaerno, E. M. Carreira, R. W. Geisser, F. Kleinbeck, *Org. Lett.* **2005**, 7, 5741-5742.

<sup>161</sup> C. R. Smith, *Synlett*, **2009**, 9, 1522-1523.

<sup>162</sup> M. Boruah, D. Konwar, *J. Chem. Res.* **2002**, 12, 601-603.

nitroène chirale, décrit précédemment (p. 137). Nous avons appliqué cette méthode à notre substrat modèle **193** sous diverses conditions. Le cycloadduit est mis en solution dans le THF et deux équivalents de  $\text{SmI}_2$  (0,1N dans le THF) sont ajoutés. Le suivi CCM a montré que la conversion n'est pas totale après 90 minutes à température ambiante. Au-delà de ce temps de réaction, une dégradation est observée. L'utilisation de quatre équivalents de  $\text{SmI}_2$  a permis d'avoir une conversion de 90% après 40 minutes de réaction. La purification sur gel de silice a permis d'isoler le produit attendu **198** avec un rendement moyen de 51% (Schéma 212).

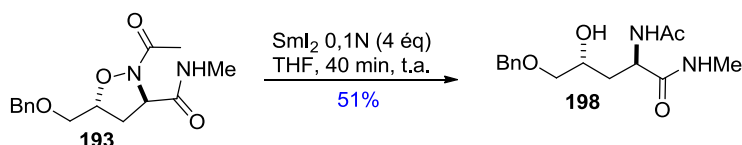


Schéma 212 - Essai d'ouverture en présence de  $\text{SmI}_2$

#### d) Par le $\text{Mo}(\text{CO})_6$

Une quatrième méthode a été testée, impliquant l'hexacarbonyl de molybdène  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  au reflux du mélange  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  (1,5/1).<sup>163</sup> Le molybdène se complexé à la liaison N-O pour conduire à un intermédiaire en équilibre avec une forme ouverte dont la mésomérie permet d'accéder à un métallacycle. Ce dernier est clivé en présence d'eau ce qui permet de déplacer l'équilibre de la réaction et former l'amino-alcool (Schéma 213).

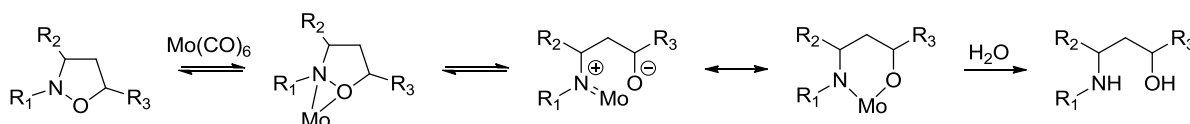


Schéma 213 - Mécanisme d'ouverture du cycle isoxazolidine par le  $\text{Mo}(\text{CO})_6$

Le cycloadduit **193** a été mis en réaction avec  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  au reflux du mélange  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  pendant 1 heure. L'extraction par l'éther éthylique ou par l'acétate d'éthyle mène, après purification sur gel de silice, au composé attendu avec un rendement de 55%. L'extraction est toutefois difficile dû aux sels de molybdène générés au cours de la réaction. Une filtration sur célite a été réalisée mais le rendement n'a pas été amélioré. En revanche, lorsque le milieu réactionnel est directement concentré et purifié sur gel de silice, le produit d'ouverture **198** est isolé avec un rendement de 98% (Schéma 214), les sels de molybdène étant retenus sur la colonne.

<sup>163</sup> S. Cicchi, A. Goti, A. Brandi, A. Guarna, F. De Sarlo, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 3351-3354.

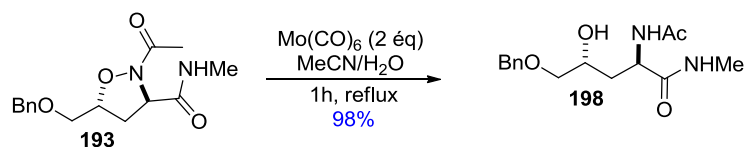


Schéma 214 - ouverture du cycle isoxazolidine par le  $\text{Mo}(\text{CO})_6$

## II - Fonctionnalisation du cycle isoxazolidine avec le sucre

### II-1. Clivage de la copule chirale

Après la réaction de cycloaddition (3+2), la copule chirale doit être retirée en milieu acide afin d'accéder aux amino-amides correspondant. Une première tentative d'hydrolyse en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique dans l'acide acétique pour acyler directement l'amine a été réalisée mais un mélange complexe a été obtenu (Schéma 215).

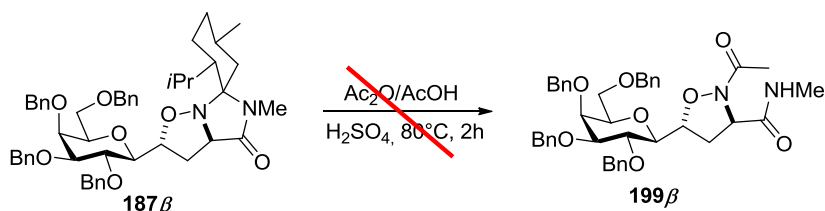
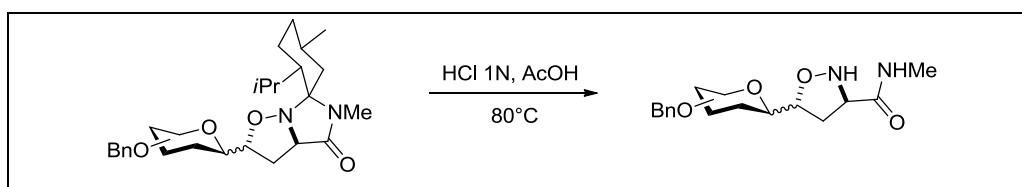


Schéma 215 - Clivage de la copule chirale avec un agent acylant

En revanche, l'hydrolyse avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique dans l'acide acétique à 80°C a permis d'accéder à l'amino-amide **199β** attendu avec un rendement de 67%. Ces conditions ont été appliquées aux autres cycloadduits et les amino-amides correspondants ont été isolés avec de bons rendements (Schéma 216). Dans la suite des paragraphes nous nous intéresserons seulement à notre isoxazolidine d'intérêt, à savoir le composé **199α**.





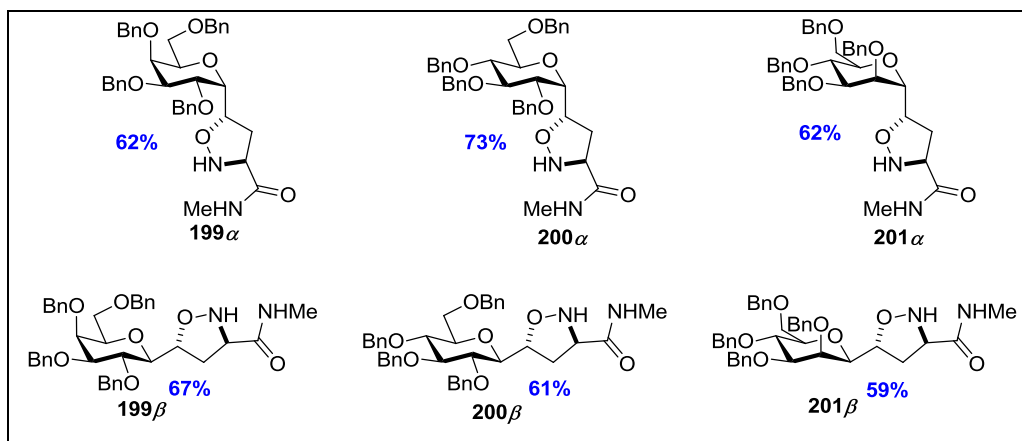


Schéma 216 - Clivage de la copule chirale

## II-2. Introduction de la chaîne acyle

Avant d'introduire la chaîne insaturée avec l'anhydride penténoïque qui est un réactif onéreux, nous avons étudié la *N*-acylation avec l'anhydride acétique selon deux conditions de réaction. Lorsque les cycloadduits **199α** et **199β** ont été mis en réaction avec cet anhydride en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane, aucune conversion n'a été observée. En revanche, la *N*-acylation dans la pyridine pendant 6h à température ambiante a mené à la formation des produits attendus **202α** ou **202β** avec un rendement de 44% en série *α* et 63% en série *β* (Schéma 217).

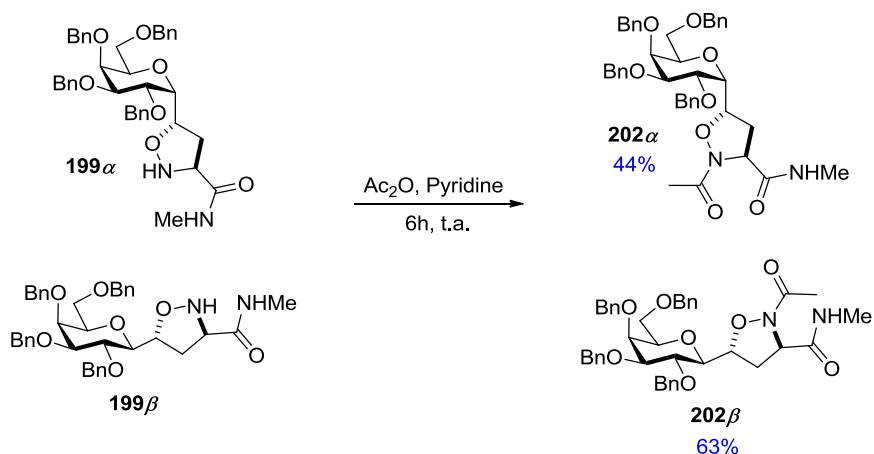


Schéma 217 - Acylation avec l'anhydride acétique

Malgré les rendements moyens observés avec l'anhydride acétique, nous avons ensuite réalisé la *N*-acylation en présence d'anhydride penténoïque dans la pyridine. Dans ces conditions, l'amide **203α** est obtenu après 6h à température ambiante avec un bon rendement de 80% (Schéma 218).

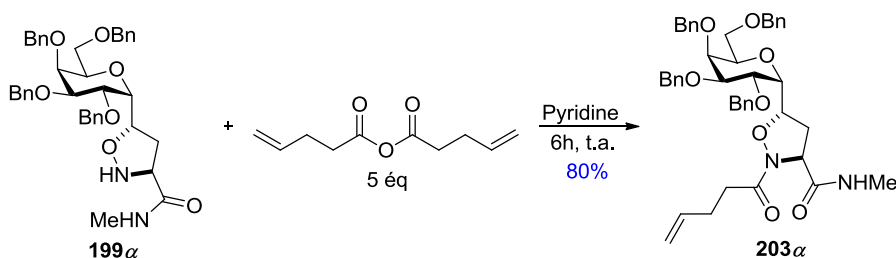


Schéma 218 - Acylation avec l'anhydride penténoïque

A ce stade, la présence de la double liaison sur la chaîne acyle devrait permettre l'introduction de différentes chaînes grâce à une réaction de métathèse croisée avec diverses oléfines. Cependant, l'étude de cette réaction n'a pas pu être réalisée avant le dépôt de ce manuscrit.

## II-3. Introduction de la chaîne sphingosine

### a) Formation du nitrosamide

Malgré le rendement faible lors de la formation de l'acide carboxylique sur le modèle *via* la formation du nitrosamide (37%) (Schéma 205), nous avons tout d'abord appliqué cette méthode aux dérivés galactosides **202α** et **203α** possédant respectivement un groupement acétyle ou penténoyle. Dans ces conditions, les acides carboxyliques **204α** et **205α** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 66 et 87% sur deux étapes (Schéma 219).

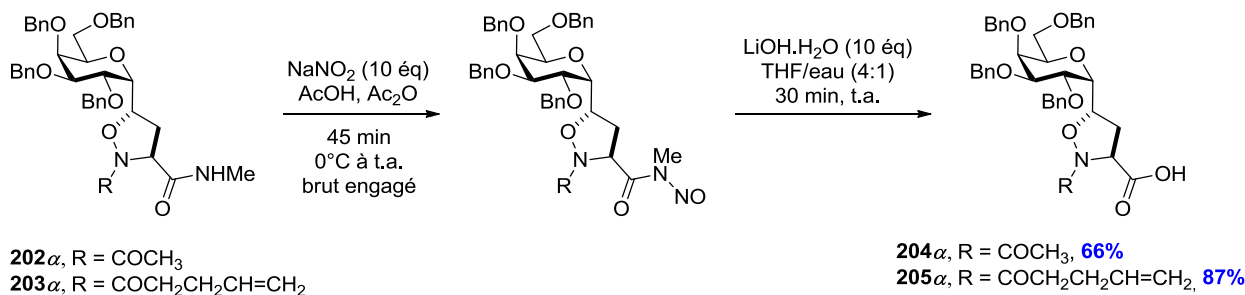


Schéma 219 – Formation de l'acide *via* le nitrosamide

### b) Formation de l'amide de Weinreb

Une fois l'acide carboxylique préparé, la synthèse de l'amide de Weinreb a été entreprise. Une première tentative a consisté à faire réagir l'acide carboxylique **204α** sur le carbonyldiimidazole<sup>164</sup> (CDI) pour conduire à l'intermédiaire électrophile **206α** et générer *in situ* de l'imidazole. Le chlorhydrate de la *N,O*-diméthylhydroxylamine, neutralisé par

<sup>164</sup> D. Mabire, S. Coupa, C. Adelinet, A. Poncelet, Y. Simonnet, M. Venet, R. Wouters, A. S. J. Lesage, L. Van Beijsterveldt, F. Bischoff, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2134-2153.

l'imidazole, est directement ajouté au milieu réactionnel pour former l'amide de Weinreb **207 $\alpha$**  (Schéma 220). Cependant, ces conditions n'ont pas permis d'isoler le produit attendu et ont conduit à une dégradation du substrat.

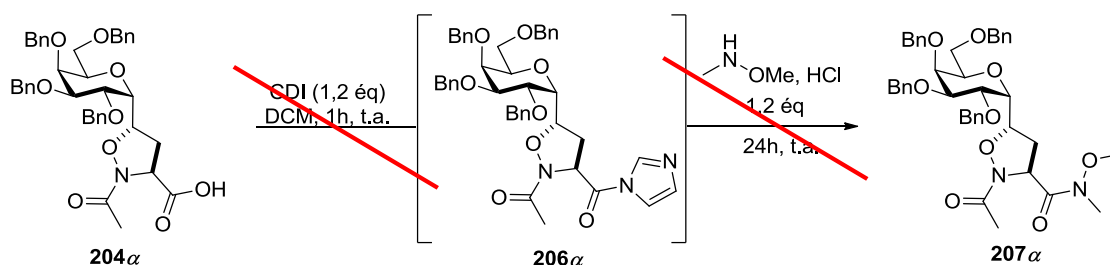


Schéma 220 - Préparation de l'amide de Weinreb **207 $\alpha$**  avec le CDI

Une seconde méthode a consisté à ajouter le chlorhydrate du 1-éthyl-3-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide (EDCI) et la *N*-méthylmorpholine (NMM) dans une solution comportant l'acide carboxylique **204 $\alpha$**  et la *N,O*-diméthylhydroxylamine.<sup>165</sup> Cette méthode a mené, après 24h à température ambiante, à la formation de l'amide de Weinreb **207 $\alpha$**  avec un rendement de 74% (Schéma 221).

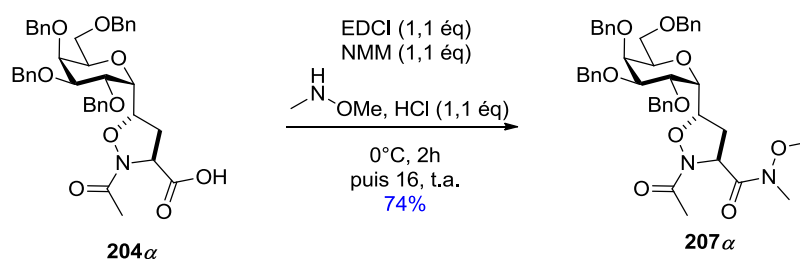


Schéma 221 - Préparation de l'amide de Weinreb **207 $\alpha$**  avec l'EDCI

Le protocole a ensuite été appliqué à l'acide carboxylique **205 $\alpha$**  comportant la chaîne acyle insaturée, et l'amide de Weinreb **208 $\alpha$**  a été obtenu avec un rendement de 69% (Schéma 222).

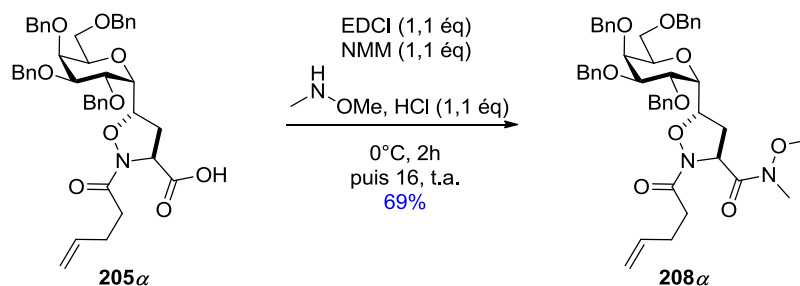


Schéma 222 - Préparation de l'amide de Weinreb **208 $\alpha$**  avec l'EDCI

<sup>165</sup> T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5569-5572.

### c) Addition d'organomagnésien

Après avoir synthétisé l'amide de Weinreb, l'addition nucléophile d'organomagnésien a pu être testée.<sup>167</sup> Seulement un essai d'addition du bromure de pentylmagnésium a été entrepris (Schéma 223). Quatre équivalents de cet organomagnésien ont été additionnés sur l'amide de Weinreb et le suivi CCM a montré une conversion complète au bout de 30 minutes de réaction et deux tâches principales moins polaires. Le spectre RMN <sup>1</sup>H a montré un mélange complexe mais le spectre de masse a permis d'identifier le produit attendu **209 $\alpha$** . L'étude de cette réaction est en cours d'optimisation.

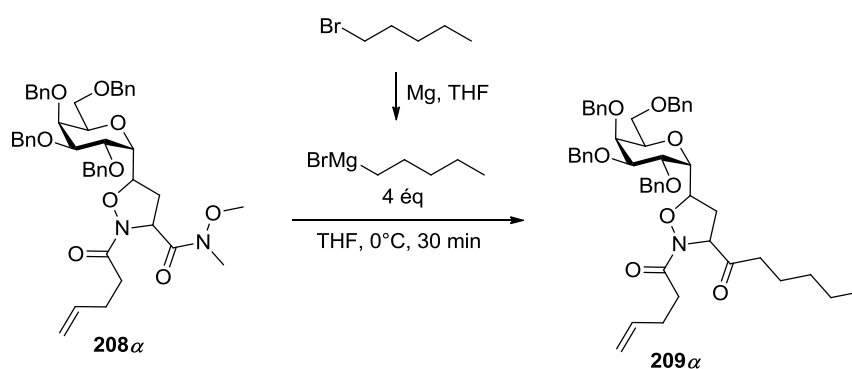


Schéma 223 - Addition d'un organomagnésien sur l'amide **208 $\alpha$**

# Conclusion et perspectives

Les objectifs de cette partie étaient de préparer de nouveaux analogues plus stables et plus sélectifs de la voie Th1, à savoir des analogues C-glycosidiques du 4-désoxy-KRN7000 selon une approche de synthèse originale. L'étape clé de cette stratégie a mis en œuvre une cycloaddition (3+2) entre une nitroène et un C-vinyl-galactoside. Pour cela, une étude méthodologique de cette réaction a été réalisée, puis une fois maîtrisée, la fonctionnalisation du cycle isoxazolidine devrait permettre d'accéder à des analogues C-glycosidiques du 4-désoxy-KRN7000 dont l'oxygène de la position anomérique sera remplacé par un groupement méthylène, mono ou difluorométhylène (Schéma 224).

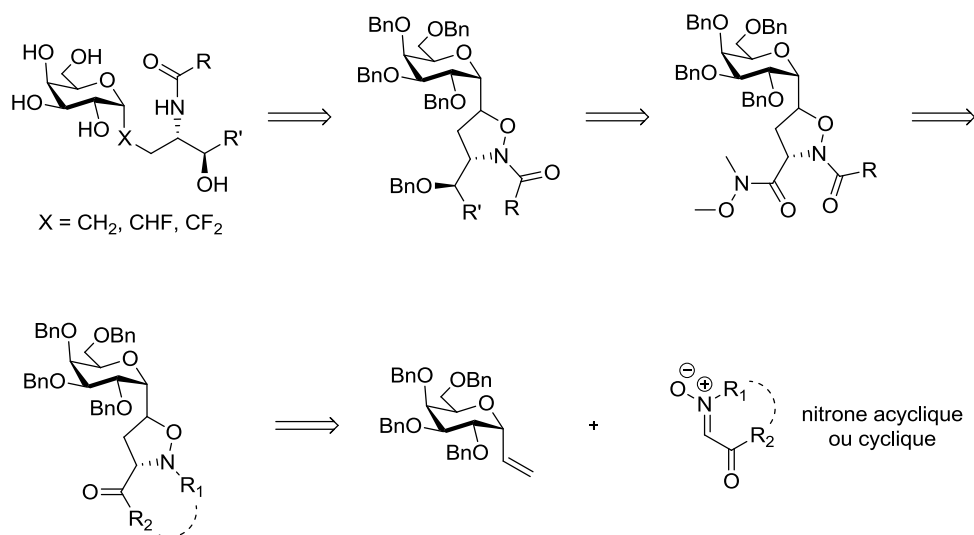


Schéma 224 - Préparation d' $\alpha$ -C-GalCer via une cycloaddition [3+2]

Il a été tout d'abord nécessaire de développer une méthode de synthèse efficace de C-vinyl-glycosides à l'échelle du gramme. Nous avons pu accéder aux deux anomères de C-vinyl-glycosides dans différentes séries (galactose, glucose, mannose, galactosamine) basés sur la même stratégie, à savoir la réduction contrôlée d'une fonction alcyne en oléfine (Schéma 225) avec des rendements compris entre 62% et 88%. Cette étude fera l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise.

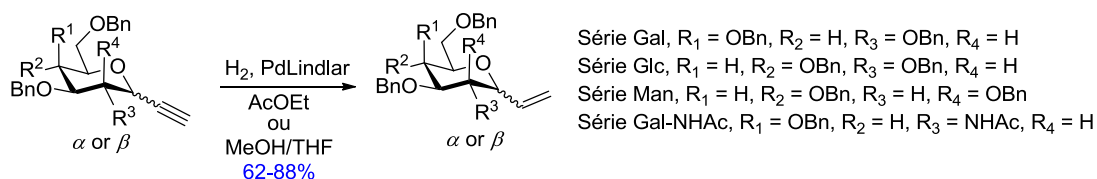


Schéma 225 - Préparation des C-vinyl-glycosides

Disposant des C-vinyl-glycosides, l'étude de la cycloaddition 1,3-dipolaire a été effectuée. L'utilisation d'une nitronne acyclique et d'une nitronne cyclique achirale n'a pas permis d'avoir une bonne diastéréosélectivité lors de la cycloaddition. Seule une nitronne dérivée de la (-)-menthone a conduit à la formation d'un seul diastéréoisomère. Après l'optimisation de la réaction, les cycloadduits ont été isolés avec des rendements compris entre 61% et 91% lorsqu'une activation par micro-onde à 140°C a été mise en œuvre (Schéma 226). Le clivage de la copule chirale a été réalisé en milieu acide à 80°C avec des rendements compris entre 59% et 73% permettant l'accès à des composés précurseurs d'acides aminés.

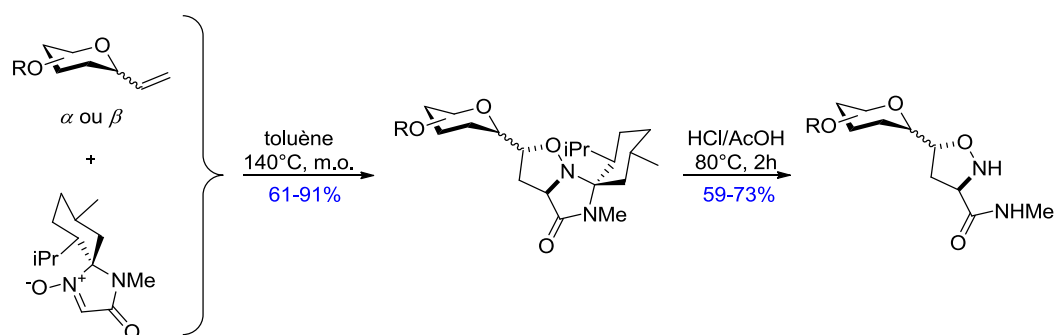
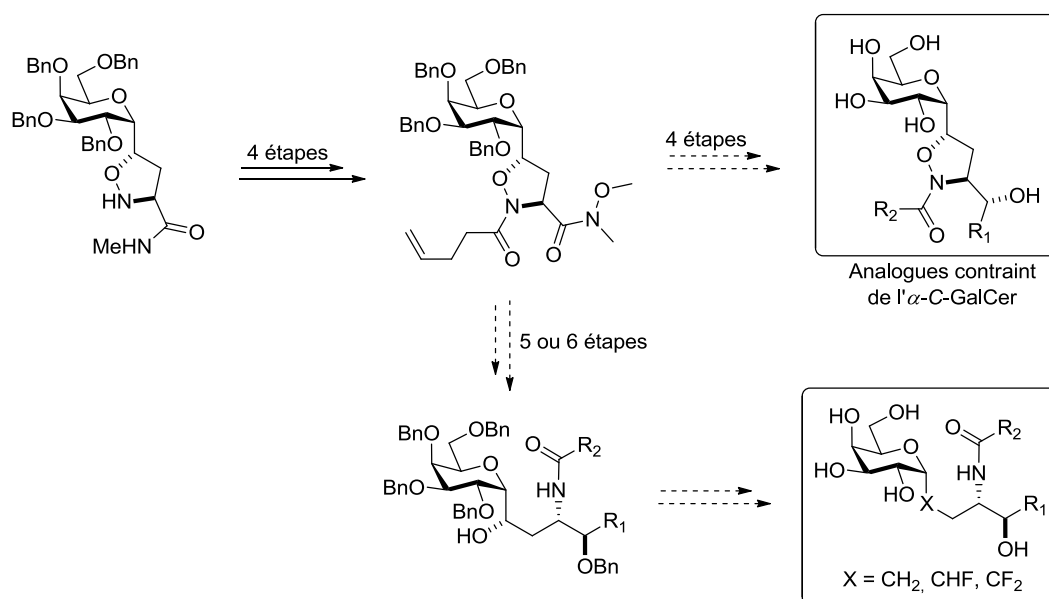


Schéma 226 - Cycloaddition 1,3-dipolaire entre des C-vinyl-glycosides et une nitronne chirale

La fonctionnalisation du cycle isoxazolidine est à ce jour en cours de réalisation. Pour le moment, nous avons pu synthétiser un intermédiaire avancé comportant d'une part, une chaîne acyle insaturée pour introduire divers motifs *via* une réaction de métathèse croisée et d'autre part, un amide de Weinreb pour permettre d'incorporer la chaîne sphingosine. Les prochaines étapes de synthèse consisteront dans un premier temps à réduire le carbonyle issu de l'addition d'un organomagnésien sur l'amide de Weinreb puis, à réaliser la réaction de métathèse et déprotéger les groupements hydroxyles pour accéder à des analogues C-glycosidiques contraints du 4-désoxy-KRN7000 (Schéma 227). L'ouverture tardive du cycle isoxazolidine en fin de synthèse nous permettra dans un second temps, d'accéder à des analogues où l'aménagement de la position pseudo-anomérique pourrait conduire notamment à des analogues fluorés (Schéma 227).

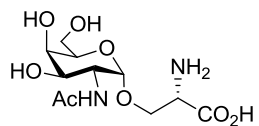
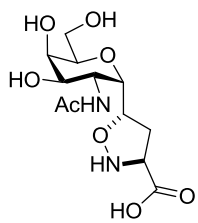


**Schéma 227 - Accès aux analogues C-glycosidiques du 4-désoxy-KRN7000**

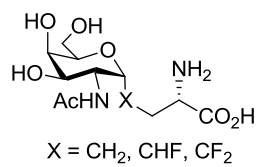
Outre la possibilité d'accéder à des analogues C-glycosidiques du 4-désoxy-KRN7000, des dérivés d'acides aminés C-glycosylés pourraient être préparés comme par exemple pour l'antigène T<sub>N</sub>. Cet antigène est spécifique des tumeurs car il est sur-exprimé à la surface des cellules tumorales dans environ 90% des cancers humains. A l'inverse, il n'est pas détectable à la surface des cellules saines. C'est pourquoi l'antigène T<sub>N</sub> est une cible thérapeutique potentielle intéressante. L'antigène T<sub>N</sub> se compose d'une partie sucre (*N*-acétylgalactosamine) dont la position anomérique est liée par *O*-glycosylation au groupement hydroxyle des acides aminés Sérine ou Thréonine. Cependant, les acides aminés *O*-glycosylés comme l'antigène T<sub>N</sub>, sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse enzymatique par les glycosidases<sup>166</sup> ce qui limite leurs utilisations pour des applications thérapeutiques.

Pour pallier cet inconvénient, une des approches est la synthèse de composés C-glycosylés qui sont connus pour être plus stables vis-à-vis des glycosidases. Dans ce contexte, notre étude sur la cycloaddition 1,3-dipolaire nous offre la possibilité de préparer des analogues contraints d'acides aminés C-glycosylés dont l'antigène T<sub>N</sub> (Schéma 228). Notre stratégie pourrait permettre aussi de fonctionnaliser la position pseudo-anomérique par des groupements mono- ou difluorométhylène.

<sup>166</sup> E. C. K. Lai, S. A. Morris, I. P. Street, S. G. Withers, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 1929-1937



Antigène Tn



Analogues C-glycosylés de l'antigène T<sub>N</sub>

Schéma 228 – Analogues de l'antigène T<sub>N</sub>



# Experimental section

---

All air and moisture sensitive reactions were performed under argon atmosphere with anhydrous solvents. Toluene, dichloromethane and THF were dried over activated alumina on a dry station purchased from Innovative Technologies. Dry acetonitrile was purified by distillation over CaH<sub>2</sub>. Commercial reagents were used without further purification.

Column chromatography was performed using The Reveleris® flash chromatography systems. Thin-layer chromatography was performed with SIL G/UV254 plates and products were detected by UV radiation ( $\lambda = 254$  nm) and phosphomolybdic acid (PMA).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C (100 MHz) spectra were recorded on a Bruker Avance 400. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in part per million (ppm) from TMS as the internal standard. Coupling constants are given in Hertz (Hz) and the multiplicity of signal is indicated as following: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br. s (broad singlet).

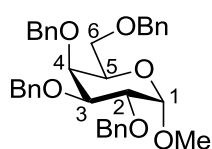
High resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a Bruker microTOF QIII mass spectrometer using ESI techniques.

Optical rotations were measured using a Jasco P2000 at the sodium D line ( $\lambda = 589$  nm) with a 1-dm path length cell at 25°C. Melting points were measured using Buchi B-545 apparatus.

## General procedure for the preparation of compounds 28, 114, 115.<sup>167</sup>

To a solution of methyl  $\alpha$ -D-glycopyranoside (0.05 mol) in DMF (200 mL), sodium hydride (60% in oil, 0.3 mmol) was added portion-wise at 0 °C. After 30 min, benzyl bromide (0.25 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with cold water (150 mL) and extracted twice with Et<sub>2</sub>O (100 mL). The combined organic layers were successively washed with water (100 mL) and brine solution (100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure.

### Methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranose 28

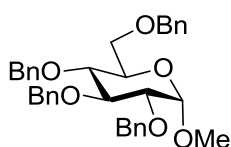


C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>  
M = 554.67 g.mol<sup>-1</sup>  
Slightly yellow oil  
R<sub>f</sub> = 0.38 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 98:2 to 85:15) to afford methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranose (27.2 g, 49 mmol, 95%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.40-7.23 (m, 20H, ArH), 4.93 and 4.57 (AB syst.  $J$  = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 and 4.73 (AB syst.  $J$  = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 and 4.68 (AB syst.  $J$  = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.68 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.47 and 4.39 (AB syst.  $J$  = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.05-4.01 (m, 1H, H-2), 3.95-3.87 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.52 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H, H-6), 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

### Methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranose 114



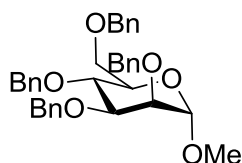
C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>  
M = 554.67 g.mol<sup>-1</sup>  
Slightly yellow oil  
R<sub>f</sub> = 0.38 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 98:2 to 85:15) to afford methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (25.3 g, 45.6 mmol, 88%).

<sup>167</sup> S. R. Koppolu, R. Niddana, R. Balamurugan, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5094-5097.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.36-7.19 (m, 18H, ArH), 7.15-7.11 (m, 2H, ArH), 4.97 and 4.81 (AB syst. *J* = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 and 4.48 (AB syst. *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.76 and 4.64 (AB syst. *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.63 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.57 and 4.45 (AB syst. *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.99 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3), 3.77-3.59 (m, 4H, H-4, H-5, H-6), 3.55 (dd, *J* = 9.5, 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

**Methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranose 115**



C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>

M = 554.67 g.mol<sup>-1</sup>

Slightly yellow oil

*R*<sub>f</sub> = 0.38 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 98:2 to 85:15) to afford methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (25.2 g, 45.4 mmol, 88%).

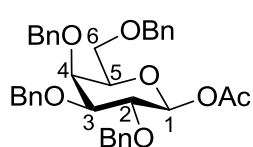
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.39-7.22 (m, 18H, ArH), 7.18-7.14 (m, 2H, ArH), 4.88 and 4.51 (AB syst. *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.77 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-1), 7.75 and 4.70 (AB syst. *J* = 12.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66 and 4.54 (AB syst. *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.97 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-4), 3.88 (dd, *J* = 9.3, 3.1 Hz, 1H, H-3), 3.80-3.71 (m, 4H, H-2, H-5, H-6), 3.32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

**General procedure for the preparation of compounds 82, 125, 126.**

Methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-glycopyranoside (0.03 mol) was dissolved in a mixture of glacial acetic acid (150 mL) and aqueous H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M, 23 mL). The reaction mixture was heated at 90 °C for 8 h. After completion of the reaction (monitored by TLC), the reaction mixture was diluted with cold water (200 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×150 mL). The organic fraction was successively washed with water (100 mL), saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (100 mL), brine (100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 85:15) to afford 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glycopyranose. For glucose series, after cooling down, the lactol precipitated and was filtered off without further purification.

To a solution of 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glycopyranose (0.03 mol) in dichloromethane (50 mL) were added Et<sub>3</sub>N (0.27 mol) and Ac<sub>2</sub>O (0.09 mol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Methanol was added (5 mL) and the reaction mixture was concentrated under reduced pressure to afford the crude product.

**Acetyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-β-D-galactopyranose 82**

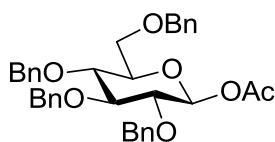


C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>  
 M = 582.68 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 R<sub>f</sub> = 0.32 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

Following the general procedure, compound **82** (6.6 g, 11.3 mmol, 38%) was isolated after purification by recrystallization in ethanol.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.37-7.24 (m, 20H, ArH), 5.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.94 and 4.62 (AB syst. *J* = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.84 and 4.73 (AB syst. *J* = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.43 and 4.38 (AB syst. *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.99-3.92 (m, 2H, H-2, H-4), 3.71-3.67 (m, 1H, H-5), 3.63-3.53 (m, 3H, H-3, H-6), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**Acetyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-β-D-glucopyranose 118**

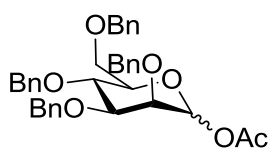


C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>  
 M = 582.68 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
 R<sub>f</sub> = 0.32 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 98:2 to 90:10) to afford the compound **118** (8.91 g, 15.3 mmol, 51%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.35-7.24 (m, 18H, ArH), 7.15-7.10 (m, 2H, ArH), 5.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-1), 4.89 and 4.82 (AB syst, *J* = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.80 and 4.51 (AB syst, *J* = 10.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.78 and 4.74 (AB syst, *J* = 11.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.63 and 4.47 (AB syst, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.78-3.68 (m, 4H, H-3, H-4, H-6), 3.62-3.54 (m, 2H, H-2, H-5), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### Acetyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -D-mannopyranose **119**



$C_{36}H_{38}O_7$

$M = 582.68 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Clear oil

$R_f(\alpha) = 0.40$  ;  $R_f(\beta) = 0.29$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

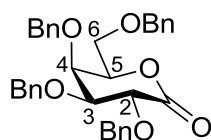
The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 98:2 to 90:10) to afford the compound **119** ( $\alpha/\beta$  1:2) (7.69 g, 13.2 mmol, 44%).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\alpha$  anomer :  $\delta$  7.41-7.15 (m, 20H, ArH), 6.21 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-1), 4.91-4.86 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.78 and 4.72 (AB syst,  $J = 9.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.69-4.50 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.07 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H-4), 3.89-3.52 (m, 5H, H<sub>2</sub>, H-2, H-3, H-5, H-6), 2.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ;  $\beta$  anomer :  $\delta$  7.44-7.13 (m, 20H, ArH), 5.59 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H, H-1), 4.84-4.80 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.69-4.50 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.99 (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H-4), 3.94 (dd,  $J = 2.8, 0.7$  Hz, 1H, H-2), 3.75 (d,  $J = 3.5$  Hz, 2H, H-6), 3.61 (dd,  $J = 9.4, 2.8$  Hz, 1H, H-3), 3.56 (dt,  $J = 9.4, 3.7$  Hz, 1H, H-5), 2.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

### General procedure for the preparation of compounds **93**, **125**, **126**.<sup>168</sup>

2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glycopyranose (4.6 mmol) was dissolved in a mixture of DMSO (15 mL) and  $\text{Ac}_2\text{O}$  (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h and then diluted with saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL). The aqueous phase was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (4 $\times$ 30 mL). The combined organic phases were washed five times with water (30 mL), then dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure to afford the crude product.

### 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-galactonolactone **93**



$C_{34}H_{34}O_6$

$M = 538.63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Slightly yellow oil

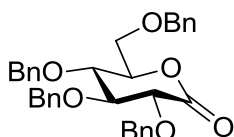
$R_f = 0.39$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 90:10) to afford the compound **93** (2.06 g, 3.8 mmol, 83%).

<sup>168</sup> Brevet : J-C. Quirion, G. Castelot-Deliencourt-Godefroy, WO/2006/059227A1, 2006.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.43-7.21 (m, 20H, ArH), 5.18 and 4.78 (Syst AB, *J* = 11.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.93 and 4.60 (Syst AB, *J* = 11.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 and 4.68 (Syst AB, *J* = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.49 and 4.44 (Syst AB, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.47 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-2), 4.35-4.30 (m, 1H, H-5), 4.16-4.14 (m, 1H, H-4), 3.88 (dd, *J* = 9.6, 2.2 Hz, 1H, H-3), 3.73-3.63 (m, 2H, H-6).

### 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-gluconolactone **125**

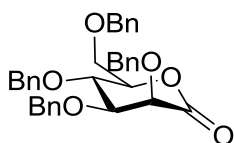


C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>  
 M = 538.63 g.mol<sup>-1</sup>  
 Slightly yellow oil  
*R<sub>f</sub>* = 0.38 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 90:10) to afford the compound **125** (2.60 g, 4.82 mmol, 65%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.43-7.12 (m, 20H, ArH), 4.99 and 4.58 (Syst AB, *J* = 11.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.77-4.40 (m, 7H, 3CH<sub>2</sub>Ph, H-2), 4.15-4.09 (m, 1H, H-5), 4.00-3.85 (m, 2H, H-3, H-4), 3.77-3.61 (m, 2H, H-6).

### 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-mannonolactone **126**

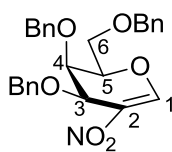


C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>  
 M = 538.63 g.mol<sup>-1</sup>  
 White solid  
*R<sub>f</sub>* = 0.36 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

Following the general procedure, compound **126** (5.23 g, 9.70 mmol, 97%) was isolated after purification by recrystallization in ethanol.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.42-7.23 (m, 18H, ArH), 7.11-7.05 (m, 2H, ArH), 5.03 and 4.57 (AB syst, *J* = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.81 and 4.62 (AB syst, *J* = 12.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.54-4.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.36-4.33 (m, 1H, H-2), 4.31 and 4.22 (AB syst, *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.25-4.19 (m, 1H, H-5), 4.07-4.03 (m, 1H, H-3), 3.79-3.75 (m, 1H, H-4), 3.64-3.59 (m, 2H, H-6).

### 3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-nitro-D-galactal **123**<sup>137</sup>



$C_{27}H_{27}NO_6$

$M = 538.63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

White solid

$R_f = 0.46$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

To acetic anhydride (12.5 mL) at  $-7^\circ\text{C}$  was added dropwise nitric acid (1.25 mL). The reaction mixture was then cooled to  $-30^\circ\text{C}$  before adding a solution of 3,4,6-tri-*O*-benzyl-D-galactal **110** (2.1 g, 5.04 mmol) in acetic anhydride (8 mL). The solution was stirred for 30 min allowing the temperature to reach  $-20^\circ\text{C}$ . Cold water (30 mL) and brine (25 mL) were then added and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (3×30 mL). Combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduced pressure. Co-evaporation with toluene (two times) led to a yellow solid which was taken up in dichloromethane (20 mL). The reaction mixture was cooled to  $0^\circ\text{C}$  before adding dropwise trimethylamine (1 mL). The solution was stirred at room temperature for 40 min and water was added. After separation of the two layers, the organic one was successively washed with an aqueous 1N HCl solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 85:15) to afford 3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-nitro-D-galactal (1.51g, 3.27 mmol, 65%) as a white solid.

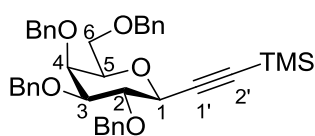
$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.08 (s, 1H, H-1), 7.40-7.25 (m, 15H, ArH), 4.91-4.88 (m, 1H, H-3), 4.86 and 4.78 (AB syst,  $J = 10.9 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.72-4.64 (m, 1H, H-4), 4.71 and 4.61 (AB syst,  $J = 11.9 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.55 and 4.41 (AB syst,  $J = 11.8 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.00-3.85 (m, 3H, H-5, H-6).

#### General procedure for $\beta$ -C-glycosylation<sup>132</sup>

Commercially available  $\text{CeCl}_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was heated at  $120^\circ\text{C}/0.1 \text{ mbar}$  for 1h and at  $140^\circ\text{C}/0.1 \text{ mbar}$  for 1h. Then, anhydrous  $\text{CeCl}_3$  (4 mmol) was cooled to  $0^\circ\text{C}$  under argon, diluted with dry THF (20 mL), stirred at rt for 2h and cooled to  $-78^\circ\text{C}$ . In a separate flask, under argon, commercially available trimethylsilylacetylene (2 mmol) was dissolved in THF (10 mL) at  $-78^\circ\text{C}$  and *n*-butyllithium solution in hexane (1.8 M, 3.3 mL, 6 mmol) was slowly added. The reaction mixture was stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 45 min, then transferred *via* cannula into the stirred suspension of  $\text{CeCl}_3$  in THF. The resulting yellow mixture was stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 30 min and then a solution of sugar lactone (2 mmol) in THF (20 mL) was added dropwise.

The reaction mixture was stirred at  $-78^{\circ}\text{C}$  for 2h, diluted with aqueous HCl solution (0.1 M, 30 mL), allowed to reach room temperature and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 40$  mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduced pressure. Under argon, the crude product was dissolved in dry acetonitrile (30 mL) and dry dichloromethane (20 mL) and cooled to  $-10^{\circ}\text{C}$ . Triethylsilane (2.87 mL, 18 mmol) was added, then freshly distilled  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (2.22 mL, 18 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at  $-10^{\circ}\text{C}$  for 1h, diluted with  $\text{Et}_3\text{N}$  (2 mL) and concentrated under reduced pressure.

### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2-(trimethylsilyl)ethyne **120 $\beta$**



$\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Si}$

$M = 620.85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Slightly yellow oil

$R_f = 0.61$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

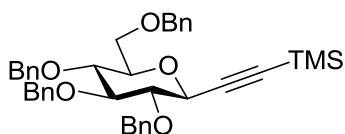
The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 99:1 to 96:4) to provide alkyne **120 $\beta$**  (1.84 g, 2.96 mmol, 80%).

$[\alpha]_D^{25} + 3.9$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.49-7.31 (m, 20H, ArH), 5.06 and 4.93 (AB syst,  $J = 10.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.02 and 4.70 (AB syst,  $J = 11.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.84-4.76 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.53 and 4.58 (AB syst,  $J = 11.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.02-3.96 (m, 2H, H-1, H-3), 3.95-3.93 (m, 1H, H-4), 3.60-3.55 (m, 2H, H-6), 3.52-3.45 (m, 2H, H-2, H-5), 0.15 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.7 (Cq), 138.5 (Cq), 138.4 (Cq), 137.9 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.1 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 102.7 (C1'), 90.7 (C2'), 83.5 (C2), 79.2 (C3), 77.4 (C5), 75.9 ( $\text{CH}_2$ ), 74.8 ( $\text{CH}_2$ ), 73.9 (C4), 73.7 ( $\text{CH}_2$ ), 72.9 ( $\text{CH}_2$ ), 70.8 (C1), 68.6 (C6), -0.1 ( $\text{CH}_3$ ).

### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2-(trimethylsilyl)ethyne **121 $\beta$**



$\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Si}$

$M = 620.85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Slightly yellow oil

$R_f = 0.59$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)



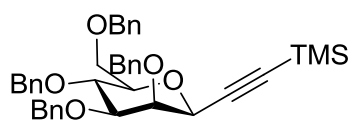
The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 99:1 to 96:4) to provide alkyne **121 $\beta$**  (1.47 g, 2.37 mmol, 64%).

$[\alpha]_D^{25}$  - 2.1 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.38-7.22 (m, 18H, ArH), 7.13-7.09 (m, 2H, ArH), 5.04 and 4.80 (AB syst, *J* = 10.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.91 and 4.81 (AB syst, *J* = 11.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.80 and 4.52 (AB syst, *J* = 10.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61 and 4.52 (AB syst, *J* = 12.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.07-4.03 m, 1H, H-1), 3.76-3.67 (m, 2H, H-6), 3.67-3.57 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 3.44-3.38 (m, 1H, H-5), 0.17 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.6 (Cq), 138.1 (Cq), 138.1 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 102.6 (C1'), 91.3 (C2'), 86.1 (C3), 82.4 (C2), 79.2 (C5), 77.7 (C4), 75.7 (CH<sub>2</sub>), 74.5 (CH<sub>2</sub>), 75.1 (CH<sub>2</sub>), 73.6 (CH<sub>2</sub>), 70.3 (C1), 68.8 (C6), -0.1 (CH<sub>3</sub>).

#### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-2-(trimethylsilyl)ethyne **122 $\beta$**



C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>Si

*M* = 620.85 g.mol<sup>-1</sup>

Slightly yellow oil

*R<sub>f</sub>* = 0.61 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 99:1 to 96:4) to provide alkyne **122 $\beta$**  (2.00 g, 3.22 mmol, 71% ( $\alpha/\beta$  1:2)).

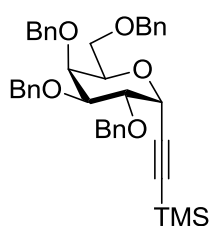
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.33-6.94 (m, 20H, ArH), 4.86 and 4.82 (AB syst, *J* = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.69 and 4.35 (AB syst, *J* = 10.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.46-4.35 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.98 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, H-1), 3.83 (dd, *J* = 3.0, 0.8 Hz, 1H, H-2), 3.71 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4), 3.60-3.50 (m, 2H, H-6), 3.34 (dd, *J* = 9.6, 3.0 Hz, 1H, H-3), 3.29-3.23 (m, 1H, H-5), 0.17 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.7 (Cq), 138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 138.3 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.2 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 101.8 (C1'), 91.1 (C2'), 83.6 (C3), 80.1 (C5), 76.0 (C2), 75.4 (CH<sub>2</sub>), 74.8 (C4), 74.7 (CH<sub>2</sub>), 73.6 (CH<sub>2</sub>), 72.0 (CH<sub>2</sub>), 69.8 (C1), 69.6 (C6), -0.1 (CH<sub>3</sub>).

### General procedure for $\alpha$ -C-glycosylation Erreur ! Signet non défini.

To a solution of acetate **82**, **125** and **126** (4 mmol) and available commercial tributylstannyl(trimethylsilyl)acetylene (8 mmol) in dry dichloromethane under argon (15 mL) was added trimethylsilyl triflate (8 mmol) dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 90 min then diluted with Et<sub>3</sub>N (2 mL) and dichloromethane (30 mL) and concentrated under vacuum.

#### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2-(trimethylsilyl)ethyne **120 $\alpha$**



C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>Si  
M = 620.85 g.mol<sup>-1</sup>  
Slightly yellow oil  
R<sub>f</sub> = 0.38 (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

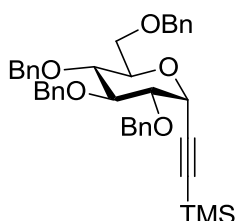
The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 96:4) to provide alkyne **120 $\alpha$**  (1.43 g, 2.30 mmol, 67%).

$[\alpha]_D^{25} + 60.7$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.39-7.24 (m, 20H, ArH), 4.93 and 4.57 (AB syst,  $J = 11.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H, H-1), 4.80 and 4.69 (AB syst,  $J = 11.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.76-4.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.48 and 4.40 (AB syst,  $J = 11.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.13-4.09 (m, 1H, H-5), 4.07 (dd,  $J = 9.8, 5.7$  Hz, 1H, H-2), 3.94-3.92 (m, 1H, H-4), 3.85 (dd,  $J = 9.8, 2.8$  Hz, 1H, H-3), 3.56-3.52 (m, 2H, H-6), 0.17 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.8 (Cq), 138.7 (Cq), 138.7 (Cq), 138.0 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 100.7 (C1'), 93.7 (C2'), 79.4 (C3), 75.6 (C2), 75.0 (C4), 74.9 (CH<sub>2</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub>), 73.0 (CH<sub>2</sub>), 72.6 (CH<sub>2</sub>), 72.6 (C5), 69.8 (C6), 67.7 (C1), 0.1 (CH<sub>3</sub>).

#### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-2-(trimethylsilyl)ethyne **121 $\alpha$**



C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>Si  
M = 620.85 g.mol<sup>-1</sup>  
Slightly yellow oil  
R<sub>f</sub> = 0.35 (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

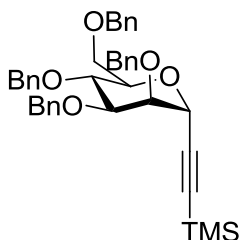
The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 96:4) to provide alkyne **121 $\alpha$**  (1.43 g, 2.30 mmol, 73%).

$[\alpha]_D^{25} + 82.6$  (*c* 1.16, CHCl<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.39-7.24 (m, 18H, ArH), 7.18-7.12 (m, 2H, ArH), 4.95 and 4.80 (AB syst, *J* = 11.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 and 4.50 (AB syst, *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82-4.81 (m, 1H, H-1), 4.67-4.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.59 and 4.46 (AB syst, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.00-3.95 (m, 1H, H-4), 3.93 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-3), 3.77-3.64 (m, 2H, H-6), 3.65-3.59 (m, 2H, H-2, H-5), 0.2 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.8 (Cq), 138.3 (Cq), 138.2 (Cq), 137.9 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 100.2 (C1'), 94.8 (C2'), 82.8 (C3), 79.1 (C2), 77.4 (C5), 75.5 (CH<sub>2</sub>), 75.2 (CH<sub>2</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub>), 73.5 (C4), 72.4 (CH<sub>2</sub>), 68.6 (C6), 67.0 (C1), 0.0 (CH<sub>3</sub>).

#### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-2-(trimethylsilyl)ethyne **122 $\alpha$**



C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>Si  
M = 620.85 g.mol<sup>-1</sup>  
Slightly yellow oil  
*R*<sub>f</sub> = 0.38 (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 96:4) to provide alkyne **122 $\alpha$**  (1.08 g, 1.72 mmol, 51%).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.41-7.16 (m, 20H, ArH), 4.88 and 4.54 (AB syst, *J* = 10.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-1), 4.74 and 4.66 (AB syst, *J* = 12.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.67-4.53 (AB syst, *J* = 12.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.62-4.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.02-3.98 (m, 2H, H-3, H-4), 3.98-3.92 (m, 1H, H-5), 3.83-3.78 (m, 2H, H-2, H-6), 3.74-3.70 (m, 1H, H-6), 0.13 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

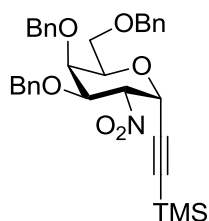
**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.5 (Cq), 138.5 (Cq), 138.4 (Cq), 138.2 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.5 (CHaro), 100.2 (C1'), 94.5

(C2'), 80.0 (C3), 8, 76.9 (C2), 75.4 (CH<sub>2</sub>), 75.0 (C4), 74.8 (C5), 73.4 (CH<sub>2</sub>), 72.1 (CH<sub>2</sub>), 71.9 (CH<sub>2</sub>), 69.3 (C6), 66.7 (C1), -0.1 (CH<sub>3</sub>).

### Preparation of galactosylamine-derived alkynes<sup>139</sup>

Under argon, to a solution of trimethylsilylacetylene (1.15 mL, 8.24 mmol, 2 eq.) in solution in dry THF (20 mL) was added a solution of *n*-BuLi in hexanes (2M, 4 mL, 8 mmol) at -50°C. The reaction mixture was stirred at -50°C for 1h. After cooling to -78°C, a solution of 3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-nitrogalactal **123** (1.9 g, 4.12 mmol) in dry THF was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 1.5h. A saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution (20 mL) was then added and the solution was allowed to reach r.t. before extraction with EtOAc (3×20 mL). The organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 85:15) to give  $\alpha$ -anomer **128 $\alpha$**  (0.695 g, 1.24 mmol, 30%) and  $\beta$ -anomer **128 $\beta$**  (0.91 g, 1.63 mmol, 40%).

#### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,2-dideoxy-2-nitro- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2-trimethylsilyl ethyne **128 $\alpha$**



C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>Si

M = 559.72 g.mol<sup>-1</sup>

White solid ; mp = 114.9-115.4 °C

R<sub>f</sub> = 0.66 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +88.4 (*c* 1.02, CHCl<sub>3</sub>).

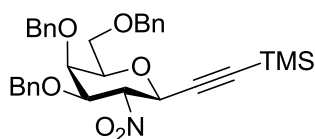
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* = 560.2463; found 560.2454

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.37-7.21 (m, 15H, ArH), 5.22 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H-1), 5.11 (dd, *J* = 10.5, 5.8 Hz, 1H, H-2), 4.85 and 4.48 (AB syst. *J* = 11.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.74 and 4.70 (AB syst. *J* = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.49 and 4.42 (AB syst. *J* = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.37 (dd, *J* = 10.5, 2.8 Hz, 1H, H-3), 4.15 (dt, *J* = 6.5, 1.0 Hz, 1H, H-5), 4.03 (br d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-4), 3.58 (d *J* = 6.5 Hz, 2H, H-6), 0.19 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.1 (Cq), 137.8 (Cq), 137.3 (Cq), 128.7 (2 CHaro), 128.6 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (2 CHaro), 128.1 (2 CHaro), 128.0 (CHaro), 97.5 (C1'), 96.1

(C2'), 84.0 (C2), 76.2 (C3), 75.4 (CH<sub>2</sub>), 73.8 (CH<sub>2</sub>), 73.3 (C4), 73.1 (CH<sub>2</sub>), 72.8 (C5), 68.3 (C6), 67.1 (C1), - 0.2 (CH<sub>3</sub>).

**1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1,2-dideoxy-2-nitro-β-D-galactopyranosyl)-2-trimethylsilyl ethyne **128β****



C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>Si

M = 559.72 g.mol<sup>-1</sup>

White solid ; mp = 79.0-81.0 °C

R<sub>f</sub> = 0.35 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +38.4 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 560.2463; found 560.2452.

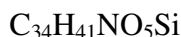
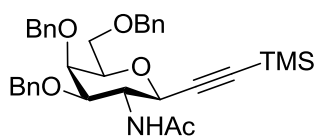
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.38-7.21 (m, 15H, ArH), 4.97 (dd, J = 10.2, 10.0 Hz, 1H, H-2) 4.84 and 4.53 (AB syst. J = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61 and 4.49 (AB syst. J = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.47 and 4.42 (AB syst. J = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.45 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-1), 4.05 (dd, J = 10.2, 2.6 Hz, 1H, H-3), 4.02-3.99 (m, 1H, H-4), 3.66-3.54 (m, 3H, H-5, H-6), 0.14 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 138.0 (Cq), 137.7 (Cq), 136.8 (Cq), 128.8 (CHaro), 128.7 (CHaro), 128.5 (2 CHaro), 128.4 (CHaro), 128.2 (2 CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 97.2 (C1'), 94.7 (C2'), 87.8 (C2), 80.2 (C3), 77.7 (C5), 75.2 (C4), 73.8 (CH<sub>2</sub>), 73.8 (CH<sub>2</sub>), 72.5 (CH<sub>2</sub>), 72.1 (C4), 69.1 (C1), 68.0 (C6), - 0.33 (CH<sub>3</sub>).

**1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1,2-dideoxy-2-acetamido-β-D-galactopyranosyl)-2-trimethylsilyl ethyne **129β****

To a solution of alkyne **128β** (0.91 g, 1.63 mmol) in solution in THF (70 mL) and water (30 mL) at 0°C were successively added concentrated HCl (3.3 mL), acetic acid (17.7 mL) and zinc (2 g, 30.6 mmol). The reaction mixture was stirred for 1.5 h at 0°C before filtration on Celite. After extraction with dichloromethane, the organic layer was washed with water, a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (3 times) and brine and then dried over MgSO<sub>4</sub>. Solvents were evaporated and the residue was taken up with dry dichloromethane (50 mL). Triethylamine (1.5 mL, 10.8 mmol), DMAP (10 mg, 0.082 mmol) and acetic anhydride (1.5 mL, 13.6 mmol) were successively added and the reaction mixture was stirred for 1.5 h at r.t. Water was added and the organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The crude product was purified by column chromatography

(cyclohexane/EtOAc, 9:1 to 8:2) to give the corresponding acetamido derivative **129 $\beta$**  (0.76 g, 1.33 mmol, 82%) as a white solid.



$$M = 571.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

White solid ; mp = 150.3-151.2 °C

$R_f$  = 0.29 (cyclohexane/EtOAc, 7:3)

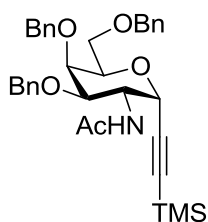
$$[\alpha]_D^{25} + 24.1 \text{ (} c \text{ 1.0, CHCl}_3\text{)}.$$

**HRMS** (ESI+): Calculated for  $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{NO}_5\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  572.2827; found: 572.2809.

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.37-7.23 (m, 15H, ArH), 5.51 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, NH), 4.88 and 4.59 (AB syst.  $J$  = 11.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.67 and 4.48 (AB syst.  $J$  = 11.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.65 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, H-1), 4.47 and 4.41 (AB syst.  $J$  = 11.9 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.18 (dd,  $J$  = 10.5, 2.6 Hz, 1H, H-3), 3.99 (d,  $J$  = 2.6, 1.0 Hz, 1H, H-4), 3.81-3.73 (m, 1H, H-2), 3.66-3.56 (m 3H, H-5, H-6), 1.92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.13 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.7 (C=O), 138.7 (Cq), 138.3 (Cq), 138.0 (Cq), 128.7 (CHaro), 128.6 (CHaro), 128.4 (2 CHaro), 128.2 (CHaro), 128.1 (CHaro), 127.7 (CHaro), 101.2 (C1'), 91.2 (C2'), 78.6 (C3), 77.5 (C5), 74.9 ( $\text{CH}_2$ ), 73.7 ( $\text{CH}_2$ ), 73.2 (C4), 72.2 ( $\text{CH}_2$ ), 69.1 (C1), 68.6 (C6), 54.4 (C2), 23.8 ( $\text{CH}_3$ ), -0.04 ( $\text{CH}_3$ ).

**1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1,2-dideoxy-2-acetamido- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-2-trimethylsilyl ethyne **129 $\alpha$****



$$M = 571.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

White solid ; mp = 135.8-138 °C

$R_f$  = 0.34 (cyclohexane/EtOAc, 7:3)

Following the same procedure as previously, alkyne **128 $\alpha$**  (650 mg, 1.16 mmol) led to compound **129 $\alpha$**  (488 mg, 0.854 mmol, 74%) as a white solid after purification by column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 85:15 to 75:25).

$$[\alpha]_D^{25} + 130.1 \text{ (} c \text{ 1.02, CHCl}_3\text{)}.$$

**HRMS** (ESI+): calculated for C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: m/z = 572.2827; found: 572.2826.

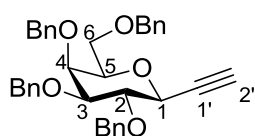
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.43-7.26 (m, 15H, ArH), 4.94 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H-1), 4.90-4.85 (m, 1H, NH), 4.93 and 4.61 (AB syst. *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.74 and 4.37 (AB syst. *J* = 12.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.55-4.49 (m, 1H, H-2), (4.50 and 4.45 (AB syst. *J* = 11.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.08-4.01 (m 2H, H-4, H-5), 3.65 (dd 1H, *J* = 9.2, 7.6 Hz, 1H, H-6), 3.62-3.57 (m, 1H, H-6), 3.55 (dd, *J* = 10.8, 2.6 Hz, 1H, H-3), 1.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.9 (C=O), 138.6 (Cq), 138.1 (Cq), 138.0 (Cq), 128.9 (CHaro), 128.6 (2 CHaro), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.0 (CHaro), 100.3 (C1'), 94.0 (C2'), 76.5 (C3), 74.8 (CH<sub>2</sub>), 73.8 (CH<sub>2</sub>), 72.2 (C4 and C5), 70.9 (CH<sub>2</sub>), 68.6 (C6), 67.7 (C1), 48.2 (C2), 23.5 (CH<sub>3</sub>), 0.00 (CH<sub>3</sub>).

### General procedure for desilylation

A solution of the protected alkyne (2 mmol) in methanol/dichloromethane mixture (5/1, 60 mL) was treated at r.t. for 1 to 2h with an aqueous NaOH solution (1N, 4 mL, 4 mmol), neutralized with 1N HCl and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with EtOAc (100 mL), washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated under reduced pressure.

### 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy-β-D-galactopyranosyl ethyne 22β



C<sub>36</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>

*M* = 548.67 g.mol<sup>-1</sup>

White solid ; mp = 66.1-69.9 °C

*R*<sub>f</sub> = 0.48 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

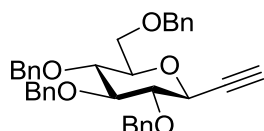
Following the general procedure, alkyne **120β** (1.24 g, 2.0 mmol) led to compound **22β** (998 mg, 1.82 mmol, 91%) after filtration through a short column of silica gel (Cyclohexane/EtOAc, 9:1).

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 6.1 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.38-7.24 (m, 20H, ArH), 4.95 and 4.86 (AB syst. *J* = 10.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.95 and 4.61 (AB syst. *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.45 and 4.39 (AB syst. *J* = 11.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.08-3.97 (m, 2H, H-1, H-3), 3.93 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4), 3.61-3.48 (m, 4H, H-2, H-5, H-6), 2.49 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz, 1H, H-2').

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.6 (Cq), 138.3 (Cq), 138.2 (Cq), 137.7 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.5 (CHaro), 83.4 (C2), 81.1 (C1'), 78.8 (C3), 77.4 (C5), 75.8 ( $\text{CH}_2$ ), 74.6 ( $\text{CH}_2$ ), 73.8 (C2') 73.7 (C4), 73.6 ( $\text{CH}_2$ ), 72.7 ( $\text{CH}_2$ ), 70.8 (C1), 68.6 (C6), -0.1 ( $\text{CH}_3$ ).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl ethyne **123 $\beta$****



$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_5$

$M = 548.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.48$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

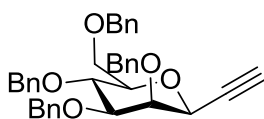
Following the general procedure, alkyne **121 $\beta$**  (1.24 g, 2.0 mmol) led to compound **123 $\beta$**  (938 mg, 1.76 mmol, 85%) after filtration through a short column of silica gel (Cyclohexane/EtOAc, 9:1).

$[\alpha]_D^{25} + 9.9$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.37-7.24 (m, 18H, ArH), 7.15-7.11 (m, 2H, ArH), 5.00 and 4.81 (AB syst,  $J = 10.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.90 and 4.82 (AB syst,  $J = 11.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.80 and 4.53 (AB syst,  $J = 10.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.61 and 4.53 (AB syst,  $J = 12.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.06-4.01 (m, 1H, H-1), 3.75-3.68 (m, 2H, H-6), 3.66-3.59 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 3.45-3.40 (m, 1H, H-5), 2.53 (d,  $^4J = 2.2$  Hz, 1H, H-2').

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.6 (Cq), 138.1 (Cq), 138.0 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 86.1 (C3), 82.2 (C2), 81.1 (C1'), 79.3 (C5), 77.8 (C4), 75.8 ( $\text{CH}_2$ ), 75.6 ( $\text{CH}_2$ ), 75.2 ( $\text{CH}_2$ ), 74.4 (C2') 73.7 ( $\text{CH}_2$ ), 69.7 (C1), 68.9 (C6).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl ethyne **124 $\beta$****



$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_5$

$M = 548.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

White solid ; mp = 95.8-97.5 °C

$R_f = 0.43$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)



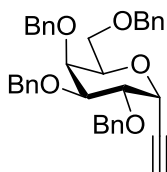
Following the general procedure, alkyne **122 $\beta$**  (1.24 g, 2.0 mmol) led to compound **124 $\beta$**  (965 mg, 1.69 mmol, 88%) after filtration through a short column of silica gel (Cyclohexane/EtOAc, 9:1).

$[\alpha]_D^{25}$  - 34.1 (*c* 1.07, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.48-7.45 (m, 2H, ArH), 7.35-7.23 (m, 16H, ArH), 7.17-7.13 (m, 2H, ArH), 4.99-4.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.86 and 4.53 (AB syst, *J* = 10.8, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66-4.56 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.15-4.13 (m, 1H, H-1), 3.98-3.96 (m, 1H, H-2), 3.91 (t, *J* = 9.6, 1H, H-4), 3.78-3.69 (m, 2H, H-6), 3.54 (dd, *J* = 9.6, 3.0 Hz, 1H, H-3), 3.47-3.42 (m, 1H, H-5), 2.46 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.3 Hz, 1H, H-2').

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 138.3 (Cq), 137.9 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 83.5 (C3), 80.2 (C1'), 80.1 (C5), 76.0 (C2), 75.4 (CH<sub>2</sub>), 74.8 (CH<sub>2</sub>), 74.7 (C4), 74.4 (C2'), 73.6 (CH<sub>2</sub>), 72.2 (CH<sub>2</sub>), 69.6 (C6), 69.2 (C1).

#### 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl ethyne **22 $\alpha$**



C<sub>36</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>

*M* = 548.67 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

*R<sub>f</sub>* = 0.58 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

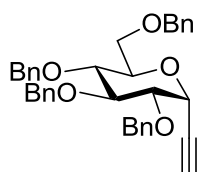
Following the general procedure, alkyne **120 $\alpha$**  (1.24 g, 2 mmol) led to compound **22a** (922 mg, 1.68 mmol, 84%) after filtration through a short column of silica gel (Cyclohexane/EtOAc, 9:1).

$[\alpha]_D^{25}$  + 50.9 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.38-7.22 (m, 20H, ArH), 4.92 and 4.56 (AB syst, *J* = 11.4, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 and 4.73 (AB syst, *J* = 11.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.79 (dd, <sup>3</sup>*J* = 5.8, <sup>4</sup>*J* = 2.2 Hz, 1H, H-1), 4.77 and 4.70 (AB syst, *J* = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.47 and 4.38 (AB syst, *J* = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.14-4.06 (m, 2H, H-2, H-5), 3.97-3.95 (m, 1H, H-4), 3.88 (dd, *J* = 9.8, 2.7 Hz, 1H, H-3), 3.54-3.51 (m, 2H, H-6), 2.5 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.2 Hz, 1H, H-2').

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.7 (Cq), 138.6 (Cq), 138.3 (Cq), 138.0 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 80.2 (C3), 79.0 (C2'), 76.4 (C1'), 75.2 (C2), 74.9 ( $\text{CH}_2$ ), 74.9 (C4), 73.5 ( $\text{CH}_2$ ), 73.3 ( $\text{CH}_2$ ), 73.3 ( $\text{CH}_2$ ), 72.7 (C5), 68.8 (C6), 67.3 (C1).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl ethyne **123 $\alpha$****



$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_5$   
 $M = 548.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Colorless oil  
 $R_f = 0.57$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

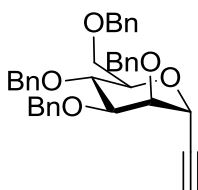
Following the general procedure, alkyne **121 $\alpha$**  (1.24, 2.0 mmol) led to compound **123 $\alpha$**  (878 mg, 1.60 mmol, 80%) after filtration through a short column of silica gel (Cyclohexane/EtOAc, 9:1).

$[\alpha]_D^{25} + 34.9$  (c 1.37,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.37-7.22 (m, 18H, ArH), 7.14-7.10 (m, 2H, ArH), 4.99 and 4.82 (AB syst,  $J = 10.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.82 and 4.74 (AB syst,  $J = 10.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.73 and 4.68 (AB syst,  $J = 11.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.74-4.71 (m, 1H, H-1), 4.58 and 4.45 (AB syst,  $J = 12.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.01-3.95 (m, 1H, H-4), 3.96 (t,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-3), 3.75-3.64 (m, 2H, H-6), 3.67-3.60 (m, 2H, H-2, H-5), 2.58 (d,  $^4J = 2.3$  Hz, 1H, H-2').

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.7 (Cq), 138.1 (Cq), 137.8 (Cq), 137.8 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 83.1 (C3), 78.7 (C2), 78.5 (C2'), 77.7 (C1'), 77.3 (C5), 75.7 ( $\text{CH}_2$ ), 75.2 ( $\text{CH}_2$ ), 73.6 (C4), 73.5 ( $\text{CH}_2$ ), 73.1 ( $\text{CH}_2$ ), 68.4 (C6), 66.6 (C1).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosyl ethyne **124 $\alpha$****



$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_5$   
 $M = 548.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Colorless oil  
 $R_f = 0.53$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

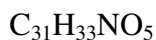
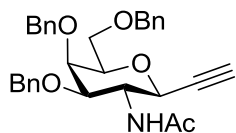
Following the general procedure, alkyne **122 $\alpha$**  (1.24 g, 2.0 mmol) led to compound **124 $\alpha$**  (932 mg, 1.69 mmol, 85%) after filtration through a short column of silica gel (Cyclohexane/EtOAc, 9:1).

$$[\alpha]_D^{25} + 27.5 \text{ (c 1.2, CHCl}_3\text{)}$$

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.39-7.23 (m, 18H, ArH), 7.18-7.15 (m, 2H, ArH), 4.88 and 4.52 (AB syst,  $J = 10.7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.81 (dd,  $^3J = 2.3$  Hz  $^4J = 2.3$  Hz, 1H, H-1), 4.74 and 4.66 (AB syst,  $J = 12.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.65 and 4.54 (AB syst,  $J = 12.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.63-4.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.06-3.95 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.84-3.82 (m, 1H, H-2), 3.81-3.70 (m, 2H, H-6), 2.49 (d,  $^4J = 2.3$  Hz, 1H, H-2').

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  138.5 (Cq), 138.4 (Cq), 138.4 (Cq), 138.0 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 80.4 (C3), 78.8 (C2'), 77.6 (C1'), 76.5 (C2), 75.4 (CH<sub>2</sub>), 75.0 (C4 or C5), 74.9 (C4 or C5), 73.6 (CH<sub>2</sub>), 72.3 (CH<sub>2</sub>), 72.0 (CH<sub>2</sub>), 69.3 (C6), 66.2 (C1).

#### 1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,2-dideoxy-2-acetamido- $\beta$ -D-galactopyranosyl) ethyne **130 $\beta$**



$$M = 499.60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

White solid ; mp = 190.8-191.9 °C

$R_f = 0.29$  (cyclohexane/EtOAc, 6:4)

Following the general procedure, compound **129 $\beta$**  (1.18 g, 2.06 mmol) led to compound **130 $\beta$**  (0.943 g, 1.89 mmol, 92%) as a white solid which was used without any purification.

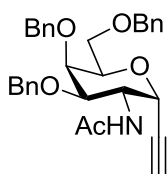
$$[\alpha]_D^{25} + 37.5 \text{ (c 1.0, CHCl}_3\text{)}$$

**HRMS** (ESI+): Calculated for C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: m/z 500.2431; found: 500.2408.

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.38-7.23 (m, 15H, ArH), 5.55 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, NH), 4.88 and 4.59 (AB syst.  $J = 11.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.69 (dd,  $J = 10.4, 2.2$  Hz, 1H, H-1), 4.66 and 4.48 (AB syst.  $J = 11.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.47 and 4.42 (AB syst.  $J = 11.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.20 (dd,  $J = 10.6, 2.8$  Hz, 1H, H-3), 4.01 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H-4), 3.80 (ddd,  $J = 10.6, 10.4, 7.5$  Hz, 1H, H-2), 3.68-3.57 (m 3H, H-5, H-6), 2.41 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-2'), 1.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 171.0 (C=O), 138.7 (Cq), 138.2 (Cq), 138.0 (Cq), 128.7 (CHaro), 128.6 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (2 CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.7 (CHaro), 80.4 (C1'), 78.4 (C3), 77.5 (C5), 74.8 ( $\text{CH}_2$ ), 74.2 (C2'), 73.7 ( $\text{CH}_2$ ), 73.1 (C4), 72.2 ( $\text{CH}_2$ ), 68.7 (C6), 68.4 (C1), 54.3 (C2), 23.9 ( $\text{CH}_3$ ).

**1-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1,2-dideoxy-2-acetamido- $\alpha$ -D-galactopyranosyl) ethyne **130 $\alpha$****



$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{NO}_5$   
 $M = 499.60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
White solid ; mp = 146-146.7 °C  
 $R_f = 0.18$  (cyclohexane/EtOAc, 6:4)

Following the same procedure as previously, compound **129 $\alpha$**  (0.95 g, 1.66 mmol) led to compound **130 $\alpha$**  (0.8 g, 1.60 mmol, 97%) as a white solid which was used without any purification.

$[\alpha]_D^{25} + 93.5$  (c 1.02,  $\text{CHCl}_3$ ).

**HRMS** (ESI+): calculated for  $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : m/z 500.2431; found: 500.2407.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.42-7.22 (m, 15H, ArH), 5.05 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, NH), 5.02 (dd,  $J = 5.6, 2.3$  Hz, 1H, H-1), 4.92 and 4.59 (AB syst.  $J = 11.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.74 and 4.41 (AB syst.  $J = 12.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.59-4.40 (m, 1H, H-2), (4.50 and 4.41 (AB syst.  $J = 11.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.10-4.00 (m 2H, H-4, H-5), 3.64 (dd 1H,  $J = 9.2, 7.4$  Hz, 1H, H-6), 3.63 (dd,  $J = 10.8, 2.6$  Hz, 1H, H-3), 3.57 (dd, 1H,  $J = 9.2, 7.6$  Hz, 1H, H-6), 2.39 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, H-2'), 1.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

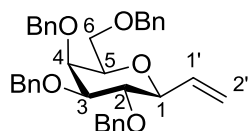
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.3 (C=O), 138.5 (Cq), 138.0 (2 Cq), 128.8 (CHaro), 128.6 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (2 CHaro), 128.0 (CHaro), 127.8 (CHaro), 78.9 (C1'), 77.3 (C3), 76.7 (C2'), 74.8 ( $\text{CH}_2$ ), 73.8 ( $\text{CH}_2$ ), 72.9 (C4 or C5), 72.4 (C4 or C5), 71.4 ( $\text{CH}_2$ ), 68.7 (C6), 67.2 (C1), 48.2 (C2), 23.5 ( $\text{CH}_3$ ).

**General procedure for partial reduction of alkynes**

To a solution of alkyne (1.5 mmol) in EtOAc (0.03M) or THF/MeOH (1:1 0.1M) was added Lindlar's catalyst (20% w/w). The reaction mixture was degassed with Ar, saturated with  $\text{H}_2$  and stirred at rt under a  $\text{H}_2$  atmosphere for 1-3 h (TLC indicated the clean reduction

of acetylene to a slightly less polar product for  $\beta$  anomer). The reaction mixture was filtered through a pad of celite, concentrated.

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\beta$ -D-galactopyranosyl ethene **84 $\beta$** <sup>108</sup>**



$C_{36}H_{38}O_5$   
 $M = 550.68 \text{ g.mol}^{-1}$   
 White solid ; mp = 50.9-53.8 °C  
 $R_f = 0.30$  (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

Following the general procedure (1 h), alkyne **22 $\beta$**  (772 mg, 1.40 mmol) led to alkene **84 $\beta$**  (628 mg, 1.14 mmol, 81 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

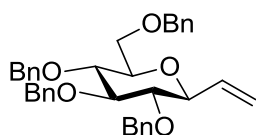
$[\alpha]_D^{25} + 11.4$  ( $c$  1.0,  $CHCl_3$ ).

**HRMS** (ESI+) : Calculated for  $C_{36}H_{39}O_5$   $[M+H]^+$  :  $m/z = 551.2792$  ; found 551.2793.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7.38-7.22 (m, 20H, ArH), 6.02-5.91 (m, 1H, H-1'), 5.42 (dd,  $^3J = 17.2 \text{ Hz}$ ,  $^2J = 1.6 \text{ Hz}$ , 1H, H-2'), 5.26 (dd,  $^3J = 10.5 \text{ Hz}$ ,  $^2J = 1.6 \text{ Hz}$ , 1H, H-2'), 4.95 and 4.63 (AB syst.  $J = 11.6 \text{ Hz}$ , 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.82 and 4.63 (AB syst.  $J = 10.5 \text{ Hz}$ , 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.74 and 4.70 (AB syst.  $J = 11.8 \text{ Hz}$ , 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.46 and 4.41 (AB syst.  $J = 11.9 \text{ Hz}$ , 2H,  $CH_2Ph$ ), 3.98 (d,  $J = 2.7 \text{ Hz}$ , 1H, H-4), 3.75-3.70 (m, 2H, H-1, H-3), 3.63-3.52 (m, 4H, H-2, H-5, H-6).

**$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  138.8 (Cq), 138.5 (Cq), 138.4 (Cq), 138.0 (Cq), 135.5 (C1'), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 118.3 (C2'), 84.4 (C2), 80.7 (C3), 79.0 (C1), 76.9 (C5), 75.3 (CH<sub>2</sub>), 74.6 (CH<sub>2</sub>), 74.0 (C4), 73.6 (CH<sub>2</sub>), 72.6 (CH<sub>2</sub>), 68.9 (C6).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl ethene **86 $\beta$****



$C_{36}H_{38}O_5$   
 $M = 550.68 \text{ g.mol}^{-1}$   
 White solid ; mp = 74.0-77.1 °C  
 $R_f = 0.30$  (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

Following the general procedure (1 h), alkyne **123 $\beta$**  (767 mg, 1.39 mmol) led to alkene **84 $\beta$**  (624 mg, 1.13 mmol, 81 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

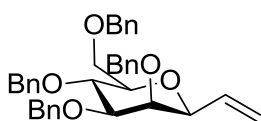
$[\alpha]_D^{25} + 20.8$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 551.2792 ; found 551.2794.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.36-7.22 (m, 18H, ArH), 7.18-7.13 (m, 2H, ArH), 5.96 (ddd, *J* = 17.3, 10.5, 6.4 Hz, 1H, H-1'), 5.46 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, H-2'), 5.28 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-2'), 4.92 and 4.87 (AB syst. *J* = 11.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 and 4.57 (AB syst. *J* = 10.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 and 4.64 (AB syst. *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.62 and 4.54 (AB syst. *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.80-3.74 (m, 1H, H-1), 3.74-3.68 (m, 3H, H-3, H-6), 3.65 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-4), 3.50-3.45 (m, 1H, H-5), 3.33 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-2).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 138.7 (Cq), 138.2 (Cq), 138.2 (Cq), 138.1 (Cq), 135.4 (C1'), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.6 (CHaro), 118.3 (C2'), 86.8 (C3), 82.6 (C2), 80.3 (C1), 78.8 (C5), 78.3 (C4), 75.7 (CH<sub>2</sub>), 75.2 (CH<sub>2</sub>), 75.1 (CH<sub>2</sub>), 73.6 (CH<sub>2</sub>), 69.1 (C6).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy-β-D-mannopyranosyl ethene 131β**



C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>

*M* = 550.68 g.mol<sup>-1</sup>

White solid ; mp = 54.2-55.8 °C

*R<sub>f</sub>* = 0.27 (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

Following the general procedure (1 h), alkyne **124β** (697 mg, 1.27 mmol) led to alkene **131β** (588 mg, 1.06 mmol, 84 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

$[\alpha]_D^{25} - 12.3$  (*c* 0.99, CHCl<sub>3</sub>)

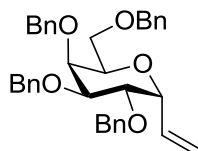
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 551.2792 ; found 551.2799.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.39-7.15 (m, 20H, ArH), 5.92 (ddd, *J* = 17.3, 10.6, 5.9 Hz, 1H, H-1'), 5.32 (dt, <sup>3</sup>*J* = 17.3 Hz, <sup>2</sup>*J* = 1.4 Hz, 1H, H-2'), 5.17 (dt, <sup>3</sup>*J* = 10.6 Hz, <sup>2</sup>*J* = 1.4 Hz, 1H, H-2'), 4.93-4.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.74-4.62 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.60-4.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.95 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.86-3.83 (m, 1H, H-1), 3.82-3.79 (m, 1H, H-2), 3.78-3.72 (m, 2H, H-6), 3.64 (dd, *J* = 9.5, 2.8 Hz, 1H, H-3), 3.52-3.46 (m, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 138.7 (Cq), 138.5 (Cq), 138.4 (Cq), 135.5 (C1'), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9

(CHaro), 127.6 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.4 (CHaro), 116.8 (C2'), 84.7 (C3), 79.7 (C5), 79.5 (C1), 76.8 (C2), 75.3 (CH<sub>2</sub>), 75.2 (C4), 74.5 (CH<sub>2</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub>), 72.3 (CH<sub>2</sub>), 69.7 (C6).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl ethene **84 $\alpha$****



C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>

M = 550.68 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

R<sub>f</sub> = 0.36 (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

Following the general procedure (1 h), alkyne **22 $\alpha$**  (3.98 g, 7.26 mmol) led to alkene **84 $\alpha$**  (3.4 g, 6.17 mmol, 85 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

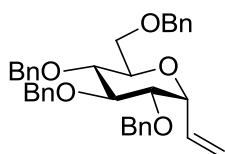
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 60.1 (*c* 1.2, CHCl<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> : m/z = 551.2792 ; found 551.2792.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.33–7.24 (m, 20H, ArH), 6.07 (ddd, *J* = 17.5, 10.9, 4.4 Hz, 1H, H-1'), 5.41 (dt, <sup>3</sup>*J* = 17.5 Hz, <sup>2</sup>*J* = 1.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 5.32 (dt, <sup>3</sup>*J* = 10.9 Hz, <sup>2</sup>*J* = 1.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 4.84 and 4.58 (AB syst. *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.71–4.55 (m, 5H, H-1, CH<sub>2</sub>Ph), 4.50 and 4.43 (AB syst. *J* = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.09–4.04 (m, 1H, H-2), 4.03–3.98 (m, 1H, H-5), 3.95 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-4), 3.70–3.55 (m, 3H, H-3, H-6).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.7 (Cq), 138.6 (Cq), 138.4 (Cq), 138.2 (Cq), 132.6 (C1'), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.1 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.4 (CHaro), 118.2 (C2'), 78.9 (C3), 76.8 (C2), 75.0 (C4), 74.0 (CH<sub>2</sub>), 73.4 (CH<sub>2</sub>), 73.3 (C1), 73.3 (CH<sub>2</sub>), 72.9 (CH<sub>2</sub>), 71.9 (C5), 68.5 (C6).

**2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl ethene **86 $\alpha$****



C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>

M = 550.68 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

R<sub>f</sub> = 0.36 (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

Following the general procedure (1 h), alkyne **123 $\alpha$**  (461 mg, 0.84 mmol) led to alkene **86 $\alpha$**  (389 mg, 0.71 mmol, 84 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

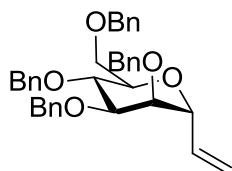
$[\alpha]_D^{25} + 58.9$  (*c* 0.97, CHCl<sub>3</sub>).

HRMS (ESI+) : Calculated for C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 551.2792 ; found 551.2790.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.34–7.22 (m, 18H, ArH), 7.14–7.10 (m, 2H, ArH), 6.15 (ddd, *J* = 17.6, 10.8, 5.0 Hz, 1H, H-1'), 5.47 (dt, <sup>3</sup>*J* = 17.6 Hz, <sup>2</sup>*J* = 1.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz, 1H, -2'), 5.42 (dt, <sup>3</sup>*J* = 10.8 Hz, <sup>2</sup>*J* = 1.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 4.94 and 4.78 (AB syst. *J* = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.81 and 4.61 (AB syst. *J* = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.69 and 4.64 (AB syst. *J* = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.63–4.56 (m, 3H, H-1, CH<sub>2</sub>Ph), 3.81–3.59 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  138.7 (Cq), 138.2 (Cq), 138.1 (Cq), 138.0 (Cq), 131.9 (C1'), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.6 (CHaro), 119.8 (C2'), 82.8 (C2 or C3 or C4), 80.0 (C2 or C3 or C4), 78.3 (C2 or C3 or C4), 75.5 (CH<sub>2</sub>), 75.1 (CH<sub>2</sub>), 74.1 (C1), 73.5 (CH<sub>2</sub>), 72.9 (CH<sub>2</sub>), 72.0 (C5), 69.0 (C6).

### 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-deoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosyl ethene **131 $\alpha$**



C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>

*M* = 550.68 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

*R*<sub>f</sub> = 0.27 (cyclohexane/EtOAc, 9:1)

Following the general procedure (1 h), alkyne **123 $\alpha$**  (833 mg, 1.52 mmol) led to alkene **86 $\alpha$**  (728 mg, 1.32 mmol, 87 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

$[\alpha]_D^{25} + 26.5$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

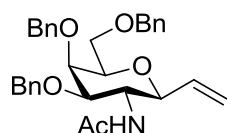
HRMS (ESI+) : Calculated for C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> : *m/z* = 573.2611 ; found 573.2628

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.40–7.15 (m, 20H, ArH), 5.80 (ddd, *J* = 17.4, 11.06, 4.5 Hz, 1H, H-1'), 5.24–5.17 (m, 2H, H-2'), 4.77 and 4.50 (AB syst. *J* = 11.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.71 and 4.64 (AB syst. *J* = 12.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61–4.53 (m, 5H, CH<sub>2</sub>Ph, H-1), 3.92 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4), 3.80–3.54 (m, 1H, H-5), 3.78–3.69 (m, 4H, H-2, H-3, H-6).



$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  138.4 (Cq), 138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 138.3 (Cq), 134.4 (C1'), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 117.9 (C2'), 78.5 (C3), 76.2 (C2), 75.2 (C4), 74.4 ( $\text{CH}_2$ ), 74.0 ( $\text{CH}_2$ ), 73.9 (C5), 73.3 ( $\text{CH}_2$ ), 72.2 (C1), 71.8 ( $\text{CH}_2$ ), 69.5 (C6).

**2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy- $\beta$ -D-galactopyranosyl ethene 132 $\beta$**



$\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{NO}_5$   
 $M = 501.61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 White solid ; mp = 184.9-186.0 °C  
 $R_f = 0.22$  (cyclohexane/EtOAc, 5:5)

Following the general procedure (3 h in MeOH/THF), alkyne **123 $\beta$**  (1 g, 2.00 mmol) led to alkene **132 $\beta$**  (620 mg, 1.23 mmol, 62 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

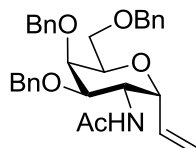
$[\alpha]_D^{25} + 34.1$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

**HRMS** (ESI+): Calculated for  $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  502.2588 ; found 502.2589.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 7.38-7.24 (m, 15H, ArH), 5.87-5.79 (m, 1H, H-1'), 5.28-5.14 (m, 2H, H-2'), 4.90 and 4.61 (AB syst.  $J = 11.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.68 and 4.44 (AB syst.  $J = 11.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.47 and 4.43 (AB syst.  $J = 11.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.04-3.99 (m, 2H, H-3, H-4), 3.90-3.84 (m, 2H, H-1, H-2), 3.66-3.61 (m, 1H, H-5), 3.61-3.56 (m, 2H, H-6), 1.86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.2 (C=O), 138.6 (Cq), 138.1 (Cq), 137.9 (Cq), 135.2 (C1'), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.0 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.5 (CHaro), 118.6 (C2'), 79.9 (C4), 79.4, (C1), 76.8 (C5), 74.5 ( $\text{CH}_2$ ), 73.5 ( $\text{CH}_2$ ), 72.6 (C3), 71.5 ( $\text{CH}_2$ ), 68.7 (C6), 52.8 (C2), 23.6 ( $\text{CH}_3$ ).

**2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl ethene 132 $\alpha$**



$\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{NO}_5$   
 $M = 501.61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 White solid ; mp = 137.5-139.2 °C  
 $R_f = 0.25$  (cyclohexane/EtOAc, 5:5)

Following the general procedure (3 h in MeOH/THF), alkyne **123 $\alpha$**  (880 mg, 1.76 mmol) led to alkene **132 $\alpha$**  (772 mg, 1.54 mmol, 88 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 96:4).

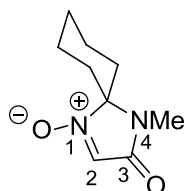
$[\alpha]_D^{25} + 54.1$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI+): Calculated for C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* 502.2588 ; found 502.2594.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.34-7.24 (m, 15H, ArH), 5.68 (ddd, *J* = 17.3, 10.8, 4.2 Hz, 1H, H-1'), 5.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.35 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 17.3, <sup>2</sup>*J* = 1.8, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 5.23 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 10.8, <sup>2</sup>*J* = 1.8, <sup>4</sup>*J* = 1.8 Hz, 1H, H<sub>vinyl</sub>), 4.73 and 4.60 (AB syst. *J* = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.65-4.61 (m, 1H, H-1), 4.58-4.48 (AB syst. *J* = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.57 and 4.53 (AB syst. *J* = 12.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.30-4.24 (m, 1H, H-5), 4.22-4.17 (m, 1H, H-2), 4.09-4.02 (m, 1H, H-6), 3.90-3.86 (m, 1H, H-3), 3.81-3.74 (m, 2H, H-4, H-6), 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 169.9 (C=O), 138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 137.8 (Cq), 133.6 (C1'), 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 128.3 (CH<sub>ar</sub>), 127.7 (CH<sub>ar</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>), 127.5 (CH<sub>ar</sub>), 117.4 (C2'), 74.7 (C5), 74.4 (C3), 73.1 (CH<sub>2</sub>), 72.5 (CH<sub>2</sub>), 72.5 (C4), 67.5 (C1), 65.9 (C6), 50.6 (C2), 23.2 (CH<sub>3</sub>).

#### 4-methyl-3-oxo-1,4-diazaspiro[4.5]dec-1-ene 1-oxide 174



C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*M* = 238.33 g.mol<sup>-1</sup>

White solid

*R<sub>f</sub>* = 0.20 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

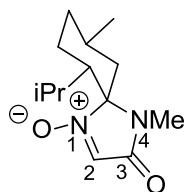
Glycine ethyl ester (5.00 g, 35.8 mmol) was mixed under N<sub>2</sub> with methylamine (solution in EtOH, 8M, 13.5 mL, 107.4 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 24 h then cyclohexanone (1.9 mL, 17.9 mmol), Et<sub>3</sub>N (5.0 mL, 35.8 mmol) and molecular sieves 3Å were successively added. The reaction mixture was refluxed for 24 h. After cooling down at RT, the resulting mixture was concentrated under vacuum and the residue was taken up in EtOAc/H<sub>2</sub>O (1:1). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2×50 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to provide amina (2.32 g, 13.8 mmol, 77%) as an oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.44 (m, 2H, H-2), 2.78 (t, *J* = 0.6 Hz, 3H, H-4), 1.82 (br s, 1H, NH), 1.75-1.50 (m, 10H, H<sub>cyclohexane</sub>).

To a solution of amination (2.31 g, 13.7 mmol) in dry DCM (65 mL) was added under N<sub>2</sub> and at 0°C *m*-CPBA in several times (77%, 9.21g, 41.1 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 2 h then aqueous 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (100 mL) was added and the reaction mixture was stirred at RT for 40 min. Saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL) was added and aqueous layer was extracted with DCM (2×150 mL). Combined organic layers were washed with NaHCO<sub>3</sub> saturated aqueous solution (75 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to provide **174** (2.377 g, 13.0 mmol, 95%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.03 (s, 1H, H-2), 3.08 (s, 3H, H-4), 2.30-1.40 (m, 10H, H<sub>cyclohexane</sub>).

### 6-isopropyl-4,9-dimethyl-3-oxo-1,4-diazaspiro[4.5]dec-1-ene 1-oxide **186**



C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

M = 238.33 g.mol<sup>-1</sup>

White solid

R<sub>f</sub> = 0.20 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

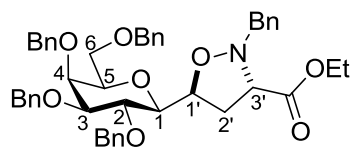
In methylamine solution (75 mL, 8M in ethanol, 600 mmol) was added glycine methyl ester hydrochloride **172** (25.1 g, 100 mmol). The resulting suspension was stirred for 16 h at room temperature. (-)-Menthone **184** (15.4 g, 0.1 mol), Et<sub>3</sub>N (27 mL, 0.2 mol) and MS 3Å (beads) were successively added. The reaction mixture was heated for 16 h at reflux without stirring, then the sieves were filtered off and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude white slurry was taken up in ethyl acetate (100 mL) and water (100 mL). Aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL) and organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> then concentrated over reduced pressure to afford the crude product **185** (8.56 g, 38 mmol, 38%) as a white solid. The residue **185** (1.07 g, 4.9 mmol) was dissolved in dichloromethane (30 mL) and cooled to 0°C. *m*CPBA (3.2 g, 16.4 mmol) was added in three portions over a period of 45 min at 0°C. The mixture was stirred for 3h at this temperature and diluted with aqueous 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (40 mL). The resulting mixture was stirred 1h at room temperature and saturated aqueous solution NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) was added. Aqueous layer was extracted with dichloromethane (2×30 mL) and organic layers was washed with saturated aqueous solution NaHCO<sub>3</sub> (2×30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated over reduced pressure to afford the crude product. Purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 8:2 to 7:3) gave the pure nitron **186** (1.01 g, 4.2 mmol, 89%) as white solid.

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.05 (s, 1H, H-2), 2.88 (s, 3H, H-4), 2.68-2.48 (m, 1H, H<sub>mentyl</sub>), 2.34-2.10 (m, 1H, H<sub>mentyl</sub>), 2.01-1.86 (m, 1H, H<sub>mentyl</sub>), 1.80-1.41 (m, 7H, H<sub>mentyl</sub>), 0.95-0.88 (m, 7H, H<sub>mentyl</sub>), 0.76-0.70 (m, 3H, H<sub>mentyl</sub>).

### [3+2] cycloaddition of glyoxalate-derived nitrone with β-C-vinylgalactoside **84β**

β-C-vinylgalactoside **84β** (172 mg, 0.312 mmol, 1.0 equiv.) and nitrone **149** (64.6 mg, 0.312 mmol, 1.0 equiv.) were dissolved in toluene (2 mL). The reaction mixture was stirred 100°C for 31h and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 9:1 to 8:2) to afford cycloadduct *trans* **170β** (85.2 mg, 0.112 mmol, 36%), cycloadduct *cis* **171β** (44.7, 0.059 mmol, 19%) and mixture of the two diastereoisomers (21.3 mg, 9%).

### Ethyl 2-benzyl-5-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl)isoxazolidine-3-carboxylate *trans* **170β**



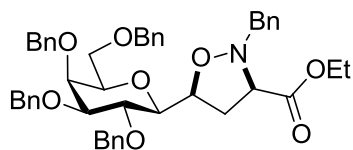
C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>8</sub>  
M = 757.91 g.mol<sup>-1</sup>  
Colorless oil  
R<sub>f</sub> = 0.30 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>47</sub>H<sub>52</sub>NO<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>, m/z = 758.3687; found: 758.3677.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.37-7.17 (m, 25H, ArH), 4.95 and 4.60 (AB syst. J = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.85 and 4.58 (AB syst. J = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.74 and 4.67 (AB syst. J = 11.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.52 (ddd, J = 8.4, 6.4, 2.0 Hz 1H, H-1'), 4.49 and 4.45 (AB syst. J = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.06 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 4.05-3.98 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-N, H-4), 3.67-3.56 (m, 5H, H-2, H-3, H-5, H-6), 3.53-3.46 (m, 2H, H-1, H-3'), 2.61 (ddd, J = 12.1, 8.4, 6.4 Hz, 1H, H-2'), 2.21 (ddd, J = 12.1, 8.4, 7.3 Hz, 1H, H-2'), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.9 (C=O), 139.1 (Cq), 138.4 (Cq), 138.1 (2 Cq), 136.9 (Cq), 129.6 (CHaro), 128.6 (2 CHaro), 128.5 (2 CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (2 CHaro), 127.8 (2 CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 85.1 (C2 or C3 or C5), 77.9 (C1), 77.3 (C1'), 76.6 (C2 or C3 or C5), 76.1 (C2 or C3 or C5), 75.3 (CH<sub>2</sub>), 74.6 (CH<sub>2</sub>), 73.9 (C4), 73.7 (CH<sub>2</sub>), 72.4 (CH<sub>2</sub>), 68.9 (C6), 67.2 (C3'), 62.2 (CH<sub>2</sub>), 61.2 (CH<sub>2</sub>), 32.6 (C2'), 14.6 (CH<sub>3</sub>).

**Ethyl 2-benzyl-5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)isoxazolidine-3-carboxylate *cis* 171 $\beta$**



$C_{47}H_{51}NO_8$   
 $M = 757.91 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
Colorless oil  
 $R_f = 0.23$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for  $C_{47}H_{52}NO_8$   $[M+H]^+$ ,  $m/z = 758.3687$ ; found: 758.3700.

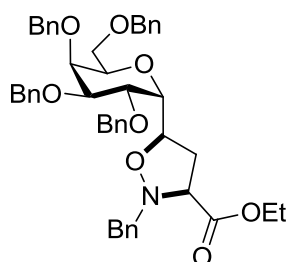
**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.40-7.20 (m, 22H, ArH), 7.18-7.13 (m, 3H, ArH), 5.02 and 4.61 (AB syst.  $J = 11.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.76 and 4.55 (AB syst.  $J = 10.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.78 and 4.73 (AB syst.  $J = 11.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.63-4.58 (m, 1H, H-1'), 4.48 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.34 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.14 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4.09 (dd,  $J = 9.6$ , 9.5 Hz, 1H, H-2), 4.02 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 3.98-3.95 (m, 1H, H-4), 3.72 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-3'), 3.68-3.55 (m, 4H, H-3, H-5, H-6), 3.17 (dd,  $J = 9.6$ , 2.0 Hz, H-1), 2.70-2.55 (m, 2H, H-2'), 1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.9 (C=O), 138.9 (Cq), 138.4 (Cq), 138.4 (Cq), 137.9 (Cq), 137.5 (Cq), 129.6 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.1 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.4 (CHaro), 127.0 (CHaro), 84.5 (C3 or C5), 78.9 (C1), 77.3 (C3 or C5), 76.0 (C2), 75.7 (C1'), 75.3 ( $\text{CH}_2$ ), 74.6 ( $\text{CH}_2$ ), 74.3 (C4), 73.6 ( $\text{CH}_2$ ), 72.5 ( $\text{CH}_2$ ), 69.2 (C6), 67.2 (C3'), 62.6 ( $\text{CH}_2$ ), 61.1 ( $\text{CH}_2$ ), 33.9 ( $\text{CH}_2$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ ).

**[3+2] cycloaddition of glyoxalate-derived nitrone with  $\alpha$ -C-vinylgalactoside 84 $\alpha$**

Following the same procedure as previously,  $\alpha$ -C-vinylgalactoside (175 mg, 0.318 mmol) led to cycloadduct *cis* **171 $\alpha$**  (32.5 mg, 0.043 mmol, 14%), cycloadduct *trans* **170 $\alpha$**  (56.1 mg, 0.074 mmol, 24%) and mixture of the two diastereoisomers (89.9 mg, 38%).

**Ethyl 2-benzyl-5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D- $\alpha$ -galactopyranosyl)isoxazolidine-3-carboxylate *cis* 171 $\alpha$**



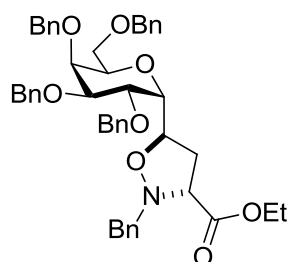
$C_{47}H_{51}NO_8$   
 $M = 757.91 \text{ g.mol}^{-1}$   
Colorless oil  
 $R_f = 0.30$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for  $C_{47}H_{52}NO_8$   $[M+H]^+$ ,  $m/z = 758.3687$ ; found: 758.3680.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.40-7.35 (m, 2H, ArH), 7.34-7.20 (m, 19H, ArH), 7.17-7.12 (m, 2H, ArH), 7.08-7.04 (m, 2H, ArH), 4.64 and 4.51 (AB syst.  $J = 12.0$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.45 and 4.18 (AB syst.  $J = 11.9$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.40 and 4.39 (AB syst.  $J = 12.1$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.43-4.38 (m, 1H, H-1'), 4.40 and 4.29 (AB syst.  $J = 12.1$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.26-4.22 (m, 1H, H-2), 4.17 (d,  $J = 11.8$  Hz, 1H, H-6), 4.11 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $CH_2-O$ ), 4.08 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H,  $CH_2-N$ ), 3.97 (dd,  $J = 9.0, 1.5$  Hz, 1H, H-3), 3.96 (dd,  $J = 6.4, 3.4$  Hz, 1H, H-1), 3.95 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H,  $CH_2-N$ ), 3.76 (dd,  $J = 11.8, 2.2$  Hz, 1H, H-6), 3.67 (dd,  $J = 8.9, 6.0$  Hz, 1H, H-3'), (dd,  $J = 3.8, 1.5$  Hz, 1H, H-4), 3.50-3.46 (m, 1H, H-5), 2.79 (ddd,  $J = 12.9, 8.9, 7.8$  Hz, 1H, H-2'), 2.64 (ddd,  $J = 12.9, 6.0, 5.0$  Hz, 1H, H-2'), 1.18 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  171.0 (C=O), 139.0 (Cq), 138.6 (Cq), 138.5 (Cq), 138.4 (Cq), 137.3 (Cq), 129.3 (CHaro), 128.5 (4 CHaro), 128.4 (2 CHaro), 128.4 (CHaro), 127.9 (2 CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (2 CHaro), 75.2 (C2), 74.4 (C3', C4), 73.7 (C5), 73.5 ( $CH_2$ ), 73.4 (C1,  $CH_2$ ), 72.6 ( $CH_2$ ), 71.3 ( $CH_2$ ), 69.6 (C3), 67.2 (C1'), 66.4 (C6), 61.8 ( $CH_2-N$ ), 61.4 ( $CH_2-O$ ), 36.7 (C2'), 14.3 ( $CH_3$ ).

**Ethyl 2-benzyl-5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D- $\alpha$ -galactopyranosyl)isoxazolidine-3-carboxylate *cis* 170 $\alpha$**



$C_{47}H_{51}NO_8$   
 $M = 757.91 \text{ g.mol}^{-1}$   
Colorless oil  
 $R_f = 0.25$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

**HRMS** (ESI+): Calculated for  $C_{47}H_{52}NO_8$   $[M+H]^+$ ,  $m/z = 758.3687$ ; found: 758.3679.

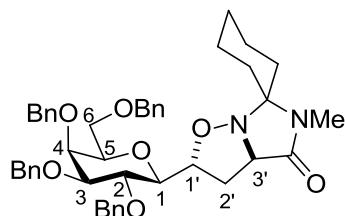
**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.36-7.20 (m, 21H, ArH), 7.15-7.12 (m, 2H, ArH), 7.09-7.04 (m, 2H, ArH), 4.61 and 4.32 (AB syst.  $J = 12.1$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.54-4.42 (m, 5H,  $CH_2Ph$ ), 4.34-2.6 (m, 3H, H-1', H-5,  $CH_2Ph$ ), 4.17 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, H-6), 4.14 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $CH_2-O$ ), 4.05 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H,  $CH_2-N$ ), 3.97 (dd,  $J = 6.2, 2.9$  Hz, 1H, H-4), 3.90 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H,  $CH_2-N$ ), 3.70 (dd,  $J = 11.7, 2.2$  Hz, 1H, H-6), 3.67 (dd,  $J = 7.8, 1.6$  Hz, 1H, H-1) 3.60-3.48 (m, 3H, H-2, H-3, H-3'), 2.67 (ddd,  $J = 12.8, 8.1, 6.7$  Hz, 1H, H-2'), 2.51 (ddd,  $J = 12.8, 8.6, 6.0$  Hz, 1H, H-2'), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  170.6 (C=O), 138.7 (Cq), 138.6 (Cq), 138.3 (Cq), 138.1 (Cq), 137.0 (Cq) 129.4 (CHaro), 128.5 (2 CHaro), 128.4 (2 CHaro), 128.3 (CHaro), 128.1 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (3 CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 75.5 (C1'), 74.9 (C2), 74.7 and 74.6 (C3, C5), 73.5 (C4) 73.4 ( $CH_2$ ), 73.2 (2  $CH_2$ ), 71.6 ( $CH_2$ ), 70.0 (C1), 66.8 (C3'), 65.6 (C6), 62.1 ( $CH_2-N$ ), 61.3 ( $CH_2-O$ ), 36.7 (C2'), 14.3 ( $CH_3$ ).

### [3+2] cycloaddition of nitron 174 with $\beta$ -C-vinylgalactoside 84 $\beta$

Under  $N_2$ , to a solution of  $\beta$ -C-vinylgalactoside **84 $\beta$**  (200 mg, 0.363 mmol, 1.0 equiv.) in dry toluene (3.6 mL) was added nitron **174** (66 mg, 0.363 mmol, 1.0 equiv.) The reaction mixture was refluxed for 70h then toluene was evaporated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 9:1 to 3:2) to provide two diastereoisomers **175** (70 mg, 0.096 mmol, 26%), **176** (25 mg, 0.034 mmol, 9%) and a mixture of **175/176** (49 mg, 0.067 mmol, 19%) as white solids.

### Diastereoisomer 175 (less polar)



$C_{45}H_{52}N_2O_7$

$M = 732.90 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

White solid

$R_f = 0.43$  (cyclohexane/EtOAc, 1:1)

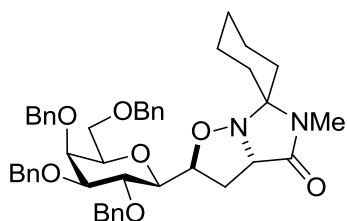
**HRMS** (ESI+): Calculated for  $C_{45}H_{52}N_2NaO_7$   $[M+Na]^+$ ,  $m/z = 755.3667$ ; found: 755.3680.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.34-7.24 (m, 20H, ArH), 4.95 and 4.67 (AB syst,  $J = 10.8$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.94 and 4.58 (AB syst,  $J = 11.6$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.75 and 4.66 (AB syst,  $J = 11.7$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.49 and 4.42 (AB syst,  $J = 11.8$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.24-

4.19 (m, 1H, H-1'), 3.98 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-4), 3.94 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-3'), 3.85 (dd,  $J = 9.4, 9.5$  Hz, 1H, H-2), 3.62 (dd,  $J = 2.8, 9.4$  Hz, 1H, H-3), 3.58-3.56 (m, 3H, H-5, H-6), 3.44 (dd,  $J = 2.5, 9.6$  Hz, 1H, H-1), 2.78-2.71 (m, 4H, H-2, NCH<sub>3</sub>), 2.60-2.55 (m, 1H, H-2), 2.19-2.16 (m, 1H, H<sub>cyclohexane</sub>), 1.95-1.46 (m, 9H, H<sub>cyclohexane</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  172.4 (C=O), 138.9 (Cq), 138.5 (Cq), 138.2 (Cq), 137.9 (Cq), 128.4 (CH<sub>aro</sub>), 128.3 (CH<sub>aro</sub>), 128.1 (CH<sub>aro</sub>), 127.9 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.6 (CH<sub>aro</sub>), 127.3 (CH<sub>aro</sub>), 85.0 (C3 and C5'), 78.2 (C1), 77.2 (C1'), 76.8 (C2 and C5), 75.0 (CH<sub>2</sub>), 74.3 (CH<sub>2</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub> and C4), 72.1 (CH<sub>2</sub>), 68.7 (C6), 64.8 (C3'), 34.0 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (C2'), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 25.7 (CH<sub>3</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>).

### Diastereoisomer 176 (more polar)



C<sub>45</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

M = 732.90 g.mol<sup>-1</sup>

White solid

R<sub>f</sub> = 0.31 (cyclohexane/EtOAc, 1:1)

**HRMS** (ESI): Calculated for C<sub>45</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup>, 755.3667; found: 755.3657.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.36-7.23 (m, 20H, ArH), 4.97 (d,  $J = 11.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 and 4.66 (AB syst,  $J = 11.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.62-4.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.48 and 4.43 (AB syst,  $J = 11.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.33-4.29 (m, 1H, H-1'), 4.05 (dd,  $J = 9.6, 9.5$  Hz, 1H, H-2), 4.01 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-3'), 3.98 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-4), 3.63-3.60 (m, 3H, H-3, H-6), 3.53-3.50 (m, 1H, H-5), 3.22 (dd,  $J = 9.6, 3.3$  Hz, 1H, H-1), 2.76-2.68 (m, 4H, H-2', NCH<sub>3</sub>), 2.60-2.56 (m, 1H, H-2'), 2.24-1.46 (m, 10H, H<sub>cyclohexane</sub>).

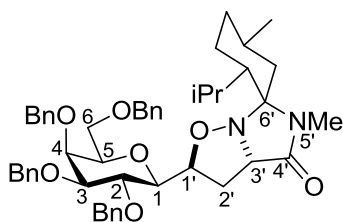
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  172.9 (C4'), 138.9 (Cq), 138.5 (Cq), 138.2 (Cq), 138.0 (Cq), 128.4 (CH<sub>aro</sub>), 128.3 (CH<sub>aro</sub>), 128.1 (CH<sub>aro</sub>), 127.8 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.6 (CH<sub>aro</sub>), 127.5 (CH<sub>aro</sub>), 85.1 (C3), 85.0 (C5'), 78.6 (C1), 77.4 (C5), 76.1 (C2), 75.1 (CH<sub>2</sub>), 74.7 (C1'), 74.3 (CH<sub>2</sub>), 73.8 (C4), 73.5 (CH<sub>2</sub>), 72.2 (CH<sub>2</sub>), 69.1 (C6), 65.0 (C3'), 34.0 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (C2'), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>3</sub>), 24.9 (CH<sub>2</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>).

### General procedure for [3+2] cycloaddition with nitron 186

Alkene (1.5 mmol, 1 eq) and nitron (1.35 mmol, 0.9 eq) were dissolved in toluene (3 mL, C = 0.5M). The reaction mixture was stirred under microwaves at 140°C for 2-8 h then concentrated under reduced pressure.



### $\beta$ -Gal-Cycloadduct **187 $\beta$**



$C_{49}H_{60}N_2O_7$

$M = 789.01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.27$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

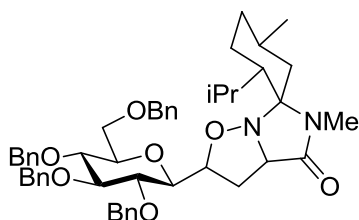
Following the general procedure (2h),  $\beta$ -C-vinylgalactoside **84 $\beta$**  (304 mg, 0.553 mmol) afforded cycloadduct **187 $\beta$**  (273 mg, 0.35 mmol, 72 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 87:13).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for  $C_{49}H_{61}N_2O_7$   $[M+H]^+$  :  $m/z = 789.4473$  ; found 789.4442.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7.37-7.21 (m, 20H, ArH), 4.95 and 4.58 (AB syst,  $J = 11.3$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.92 and 4.53 (AB syst,  $J = 10.8$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.75 and 4.65 (AB syst,  $J = 11.7$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.40-4.47 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.08-4.03 (m, 1H, H-1'), 4.01 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-4), 3.92 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-3'), 3.69 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H, H-2), 3.63-3.50 (m, 6H, H-1, H-3, H-5, H-6), 2.70 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 2.69-2.62 (m, 1H, H-2'), 2.45-2.39 (m, 1H, H-2'), 2.08-1.99 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.94-1.88 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.79-1.65 (m, 2H,  $H_{menthyl}$ ), 1.58-1.50 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.48-1.34 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.32-1.24 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.17 (t,  $J = 12.4$  Hz, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 0.86-0.78 (m, 10H,  $H_{menthyl}$ ).

**$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  173.3 (C=O), 139.0 (Cq), 138.2 (Cq), 128.1 (Cq), 137.9 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.3 (CHaro), 127.3 (CHaro), 89.7 (C6'), 84.9 (C3), 76.9 (C1 or C1'), 76.8 (C1 or C1'), 76.5 (C2 or C5), 76.4 (C2 or C5), 75.5 (CH<sub>2</sub>), 74.4 (CH<sub>2</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub>), 73.4 (C4), 72.1 (CH<sub>2</sub>), 68.3 (C6), 66.2 (C3'), 48.3 (CH), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 34.8 (CH<sub>2</sub>), 32.6 (C2'), 29.4 (CH), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 24.4 (CH), 24.2 (CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>3</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>).

### $\beta$ -Glc-Cycloadduct **188 $\beta$**



$C_{49}H_{60}N_2O_7$

$M = 789.01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.28$  (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

Following the general procedure (2h),  $\beta$ -C-vinylglucoside **86 $\beta$**  (373 mg, 0.68 mmol) afforded cycloadduct **188 $\beta$**  (440 mg, 0.55 mmol, 91 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 87:13).

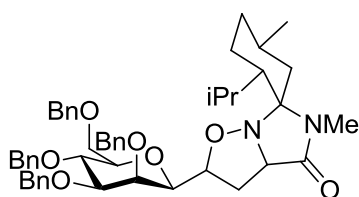
$[\alpha]_D^{25} + 31.1$  (*c* 0.99, CHCl<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI+) : Calculated for C<sub>49</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 789.4473 ; found 789.4463.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.34-7.17 (m, 20H, ArH), 4.92 and 4.87 (AB syst, *J* = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.87 and 4.56 (AB syst, *J* = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.80 and 4.61 (AB syst, *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.60 and 4.52 (AB syst, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.03-4.08 (m, 1H, H-1'), 3.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-3'), 3.76-3.63 (m, 4H, H-3, H-4, H-6), 3.57-3.52 (m, 1H, H-1), 3.44-3.39 (m, 1H, H-5), 3.39-3.33 (m, 1H, H-2), 2.71 (s, 3H, N CH<sub>3</sub>), 2.71-2.63 (m, 1H, H-2'), 2.48-2.42 (m, 1H, H-2'), 2.09-1.99 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.97-1.91 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.82-1.67 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.60-1.53 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.44-1.35 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.24-1.29 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.18 (t, *J* = 12.7 Hz, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 0.93-0.79 (m, 10H, H<sub>menthyl</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.3 (C=O), 138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 138.2 (Cq), 137.8 (Cq), 128.5 (CH<sub>aro</sub>), 128.5 (CH<sub>aro</sub>), 128.4 (CH<sub>aro</sub>), 128.3 (CH<sub>aro</sub>), 128.0 (CH<sub>aro</sub>), 127.9 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.5 (CH<sub>aro</sub>), 89.8 (C6'), 87.1 (C3 or C4), 79.7 (C2), 78.9 (C5), 78.2 (C3 or C4), 76.7 (C1 or C1'), 76.7 (C1 or C1), 75.6 (CH<sub>2</sub>), 75.3 (CH<sub>2</sub>), 75.0 (CH<sub>2</sub>), 73.4 (CH<sub>2</sub>), 68.8 (C6), 66.1 (C3'), 48.2 (CH), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 34.7 (CH<sub>2</sub>), 32.8 (C2'), 29.4 (CH), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 24.4 (CH), 24.2 (CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>3</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>).

### $\beta$ -Man-Cycloadduct **189 $\beta$**



C<sub>49</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

*M* = 789.01 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

*R*<sub>f</sub> = 0.27 (cyclohexane/EtOAc, 8:2)

Following the general procedure (2h),  $\beta$ -C-vinylmannoside **131 $\beta$**  (230 mg, 0.42 mmol) afforded cycloadduct **189 $\beta$**  (253 mg, 0.32 mmol, 90 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 87:13).

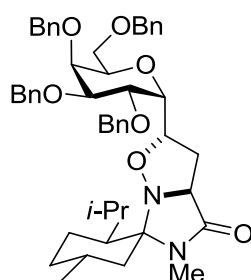
$[\alpha]_D^{25} + 19.5$  (*c* 1.07, CHCl<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI+) : Calculated for C<sub>49</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 789.4473 ; found 789.4473.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.37-7.18 (m, 20H, ArH), 5.04 and 4.58 (AB syst, *J* = 11.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.86 and 4.56 (AB syst, *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61 and 4.52 (AB syst, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.23-4.16 (m, 1H, H-1'), 4.00-3.97 (m, 1H, H-2), 3.94-3.88 (m, 2H, H-3', H-4), 3.77-3.65 (m, 2H, H-6), 3.60 (dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz, 1H, H-3), 3.46-3.40 (m, 1H, H-5), 3.26 (dd, *J* = 8.6, 0.6 Hz, 1H, H-1), 2.83-2.76 (m, 1H, H-2'), 2.69 (s, 3H, N CH<sub>3</sub>), 2.52-2.44 (m, 1H, H-2'), 2.09-2.03 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 2.00-1.90 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.88-1.80 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.68-1.59 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.48-1.40 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.38-1.33 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.18 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 0.95-0.75 (m, 10H, H<sub>menthyl</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 173.0 (C=O), 139.0 (Cq), 138.4 (Cq), 138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 128.4 (CH<sub>aro</sub>), 128.3 (CH<sub>aro</sub>), 128.3 (CH<sub>aro</sub>), 128.0 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.6 (CH<sub>aro</sub>), 127.6 (CH<sub>aro</sub>), 127.4 (CH<sub>aro</sub>), 127.2 (CH<sub>aro</sub>), 88.5 (C6'), 84.3 (C3), 80.3 (C5), 79.0 (C1), 75.3 (C4), 75.1 (CH<sub>2</sub>), 75.1 (C2), 74.8 (CH<sub>2</sub>), 73.5 (CH<sub>2</sub>), 73.4 (C1'), 72.4 (CH<sub>2</sub>), 69.7 (C6), 65.4 (C3'), 48.1 (CH), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 36.0 (C2'), 34.8 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH), 25.9 (CH<sub>3</sub>), 24.3 (CH), 24.1 (CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 22.2 (CH<sub>3</sub>), 18.5 (CH<sub>3</sub>).

#### α-Gal-Cycloadduct **187α**



C<sub>49</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

*M* = 789.01 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

*R<sub>f</sub>* = 0.44 (cyclohexane/EtOAc, 6:4)

Following the general procedure (4h), α-*C*-vinylgalactoside **84α** (826 mg, 1.50 mmol) afforded cycloadduct **187α** (790 mg, 1.00 mmol, 73 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 87:13).

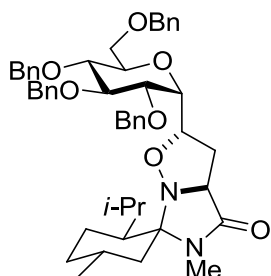
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>49</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> : *m/z* = 789.4473 ; found 789.4473.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.35-7.20 (m, 20H, ArH), 4.80 and 4.56 (AB syst, *J* = 11.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72 and 4.65 (AB syst, *J* = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.67 and 4.54 (AB syst, *J* = 11.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.54 and 4.43 (AB syst, *J* = 11.7, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.32-4.27 (m, 1H, H-5), 4.14-4.08 (m, 1H, H-1'), 4.07-3.91 (m, 5H, H-1, H-2, H-3, H-4, H-3'), 3.72-3.57 (m, 2H, H-6), 2.69 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.56-2.49 (m, 1H, H-2'), 2.49-2.39 (m, 1H, H-2'), 2.09-1.96 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.80-1.64 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.60-1.52 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.42-1.34 (m, 1H,

H<sub>menthyl</sub>), 1.32-1.25 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.12 (t,  $J = 12.3$  Hz, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 0.92-0.79 (m, 10H, H<sub>menthyl</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.0 (C=O), 138.7 (Cq), 138.6 (Cq), 138.3 (Cq), 138.1 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.5 (CHaro), 127.3 (CHaro), 90.0 (C6'), 76.9 (C1'), 76.0, 74.4, 74.2, 73.9, 73.8, 73.3, 73.1, 72.0, 68.6 (C6), 66.0 (C3'), 48.2 (CH), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 34.9 (C2'), 34.7 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 24.4 (CH), 24.2 (CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 22.2 (CH<sub>3</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>).

### $\alpha$ -Glc-Cycloadduct **188 $\alpha$**



C<sub>49</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

M = 789.01 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

$R_f = 0.44$  (cyclohexane/EtOAc, 6:4)

Following the general procedure (4h),  $\alpha$ -C-vinylglucoside **86 $\alpha$**  (289 mg, 0.52 mmol) afforded cycloadduct **188 $\alpha$**  (228 mg, 0.28 mmol, 61 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 87:13).

$[\alpha]_D^{25} + 48.4$  ( $c$  1.24, CHCl<sub>3</sub>).

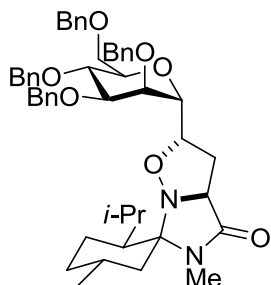
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>49</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>:  $m/z = 789.4473$ ; found 789.4453.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.33-7.24 (m, 18H, ArH), 7.16-7.12 (m, 2H, ArH), 4.91 and 4.78 (AB syst,  $J = 10.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.81 and 4.49 (AB syst,  $J = 10.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72 and 4.59 (AB syst,  $J = 11.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61 and 4.47 (AB syst,  $J = 12.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.19-4.14 (m, 1H, H-1'), 4.11-4.06 (m, 1H, H-5), 3.98 (t,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-3), 3.96-3.88 (m, 2H, H-1, H-3'), 3.83-3.78 (m, 1H, H-2), 3.67-3.64 (m, 2H, H-6), 3.61 (t,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-4), 2.72 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.69-2.51 (m, 2H, H-2'), 2.16-2.01 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.80-1.67 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.59-1.50 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.43-1.35 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.33-1.25 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.15 (t,  $J = 12.3$  Hz, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 0.93-0.72 (m, 10H, H<sub>menthyl</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.0 (C=O), 138.4 (Cq), 138.4 (Cq), 138.2 (Cq), 138.0 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 89.9 (C6'), 83.7 (C3), 79.5 (C2), 78.1 (C4), 75.6 (CH<sub>2</sub>), 75.5 (C1'), 74.9 (CH<sub>2</sub>), 74.3 (C5), 74.0 (CH<sub>2</sub>), 73.5

(CH<sub>2</sub>), 72.9 (C1), 69.1 (C6), 66.0 (C3'), 48.2 (CH), 40.2 (CH<sub>2</sub>), 34.8 (CH<sub>2</sub>), 34.6 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH), 26.1 (CH<sub>3</sub>), 24.4 (CH), 24.1 (CH<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>3</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>).

### $\alpha$ -Man-Cycloadduct **189 $\alpha$**



C<sub>49</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

M = 789.01 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

R<sub>f</sub> = 0.44 (cyclohexane/EtOAc, 6:4)

Following the general procedure (4h),  $\alpha$ -C-vinylmannoside **131 $\alpha$**  (625 mg, 1.13 mmol) afforded cycloadduct **189 $\alpha$**  (561 mg, 0.71 mmol, 69 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 95:5 to 87:13).

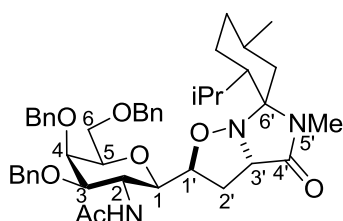
$[\alpha]_D^{25} + 39.5$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>49</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> ; m/z = 789.4473 ; Found 789.4452.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.32-7.24 (m, 18H, ArH), 7.21-7.17 (m, 2H, ArH), 4.69-4.56 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.55-4.49 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.03-3.96 (m, 2H, H-1'), 3.94-3.87 (m, 3H, H-1, H-5, H-3'), 3.80-3.55 (m, 4H, H-2, H-3, H-6), 2.70 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.44-2.28 (m, 2H, H-2'), 2.15-2.05 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.95-1.88 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.80-1.66 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.58-1.51 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.41-1.24 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.19 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 0.85-0.72 (m, 10H, H<sub>menthyl</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  172.9 (C=O), 138.4 (Cq), 138.4 (Cq), 138.2 (Cq), 138.0 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.2 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 89.7 (C6'), 77.9, 74.9, 74.9, 74.7, 74.4, 73.7, 73.4, 73.3, 72.5, 71.7, 69.2 (C6), 66.1 (C3'), 48.2 (CH), 40.7 (CH<sub>2</sub>), 34.7 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH), 26.9 (CH), 26.1 (CH<sub>3</sub>), 24.3 (CH), 22.4 (CH<sub>3</sub>), 22.2 (CH<sub>3</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>).

### $\beta$ -Gal-Cycloadduct **190 $\beta$**



$C_{44}H_{57}N_3O_7$

$M = 739.94 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.2$  (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

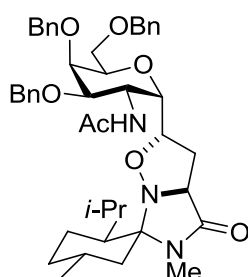
Following the general procedure (8h),  $\beta$ -C-vinylgalactoside **132 $\beta$**  (462 mg, 0.921 mmol) afforded cycloadduct **190 $\beta$**  (400 mg, 0.54 mmol, 65 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 5:5 to 3:7).

**HRMS** (ESI+) : Calculated for  $C_{44}H_{58}N_3O_7$   $[M+H]^+$  :  $m/z = 740.4269$  ; found 789.4264.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7.38-7.21 (m, 15H, ArH), 5.21 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, NH), 4.87 and 4.57 (AB syst,  $J = 11.6$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.66 and 4.41 (AB syst,  $J = 11.8$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.46 and 4.41 (AB syst,  $J = 11.8$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.01-3.97 (m, 1H, H-4), 3.95-3.84 (m, 3H, H-1', H-3', H-3), 3.84-3.75 (m, 1H, H-2'), 3.73-3.67 (m, 1H, H-1), 3.57-3.52 (m, 2H, H-6), 2.68 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 2.71-2.64 (m, 1H, H-2'), 2.57-2.48 (m, 1H, H-2'), 1.98-1.89 (m, 2H,  $H_{menthyl}$ ), 1.86 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 1.82-1.74 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.73-1.60 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.59-1.50 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.42-1.33 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.33-1.25 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 1.25-1.16 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 0.90-0.83 (m, 1H,  $H_{menthyl}$ ), 0.90 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $H_{menthyl}$ ), 0.82 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $H_{menthyl}$ ), 0.79 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $H_{menthyl}$ ).

**$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  173.2 (C=O), 170.5 (C=O), 138.8 (Cq), 138.1 (Cq), 138.0 (Cq), 128.6 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.1 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.6 (CHaro), 89.4 (Cq), 79.5 (C1' or C3'), 78.2 (C1' or C3'), 77.3 (C1), 76.6 (C5), 74.5 ( $CH_2$ ), 73.6 ( $CH_2$ ), 72.4 (C4), 71.6 ( $CH_2$ ), 68.7 (C6), 65.6 (C3), 52.1 (C2), 48.3 (CH), 40.5 ( $CH_2$ ), 35.1 (C2'), 34.8 ( $CH_2$ ), 29.4 (CH), 26.1 ( $NCH_3$ ), 24.4 (CH), 24.2 ( $CH_3$ ), 23.8 ( $COCH_3$ ), 22.7 ( $CH_3$ ), 22.3 ( $CH_2$ ), 18.5 ( $CH_3$ ).

### $\alpha$ -Gal-Cycloadduct **190 $\alpha$**



$C_{44}H_{57}N_3O_7$

$M = 739.94 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.2$  (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

Following the general procedure (8h),  $\alpha$ -C-vinylgalactoside **132 $\alpha$**  (565 mg, 1.126 mmol) afforded cycloadduct **190 $\alpha$**  (580 mg, 0.784 mmol, 77 %) after purification by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 5:5 to 2:8).

**HRMS** (ESI+) : Calculated for C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> : m/z = 740.4269 ; found 740.62.61

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.36-7.21 (m, 15H, ArH), 5.81 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, NH), 4.74 and 4.58 (AB syst,  $J$  = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.57 and 4.51 (AB syst,  $J$  = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.56 and 4.45 (AB syst,  $J$  = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.35-3.0 (m, 1H, H-3), 4.21-1.13 (m, 2H, H-1, H-2), 4.05-3.98 (m, 2H, H-3, H-6), 3.93-3.89 (m, 1H, H-3'), 3.84-3.73 (m, 3H, H-1', H-4, H-6), 2.70 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.54-2.40 (m, 2H, H-2'), 2.01-1.88 (m, 2H, H<sub>menthyl</sub>), 1.90 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.82-1.65 (m, 3H, H<sub>menthyl</sub>), 1.62-1.54 (m, 1H, H<sub>menthyl</sub>), 1.44-1.20 (m, 3H, H<sub>menthyl</sub>), 0.88-0.80 (m, 9H, H<sub>menthyl</sub>).

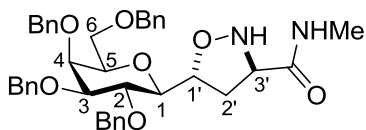
**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  172.7 (C=O), 169.8 (C=O), 138.5 (Cq), 138.3 (Cq), 137.8 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 89.9 (Cq), 77.7 (C1'), 75.6 (C5), 74.8 (C3), 73.2 (CH<sub>2</sub>), 72.9 (CH<sub>2</sub>), 72.0 (C4), 71.6 (CH<sub>2</sub>), 67.1 (C1), 66.2 (C6), 65.6 (C3'), 50.7 (C2), 48.2 (CH), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 35.0 (C2'), 34.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH), 26.1 (NCH<sub>3</sub>), 24.4 (CH), 24.2 (CH<sub>3</sub>), 23.4 (COCH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>).

### General procedure for cleavage of chiral auxiliary

A solution of cycloadduct (**187-189**) (0.5 mmol) in AcOH (25 mL) mixed with aqueous 1M HCl (5 mL) was stirred at 80 °C for 2 h. TLC showed the formation of a more polar intermediate. The reaction mixture was diluted with EtOAc (30 mL) and a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (30 mL). Aqueous layer was extracted with EtOAc (30 mL) and organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure to afford the crude product.

***N*-methyl 5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*- $\beta$ -galactopyranosyl)isoxazolidine-3-amide *trans***

**199 $\beta$**



C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

M = 652.78 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

R<sub>f</sub> = 0.23 (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

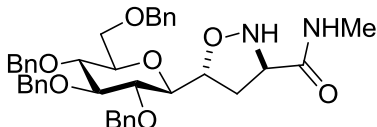
The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 80:20 to 25:75) to provide compound **199 $\beta$**  (218 mg, 0.33 mmol, 67%).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> : m/z = 653.3221 ; found 653.3210.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.38-7.23 (m, 21H, ArH, NH), 6.09 (br dd, *J* = 4.0 Hz, 1H, NH), 4.98-4.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.78-4.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.59-4.35 (m, 5H, CH<sub>2</sub>Ph, H-1'), 3.94-3.90 (m, 1H), 3.87-3.81 (m, 1H, H-3'), 3.65-3.54 (m, 4H), 3.51-3.40 (m, 2H), 2.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.64-2.56 (m, 1H, H-2'), 2.42-2.34 (m, 1H, H-2').

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  172.5 (C=O), 138.7 (Cq), 138.0 (Cq), 137.7 (Cq), 137.6 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.6 (CHaro), 127.5 (CHaro), 84.4, 82.2, 78.3, 76.3, 75.2, 75.1, 74.4, 73.4, 72.2, 68.8 (C6), 62.9 (C3'), 30.9 (C2'), 25.9 (CH<sub>3</sub>).

***N*-methyl 5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*- $\beta$ -glucopyranosyl)isoxazolidine-3-amide *trans* 200 $\beta$**



C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

M = 652.78 g.mol<sup>-1</sup>

White solid

R<sub>f</sub> = 0.23 (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 80:20 to 25:75) to provide compound **200 $\beta$**  (94 mg, 0.14 mmol, 61%).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> : m/z = 653.3221 ; found 653.3233.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.36-7.18 (m, 21H, NH, ArH), 6.17 (d, *J* = 5.0, 1H, NH), 4.91 and 4.87 (AB syst. *J* = 10.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 and 4.57 (AB syst. *J* = 11.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 and 4.53 (AB syst. *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.48 and 4.43 (AB syst. *J* = 12.1

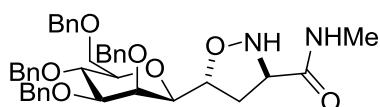


Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.41-4.36 (m, 1H, H-1'), 3.85-3.79 (m, 1H, H-3'), 3.72-3.57 (m, 3H, H-1, H-3, H-6), 3.57-3.45 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.21 (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H-2), 2.80 (d,  $J = 5.0$  Hz, 3H,  $NCH_3$ ), 2.46-2.54 (m, 1H, H-2'), 2.32-2.40 (m, 1H, H-2').

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  172.4 (C=O), 138.2 (Cq), 137.9 (Cq), 137.8 (Cq), 137.3 (Cq), 128.6 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.1 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 86.9 (C3), 82.0 (C1), 78.7 (C2), 78.3 (C4 or C5), 78.2 (C1'), 78.0 (C4 or C5), 75.7 (CH<sub>2</sub>), 75.1 (CH<sub>2</sub>), 75.0 (CH<sub>2</sub>), 73.2 (CH<sub>2</sub>), 69.1 (C6), 62.8 (C3'), 32.0 (C2'), 25.9 (CH<sub>3</sub>).

***N*-methyl 5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*- $\beta$ -mannopyranosyl)isoxazolidine-3-amide *trans***

**201 $\beta$**



$C_{39}H_{44}N_2O_7$

$M = 652.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.25$  (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 80:20 to 25:75) to provide compound **201 $\beta$**  (210 mg, 0.32 mmol, 59%).

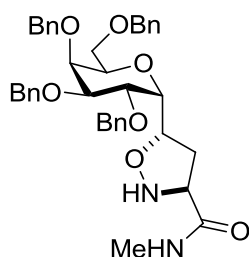
**HRMS** (ESI+) : Calculated for  $C_{39}H_{45}N_2O_7$   $[M+H]^+$  :  $m/z = 653.3221$  ; found 653.3232.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7.37-7.24 (m, 19H, ArH, NH), 7.22-7.18 (m, 2H, ArH), 6.09-5.86 (br s, 1H, NH), 4.93 and 4.63 (AB Syst.  $J = 11.3$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.84 and 4.56 (AB syst.  $J = 10.8$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.75 and 4.70 (AB syst.  $J = 11.8$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.57 and 4.47 (AB syst.  $J = 12.0$  Hz, 2H,  $CH_2Ph$ ), 4.19-4.13 (m, 1H, H-1'), 3.92-3.90 (m, 1H, H-2), 3.86-3.81 (m, 2H, H-3', H-4), 3.72-3.67 (m, 1H, H-6), 3.65-3.56 (m, 2H, H-3, H-6), 3.50-3.45 (m, 1H, H-5), 3.43-3.40 (m, 1H, H-6), 2.92-2.84 (m, 1H, H-2'), 2.80 (d,  $J = 5.0$  z, 3H,  $NCH_3$ ), 2.70-2.62 (m, 1H, H-2').

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  172.4 (C=O), 138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 138.3 (Cq), 138.3 (Cq), 128.6 (CHaro), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.2 (CHaro), 128.2 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.6 (CHaro), 84.7 (C3), 80.5 (C1), 79.8 (C3'), 79.7 (C5), 75.4 (CH<sub>2</sub>), 75.2 (C4), 74.6 (CH<sub>2</sub>), 74.6 (C2), 73.4 (CH<sub>2</sub>), 72.6 (CH<sub>2</sub>), 69.9 (C6), 62.8 (C3'), 35.0 (C2'), 26.0 (CH<sub>3</sub>).

***N*-methyl 5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*- $\alpha$ -galactopyranosyl)isoxazolidine-3-amide *trans***

**199 $\alpha$**



$C_{39}H_{44}N_2O_7$

$M = 652.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.13$  (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 80:20 to 25:75) to provide compound **199 $\alpha$**  (809 mg, 1.24 mmol, 62%).

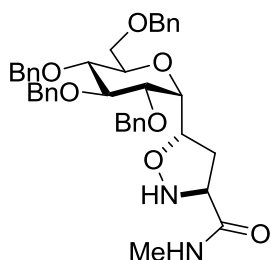
**HRMS** (ESI+) : Calculated for  $C_{39}H_{44}N_2O_7Na$   $[M+Na]^+$  ;  $m/z = 675.3041$  : found 675.3043.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  7.36-7.21 (m, 21H, ArH, NH), 4.73-4.46 (m, 8H,  $CH_2Ph$ ), 4.39-4.32 (m, 1H, H-1'), 4.31-4.25, 1H, H-1), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.91-3.64 (m, 5H), 3.61-3.50 (m, 1H), 2.80-2.74 (m, 3H,  $NCH_3$ ), 2.70-2.60 (m, 1H, H-2'), 2.28-2.19 (m, 1H, H-2').

**$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  171.7 (C=O), 138.4 (Cq), 138.3 (Cq), 138.2 (Cq), 137.8 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.1 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.5 (CHaro), 78.9, 76.0, 74.8, 74.0, 73.3, 73.2, 72.9, 71.4, 62.2 (C3'), 36.9 (C2'), 25.9 ( $CH_3$ ).

***N*-methyl 5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*- $\alpha$ -glucopyranosyl)isoxazolidine-3-amide *trans***

**200 $\alpha$**



$C_{39}H_{44}N_2O_7$

$M = 652.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.13$  (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 80:20 to 25:75) to provide compound **200 $\alpha$**  (211 mg, 0.32 mmol, 73%).

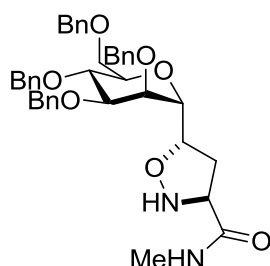
**HRMS** (ESI+) : Calculated for  $C_{39}H_{44}N_2O_7Na$   $[M+Na]^+$  ;  $m/z = 675.3041$  ; found 675.3041.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.37-7.24 (m, 18H, ArH), 7.23-7.18 (m, 2H, ArH), 7.12 (br s, 1H, NH), 5.96 (br s, 1H, NH), 4.93 and 4.63 (AB syst. *J* = 11.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.87 and 4.56 (AB syst. *J* = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 and 4.70 (AB syst. *J* = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.57 and 4.46 (AB syst. *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.19-4.13 (m, 1H, H-1'), 3.93-3.90 (m, 1H, H-2), 3.88-3.81 (m, 2H, H-3', H-4), 3.72-3.56 (m, 3H, H-3, H-6), 3.50-3.45 (m, 1H, H-5), 3.43-3.40 (m, 1H, H-1), 2.92-2.84 (m, 1H, H-2'), 2.80 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.70-2.62 (m, 1H, H-2').

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 172.3 (C=O), 138.5 (Cq), 138.1 (Cq), 138.0 (Cq), 137.8 (Cq), 128.5 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 84.6 (C3), 80.4 (C1), 79.7 (C1'), 79.6 (C5), 75.3 (CH<sub>2</sub>), 75.1 (C4), 74.5 (C2), 74.4 (CH<sub>2</sub>), 73.3 (CH<sub>2</sub>), 72.5 (CH<sub>2</sub>), 69.7 (C6), 62.7 (C3'), 34.8 (C2'), 25.9 (CH<sub>3</sub>).

***N*-methyl 5-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*-α-mannopyranosyl)isoxazolidine-3-amide *trans***

**201α**



C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

*M* = 652.78 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

*R*<sub>f</sub> = 0.15 (cyclohexane/EtOAc, 3:7)

The crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 80:20 to 25:75) to provide compound **201α** (297 mg, 0.45 mmol, 62%).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> ; *m/z* = 653.3221 ; Found 653.3215.

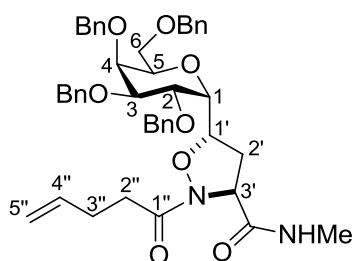
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.36-7.23 (m, 19H, NH, ArH), 7.23-7.18 (m, 2H, ArH), 6.37 (br s, 1H, NH), 4.58-4.42 (m, 7H, CH<sub>2</sub>Ph, H-1'), 4.40 and 4.34 (AB syst. *J* = 12.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.13-4.08 (m, 1H, H-5), 4.03 (dd, *J* = 9.7, 2.8 Hz, 1H, H-2), 3.94-3.90 (m, 1H, H-3'), 3.82 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-3), 3.77 (dd, *J* = 9.7, 0.8 Hz, 1H, H-1), 3.76-3.69 (m, 1H, H-6), 3.55-3.49 (m, 2H, H-4, H-6), 2.84-2.77 (m, 1H, H-2'), 2.80 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.64-3.56 (m, 1H, H-2').

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 172.7 (C=O), 138.0 (Cq), 137.9 (Cq), 128.4 (CHaro), 128.4 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.5

(CH<sub>aro</sub>), 77.3 (C1'), 75.4 (C4), 74.9 (C5), 74.1 (C2), 73.7 (C3), 73.3 (CH<sub>2</sub>), 73.0 (C1), 72.9 (CH<sub>2</sub>), 72.3 (CH<sub>2</sub>), 71.4 (CH<sub>2</sub>), 68.3 (C6), 62.7 (C3'), 34.8 (C2'), 25.9 (CH<sub>3</sub>).

### Compound 203 $\alpha$

To a solution of compound **199 $\alpha$**  (268 mg, 0.41 mmol) in pyridine (15 mL) were added 4-pentenoic anhydride (375  $\mu$ L, 2.05 mmol) and DMAP (5 mg, 0.041 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4h, then diluted with EtOAc (15mL) and water (15 mL). Aqueous layer was extracted with EtOAc (2 $\times$ 30 mL). Organic layer was washed with water (2 $\times$ 30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to afford the crude product. Purification by column chromatography on silicagel (cyclohexane/EtOAc, 70:30 to 66:34) gave **203 $\alpha$**  as a colorless oil (298 mg, 0.40 mmol, 99%).



C<sub>44</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

M = 734.88 g.mol<sup>-1</sup>

Colorless oil

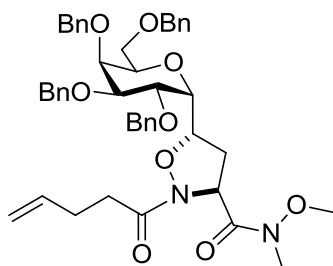
R<sub>f</sub> = 0.42 (cyclohexane/EtOAc, 5:5)

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for C<sub>44</sub>H<sub>51</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> ; m/z = 735.3640 ; Found 735.3630.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.23-7.36 (m, 20H, ArH), 6.82-6.88 (m, 1H, NH), 5.68-5.80 (m, 1H, H-4''), 4.88-5.01 (m, 2H, H-5''), 4.72-7.76 (m, 1H, H-3'), 4.72 and 4.52 (AB syst. *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.61 and 4.53 (AB syst. *J* = 11.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.53 and 4.44 (AB syst. *J* = 12.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.53 and 4.41 (AB syst. *J* = 12.0, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.50-4.55 (m, 1H, H-1'), 4.19-4.25 (m, 1H, H-5), 3.97-4.01 (m, 1H, H-4), 3.80-3.89 (m, 2H, H-3, H-6), 3.71-3.75 (m, 1H, H-1), 3.61-3.65 (m, 2H, H-2, H-6), 2.76 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.72-2.77 (m, 1H, H-2'), 2.63-2.73 (m, 1H, H-2''), 2.48-2.57 (m, 1H, H-2''), 2.24-2.32 (m, 1H, H-3''), 2.03-2.10 (m, 1H, H-3'').

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  173.5 (C=O), 169.3 (C=O), 138.3 (Cq), 138.2 (Cq), 138.1 (Cq), 137.4 (Cq), 137.3 (C4''), 128.5 (CH<sub>aro</sub>), 128.5 (CH<sub>aro</sub>), 128.4 (CH<sub>aro</sub>), 128.3 (CH<sub>aro</sub>), 128.1 (CH<sub>aro</sub>), 127.9 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.7 (CH<sub>aro</sub>), 127.6 (CH<sub>aro</sub>), 115.2 (C5''), 80.2 (C1'), 75.8 (C2), 74.5 (C3), 73.6 (C5), 73.3 (C4), 73.3 (CH<sub>2</sub>), 73.1 (CH<sub>2</sub>), 73.0 (CH<sub>2</sub>), 72.8 (CH<sub>2</sub>), 69.7 (C1), 66.7 (C6), 58.2 (C3'), 32.3 (C2'), 31.9 (C2''), 28.6 (C3''), 26.3 (CH<sub>3</sub>).

### Compound **208 $\alpha$**



$C_{45}H_{52}N_2O_9$

$M = 764.90 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Colorless oil

$R_f = 0.18$  (cyclohexane/EtOAc, 6:4)

To a solution of the compound **203 $\alpha$**  (147 mg, 0.2 mmol) in dichloromethane (4 mL) at 0°C were added *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (21.5 mg, 0.22 mmol), *N*-methylmorpholine (25  $\mu$ L, 0.22 mmol) and EDCI.HCl (42 mg, 0.22 mmol) successively. The reaction mixture was stirred for 24h at room temperature, then diluted with cold HCl 1N (10 mL). Aqueous layer was extracted with dichloromethane (2 $\times$ 10 mL). Organic layer was washed with brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to afford the crude product. Purification by column chromatography on silicagel (cyclohexane/EtOAc, 75:25 to 60:40) gave **208 $\alpha$**  as a colorless oil (107 mg, 0.14 mmol, 69%).

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) : Calculated for  $C_{45}H_{53}N_2O_9$  [M+H]<sup>+</sup> ;  $m/z = 765.3746$  ; Found 765.3733.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  7.36-7.20 (m, 20H, ArH), 5.82-5.72 (m, 1H, H-4''), 5.13-5.07 (m, 1H, H-3'), 5.03-4.96 (m, 1H, H-5''), 4.93-4.88 (m, 1H, H-5''), 4.76-7.72 (m, 1H, H-1'), 4.75-4.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66-4.43 (m, 6H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.24-4.18 (m, 1H, H-5), 4.02-3.99 (m, 1H, H-4), 3.90-3.82 (m, 3H, H-1, H-2, H-3), 3.82-3.75 (m, 1H, H-6), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.63-3.58 (m, 1H, H-6), 3.19 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.6-2.45 (m, 2H, H-4''), 2.47-2.38 (m, 1H, H-2'), 2.37-2.28 (m, 2H, H-3''), 2.21-2.12 (m, 1H, H-2').

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  170.9 (C=O), 169.8 (C=O), 138.3 (Cq), 138.3 (Cq), 138.2 (Cq), 137.8 (Cq), 137.5 (C4''), 128.4 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.3 (CHaro), 128.0 (CHaro), 127.9 (CHaro), 127.8 (CHaro), 127.7 (CHaro), 127.6 (CHaro), 114.9 (C5''), 79.0 (C3'), 77.1 (C1 or C2 or C3), 75.8 (C1 or C2 or C3), 74.3 (C5), 74.0 (C4), 73.4 (CH<sub>2</sub>), 73.2 (2CH<sub>2</sub>), 73.1 (CH<sub>2</sub>), 70.7 (C1 or C2 or C3), 67.5 (C6), 61.3 (OCH<sub>3</sub>), 54.3 (C1'), 34.6 (C2'), 32.2 (C4''), NCH<sub>3</sub>), 28.1 (3'').

**Titre :** Synthèse de nouveaux analogues *C*-glycosidiques d' $\alpha$ -galactosylcéramides - Couplage des glycolipides à un agent ciblant

**Mots clés :** Galactosylcéramides, vectorisation, *C*-glycoside, cycloaddition 1,3-dipolaire

**Résumé :** Le sujet de thèse concerne l'immunothérapie induite par des glycolipides synthétiques dont le chef de file est le KRN7000. Ce composé montre une activité à stimuler le système immunitaire renforçant l'action antitumorale. Cependant, comme la plupart des principes actifs, le KRN 7000 n'est pas spécifique des cellules tumorales. Pour pallier ce manque de spécificité, nous avons envisagé de coupler des glycolipides à un agent ciblant des cellules tumorales selon deux approches. La première a consisté à lier de manière covalente l'agent ciblant au glycolipide via un espaceur, ce qui a permis d'évaluer si le greffage de cet immunostimulant sur l'agent ciblant ne perturberait pas la reconnaissance par le récepteur membranaire.

Concernant la seconde approche, une étude préliminaire reposant sur le relargage du KRN7000 a été abordé en préparant une prodrogue du glycolipide. Un autre problème du KRN7000 est qu'il n'est pas sélectif vis-à-vis de deux voies d'activation du système immunitaire. Pour pallier ce problème, la synthèse de nouveaux analogues *C*-glycosidiques d' $\alpha$ -galactosylcéramides plus stables et plus sélectifs de la voie Th1 a été envisagée. La stratégie de synthèse met en œuvre une cycloaddition 1,3-dipolaire entre un *C*-vinyl glycoside et une nitroène. Dans un premier temps, une étude méthodologique de cette réaction a d'abord été réalisée. Dans un deuxième temps, la fonctionnalisation du cycle isoxazolidine puis son ouverture devrait permettre d'accéder aux analogues ciblés.

**Title :** Synthesis of new *C*-glycosidic analogs of  $\alpha$ -galactosylceramides. Glycoconjugates synthesis combining glycolipid and targeting agent

**Keywords :** Galactosylceramides, vectorization, *C*-glycoside, 1,3-dipolar cycloaddition

**Abstract :** This PhD work concerns glycolipid-induced activation of immune system with KRN7000 as lead compound. This latter has shown its ability to stimulate NKT cells which are T cells of the immune system resulting in potent antitumor activity. However, like lots of drugs, KRN7000 is not specific for tumor cells. To tackle this lack of specificity, we plan to graft glycolipids to a targeting agent for tumor cells following two approaches. The aim of the first one was to bind covalently the glycolipid to the targeting agent in order to determine the effect of the glycolipid grafting onto the targeting agent on the recognition by the membrane receptor.

Regarding the second approach, a preliminary study based on the KRN7000 release was performed by synthesizing a glycolipid prodrug. Another drawback of the KRN7000 is the lack of selectivity towards two ways of activation of the immune system. In order to favor the Th1 immune response, the synthesis of new *C*-glycosidic analogues of  $\alpha$ -galactosylceramides was implemented. The synthetic strategy has involved a 1,3-dipolar cycloaddition between a *C*-vinyl glycoside and a nitroène. First, a methodologic study about this reaction was performed. Then functionalization of the obtained isoxazolidine ring and the N-O bond cleavage should lead to the expected original analogs.